

Universitätsklinikum Ulm
Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Prof. Dr. med. Steffen Stenger

**Molekularbiologische und ultramorphologische
Charakterisierung des Typ III sezernierten *Chlamydia*
abortus Proteins – CAB063**

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Humanbiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Miriam Theresia Hermanutz

Riedlingen a. d. Donau

2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Essig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. sc. nat. (ETH) Paul Walther

Tag der Promotion: 22. Juni 2018

Meinen Eltern

und

Philipp

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	II
1. Einleitung.....	1
1.1 <i>Chlamydiaceae</i>	1
1.2 Humanmedizinische Relevanz von Chlamydien.....	7
1.3 Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren.....	10
1.4 Aufgabenstellung der Arbeit	15
2. Material und Methoden.....	17
2.1 Material	17
2.2 Methoden	31
2.3 Statistik.....	53
3. Ergebnisse	54
3.1 Experimentelle Infektion von HeLa-Zellen mit Chlamydien	54
3.2 Herstellung einer Transfektanden	57
3.3 Intrazelluläre Lokalisierung des <i>Chlamydia abortus</i> Proteins CAB063.....	60
3.4 Mögliche Bindungspartner des <i>Chlamydia abortus</i> Proteins CAB063.....	66
3.5 Einfluss von CAB063 auf Apoptose und Zelltod.....	75
3.6 Lokalisierung des <i>Chlamydia pneumoniae</i> Proteins CpB0704.....	83
3.7 Einfluss von CpB0704 auf Apoptose und Zelltod	87
4. Diskussion	89
4.1 Molekularbiologische und ultramorphologische Charakterisierung des <i>Chlamydia abortus</i> Proteins CAB063 und des <i>Chlamydia pneumoniae</i> Proteins CpB0704	91
4.2 Schlussfolgerung und Ausblick	101
5. Zusammenfassung	103
6. Literaturverzeichnis	105
Danksagung	119
Lebenslauf.....	120

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µM	Mikrometer
AB	Aberrante Körperchen
bp	Basenpaare
C.	Chlamydia
CaCl ₂	Calciumchlorid
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
CPAF	engl. Chlamydial Protease/proteasome-like Activity Factor
CpoS	engl. Chlamydia promotor of Survival
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EB	Elementarkörperchen
ECL	engl. Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	engl. Fluorescence-Activated Cell Scanning
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	engl. Fluorescencinisoithiocyanat
FLICA	engl. Fluorescent Labeled Inhibitors of Caspase
fwd	engl. forward
g	Gramm
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HeLa	Henriette Lacks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HSP	engl. Heat Shock Protein

IFU	engl. Inclusion Forming Unit
IM	Innere Membran
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
Inc	engl. Inclusion Membran Protein
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogactopyranosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	engl. Lysogeny Broth
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliampere
MEP	engl. Non-Mealonate Pathway
MIF	Mikroimmunofluoreszenz
min	Minuten
MIP	engl. Major Intrinsic Protein
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	engl. Multiplicity of Infection
MOMP	engl. Major Outer Membran Protein
ng	Nanogramm
NUE	engl. Novel Nuclear Effector
OD	Optische Dichte
OEA	engl. Ovine Enzootic Abortion
OM	Äußere Membran
p. I.	post Infection
p. Tr.	post Transfektion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PMP	engl. Polymorphic Membran Protein
POX	Peroxidase
RB	Retikularkörperchen
rev	engl. reverse

RIPA	engl. Radioimmunoprecipitation Assay
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	engl. Reactive Oxygen Species
rpm	engl. rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS- PAGE	engl. Sodium Dodecyl Sulfate PolyacrylAmide Gel Electrophoresis
SEM	engl. Standard Error of the Mean
SINC	engl. Secreted Inner Nuclear membrane-assoziated Chlamydia Protein
T3SS	Typ III Sekretionssystem
TARP	engl. Translocated Actin-Recruting Phosphoprotein
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TBS-T	TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TIP	engl. Tonoplast Intrinsic Protein
TTSS	Typ III Sekretionssystem
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vh	Voltstunde
W	Watt

1. Einleitung

1.1 *Chlamydiaceae*

Bereits 1907 konnten Halberstaedter und von Prowazek Einschlusskörperchen in Bindehautepithelien nachweisen. Diese bezeichneten sie als *Chlamydazoa* (Halberstaedter and Von Prowazek 1907). Der Name leitet sich aus dem Griechischen „Chlamys“ ab, was übersetzt „kurzer Mantel“ bedeutet. Inzwischen weiß man, dass Chlamydien weltweit verbreitet sind und ein breites Spektrum an unterschiedlichen Krankheiten verursachen. So können beim Menschen die Augen, der Genitaltrakt und die Lunge durch verschiedene Spezies der *Chlamydiaceae* infiziert werden. Im Tierreich sind Chlamydien bei vielen Arten wie Vögel, Wiederkäuer, Nager, Schweine und Katzen als Zoonose-Erreger bekannt.

1.1.1 Taxonomie, Merkmale und Nachweis

Chlamydien sind obligat intrazellulär-replizierende Bakterien. Lange galten sie aufgrund ihrer intrazellulären Lebensweise und Größe als Viren. Aber im Laufe der Jahre wurde klar, dass sie über DNS, RNS und einen Proteinsyntheseapparat verfügen. Taxonomisch gehören die *Chlamydiales* seit 1966 zu den gram-negativen Bakterien. Aufgrund von 16S- und 23S-RNS-Genanalysen werden sie in vier Familien eingeteilt (Everett, Bush, and Andersen 1999; Bush and Everett 2001). Es gibt die *Chlamydiaceae*, die *Parachlamydiaceae*, die *Simkaniaceae* und die *Waddliaceae* (Abbildung 1).

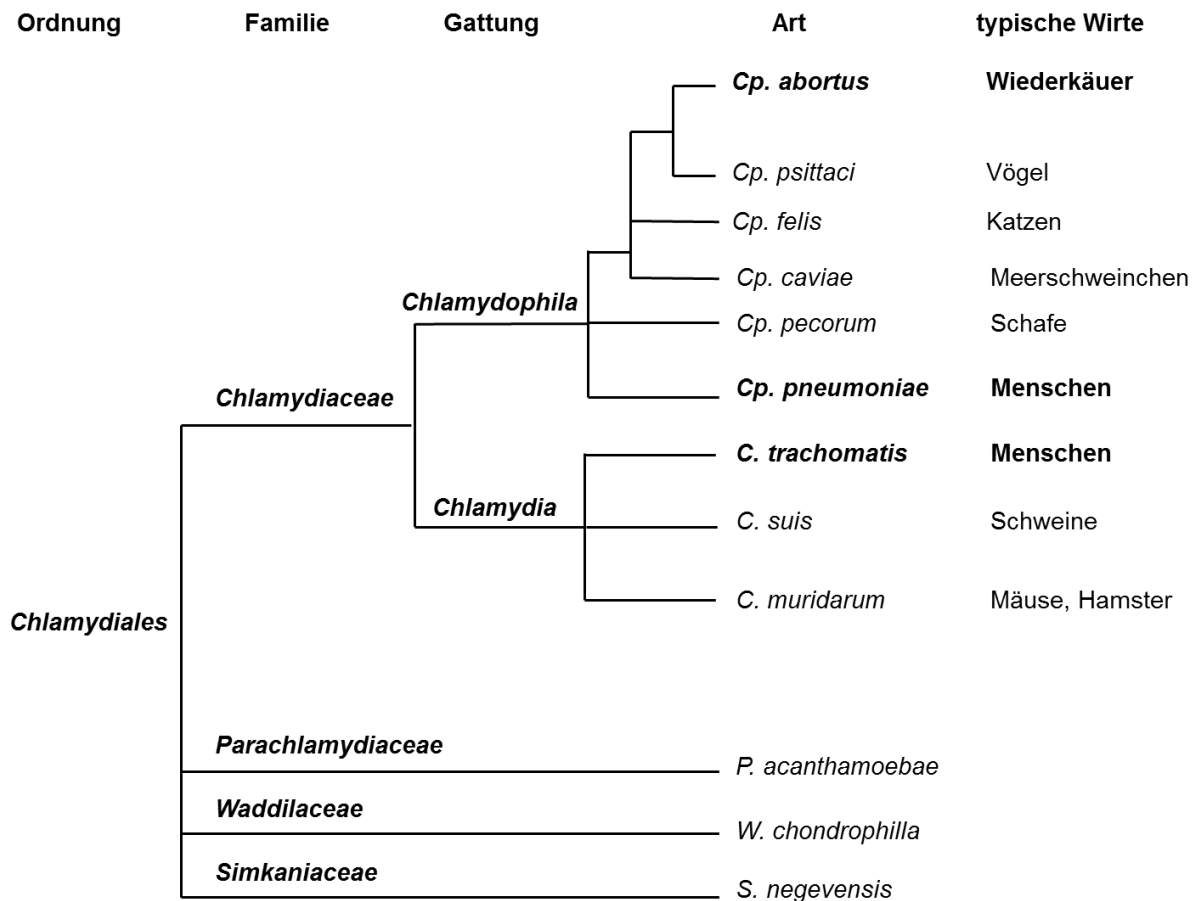


Abbildung 1: Bisher gültige Taxonomie der *Chlamydiales*. Hier ist der phylogenetische Baum der Chlamydien abgebildet. Die Längen der Linien entsprechen nicht der tatsächlichen phylogenetischen Distanz. Zusätzlich sind noch einige typische Wirte der einzelnen Chlamydienarten aufgelistet (modifiziert nach Bush et al. 2001, Seite 204). Mit freundlicher Genehmigung von „Microbiology Society“.

Die *Chlamydiaceae* werden in die beiden Gattungen *Chlamydophila* und *Chlamydia* unterteilt. Diese Gattungen werden wiederum in weitere neun Spezies eingeteilt, die teilweise unterschiedliche Wirte haben. Allerdings hat sich in der Literatur die Gattungsbezeichnung *Chlamydophila* nicht durchgesetzt. So werden die Arten *Chlamydophila abortus/psittaci/felis/caviae/pecorum* und *Chlamydophila pneumoniae* weiterhin als *Chlamydia abortus/psittaci/felis/caviae/pecorum* und *Chlamydia pneumoniae* bezeichnet. Dies hängt damit zusammen, dass die Unterschiede der Genschlüsselsequenzen in den 16S- und 23S-Ribosomen wissenschaftlich nicht überzeugend waren (Stephens et al. 2009). Auch Sachse, Bavoil et al. zeigten anhand der 16S-RNS-Sequenz und der fehlenden phänotypischen Unterscheidung, dass die Gattung *Chlamydophila* nicht von der Gattung *Chlamydia* abzugrenzen ist (Sachse et al. 2015). Es wurde deshalb ein

neuer phylogenetischer Baum erstellt (Abbildung 2), der innerhalb der Familie der *Chlamydiaceae* nur eine Gattung *Chlamydia* berücksichtigt, deren Spezies jedoch Unterschiede im Wirtsspektrum, Gewebetropismus und Krankheitsverlauf aufweisen.

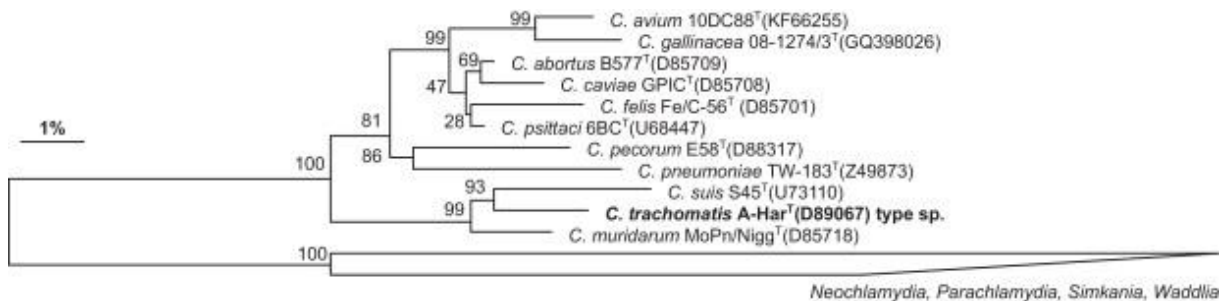


Abbildung 2: Phylogenetischer Baum der *Chlamydiaceae* spp. (Sachse et al. 2015, Seite 101). „Reprinted from 'Emendation of the family Chlamydiaceae: proposal of a single genus, Chlamydia, to include all currently recognized species', Syst Appl Microbiol, 38: 99-103, Sachse, K., P. M. Bavoil, B. Kaltenboeck, R. S. Stephens, C. C. Kuo, R. Rossello-Mora, and M. Horn, 2015., with permission from Elsevier.“

Die wichtigsten humanpathogenen Erreger sind *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia pneumoniae*. *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia abortus* verursachen Anthroozoonosen. In der Landwirtschaft können Ausbrüche mit *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum* und *Chlamydia suis* zu hohen wirtschaftlichen Schäden führen.

Im Gegensatz dazu gehören die Familien *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* und *Waddliaceae* zu den sogenannten Umweltchlamydien. Sie sind als Symbionten von Amöben bekannt (Horn et al. 2000; Fritsche et al. 2000), können aber auch in eukaryotischen Zellen vorkommen (Horn 2008). Dazu gehören zum Beispiel *Waddlia malaysiensis*, dieser Erreger wurde im Urin von Fruchtfledermäusen nachgewiesen, und *Waddlia chondrophila*, der in einem abortierten Rinderfetus entdeckt wurde (Horn 2008). Mittlerweile wurde *Simkania negevensis* als humanpathogener Krankheitserreger vorgeschlagen (Friedman et al. 2006). Mit *W. chondrophila* wurde ein tierpathogener Erreger entdeckt, der einen ähnlichen klinischen Verlauf wie *Chlamydia abortus* (siehe Kapitel 1.2.4) bei Schafen zeigt (Wheelhouse et al. 2014).

Als gram-negative Bakterien besitzen Chlamydien eine äußere und innere Zellmembran. In einer neueren Studie konnte in *Chlamydia trachomatis* auch

Peptidoglykan nachgewiesen werden (Liechti et al. 2014). In der äußeren Membran kommen das speziesspezifische MOMP (engl. Major Outer Membrane Protein) und das speziessübergreifende chlamydiale LPS (Lipopolysaccharid) vor.

Chlamydien präsentieren sich morphologisch als infektiöse Elementarkörperchen mit einem Durchmesser von 0,2 bis 0,4 µm oder als stoffwechselaktive Retikularkörperchen mit einem Durchmesser von 0,6 bis 1,5 µm (Moulder 1991). In der Zelle bilden sie sogenannte Einschlusskörperchen (engl. Inclusion). Der chlamydientypische Entwicklungszyklus ist für diese Bakterien einzigartig und wird im nächsten Kapitel genauer beschrieben.

Chlamydien haben ein ca. 1400 kb großes Genom und besitzen somit nur 25 % der Genomgröße von *Escherichia coli* (Everett, Bush, and Andersen 1999). Aufgrund dieser geringen Größe des Genoms haben Chlamydien die Fähigkeit zur Synthese wichtiger Metabolite und Proteine verloren und nutzen dafür ihre Wirtszelle.

Der Nachweis von Chlamydien aus menschlichen Untersuchungsmaterialien kann durch kulturelle Anzucht in der Zellkultur aus Probenmaterial erfolgen. Allerdings wird dieses Verfahren aufgrund seiner Komplexität und vor allem wegen seines hohen Zeitaufwands in der Routinediagnostik sehr selten angewendet. Eine weitere Möglichkeit Chlamydien direkt im Untersuchungsmaterial nachzuweisen, bietet die PCR (Polymerasekettenreaktion). Hierfür werden chlamydienspezifische Genabschnitte amplifiziert und detektiert. Damit können vor allem akute Infektionen nachgewiesen werden. Eine zurückliegende Infektion kann serologisch nachgewiesen werden. In der Diagnostik dient der Mikroimmunfluoreszenz-Test (MIF) als Goldstandard für den serologischen Nachweis von Chlamydien. Hierfür wird die Reaktivität der Antikörper aus dem Patientenserum mit den chlamydienspezifischen Antigenen gemessen (Wang 2000).

1.1.2 Entwicklungszyklus

Der obligat intrazelluläre Entwicklungszyklus ist eine Besonderheit der *Chlamydiaceae*. Hierbei spielen die Elementar- und Retikularkörperchen eine wichtige Rolle. Die Vermehrung der Chlamydien findet im Einschlusskörper statt.

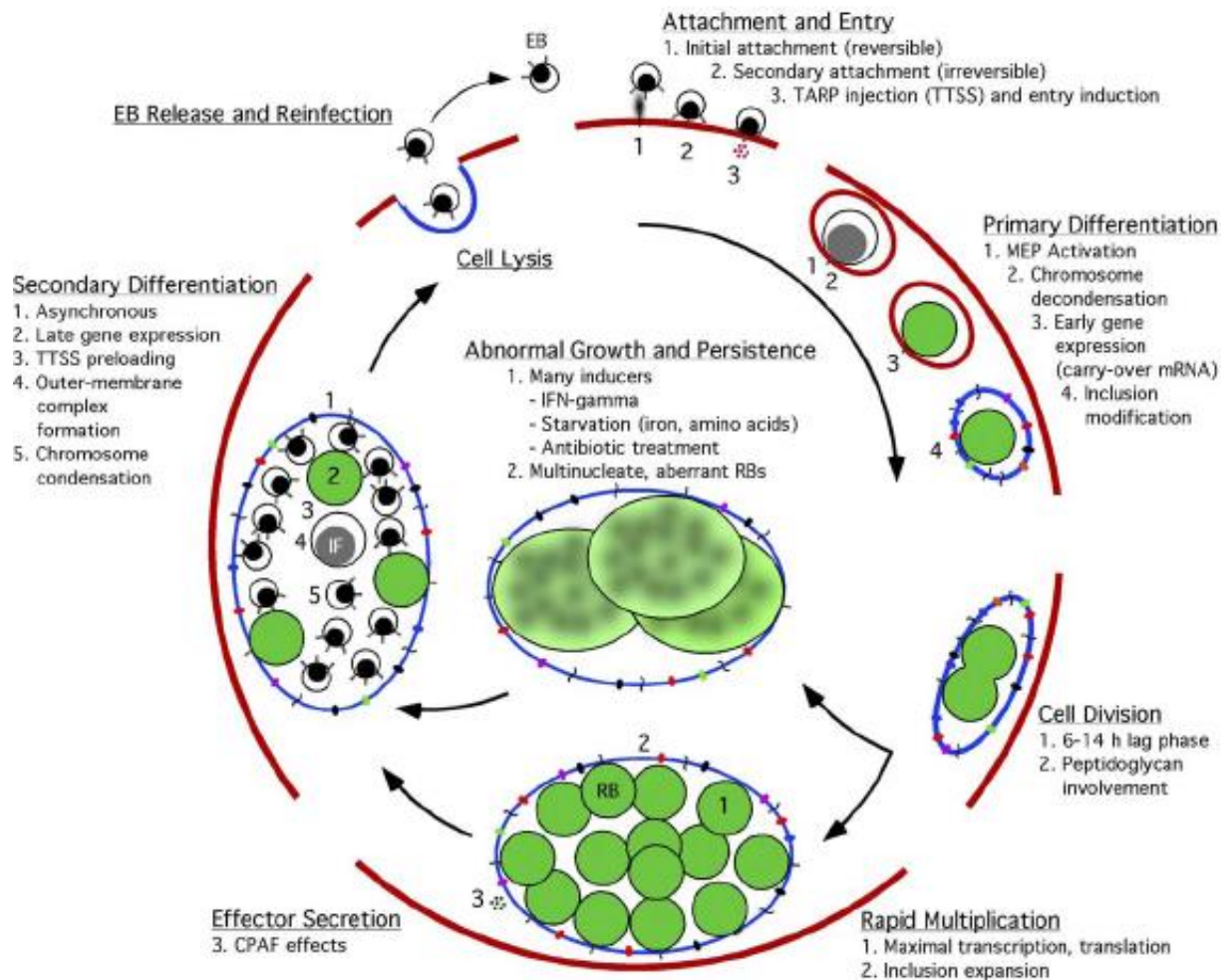


Abbildung 3: Schematische Abbildung des Entwicklungszyklus von Chlamydien im zeitlichen Verlauf. Der genaue Ablauf des Entwicklungszyklus wird im

Text beschrieben. Die Zellmembran des Wirtszellzytoplasmas ist in Rot dargestellt. Die Abkürzungen bedeuten: CPAF (engl. Chlamydial Protease/proteasome-like Activity Factor), EB (Elementarkörperchen), MEP (engl. non-Mevalonate Pathway), RB (Retikularkörperchen), TARP (engl. Translocated Actin-Recruiting Phosphoprotein), TTSS (Type III Sekretionssystem) (AbdelRahman and Belland 2005, Seite 952). Mit freundlicher Genehmigung von „Oxford University Press“.

Der Entwicklungszyklus (Abbildung 3) beginnt mit der Adhäsion der Elementarkörperchen an die Wirtszelle. Rezeptoren für die Aufnahme der Elementarkörperchen sind bisher nicht bekannt. Allerdings wird die Beteiligung von Heparin und Heparansulfat bei der Adhäsion diskutiert (Wuppermann, Hegemann, and Jantos 2001; Wehrl et al. 2004). Je nach Chlamydienspezies kann die endosomale oder phagozytotische Aufnahme mit Hilfe von Clathrin- oder Caveolin-abhängige Wege oder über Lipidmikrodomänen erfolgen (Stuart, Webley, and Norkin 2003; Hybiske and Stephens 2007). Zusätzlich wird das Chlamydienprotein

TARP (engl. Translocated Actin Recruiting Phosphoprotein) über ein Typ III Sekretionssystem in die Zelle transloziert (AbdelRahman and Belland 2005). Durch die Sekretion von TARP in die Wirtszelle wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt und das Zytoskelett der Wirtszelle umgebaut, damit die Elementarkörperchen von der Zelle aufgenommen werden können (Clifton et al. 2005).

Die Elementarkörperchen wandeln sich nach der Internalisierung in die stoffwechselaktiven Retikularkörperchen um. Es erfolgt eine Dekondensierung der Chlamydien-DNS und Initiierung der Genexpression (AbdelRahman and Belland 2005). Die Einschlusskörpermembran, welche unter anderem durch die chlamydialen Inc-Proteine gebildet wird, dient als Schutz vor den wirtseigenen Abwehrmechanismen (Bannantine et al. 1998; Scidmore-Carlson et al. 1999). Über Interaktionen des Einschlusskörpers mit dem Golgi-Apparat werden die notwendigen Metabolite über Transportsysteme aufgenommen (van Ooij, Apodaca, and Engel 1997; Heuer, Lipinski, et al. 2009). Die Retikularkörperchen vermehren sich innerhalb des Einschlusses durch Zweiteilung. Die Umwandlung in die infektiösen Elementarkörperchen beginnt je nach Chlamydienspezies 20 bis 48 h nach der Infektion (Hodinka et al. 1988; Wolf, Fischer, and Hackstadt 2000). Hierfür wird die Translation und Transkription maximiert, während sich der Einschlusskörper stark vergrößert (AbdelRahman and Belland 2005). In der sogenannten zweiten Differenzierung werden die RB in die Elementarkörperchen umgewandelt. Ein chlamydialer Auslösemechanismus ist bisher nicht bekannt. Es wird spekuliert, dass Typ III sezernierte Proteine eine Rolle spielen können (Bavoil, Hsia, and Ojcius 2000). Das Chromatin wird wieder kondensiert (AbdelRahman and Belland 2005) und Proteine der äußeren Membran werden vermehrt produziert (Belland et al. 2003).

Anschließend werden die neugebildeten Elementarkörperchen freigesetzt (Hybiske and Stephens 2008). Die Elementarkörperchen können über Zelllyse freigesetzt werden. Dadurch geht die Wirtszelle zu Grunde. Das bedeutet, dass die Einschlussmembran und die Zellkernmembran permeabilisiert werden und zum Schluss die Zytoplasmamembran lysiert wird (Hybiske and Stephens 2008). In dieser Phase spielt CPAF (engl. Chlamydial Protease/proteasome-like Activity Factor) eine wichtige Rolle. Dieses Protein bereitet die Elementarkörperchen auf die Freisetzung vor und wird mit dem Untergang der Wirtszelle in Verbindung gebracht

(Snavely et al. 2014). Als besonderes Stadium des chlamydialen Entwicklungszyklus wird die sogenannte Chlamydienpersistenz diskutiert. Diese Persistenz kann durch Nährstoffmangel, zum Beispiel Aminosäuren- und Eisenmangel, Interferon-Gamma oder durch Antibiotika, zum Beispiel Penicillin G, zustande kommen (Mehta et al. 1998; AbdelRahman and Belland 2005). Es entstehen morphologisch aberrante Körperchen (AB), die größer als die Elementar- und Retikularkörperchen und eingeschränkt metabolisch aktiv sind. Sie können sich allerdings nicht replizieren und in infektiöse Elementarkörperchen differenzieren und werden somit nicht freigesetzt. Sobald die einwirkenden Noxen in ihrer Konzentration abnehmen und ihren Einfluss verlieren, können die aberranten Körperchen wieder in ihren regulären Entwicklungszyklus eintreten (Al-Younes et al. 2001). Chlamydienpersistenz wird daher als Mechanismus zur Chronifizierung von Infektionen diskutiert.

1.2 Humanmedizinische Relevanz von Chlamydien

1.2.1 *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis besitzt die größte klinische Relevanz unter den humanpathogenen Chlamydien. Dieser Erreger wird aufgrund variabler Domänen des MOMP (engl. Major Outer Membrane Protein) in die Serovare A bis L eingeteilt. Diese Serovare können wiederum in drei Gruppen unterteilt werden. Es gibt eine Gruppe mit den Serovaren A bis C, eine Gruppe mit den Serovaren D bis K und eine weitere Gruppe mit den Serovaren L1 bis L3. Jede dieser Gruppen verursacht unterschiedliche Krankheiten. Der Mensch ist der einzig bekannte Wirt von *C. trachomatis*. Der Erreger wird meist durch Sexualkontakte und Schmierinfektionen übertragen.

Die Serovare A bis C verursachen eine schwerwiegende Keratokonjunktivitis, das sogenannte Trachom. Vor allem in Entwicklungsländern mit extrem niedrigen hygienischen Standards sind diese Serovare zu finden und führen dort sehr häufig zur Erblindung der Patienten (Gambhir et al. 2007). Die Serovare D bis K verursachen typischerweise sexuell übertragbare Infektionen wie Urethritis und Zervizitis. Jährlich infizieren sich bis zu 130 Millionen Menschen neu mit *C. trachomatis* (Newman et al. 2015). Es werden die Epithelzellen des Urogenitaltrakts infiziert, wobei viele dieser Infektionen oligo- oder asymptomatisch verlaufen. Vor allem für Frauen können die Folgen unentdeckter und unbehandelter Infektionen

gravierend sein. Es kann zu Eileiterschwangerschaften, Tubenverschlüssen und Infertilität kommen (Rashidi et al. 2013). Zusätzlich können die Chlamydien zu Neugeboreneninfektionen führen, wenn bei der Passage durch den Geburtskanal es zu einer Exposition mit den Erregern kommt. Bei Neugeborenen kann dadurch eine Bindehaut- und Lungenentzündung hervorgerufen werden (Ranjit et al. 2014). Eine weitere mögliche Variante der Infektion ist das Paratrachom, die sogenannte Schwimmbadkonjunktivitis. Die ebenfalls sexuell übertragbaren Serovare L1 bis L3 sind Ursache für das *Lymphogranuloma venereum* (LGV) und kommen endemisch in tropischen Gebieten vor. Der Serotyp L2 wurde dagegen in den letzten Jahren zunehmend häufig bei HIV-positiven, homosexuellen Männern in europäischen und amerikanischen Großstädten nachgewiesen (White 2009). Es kann zu schmerzhaften Schwellungen der Lymphknoten und Lymphgefäße kommen (Ceovic and Gulin 2015).

C. trachomatis-verursachte Infektionen können mit Antibiotika, wie Tetrazyklinen, Makroliden oder Chinolonen, behandelt werden. Definierte Resistenzen gegenüber diesen Substanzen wurden bisher beim Menschen noch nicht nachgewiesen.

1.2.2 *Chlamydia pneumoniae*

Eine weitere humanpathogene Chlamydienart ist *Chlamydia pneumoniae*. Auch hier ist der Mensch der typische Wirtsorganismus für den Erreger, der meist durch eine Tröpfcheninfektion übertragen wird. Mindestens 50 % der Bevölkerung sind mit dem Erreger durchseucht, wobei mit zunehmenden Alter die Durchseuchungsrate zu nimmt (Robert-Koch-Institut 2010).

C. pneumoniae infiziert die Epithelzellen des Respirationstraktes (Wreghitt 1993). Ein Großteil der Infektionen verläuft asymptomatisch. Allerdings kann es auch zu Erkrankungen des Respirationstraktes kommen, wie zu einer Sinusitis, Bronchitis und Pneumonie. Bei immungeschwächten Patienten führen solche Infektionen jedoch oft zu schweren Lungenentzündungen. Aufgrund der schwierigen Diagnostik ist die klinische Relevanz von *C. pneumoniae* noch nicht abschließend geklärt.

1.2.3 *Chlamydia psittaci*

Chlamydia psittaci hat sein Erregerreservoir in Säugetieren und Vögeln. Es handelt sich hierbei um einen Erreger der Risikogruppe 3. Er ist der Erreger der Psittakose (Papageienkrankheit) und der Ornithose bei Vögeln (Contreras et al. 2016). Vor allem von Papageien und Kanarienvögeln kann der Erreger auch auf den Menschen

übertragen werden und somit eine Anthropozoonose verursachen. Der Erreger wird durch Kontakt mit kranken Tieren sowie erregerhaltigen Ausscheidungen übertragen (Rohde et al. 2010). Die Infektion zeigt sich in einer schweren Lungenentzündung (Robert-Koch-Institut 2010), kann aber auch sehr hohes Fieber verursachen (Rohde et al. 2010). Eine Übertragung von *C. psittaci* von Mensch zu Mensch wurde bisher nicht beschrieben.

1.2.4 *Chlamydia abortus*

Chlamydia abortus ist weltweit verbreitet und kann in der Landwirtschaft bei Ausbruchssituationen zu hohen wirtschaftlichen Schäden führen (Longbottom and Coulter 2003; Essig and Longbottom 2015). Dieser Erreger infiziert hauptsächlich Wiederkäuer, vor allem Schafe und Ziegen. Dadurch können trächtige Tiere einen OEA (engl. Ovine Enzootic Abortion) im letzten Drittel der Schwangerschaft erleiden (Navarro et al. 2004; Essig and Longbottom 2015; Aitken and Longbottom 2008). Wenn Futter, Wasser oder Einstreu mit infiziertem Plazentamaterial kontaminiert wird, kann eine Übertragung auf andere Tiere erfolgen. Dadurch kann sich die gesamte Herde mit *C. abortus* anstecken (Amin and Wilsmore 1995). Allerdings haben Tiere, die einen Abort erlitten haben, eine protektive Immunität gegen eine erneute Infektion und es kommt somit zu keinem weiteren Abort (Nietfeld 2001). In aktuellen Publikationen wurde gezeigt, dass Schafe zum Zeitpunkt des Aborts eine deutliche humorale Immunantwort gegen die Oberflächenproteine MOMP (engl. Major Outer Membrane Protein), MIP (engl. Major Intrinsic Protein) und PMP13G (engl. Polymorphic Membrane Protein), sowie die Virulenzfaktoren CPAF (engl. Chlamydial Protease/proteasome-like Activity Efactor), TARP (engl. Translocated Actin-Recruiting Phosphoprotein) und CAB063 zeigen (Hagemann et al. 2016).

Kasuistisch ist bekannt, dass sich auch Menschen mit *C. abortus* infizieren können (Hyde and Benirschke 1997; Pospischil et al. 2002; Meijer et al. 2004; Essig and Longbottom 2015). Insbesondere bei Schwangeren kann es zu schwerwiegenden Komplikationen kommen. So wurden in Zusammenhang mit einer *C. abortus* Infektion spontane Aborte, Totgeburten und Sepsis dokumentiert (Essig and Longbottom 2015). Walder, Hotzel et al. berichteten von einer Schwangeren, die in der 16. Woche eine Totgeburt nach drei Tagen sehr hohem Fiebers erlitt. Zusätzlich kam es zur Sepsis mit Schock und Multiorganversagen. Dies geschah nach einem Kontakt mit einer *C. abortus* infizierten Ziege (Walder et al. 2005).

Für die Behandlung von *C. abortus* Infektionen beim Menschen können Tetracyklinen und Makrolide angewendet werden. Bei Schafsherden ist es vor allem wichtig, infizierte Schafe frühzeitig zu isolieren und die gesamte Herde zu impfen (Longbottom and Livingstone 2006). Allerdings wurde bei diesen Impfstoffen bereits eine Rückmutation und eine damit verbundene Pathogenität des Impfstammes beobachtet (Wheelhouse et al. 2010). Deshalb ist es von Bedeutung in dieser Hinsicht nach neuen potentiellen Vakzinen zu suchen und somit neue *C. abortus* Antigene zu identifizieren, die sich für eine Impfung eignen (Forsbach-Birk et al. 2013).

1.3 Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren

Die Charakterisierung von Virulenzfaktoren bei Chlamydien gestaltet sich schwierig, da sie sich genetisch nur mit sehr hohem Aufwand manipulieren lassen (Beare et al. 2011; Bastidas and Valdivia 2016). Aus diesem Grund sind bisher bei Chlamydien nur sehr wenige Virulenzfaktoren bekannt und charakterisiert worden. Unter ihnen sind unter anderem CPAF (engl. Chlamydial Protease/proteasome-like Activity Factor), PMP's (engl. Polymorphic Membrane Proteins) und weitere Proteine des Typ III Sekretionssystems. Diese Proteine werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

1.3.1 Virulenzfaktoren

Zu den Virulenzfaktoren von Chlamydien gehört CPAF (engl. Chlamydial Protease/proteasome-like Activity Factor), der in diversen Spezies der Chlamydien vorkommt (Dong et al. 2005; Zhong 2009). Es handelt sich hierbei um eine Serinprotease, die in den Einschluss sezerniert wird (Zhong et al. 2001; Snively et al. 2014). Außerdem ist CPAF an der Degradierung wichtiger Transkriptionsfaktoren beteiligt. Diese sind wichtig für die Antigenpräsentation (Zhong et al. 2001), die Apoptoseinduktion (Pirbhai et al. 2006), die Organisation des Golgi-Apparats (Heuer, Rejman Lipinski, et al. 2009) und für das NF- κ B-Signaling (Christian et al. 2010). CPAF ist essentiell für die Replikation der Chlamydien und verhindert das Eintreten des Caspase-1-induzierten Zelltods bei Epithelzellen (Jorgensen et al. 2011). Allerdings werden diese Eigenschaften in neueren Veröffentlichungen kontrovers diskutiert (Bavoil and Byrne 2014; Dille et al. 2014; Snively et al. 2014).

1.3.2 Typ III Sekretionssystem

Das Typ III Sekretionssystem (T3SS) gilt als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren bei Chlamydien. Vor allem die Proteine TARP, Inc Proteine und die Heat Shock Proteine (HSP) spielen hierbei eine wichtige Rolle. Es sind darüber hinaus mittlerweile Proteine bekannt, die aufgrund von *in silico* Vorhersagen vermutlich zu den T3SS Proteinen zählen. Dazu gehört das CAB063, welches in dieser Arbeit näher charakterisiert werden soll. Das T3SS wurde bereits in *C. trachomatis* (Fields et al. 2003; Ho and Starnbach 2005), *C. pneumoniae* (Herrmann et al. 2006; Lugert et al. 2004), *C. psittaci* (Beeckman et al. 2008) und *C. abortus* (Wilkat et al. 2014) beschrieben. Mittlerweile ist auch bekannt, dass 5 % des Chlamydiengenoms für T3SS Proteine codieren (Arnold et al. 2009).

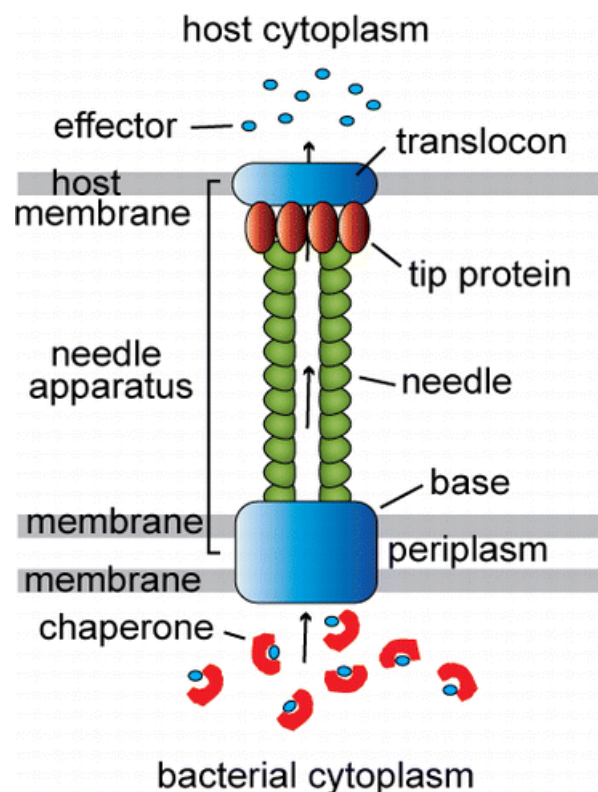


Abbildung 4: Schematische Darstellung Typ III Sekretionssystem in gram-negativen Bakterien. Das T3SS ist als molekularen Spritzenapparat zu verstehen. Das sogenannte *Translocon* geht durch die Membran des Wirts und die *Basis* durch die Membranen des Erregers. Die *TIP Proteine* erkennen den Wirt. Durch das Lumen der molekularen *Nadel* gelangen die Proteine mit Hilfe der *Chaperone* in den Wirt (Chatterjee et al. 2013, Seite 2508). „Reprinted with permission from Chatterjee, S., S. Chaudhury, A. C. McShan, K. Kaur, and R. N. De Guzman. 2013. 'Structure and biophysics of type III secretion in bacteria', *Biochemistry*, 52: 2508-17. Copyright 2013 American Chemical Society.“

In Abbildung 4 ist die typische ultramorphologische Struktur des T3SS zu sehen. Es ähnelt einem molekularen Spritzenapparat. Dass T3SS dient gram-negativen Bakterien Proteine in eukaryotische Zellen zu injizieren (Salmond and Reeves 1993). Diese typische Struktur (Abbildung 5) wurde in *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia abortus* entdeckt und elektronenmikroskopisch aufgenommen (Nans et al. 2015; Wilkat et al. 2014).

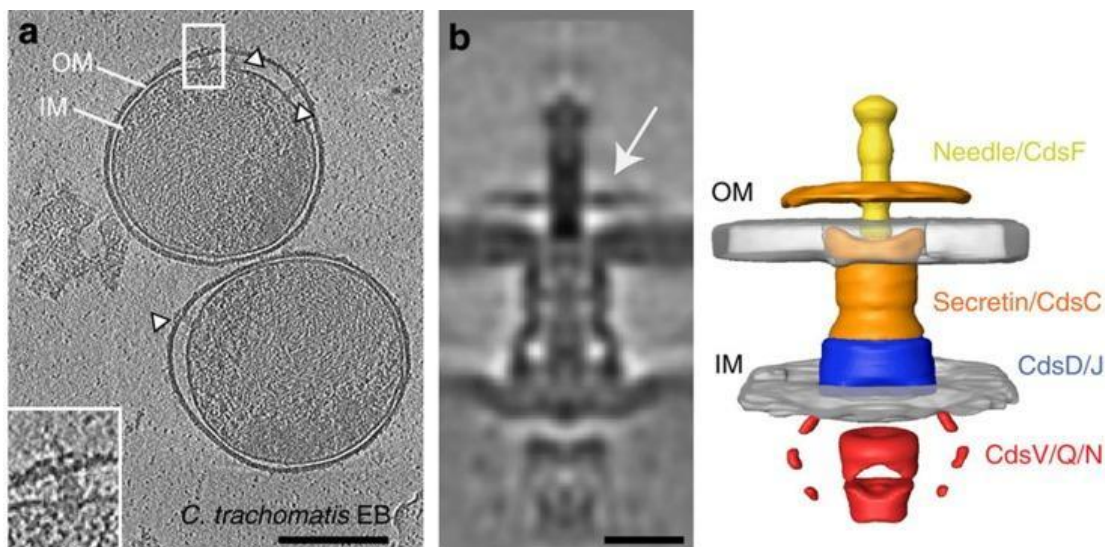


Abbildung 5: Typ III Sekretionssystem von *Chlamydia trachomatis*.

Cryoelektronische Aufnahmen von Elementarkörperchen, die schockgefroren wurden (a). Das T3SS wird in (b) von der Seite gezeigt. Rechts ist die schematische Ansicht zu Bild (b) zu sehen. OM (Äußere Membran), IM (innere Membran), weiße Pfeile = T3SS. (Messbalken a = 200 nm; b = 15 nm) (modifiziert nach Nans et al. 2015, Seite 2). Mit freundlicher Genehmigung von Nature Publishing Group.

Durch Defekte im T3SS verlieren die Bakterien ihre Pathogenität und bei Chlamydien kann es zur Störung im Entwicklungszyklus kommen (Wolf et al. 2006; Ur-Rehman et al. 2012). Denn sowohl die Infektion der Wirtszelle, der Aufbau der Inklusion, die Replikation der Elementarkörperchen also auch die Freisetzung der Elementarkörperchen sind T3SS abhängig (Fields et al. 2003; Peters et al. 2007).

1.3.2.1 Typ III sezernierte Proteine

Zu Beginn des Entwicklungszyklus spielt das TARP (engl. Translocated Actin-Recruiting Phosphoprotein) eine wichtige Rolle (siehe auch 1.1.2). Dieses Effektorprotein wird sofort nach dem Kontakt mit der Wirtszelle sezerniert (Clifton et al. 2005; Hower, Wolf, and Fields 2009). Im Zytoplasma des Wirts wird das TARP durch Kinasen tyrosinphosphoryliert (Jewett et al. 2008). Zusätzlich werden

Aktinfilamente im Zuge der Internalisierung der Elementarkörperchen rekrutiert (Jewett et al. 2010; Lane et al. 2008). Dadurch kann es zu einer Aufnahme des Erregers in die Wirtszelle kommen (Wang et al. 2010). Eine weitere wichtige Eigenschaft dieses T3SS Proteins ist die Apoptoseinhibierung am Anfang des Entwicklungszyklus. Dies geschieht durch die Interaktion mit SH2-Domänen (Mehlitz et al. 2010).

Eine weitere wichtige Rolle im Entwicklungszyklus der Chlamydien spielen die Inc (engl. Inclusion Membran Protein) Proteine. Bisher sind 23 unterschiedliche Inc Proteine bekannt, die in allen Spezies vorkommen und nicht detailliert charakterisiert sind. In den verschiedenen Spezies kommen aber noch weitere spezifische Inc Proteine vor (Lutter, Martens, and Hackstadt 2012). Alle Inc Proteine haben eine große hydrophobe Domäne am N-Terminus. Dadurch können sich die Proteine in die Membran der Inklusion einlagern (Subtil, Parsot, and Dautry-Varsat 2001). Vor allem Inc A spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung der Inklusion (Dai and Li 2014). Weitere Inc Proteine sind auf der Oberfläche der Inklusion zu finden. Einige interagieren aber auch mit den Proteinen des Wirtszellzytoplasmas (Mueller, Plano, and Fields 2014).

1.3.2.2 Putative Typ III sezernierte Proteine

Aufgrund von in-silico Analysen wurden weitere chlamydiale Proteine vorgeschlagen, die zu den putativen T3SS Proteinen gezählt werden (Arnold et al. 2009). Eines dieser Proteine ist das *Chlamydia abortus* Protein CAB063.

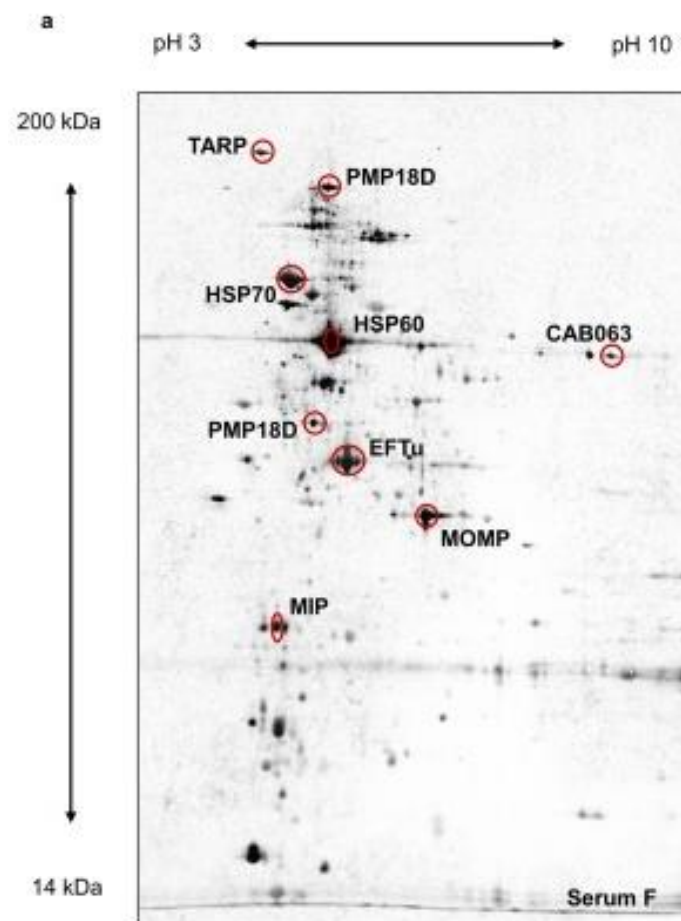


Abbildung 6: 2D-Immunoblot lysierter Elementarkörperchen von *Chlamydia abortus*. Die eingekreisten Spots wurden als Homologe von MOMP (CAB048), HSP60 (CAB615), HSP70 (CAB237) und dem Elongationsfaktor TU (CAB668) als auch die putativen Virulenzfaktoren MIP (CAB080), PMP18D (CAB776), CAB063 und TARP (CAB167) massenspektrometrisch identifiziert (modifiziert nach Forsbach-Birk et al. 2013, Seite 6), CC BY 3.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.

Mit Hilfe einer serologischen Proteomanalyse von *C. abortus* konnten in der Arbeitsgruppe immunogene putative Virulenzfaktoren identifiziert werden (Abbildung 6). Dazu gehört unter anderem CAB167, welches als Homolog zu TARP gilt. Außerdem wurden das Homolog von CPAF (CAB712) und das Homolog zu PMPD (CAB776) gefunden. Unter den drei putativen T3SS Proteinen war auch das CAB063 (Forsbach-Birk et al. 2013; Hagemann et al. 2016).

In weiteren Untersuchungen wurde herausgefunden, dass nach 44 h p. I. (post Infektion) ein Großteil des CAB063 produziert wird. Das bedeutet, dass das Protein hauptsächlich am Ende des *C. abortus* Entwicklungszyklus sezerniert wird.

Zusätzlich wurde bei ersten Lokalisationsversuchen entdeckt, dass CAB063 neben der Inklusion auch im Zellkern der Wirtszelle detektiert werden konnte (Forsbach-Birk et al. 2013). Des Weiteren ist bekannt, dass CAB063 ein Ortholog des SINC (engl. Secreted Innner Nuclear membrane-associated Chlamydia Protein) Proteins ist. Dieses Protein stammt aus *Chlamydia psittaci* und zeigt eine Orthologie zu CAB063 von 76 %. Dieses Protein wurde in der Zellkernmembran von experimentell *C. psittaci* infizierten Zellen lokalisiert (Mojica et al. 2015).

1.4 Aufgabenstellung der Arbeit

Ziel dieser Doktorarbeit war es das putativ Typ-III-sezernierte Protein CAB063 von *Chlamydia abortus* molekularbiologisch und ultramorphologisch näher zu charakterisieren.

Eine essentielle Grundlage für diese Charakterisierung stellte die erfolgreiche experimentelle Infektion der Wirtszelle (hier HeLa-Zellen) durch *C. abortus* und *C. pneumoniae* dar. Ein weiterer wichtiger methodischer Schritt, war die Herstellung einer Zelle, die die gewünschten Chlamydienproteine exprimiert, ohne dass dadurch die Zellen mit dem Erreger infiziert werden musste. Dafür wurde eine sogenannte Transfektante hergestellt. Das bedeutete, dass ein Vektorplasmid mit dem gewünschten Gen transient in die HeLa-Zelle transfiziert wurde. Diese HeLa-Zelle exprimierte bei erfolgreicher Transfektion das gewünschte Protein.

Für die weitere Charakterisierung des *C. abortus* Proteins CAB063 erfolgte zunächst eine subzelluläre Lokalisierung des Proteins mittels Immunfluoreszenzmikroskopie, Immunelektronenmikroskopie und Westernblot-Analyse. Anschließend wurde versucht, mögliche Bindungspartner von CAB063 in der experimentell mit *C. abortus* infizierten HeLa-Zelle sowie in deren Zellkern mittels Co-Immunpräzipitation und anschließender massenspektrometrischer Untersuchung zu identifizieren. Dadurch war es möglich auf die mögliche Funktion dieses Proteins zu schließen. Einer der in Frage kommenden möglichen Bindungspartner wurde zum einen durch Co-Immunfluoreszenz und zum anderen mit einer Co-Immunpräzipitation und anschließender Westernblot-Analyse überprüft. Zusätzlich wurde das Apoptose- und Zelltodverhalten bei experimentell *C. abortus* infizierten und CAB063-transfizierten Wirtszellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Außerdem wurden ultramorphologische

Veränderungen des Wirtszellkerns von CAB063-transfizierten HeLa-Zellen im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) untersucht.

Da das *C. pneumoniae* Protein CpB0704 (entspricht CP_0070) als mögliches Ortholog von SINC und CAB063 gilt (Mojica et al. 2015), wurde ebenfalls versucht, dieses Protein in der Wirtszelle zu lokalisieren. Zusätzlich wurde auch hier das Apoptose- und Zelltodverhalten von experimentell *C. pneumoniae* infizierten und CpB0704 transfizierten HeLa-Zellen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gerätschaften

Die folgenden Gerätschaften wurden während dieser Doktorarbeit verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Gerätschaften

Gerätename	Hersteller
Blotkammer (Semy-Dry Transfer Unit TE77 PWR)	GE Healthcare, München
Elektrophoresekammer (Mini VE Vertical Electrophoresis System)	Hoefer Inc., Holliston
Fluorometer Qubit 2.0	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Digital-pH Meter 525	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Durchflusszytometer (BD FACSCalibur™)	BD Biosciences Europe, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager M2)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Geldokumentation (BioDocAnalyze)	Biometra GmbH, Göttingen
Gelelektrophoresekammer (Horizon® 11.14)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Geltrockner (Geldryer Model 543)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Hochdruckgefriergerät (Wohlwend Compact 01)	Engineering Office M. Wohlwend GmbH, Sennwald
Inkubationskammer „Schüttler“ (Centromat® R)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Inkubator (HEPA Class 100 Forma Series II Water jacketed CO ₂ Incubator)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm
Isolelektrisches Fokussierungsgerät (Protean IEF Cell)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Magnetrührer IKAMAG REO Basic C	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop (Axiovert 40CFL)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikrowelle	Sharp K.K, Osaka
PCR-Kabinett (Captair® bio)	Erlab D.F.S S.A.S, Köln

Photometer (UV/Visible Spectrophotometer)	GE Healthcare, München
Pipettierapparat (Pipetboy plus)	Integra bioscience GmbH, Fernwald
Pipetten (Pipetman)	Gilson, Inc., Middleton
Premium Kühl-Gefrierkombination CP405	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Röntgenfilmentwickler Curix 60	AGFA GmbH, Stuttgart
Röntgenfilmkassette	Bender und Hobein, Zürich
Stuart Roller Mixer SRT90	Bibby Scientific Limited, Staffordshire
Scanner (Epson Expression 1600 Pro)	EPSON Deutschland GmbH, Meerbusch
Schüttelapparat 3016	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Thermocycler (T professional)	Biometra GmbH, Göttingen
Tischzentrifuge (miniSpin)	Eppendorf AG, Hamburg
Sequenziergerät (Abi Prism 310 Genetic Analyzer)	Applied Biosystems, Forster City
Sicherheitswerkbank (Lamin Air® Airflow)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Tiefkühlschrank (Hera freeze HPU 586B)	Kendro Laboratory Products GmbH, Hamburg
Tischzentrifuge (Centrifuge 5417C)	Eppendorf AG, Hamburg
Transmissionselektronenmikroskop JEM-1400	JOEL GmbH, Eching
Ultramikrotom	Leica Microsystems, Wetzlar
Ultrazentrifuge (Avanti™ J-25)	Beckman Clouter GmbH, Krefeld
UV-Lampe	UV-Tech Silberberger & Co. GmbH, Weilheim
Vakuumpumpe	Bachofer GmbH & Co. KG Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Vortexer (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries, Inc., New York
Waage AG204	Mettler-Toledo GmbH, Gießen

Wasserbad 1003	GFL GmbH, Burgwedel
Zentrifuge (Microfuge® R)	Beckman Clouter GmbH, Krefeld
Zentrifuge (Multifuge 2 S-R)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge (Rotana 460 RC)	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Zentrifuge (Varifuge 3 S-R)	Heraeus Holding GmbH, Hanau

2.1.2 Reagenzien und Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Chemikalien werden in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure (HEPES) 1M	Gibco/ Life Technologies GmbH, Darmstadt
3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonathydrat (CHAPS)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid (AEBSF)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
6-Aminohexansäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agar (Bacto™ Agar)	BD Biosciences Europe, Heidelberg
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ampholyte (Bio-Lyte® 3/10 Ampholyte)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ampicilin	Merck KGaA, Darmstadt
Aprotinin	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Aqua bidestilliert	Universitätsklinikum Apotheke, Ulm
Blockierlösung (Amersham™ ECL™ Blocking Agent)	GE Healthcare, München

Bromphenolblau	Biomol, Hamburg
Calciumchlorid (CaCl_2)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cycloheximid 100 mg/mL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D-(+)-Glukose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Detektionsreagenz (Amersham TM ECL TM Western Blotting Detection reagent)	GE Healthcare, München
Desomedan ID	Desomed Dr. Trippen GmbH, Freiburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4(7\text{H}_2\text{O})$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNAse	Roche GmbH, Mannheim
DNS Ladepuffer (Gel Loading Dye (6X))	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm
DNS-Längenstandard (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm
Eindeckmedium (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI)	Vector Laboratories Inc., Burlingame
Epon-Harz	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ethanol, 99,8 %	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka Chemie AG, Buchs
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Evansblue, 1%	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
Formaldehydlösung 37 % (HCHO), stabilisiert mit 10 – 15 % Methanol	J. T. Baker Deutschland, Griesheim

Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco/ Life Technologies GmbH, Darmstadt
Gentamycin 7,5 mg/mL	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Glutaminsäure (C ₅ H ₉ NO ₄)	Riedel-de Haen Laborchemikalien GmbH & Co.KG, Seelze
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Glycerin (C ₃ H ₈ O ₃)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Harnstoff (6 M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hefe (Bacto™ Hefe Extrakt)	BD Biosciences Europe, Heidelberg
Igepal CA630 (TritonX100, Nonidet- P40)	Fluka Chemie AG, Buchs
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Iso-Septol	Universitätsklinikum Apotheke, Ulm
Jodacetamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Längenstandard (Amersham™ Full- Range Rainbow™ Molecular Weight Markers (RPN800E))	GE Healthcare, München
Längenstandard (Amersham™ High- Range Rainbow™ Molecular Weight Markers (RPN756E))	GE Healthcare, München
Leupeptin	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Methanol (CH ₄ O), 99,8 %	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Fluka Chemie AG, Buchs
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	VWR InterNStional GmbH, Darmstadt
Natrium-Deoxycholat	Fluka Chemie AG, Buchs

Natriumdodecylsulfat (SDS), 10 %	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Natronlauge (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
PBS (Dolbecco's PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
PBS-Tabletten	Gibco/ Invitrogen/ Life Technologies GmbH, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA 4%)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Polyacrylamid (PAA): UltraPure ProtoGel (30 % Acrylamid)	National Diagnostics, Atlanta
Polymerase (PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase)	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn
Proteaseninhibitoren (Halt™ Proteasen Inhibitorcocktail)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm
Protein G Sepharose (rec-Protein G- Sepharose® 4B Konjugat)	Invitrogen Corporation, Kalifornien
Salzsäure (HCl)	J.T. Baker Deutschland, Griesheim
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Streptavidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Thioharnstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TRIS-Borat EDTA Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TRIS-HCl pH 8,8 (1,5 M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Trypton (Bacto™ Trypton)	
Tween 20	Fluka Chemie AG, Buchs

Uranylacetat, 0,1 %	Merck KGaA, Darmstadt
Waschpuffer für Durchflusszytometrie (Permash)	BD Biosciences Europe, Heidelberg
Zellkulturmedium (RPMI Medium 1640 + GlutaMAX™-1)	Gibco/ Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ziegerserum (Goatserum (Normal))	Dako Deutschland GmbH, Hamburg

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Es wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Verbrauchsmaterialien verwendet.

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
6-Loch-Gewebekulturplatten (Zellkulturplatte Multiwell 6 Vertiefungen)	BD Biosciences Europe, Heidelberg
12-Loch-Gewebekulturplatten (Zellkulturplatte Multiwell 12 Vertiefungen)	BD Biosciences Europe, Heidelberg
24-Loch-Gewebekulturplatten (Zellkulturplatte Multiwell 24 Vertiefungen)	BD Biosciences Europe, Heidelberg
Chromatographieblätter (Whatman® Schleicher & Schuell®)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Deckgläser (12 mm Durchmesser)	VWR InterNStional GmbH, Darmstadt
Elektrodenpapier (Electrode Paper)	GE Healthcare, München
Eppendorfgefäße (Safe lock Tubes 1,5 mL und 2,0 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon-Röhrchen (Polystyrol 15 mL, 50 mL)	BD Biosciences Europe, Heidelberg
Gel-Trocknungsfilm	Promega Corporation, Madison
Glaskugeln 3 mm	Scherf Praezision Europa GmbH, Meiningen-Dreissigacker
Immersionsöl	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena

Injektionsspritze Luer 10 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
IPG- (immobilisierter pH-Gradienten) Streifen (ReadyStrip™ IPG Strips)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Küvetten Polysterol	SARSTEDT AG & Co., Nürmbrecht
Labortücher	Hakle-Kimberly Deutschland GmbH, Mainz
Objektträger	VWR InterNStional GmbH, Darmstadt
Parafilm „M“ Laborfilm	Brand GmbH & Co., Wertheim
Pipettenspitzen (Biosphere Filter Tips 10 µL -1000 µL type)	SARSTEDT AG & Co., Nürmbrecht
Röhrchen 13 mL	SARSTEDT AG & Co., Nürmbrecht
Röntgenfilme ERONEX 5	AGFA GmbH, Stuttgart
Rundbodenröhrchen (Falcon Polysterol 5 mL (FACS-Röhrchen))	BD Biosciences Europe, Heidelberg
Saphirplättchen 0,17 mm	Engineering Office M. Wohlwend GmbH, Sennwald
Serologische Pipetten (Stripette® 5 mL – 25 mL)	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam
Stammkulturröhrchen (MICROBANK™ (Light Blue))	PRO-LAB DIAGNOSTICS, Richmond Hill
Sterilfilter (Aerodisc® Syringe Filter)	Pall GmbH, Dreieich
Transfermembran (Immobilon-P PVDF)	Millipore GmbH, Schwalbach am Taunus
Transfermembran (Protran Nitrocellulose Transfer Membran)	Whatmann GmbH, Dassel
Vernichtungsbeutel	SARSTEDT AG & Co., Nürmbrecht
Zellkulturflasche 75 cm²	BD Biosciences Europe, Heidelberg
Zellschaber (Cell Scraper 16 cm)	SARSTEDT AG & Co., Nürmbrecht
Zellzählkammer (C-Chip (Neubauer Improved))	NanoEnTek Inc., Seoul

2.1.3 Zelllinien und Bakterienstämme

Die obligat intrazellulär replizierenden Chlamydien wurden in HeLa 229-Zellen (ATCC: CCL-2.1) kultiviert. Hierbei handelt es sich um eine immortalisierte, adhärente Epithelzelllinie, die aus dem Tumorgewebe von Henriette Lacks, einer Patientin mit Zervixkarzinom, isoliert wurden (Brown et. Henderson, 1983).

In dieser Arbeit wurden die Chlamydienreferenzstämme *Chlamydia abortus* S26/3 und *Chlamydia pneumoniae* TW183 (TWAR Stamm TW-183, ATCC: VR-2282) verwendet. Für die Klonierungsarbeiten wurde der K12-Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α genommen.

2.1.4 Oligonukleotide, Restriktionsenzyme, Plasmide und Proteine

Die in Tabelle 4 aufgelisteten Oligonukleotide wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Scientific GmbH, Ulm bzw. von der Firma biomers.net GmbH, Ulm hergestellt. Diese Oligonukleotide wurden für die Amplifikation der Chlamydien-Gene *CAB063* und *CpB0704*, sowie für das *GFP*-Gen in der Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt.

Tabelle 4: Oligonukleotide (Primer)

Name	Sequenz (5' → 3')
CAB063_pCI_fwd	AACGCTGGTACCGCAGTACGTCTTCTATGTC
CAB063_pCI_rev	ACCGGCGCTGAATTCTTAATCCTCTGACAC
EGFP_fwd	AAACGGTACCGCGGGCCCCGG
EGFP_rev	AAATCTAGAGTCGCGGCCGCTTTAC
CpB0704_pCI_fwd	GAAGCCGGTACCATGGGAATCAATCCTTCGGGTAATAG
CpB0704_pCI_rev	GGGCCGTCGACTTATTCAAAAAGATCCCCG

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme (EcoRI, KpnI, Sall, XbaI) wurden von der Firma Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim bezogen und für den Restriktionsverdau in den unterschiedlichen Klonierungsarbeiten eingesetzt.

Für die transiente Transfektion der HeLa-Zellen mit *CAB063*, *GFP* und *CpB0704* wurde ein Vektorsystem benötigt. Hierzu wurde ein kommerziell erhältlicher Expressionsvektor (pCI Mammalian Expression Vektor, Promega GmbH,

Mannheim) mit den passenden Restriktionsenzymen geschnitten und das passende Gen in diesen Vektor kloniert.

Das rekombinante Protein CAB063 aus *C. abortus* wurde selbst hergestellt (siehe Kapitel 2.2.4). Das rekombinante Protein CpB0704 aus *C. pneumoniae* wurde von der Firma Mikrogen, Neuried zur Verfügung gestellt.

Außerdem wurde zur Abklärung potentieller Bindungspartner von CAB063 das rekombinante Protein Lamin-A (ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Rehovot) verwendet.

2.1.5 Monoklonale und polyklonale Antikörper

In Tabelle 5 sind die kommerziell verfügbaren Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden, aufgelistet.

Tabelle 5: verwendete kommerziell erworbene Antikörper

Antikörper	Hersteller
Alexa Fluor® 488 Goat-Anti Mouse IgG (H+L) highly cross-adsorbed	Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Alexa Fluor® 488 Goat-Anti Rabbit IgG (H+L) highly cross-adsorbed	Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Alexa Fluor® 647 Goat-Anti Mouse IgG (H+L)	Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Anti-HSP60	Dianova GmbH, Hamburg
Anti-PARP (aus Proteo Extrakt® S-PEK Antibody Control Kit)	Merck KGaG, Darmstadt
Anti-Xpress™ Antikörper	Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Chlamydialer LPS-Antikörper (ACI-C (Chlamydien-Antikörper))	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg
FITC (Fluorescein) -conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Suffolk
Goat-Anti-Rabbit Antikörper gekoppelt mit Gold (10 nm Partikeldurchmesser)	Aurion, Wangeningen

Lamin A-C Antikörper	Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt
Pathfinder® Chlamydia Culture Confirmation System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Polyclonales Goat Anti-Rabbit Immunoglobulin/HRP	Dako, Glostrup
Polyclonales Goat Anti-Rabbit Immunoglobulin/HRP	Dako, Glostrup

Der Antikörper Anti-CAB063 (Kaninchen) wurde in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe (Forsbach-Birk et. al, 2013) durch Immunisierung von Kaninchen hergestellt und mittels Affinitätschromatographie mit einem kommerziell erhältlichen Auffreinigungskit (NAb™ Protein A Plus Spin Kit, Pierce Biotechnologie, Rockford) aufgereinigt.

Der Antikörper Anti-CpB0704 (Kaninchen) wurde in dieser Arbeit in enger Zusammenarbeit mit dem Tierforschungszentrum Universität Ulm, Ulm hergestellt (siehe Kapitel 2.2.5).

2.1.6 Medien und Pufferlösungen

Für die Zellkultivierung wurde das Zellkulturmedium RPMI (Gibco/ Life Technologies GmbH, Darmstadt) verwendet. Es wird zusätzlich mit 10 % FCS (Fötales Kälberserum) versetzt.

Für die Infektion der Zellen wird ein Infektionsmedium verwendet. Dazu wurde dem RPMI-Zellkulturmedium Vancomycin (90 µg/mL), Gentamycin (45 µg/mL), Glukose (500 µg/mL), HEPES (5 mM) und Cycloheximid (4 µg/mL) zugesetzt.

Für die fluoreszenzmikroskopischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde auf die Zugabe von Cycloheximid im Infektionsmedium verzichtet, damit die morphologischen Veränderungen der Wirtszelle unabhängig von dem potentiellen zytotoxischen Effekt des Cycloheximids untersucht werden konnten.

Für die *E. coli*-Kulturen wurden LB (engl. Lysogeny Broth)-Komplexmedium mit/ohne Ampicillin (100 µg/mL) und LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/mL) verwendet. Dazu wurden 5 g Trypton, 2,5 g Hefe Extrakt und 5 g NaCl ad 500 mL

Aqua bidest autoklaviert. Für die Agarplatten wurde in die Lösung noch 7,5 g Agar hinzugegeben und ebenfalls autoklaviert. Das Ampicillin wurde erst nach dem Autoklavieren hinzugegeben.

Folgende Pufferlösungen wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet (Tabelle 6).

Tabelle 6: verwendete Pufferlösungen

Puffer	Zusammensetzung
10 x Laufpuffer	30,2 g TRIS; 144 g Glycin; 10 g SDS ad 1 L Aqua bidest.
2 x Lämmli-Reduktionspuffer	2,5 mL Sammelgelpuffer; 2 mL Glycerin; 0,4 g SDS; 0,31 g DTT; 0,1 mg Bromphenolblau ad 10 mL Aqua bidest.
6 x Lämmli-Reduktionspuffer	7,5 mL Sammelgelpuffer; 6 mL Glycerin; 1,2 g SDS; 0,93 g DTT; 0,6 mg Bromphenolblau ad 10 mL Aqua bidest.
10 x PBS	2 g KCl; 2 g KH ₂ PO ₄ ; 80 g NaCl; 11,4 g Na ₂ HPO ₄ (7H ₂ O) ad 1 L Aqua bidest. (pH 7,2 bis 7,4)
10 x PBS-T	1 L PBS; 1 mL Tween
10 x TBS	88 g NaCl; 12 g TRIS; 680 mg NaN ₃ ad 1 L Aqua bidest. (pH 8,0)
10 x TBS-T	1 L TBS; 1 mL Tween
10 x TBS (ohne NaN ₃)	88 g NaCl; 12 g TRIS ad 1 L Aqua bidest. (pH 8,0)
Anode 1-Puffer	36,3 g TRIS; 200 mL Methanol ad 1 L Aqua bidest.
Anode 2-Puffer	3,03 g TRIS; 200 mL Methanol ad 1 L Aqua bidest.
Blockierlösung (5%)	1 g Amersham™ ECL™ Blocking Agent + 20 mL TBS-T
CaCl ₂ (0,1 M)	11,09 g CaCl ₂ ad 1 L Aqua bidest.
Equilibrierungslösung	90 g Harnstoff; 75 mL Glycerin; 5 g SDS; 8,25 mL TRIS-HCl ad 250 mL Aqua

	bidest. Vor Gebrauch Zugabe von: 10 µL AEBSF; 10 µL Leupeptin; 10 µL Aprotinin
FACS-Puffer	10 mL FCS; 10 mL 10% NaN ₃ ad 1 L PBS
Gefriersubstitutionslösung für die Immunelektronenmikroskopie	Ethanol; 0,5 % Uranylacetat; 0,5 % Glutardaldehyd; 3 % Paraformaldehyd; 2 % Aqua bidest.
Gefriersubstitutionslösung für die Transmissionselektronenmikroskopie	Aceton; 0,2 % Osmiumtetroxid; 0,1 % Uranylacetat; 5 % Aqua bidest.
Kathoden-Puffer	5,3 g 6-Aminohexansäure; 1 mL 10 % SDS; 200 mL Methanol ad 1 L Aqua bidest.
LR-Gold-Einbettmedium	LR-Gold; 0,1 % Benzil; 0,1 % Benzoylperoxid
Rehydratisierungspuffer	18 g Harnstoff; 7,6 g Thioharnstoff; 100 mg DTT; 500 mg Chaps; 313 µL Ampholyte 3-10 ad 50 mL Aqua bidest.
RIPA-Puffer	0,1 mL SDS; 1 mL Igepal; 0,5 mL Na-Deoxycholat ad 100 mL PBS vor Gebrauch Zugabe von 100 µL Halt™ Proteasen Inhibitor Cocktail
Sammelgel (2 kleine Gele)	6,1 mL Aqua bidest; 2,5 mL Sammelgelpuffer; 1,3 mL PAA; 50 µL APS; 10 µL TEMED
Sammelgelpuffer	6,05 g TRIS; 0,4 g SDS ad 100 mL Aqua bidest. (pH 6,8)
SPG	75 g Sucrose; 0,52 g KH ₂ PO ₄ ; 2,3 g Na ₂ HPO ₄ (7H ₂ O); 0,72 g Glutaminsäure ad 1 L Aqua bidest. (pH 7,2 bis 7,4)
Trenngel (2 kleine Gele)	5,25 mL Aqua bidest; 3,75 mL Trenngelpuffer; 6 mL PAA; 50 µL APS; 10 µL TEMED
Trenngelpuffer	91 g TRIS; 2 g SDS ad 500 mL Aqua bidest. (pH 8,8)

2.1.7 Kits

Es wurden folgende kommerziell verfügbare Kits in dieser Arbeit verwendet. Dabei wurde, sofern nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben gearbeitet (Tabelle 7).

Tabelle 7: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Annexin V ^{APC} Apoptose Detektionskit I	BD Biosciences Europe, Heidelberg
Antikörperaufreinigungs- (NAb TM Protein A Plus Spin Kit, 0,2 mL für Antikörperaufreinigung)	Pierce Biotechnologie, Rockford
Aufreinigungs- (Protino [®] Ni-TED 1000) für Histidin-Tag-Proteine	Machery-Nagel GmbH & Co.KG, Düren
Caspasen-Detektionskit (SR-FLICA [®] <i>in vitro</i> Caspase Detektionskit)	ImmunoChemistry Technologies LCC., Bloomington
DNS-Aufreinigungs- (NucleoSpin [®] Gel und PCR Aufreinigungs-)	Machery-Nagel GmbH & Co.KG, Düren
DNS-Isolierungs- (QIAamp [®] DNA Mini Kit)	Qiagen GmbH, Hilden
FireSilver Fixierungs-	Proteome Factory AG, Berlin
Ligations- (USB [®] Ligate-IT TM Rapid Ligation Kit)	Affymetrix, Inc., Santa Clara
Plasmidisolierungs- (QIAprep [®] Spin Miniprep Kit)	Qiagen GmbH, Hilden
Proteinfärbekit (MemCode TM Reversible Protein Stain Kit (für Nitrocellulosemembran))	Pierce Biotechnologie, Rockford
Proteinkonzentrationsbestimmungs- (Quick Start TM Bradford Protein-Assay)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sequenzieraufreinigungs- (Centri Sep Spin Columns)	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm

Transfektionsreagenz (jetPRIME® in vitro DNA & siRNA Transfektionsreagenz)	Polyplus-transfection S.A., Illkirch
Zellfraktionierungskit (Proteo Extract® Subcellular Proteome Extraction Kit)	Merck KGaA, Darmstadt
Zellfraktionierungskit (Qproteome Nuclear Protein Kit)	Qiagen GmbH, Hilden

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von HeLa 229-Zellen

Die Kultivierung von HeLa 229-Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 cm² Zellkulturflaschen (BD Biosciences Europe, Heidelberg). Sie wurden in RPMI-Zellkulturmedium (inkl. 10% FCS) bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert und alle 3-4 Tage gesplittet. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit Trypsin/EDTA 5 min und bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension in frisches Zellkulturmedium überführt und für 10 min bei RT und 300 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in neuem Zellkulturmedium gelöst und in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Für die DNS-Transfektion, Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie wurden 3,0 x 10⁵ Zellen/mL in 12-Loch-Gewebekulturplatten (Multiwell, BD Biosciences Europe, Heidelberg) ausgesät, damit die Zellen am Folgetag semikonfluent (70 – 80 %) waren. Dazu wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt und dann mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. In Abhängigkeit der Fragestellung wurde eine Inkubationszeit von 24, 48 und 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ gewählt.

Für die Herstellung von Immunfluoreszenzpräparaten wurden in die Vertiefungen der Mehrloch-Gewebekulturplatten (BD Biosciences Europe, Heidelberg) Deckgläser platziert. Für die Herstellung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie wurden ausglühte, mit Kohle beschichtete Saphirplättchen in die Vertiefungen gelegt.

2.2.2 Kultivierung von *Chlamydia abortus* S26/3 und *Chlamydia pneumoniae* TW183

Die Kultivierung von *Chlamydia abortus* S26/3 und *Chlamydia pneumoniae* TW183 erfolgte in konfluenten HeLa-Zellmonolayerkulturen in 6-Loch-Gewebekulturplatten (Multiwell 6 Vertiefungen, BD Biosciences Europe, Heidelberg). Dazu wurde der Zellkulturüberstand verworfen und durch eine Chlamydien-Suspension in einer Konzentration von ca. 10^6 IFU/mL (engl. Inclusion Forming Units) je Vertiefung der 6-Loch-Gewebekulturplatte ersetzt. Dies entspricht einer MOI (engl. Multiplicity of Infection) von 5. Daraufhin wurden die Platten bei 1800 x g für 1 h bei 37 °C zentrifugiert und anschließend für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Standardkultivierung der Chlamydien wurden die Zellen mit 5 mL Infektionsmedium mit Cycloheximid bedeckt. Die Standardkultur wurde nach 72 bis 96 Stunden mittels eines Zellschabers abgelöst, mit Glaskugeln versetzt und durch Vortexen aufgeschlossen. Diese Chlamydien suspension wurde für die Subkultivierung genutzt. Für funktionelle und morphologische Fragestellungen in der Immunfluoreszenz- bzw. Elektronenmikroskopie wurde das Infektionsmedium ohne Cycloheximid verwendet. Je nach Fragestellung wurden die Zellen dann 24, 48 und 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Für die Kontrolle der Infektionsrate wurde ein Methanol-fixiertes Deckglas (Fixierung siehe Kapitel 2.2.6) mit einem FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen chlamydien spezifische LPS (Lipopolysaccharid) angefärbt. Die Dichte der so visualisierten Chlamydien einschliesskörper konnte dann mit dem Fluoreszenzmikroskop überprüft werden.

2.2.3 Generierung von HeLa-Zellen, die Proteine transient exprimieren

Um die Lokalisation des *C. abortus* SINC-Orthologs CAB063 und des *C. pneumoniae* SINC-Orthologs CpB0704 in den Wirtszellen bestimmen zu können und weitere fortführende Experimente zu machen, wurde eine Transfektante benötigt. Aus diesem Grund wurden die korrespondierenden Gene (CAB063 und CpB0704) mittels PCR vervielfältigt und in einen kommerziell verfügbaren Expressionsvektor (pCI Mammalian Expression Vektor, Promega GmbH, Mannheim) kloniert. Anschließend wurde der Expressionsvektor transient in HeLa-

Zellen transfiziert, damit die Zellen das gewünschte Protein exprimieren konnten. Für die Transfektionskontrolle wurde das *GFP* ebenfalls in den pCI-Expressionsvektor kloniert.

2.2.3.1 DNS-Isolierung, DNS-Amplifikation und Vektorisolierung

Die DNS von *C. abortus* und *C. pneumoniae* wurde mittels Säulchenextraktion (QIAamp® DNA Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben aus experimentell mit *C. abortus* bzw. *C. pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen isoliert und aufgereinigt. Dazu wurden experimentell infizierte HeLa-Zellen durch Trypsinierung geerntet, mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS gelöst und mit Proteinase K versetzt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mit Ethanol versetzt. Die Suspension wurde auf ein Extraktionssäulchen gegeben und anschließend gewaschen. Nach den Waschschritten wurde die DNS mit dem Elutionsbuffer eluiert und danach wurde die isolierte DNS bei -20 °C gelagert.

Zur Template-Vervielfältigung (hier das *CAB063*) wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die dafür benötigten Primersequenzen wurden mit dem Programm CloneManager 7 (Scientific & Educational Software, Denver) erstellt (siehe Tabelle 4). Der PCR-Ansatz wird im Folgenden detailliert beschrieben.

PCR-Ansatz:

81 µL H₂O

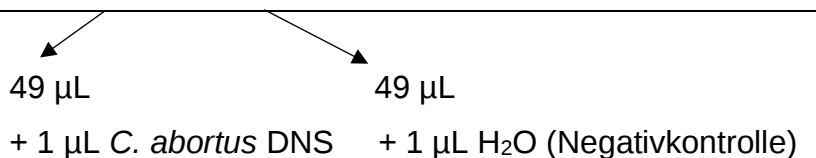
10 µL Polymerase-Puffer(10x)

2 µL dNTPs

2 µL fwd-Primer (siehe Tabelle 4)

2 µL rev-Primer (siehe Tabelle 4)

1 µL Pfull-Polymerase



Folgendes PCR-Programm wurde verwendet.

PCR-Programm:

1) Denaturierung	95 °C, 2 min	
2) Denaturierung	95 °C, 1 min	} 30 x
3) Annealing	54 °C, 1,5 min	
4) Elongation	72 °C, 1 min	
5) Elongation	72 °C, 5 min	
6) Abkühlen	10 °C, ∞	

Zur Kontrolle wurde das PCR-Produkt auf ein 1%iges Agarosegel (mit Ethidiumbromid versetzt) aufgetragen. Wenn eine Bande in der Höhe der erwarteten Größe erschien, wurde das PCR-Produkt mit einem kommerziell erhältlichen PCR-Aufreinigungskit (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit, Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Dürren) aufgereinigt. Dafür wurde das PCR-Produkt auf ein Extraktionssäulchen mit Silicamembran gegeben und die DNS wurde durch die Membran adsorbiert wurde, konnte die DNS nach Waschen der Membran eluiert werden.

In Analogie zu dem oben beschriebenen Verfahren wurde *CpB0704* mittels PCR amplifiziert. Dazu wurde die DNS aus experimentell mit *C. pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen isoliert und die entsprechenden Primer (siehe Tabelle 4) gewählt.

Für die Vervielfältigung des *EGFP* wurde der Vektor peGFP verwendet und die passenden Primer (siehe Tabelle 4) sowie eine angepasste Annealing-Temperatur von 62 °C gewählt.

Die Vektorisolierung erfolgte mittels *Escherichia coli*. Dazu wurde die *E. coli*-Stammkultur mit der Vektor-DNS des Expressionsvektors pCI in LB-Medium mit Ampicillin ÜN bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Dann wurde der Vektor mit einem kommerziell erhältlichen Plasmidisolierungskit (QIAprep® Spin Miniprep Kit, Qiagen GmbH, Hilden) isoliert. Diese Isolierung erfolgte mit Hilfe der Säulchenextraktion. Dazu wurden die Bakterien zuerst unter alkalischen Bedingungen lysiert und anschließend auf ein Säulchen mit Silicamembran pipettiert. Die Plasmid-DNS wurde durch die Membran adsorbiert. Dann erfolgte ein Waschschriff und die Plasmid-DNS konnte anschließend eluiert werden.

2.2.3.2 Restriktionsverdau und Ligation

Nachdem das gewünschte Gen vervielfältigt und der Vektor isoliert wurde, wurden sie mit den passenden Restriktionsenzymen geschnitten. Dazu wurde der Restriktionsansatz (siehe unten) ÜN bei 37 °C inkubiert und anschließend wie oben beschrieben mit dem kommerziell erhältlichen PCR-Aufreinigungsset (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit, Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Dürren) aufgereinigt.

Restriktionsansatz:

30 µL PCR-Produkt bzw.

Vektor

4 µL Restriktionspuffer (5 x)

4 µL H₂O

1 µL Restriktionsenzym 1

1 µL Restriktionsenzym 2

40 µL

Von den aufgereinigten Produkten wurde mittels Photometer bei einer OD_{260nm} die Konzentration bestimmt. Dafür wurden 5 µL der DNS und 995 µL H₂O gemischt. Anschließend wurde die OD_{260nm} gemessen. Der gemessene OD_{260nm}-Wert wurde dann mit 10000 multipliziert um die Konzentration in ng/µL zu erhalten.

Anschließend erfolgte die Ligation. Diese wurde mit einem kommerziell erhältlichen Ligationskit (USB® Ligate-IT™ Rapid Ligation Kit, Affymetrix Inc., Santa Clara) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 100 ng der Vektor-DNS verwendet und im Verhältnis 1:2, 1:3 und 1:4 die DNS des PCR-Produkts eingesetzt. Zusätzlich wurde Ligationspuffer dazugegeben und der Ansatz bei RT für 10 min inkubiert.

2.2.3.3 Transformation in *Escherichia coli*, Plasmidisolierung und Sequenzierung

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde eine Übernachtskultur aus der Stammsammlung vorbereitet. Dafür wurden 5 mL LB-Medium mit *E. coli* DH5α angeimpft und ÜN bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Am nächsten Morgen wurde 1 mL aus der ÜN-Kultur in frisches LB-Medium gegeben und 2 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Dann wurde die Bakteriensuspension 10 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 25 mL eiskaltem CaCl₂ gelöst und 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min, 4 °C, 4000

rpm) und die Bakterien wurden in 5 mL eiskaltem CaCl_2 gelöst. Danach wurden sie zu je 100 μL in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert.

Zu den kompetenten *E. coli*-Bakterien wurden 10 μL des jeweiligen Ligationsansatzes pipettiert. Zusätzlich wurde 2 μL des Expressionsvektors ohne Insert zu den Bakterien gegeben. Dieser Ansatz diente als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurden *E. coli* DH5 α ohne Zugabe von DNS gewählt. Die Bakteriensuspension wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 2 min bei 42 °C im Wasserbad erhitzt. Danach erfolgte eine Abkühlung von 3 min auf Eis und eine Zugabe von 900 μL LB-Medium. Die *E. coli*-Bakteriensuspension wurde 1 h bei 37 °C und 300 rpm im Thermoblock inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 min, RT, 14000 rpm) wurde das Pellet in 80 μL LB-Medium gelöst und die Bakterien wurden auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. Diese Platten wurden ÜN bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

Nach dem Inkubationsschritt ÜN wurden die Platten auf Wachstum von Klonen überprüft. Auf der Platte mit der Positivkontrolle sollte ein dichter Rasen von Klonen zu sehen sein, während auf der Platte mit der Negativkontrolle kein Wachstum erkennbar sein sollte. Mögliche Klone wurden von den Platten mit den unterschiedlichen Ligationsansätzen gepickt und in LB-Ampicillin-Medium ÜN bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Plasmidisolierung mit dem kommerziell erhältlichen Plasmidisolierungskit (QIAprep® Spin Miniprep Kit, Qiagen GmbH, Hilden). Die unterschiedlichen Ansätze mit isolierter Plasmid-DNS wurden zusammen mit dem Leervektor auf ein 1 %iges Ethidiumbromidagarosegel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Kontrollverdau mit den passenden Restriktionsenzymen ÜN durchgeführt und dieser wurde ebenfalls auf ein 1%iges Ethidiumbromidagarosegel aufgetragen. Zur vollständigen Abklärung, ob die Klonierung erfolgreich war, wurde die Plasmid-DNS sequenziert.

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Methode nach Sanger zu Beginn der Arbeiten noch im eigenen Institut. Dafür wurde eine sogenannte Sequenzierreaktion durchgeführt um das gewünschte Produkt zu vervielfältigen. Folgender Ansatz wurde verwendet.

Sequenzier-Ansatz:

3 µL BigDye Terminator Ready Reaction Kit	
5 µL Sequenzierpuffer (5x)	
0,5 µL fwd-Primer (siehe Tabelle 4)	
11,5 µL H ₂ O	
19 µL + 1 µL Plasmid-DNS (zu sequenzierende DNS)	

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet.

PCR-Programm:

1) Denaturierung	95 °C, 30 sec	} 25 x
2) Annealing	60 °C, 240 sec	
3) Abkühlen	10 °C, ∞	

Anschließend erfolgte die Aufreinigung des Sequenzierproduktes mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (Centri Sep Spin Columns, GENAXXON, Ulm). Das aufgereinigte Produkt wurde mit dem Sequenziergerät (Abi Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Forster City) analysiert und die erhaltene Sequenz ausgewertet. Dazu wurde die Sequenz mit Hilfe des CloneManager 7-Programms auf Homologien mit der Originalsequenz des jeweiligen Gens abgeglichen.

Die Klonierung pCI-CpB0704 wurde extern ebenfalls gemäß der Sanger Methode sequenziert (GATC Biotech AG, Konstanz). Dafür wurde die Plasmid-DNS zusammen mit dem entsprechenden fwd-Primer (siehe Tabelle 4) verschickt. Die erhaltene Sequenz wurde wie oben beschrieben mit der der Originalsequenz des jeweiligen Gens abgeglichen.

Anschließend wurde bei positiver Sequenzierung eine Stammkultur angelegt. Dazu wurde LB-Ampicillin-Medium mit den positiven Klonen angeimpft und ÜN bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein 3-Ösenaustich auf eine LB-Ampicillin-Agarplatte. Diese wurde ÜN bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde ein Impfösenabstrich in ein Stammkulturröhrchen (PRO-LAB DIAGNOSTICS, Richmond Hill) gegeben.

2.2.3.4 Transiente Transfektion von HeLa-Zellen

Für die transiente Expression von CAB063, GFP oder CpB0704 in den Wirtszellen wurden HeLa 229-Zellen mit einer Zelldichte von $1,0 \times 10^5$ Zellen / Vertiefung einer 12-Loch-Gewebekulturplatte am Vortag der geplanten Transfektion ausgesät, um am nächsten Tag eine Semikonfluenz von 70 – 80 % zu bekommen.

Die Transfektion erfolgt mit einem kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenz (jetPRIME® in vitro DNA & siRNA Transfection Reagent, Polyplus-transfection S.A, Illkirch). Das Vorgehen erfolgte nach Herstellerangaben. Die verwendete Plasmid-DNS-Menge war 0,5 µg pro Vertiefung einer 12-Loch-Gewebekulturplatte. Außerdem wurden 75 µL Transfektionspuffer und 1,5 µL Transfektionsreagenz pro Vertiefung einer 12-Loch-Gewebekulturplatte eingesetzt. Dazu wurde zuerst die DNS mit dem Transfektionspuffer gemischt und anschließend wurde zu diesem Gemisch das Transfektionsreagenz hinzugegeben. Es erfolgte ein Inkubationsschritt von 10 min bei RT. Der Transfektionsansatz von 78 µL pro Vertiefung einer 12-Loch-Gewebekulturplatte wurde dann tröpfchenweise in das Zellkulturmedium gegeben. Es erfolgte je nach Fragestellung eine Inkubation der transfizierten Zellen von 24 bzw. 48 bzw. 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂.

Zur Transfektionskontrolle wurde der pCI-GFP eingesetzt. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz von pCI-CAB063 bzw. pCI-CpB0704 erfolgte mittels Immunfluoreszenz (siehe Kapitel 2.2.6) bzw. mittels durchflusszytometrischer Analyse (siehe Kapitel 2.2.9.1).

2.2.4 Herstellung rekombinanter Proteine in *Escherichia coli*

Für die Herstellung des rekombinanten Proteins CAB063 in *Escherichia coli* wurde mit der Stammkultur eine Übernachtskultur in LB-Ampicillin-Medium bei 37 °C und 180 rpm hergestellt. Diese Stammkultur enthielt ein Vektor, welcher für das CAB063 mit Histidin-Tag codierte. Anschließend wurden 45 mL LB-Ampicillin-Medium mit 3 mL ÜN-Kultur bis zu einer OD_{600nm} von 0,7 bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Sobald diese Bakteriendichte erreicht wurde, wurden 280 mL LB-Ampicillin-Medium mit 20 mL dieser Kultur angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,3 bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Anschließend erfolgte die Induktion mit IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) (1 mM) für 5 h 37 °C und 180 rpm. Nach dieser Inkubation wurden die Bakterien zentrifugiert (10000 rpm, 4 °C, 10 min) und dann das Zellpellet bis zur Lyse bei -70°C gelagert.

Die Bakterienlyse mit anschließender Proteinaufreinigung erfolgte mit einem kommerziellen Aufreinigungskit für Histidin-Tag-Proteine (Protino® Ni-TED 1000, Machery-Nagel GmbH & Co.KG, Düren). Dazu wurden die Bakterien lysiert und anschließend über eine IMAC (Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie) aufgereinigt. Dabei erfolgte eine kovalente Bindung des Histidin-Tags an die Metallionen. Durch Elution wurde das rekombinant hergestellte Protein vom Histidin-Tag getrennt und konnte für die Westernblot-Analysen verwendet werden.

2.2.5 Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen CpB0704

Bisher gibt es keine kommerziell verfügbaren Antikörper gegen das *C. pneumoniae* Protein CpB0704. Deshalb wurden in Zusammenarbeit mit dem Tierforschungszentrum der Universität Ulm Antikörper gegen CpB0704 hergestellt. Für diese Antikörperherstellung wurde beim Regierungspräsidium Tübingen ein entsprechender Tierversuchsantrag gestellt, dem mit der Versuchsnummer V.46 zugestimmt wurde.

2.2.5.1 Vorbereitungen für die Immunisierung der Mäuse und Kaninchen

Für die Immunisierung (Antikörpergenerierung) wurde das rekombinante Protein CpB0704 verwendet, welches in aufgereinigter Form in einer Konzentration von 0,56 µg/µL von der Firma Mikrogen zur Verfügung gestellt wurde.

Dieses Protein wurde mit 2 x Lämmli-Reduktionspuffer für 5 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend erfolgte eine SDS-PAGE. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 2.2.7.2 beschrieben.

Nach der SDS-PAGE wurden die Proben auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Der Aufbau und Ablauf ist in Kapitel 2.2.7.2 beschrieben. Allerdings wurde die Nitrocellulosemembran nicht mit Methanol, sondern mit H₂O aktiviert.

Nach dem Blotten wurde die Membran mit einem Proteinfärbekit (MemCode™ Reversible Protein Stain Kit (for Nitrocellulose Membrane), Pierce Biotechnology, Rockford) angefärbt, das gewünschte Protein mit Bleistift markiert und dann die Membran entfärbt. Mit einem Skalpell wurde die markierte Bande ausgeschnitten und bis zur Immunisierung bei 4 °C gelagert.

2.2.5.2 Immunisierung der Mäuse und Kaninchen

Für die Immunisierung werden weibliche Balb/c Mäuse und weibliche New Zealand White Kaninchen herangezogen. Die Immunisierung der Mäuse erfolgte zur Überprüfung der Immunogenität der eingesetzten Proteine. Bei einer ausreichenden Reaktivität und einer hohen Spezifität des gewonnenen Antiserums konnten im Anschluss die Kaninchen mit dem entsprechenden Protein immunisiert werden.

Die gewünschte Proteinbande wurde in DMSO aufgelöst und anschließend den Mäusen bzw. den Kaninchen in die Nackenfalte injiziert. Nach 14 Tagen erfolgte eine erste Boosterung und nach weiteren 14 Tagen erfolgte eine zweite Boosterung. Nach der vollständigen Immunisierung (14 Tage nach der zweiten Boosterung) wurden die Tiere getötet und ausgeblutet. Zwischen den Boosterungen wurde jeweils 1 mL Blut aus der Ohrvene abgenommen um den Verlauf der Immunisierung zu überprüfen. Dafür wurde jeweils mit dem daraus gewonnenen Serum eine Westernblot-Analyse mit dem entsprechenden rekombinanten Protein gemacht. Das Vorgehen wird in Kapitel 2.2.7.2 beschrieben.

Zur Serumgewinnung wurde das sterile Gefäß mit Blut 30 min bei RT stehen gelassen und anschließend bei RT für 10 min mit 3000 rpm zentrifugiert. Danach konnte der Serumsüberstand abgenommen werden und der restliche Blutkuchen verworfen werden. Das so gewonnen Serum konnte nun z.B. für einen Westernblot eingesetzt werden.

Die Spezifität des Immunserums wurde nach der Aufreinigung der Seren (siehe Kapitel 2.2.5.3) überprüft.

2.2.5.3 Aufreinigung der Kaninchenserum

Zur Vermeidung unspezifischer Reaktionsausfälle in den Westernblot-Analysen und in der Immunfluoreszenz wurden die Kaninchenserum mittels eines kommerziellen Kits für die Antikörperaufreinigung (NAbTM Protein A Plus Spin Kit, 0,2 mL für Antikörperaufreinigung, Pierce Biotechnology, Rockford) behandelt. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Nach Inkubation mit der Protein A/G- Agarose aus dem Kit wurden die Antikörper der Klasse IgG gebunden. Durch mehrere Waschschriffe wurden die gebundenen Antikörper aufgereinigt und konnten nach einem abschließenden Elutionsschritt für weitere Experimente verwendet werden.

2.2.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

Es wurden für die direkte Immunfluoreszenzmikroskopie die mit Zellen bewachsenen Deckgläser mit zwei verschiedenen Verfahren chemisch fixiert (siehe unten) und die ausgewählten Antigene (LPS (Lipopolysaccharid) und HSP60 (Heat Shock Protein) von Chlamydien, CAB063, CpB0704) mit den passenden Antikörpern markiert. Dafür standen FITC-markierte Antikörper und nicht-markierte Antikörper zur Verfügung. Die Bindung nicht-markierter Antikörper wurde mit einem konjugierten Sekundärantikörper dargestellt.

Mit Hilfe der Methanolfixierung werden die Zellen durch einfache Proteinfällung schnell fixiert. Allerdings könnten dadurch lösliche Proteine verloren gehen und somit im Zytoplasma lokalisierte Proteine nicht dargestellt werden. Durch die Paraformaldehydfixierung können auch Proteine, die im Zytoplasma vorkommen, sicher detektiert werden. Durch das Paraformaldehyd werden intermolekulare Verbindungen zwischen den verschiedenen Proteinen in der Zelle gebildet. Allerdings wird dadurch die Membranpermeabilität behindert, so dass die Antikörper nicht immer an ihr Ziel gelangen können. Aus diesem Grund wurden die Zellen anschließend nach der Paraformaldehydfixierung noch mit Saponin behandelt.

2.2.6.1 Methanolfixierung und Fluoreszenzfärbung

Zur Herstellung von Deckglaspräparaten wurden die Deckgläser mit einer Pinzette aus einer Vertiefung der Zellkulturplatte genommen und in 99,8 %igem Methanol für 30 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Deckgläser mit PBS für 5 min bei RT gewaschen. Nach dem Waschschrift wurden die Deckgläser mit 4 %igem Goat-Serum (mit PBS verdünnt) für 1,5 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Dieser Schritt diente zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungen. Danach wurde die Pr-Verdünnung (1:50 mit 4 %igem Goat-Serum verdünnt) zugegeben und die Deckgläser für weitere 1,5 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit PBS für 5 min bei RT, im Dunkeln. Danach wurde mit dem passenden Sekundärantikörper (Alex Fluor® 488 Goat-Anti Mouse IgG (H+L) highly cross-adsorbed, Alex Fluor® 488 Goat-Anti Rabbit IgG (H+L) highly cross-adsorbed oder Alex Fluor® 647 Goat-Anti Mouse IgG (H+L)) 30 min bei RT und im Dunkeln gefärbt. Der Sekundärantikörper wurde 1:400 mit einer 1:800 Evansblue-PBS-Verdünnung verdünnt. Bei der Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit Anti-CAB063 und Anti-Lamin A wurden die Sekundärantikörper mit PBS verdünnt. Nach drei

weiteren Waschschritten mit PBS (jeweils 5 min bei RT und im Dunkeln). Die Deckglaspräparate wurden getrocknet und mit Eindeckmedium (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI) auf einen Objektträger eingebettet.

Die Präparate wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager M2, Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Jena) bei einer 630fachen Vergrößerung analysiert und repräsentative Aufnahmen mit Hilfe der Fluoreszenzkamera dokumentiert. Für die Aufnahmen wurde die Software Axio Vison 40 (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Jena) verwendet.

2.2.6.2 Paraformaldehydfixierung und Fluoreszenzfärbung

Für die Paraformaldehydfixierung wurden Deckgläser 5 min bei 37 °C mit PBS gewaschen. Dann wurde mit 3,7 %iger Paraformaldehydlösung in PBS für 30 min fixiert und erneut mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte zur Permeabilisierung eine Behandlung der Präparate mit 0,25 %igem Saponin in 4 %igem Goat-Serum für 1 h bei RT und Dunkelheit. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS wurde wie bei der Methanolfixierung (siehe 2.2.6.1) weiter verfahren. Es erfolgte eine Inkubation mit 4 %igem Goat-Serum. Dann wurde der Primär- und Sekundärantikörper hinzugegeben und zum Schluss wurden die Deckgläser eingebettet.

Die Präparate wurden ebenfalls bei 630facher Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager M2, Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Jena) analysiert und repräsentative Aufnahmen dokumentiert.

2.2.7 Westernblot-Analysen

Für die intrazelluläre Lokalisation von CAB063 und CpB0704 wurden neben der direkten Immunfluoreszenzmikroskopie auch Westernblot-Analysen der unterschiedlichen Zellfraktionen durchgeführt. Dazu wurden die mit pCI-CAB063 bzw. pCI-CpB0704 transfizierten sowie experimentell mit *C. abortus* bzw. *C. pneumoniae* infizierte HeLa-Zellen nach der Zellernte aufgeschlossen und in eine Zellkern- und eine Zytoplasmafraktion getrennt. Durch die Verwendung eines weiteren Aufschlussverfahrens erhielt man zusätzlich weitere Fraktionen, wie die Fraktion mit Zellorganellen und die Fraktion mit dem Zytoskelett.

2.2.7.1 Zellfraktionierung und Proteinbestimmung

Um die einzelnen Zellkomponenten zu erhalten, wurden zwei verschiedene Zellfraktionierungskits (Proteo Extract® Subcellular Proteome Extraction Kit, Merck KGaA, Darmstadt und Qproteome Nuclear Protein Kit, Qiagen GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

Dabei wurden durch den Proteo Extract® Subcellular Proteome Extraction Kit folgende 4 Fraktionen isoliert:

- 1) Zytoplasmafraktion
- 2) Zellorganellenfraktion (einschließlich der Chlamydieneinschlusskörperchen bei infizierten Zellen)
- 3) Zellkernfraktion
- 4) Zytoskelettfraktion

Für diese Isolierungen wurden die Zellen mit unterschiedlichen Puffern aus dem Kit inkubiert. Dadurch wurde nach jedem Inkubationsschritt eine andere, der oben genannten Fraktion erhalten.

Mit Hilfe des Qproteome Nuclear Protein Kits wird die Zellkernfraktion von der Zytoplasmafraktion getrennt extrahiert. Hierfür wurden die Zellen mit einem hypotonischen Puffer inkubiert und anschließend die Plasmamembran lysiert. Durch einen Zentrifugationsschritt wurden die Zytoplasmaproteine von der Zellkernfraktion getrennt.

Anschließend wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Proteinkonzentrationsbestimmungskits (Quick Start™ Bradford Protein Assay, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen gemessen. Dafür wurde eine Standardkurve mit den mitgelieferten Standardkonzentrationen (BSA (Bovine Serum Albumin)) erstellt. Es wurden 7 unterschiedliche Konzentrationen mit dem Photometer bei 595 nm gemessen. Die zu messenden Proben wurden ebenfalls mit dem Photometer bei 595 nm gemessen. Mit Hilfe der Standardkurve konnte eine Gleichung für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erstellt werden.

2.2.7.2 SDS-PAGE und Westernblot

Für die Westernblotanalyse wurden die Proben mit Lämmli-Puffer bei 95 °C für 5 min erhitzt. Bei einer hohen Proteinausgangskonzentration wurde ein 2x Lämmli-Reduktionspuffer und bei einer niedrigen Proteinausgangskonzentration wurde 6x Lämmli-Reduktionspuffer verwendet. Nach dem Erhitzen wurden die Proben auf Eis abgekühlt.

Am Vortag wurde bereits das Gel für die SDS-PAGE gegossen. Hierzu wurde zuerst das Trenngel in die Gelkammer pipettiert und bis zum Aushärten mit H₂O überschichtet. Anschließend wurde das H₂O entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und der Kamm für die Probentaschen eingesetzt. Das komplette Gel wurde ÜN bei 4 °C vollständig ausgehärtet.

Die Gelkammer wurde in die Apparatur eingebaut und mit 1x Laufpuffer befüllt. Anschließend wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit Proben und einem Marker beladen. Nicht befüllte Taschen wurden ebenfalls mit verdünntem Lämmli-Reduktionspuffer beladen, um den sogenannten Smileyeffekt zu vermeiden. Die Gelelektrophorese wurde bei 300 V und 15 mA pro Gel gestartet. Nach einer Stunde wurde die Stromstärke auf 20 mA pro Gel erhöht.

Nachdem die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, wurden die Proteine durch Elektroblothing auf eine PVDF-Blotting-Membran übertragen. Dazu wurde die Kammer folgendermaßen aufgebaut:

Anode

6 Filterpapiere in Anode 1-Puffer getränkt

3 Filterpapiere in Anode 2-Puffer getränkt

PVDF-Membran mit Methanol aktiviert und in Anode 2-Puffer getränkt

Trenngel

9 Filterpapiere in Kathode-Puffer getränkt

Kathode

Es wurde eine Stromstärke von 90 mA pro Gel für 3 h angelegt. Anschließend wurde die Membran in 5 %iger Blockierlösung ÜN bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden. Danach wurde die Membran für 5 min mit TBS-T gewaschen.

Es erfolgte nun die Inkubation mit dem Primärantikörper. Dieser wurde 1:1000 mit TBS verdünnt und ÜN bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Danach wurde die Membran für 10 min mit TBS-T gewaschen. Der dazugehörige Sekundärantikörper wurde ebenfalls 1:1000 mit TBS-T verdünnt und 1 h bei RT mit der Membran inkubiert. Es erfolgten weitere Waschschrte mit TBS-T und ein letzter Waschrst mit TBS-T (ohne NaN₃) für je 10 min.

Die Detektion der gesuchten Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der Autoradiographie. Die Antigen-Antikörperbindung wurde mit der ECL (engl. Enhanced ChemiLuminescence)-Lösung als Substrat für das antikörpergekoppelte POX-Enzym (Peroxidase-Enzym) mit einem aufgelegten Röntgenfilm detektiert. Dazu wurden unterschiedliche Expositionszeiten verwendet, die abhängig von der Proteinkonzentration und von der Qualität des Primärantikörpers waren. Es wurde mit dem Röntgenfilmentwicklungsautomat Curix 60 gearbeitet.

2.2.8 Co-Immunpräzipitation und Identifizierung möglicher Bindungspartner

Um mögliche Bindungspartner des *C. abortus* Proteins CAB063 zu identifizieren wurden eine Co-Immunpräzipitation (Co-IP) mit anschließender SDS-PAGE, Silberfärbung und einer massenspektrometrischen Untersuchung durchgeführt.

In Abbildung 8 ist die Methode der der Co-IP in einer schematischen Übersicht dargestellt.

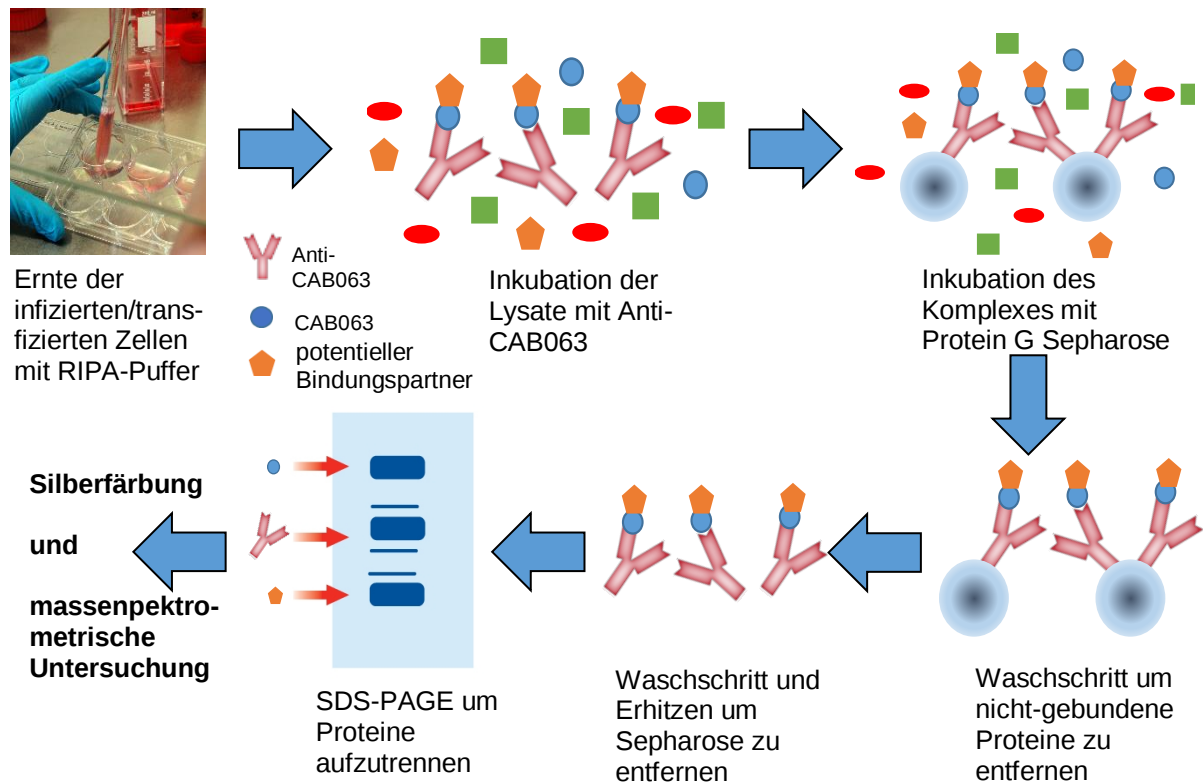


Abbildung 7: Schematische Darstellung der experimentellen Durchführung einer Co-Immunpräzipitation. Zuerst wurden die Zellen mit einem Lysispuffer geerntet und anschließend wurden die Lysate mit dem Antikörper Anti-CAB063 inkubiert. Dadurch wird es CAB063 ermöglicht, mit dem (den) potentiellen Bindungspartner(n) an den Antikörper zu binden. Dieser Komplex aus Antikörper mit CAB063 und Bindungspartner(n) wurde mit Protein G Sepharose inkubiert. Nicht-gebundene Proteine werden durch Waschen entfernt. Durch einen weiteren Waschschritt wurde die Sepharose entfernt und der Komplex Antikörper mit CAB063 und Bindungspartner(n) über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgten eine Silberfärbung und eine massenspektrometrische Untersuchung zur Identifizierung möglicher Bindungspartner.

2.2.8.1 Co-Immunpräzipitation

Für die Co-Immunpräzipitation wurden *C. abortus* infizierte, CAB063-transfizierte und unbehandelte HeLa-Zellen mit dem Zellschaber geerntet. Diese wurden bei 1300 rpm und RT für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das gewaschene Zellpellet mit RIPA-Puffer (engl. RadioImmunoPrecipitation Assay) für 30 min auf Eis lysiert. Danach wurde die Proteinkonzentration mit dem Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bestimmt (siehe Kapitel 2.2.7.1).

Es wurden 60 µg Proteinlysate pro Ansatz verwendet. Dem Ansatz wurden 20 µL Protein G Sepharose hinzugefügt und es erfolgte eine Über-Kopf-Inkubation für 2 h bei 4 °C um unspezifische Bindungen der Proteine an die Beads abzufangen. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 1300 rpm und 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde anschließend mit 2 µg des gewünschten Antikörpers (hier Anti-CAB063) ÜN bei 4 °C Über-Kopf inkubiert. Am nächsten Tag wurden 20 µL Protein G Sepharose hinzugegeben und 2 h bei 4 °C Über-Kopf inkubiert. Die Proben wurden bei 14000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert und das Pellet mit der Sepharose in 40 µL 2 x Lämmli-Reduktionspuffer (für die 1D SDS-PAGE) für 5 min bei 95 °C erhitzt. Für die 2D-SDS-PAGE wurde die Probe in 40 µL Rehydrationspuffer aufgenommen. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm und RT für 10 min. Danach konnte der Überstand auf ein SDS-Gel (1D oder 2D) aufgetragen werden.

2.2.8.2 SDS-PAGE, Silberfärbung und Trocknung

Die Durchführung einer 1D-SDS-PAGE ist bereits in Kapitel 2.2.8.2 beschrieben.

Für die 2D-SDS-PAGE wurde ein großes SDS-Gel mit einer kleinen und einer großen Probentasche gegossen. Die Probe wurde zuerst auf einen IPG- (immobilisierter pH-Gradient) Streifen in das Fach von Elektrode zu Elektrode pipettiert und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit Öl überdeckt und die aktive Rehydratation wurde für mindestens 12 h bei 50 V auf dem isoelektrischen Fokussierungsgerät (Protean IEF Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gestartet. Anschließend erfolgt die isoelektrische Fokussierung mit folgendem Programm:

Fokussierungsprogramm

1 h 150 V „rapid“

1 h 300 V „rapid“

1 h 1000 V „rapid“

1 h 8000 V „linear“

20000 Vh 8000 V „linear“

Hold 500 V „rapid“

Nach der Fokussierung erfolgte die Equibrillierung. Dazu wurde der Streifen 15 min bei RT mit DTT (100 mg in 10 mL Equibrillierungspuffer gelöst) und anschließend 15 min bei RT mit Jodacetamid (481 mg in 10 mL Equibrillierungspuffer gelöst) auf

dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Proteine in die zweite Dimension aufgetrennt. Hierfür wurde der Streifen vorsichtig in die große Tasche gegeben und anschließend mit 0,5 %iger Agarose (mit Bromphenolblau) überschichtet. Es wurden 12 W für 30 min pro Gel angelegt und anschließend auf 24 W erhöht.

Nach der SDS-PAGE erfolgte die Silberfärbung der Gele. Diese wurde mit einem kommerziellen Silberfärbungskit (FireSilver Fixierungskit, Proteome Factory AG, Berlin) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden die Gele fixiert, anschließend gewaschen und sensibilisiert. Dann erfolgte die Silberfärbung und Entwicklung. Zum Schluss wurde die Entwicklungsreaktion abgestoppt.

Die Trocknung des silbergefärbten Gels diente dem erleichterten Betrachten der Banden und Spots. Die getrockneten Banden und Spots wurden zur massenspektrometrischen Untersuchung (Proteome Factory AG, Berlin) versendet. Dazu wurde das Gel in 5 % Glycin für 30 min bei RT geschwenkt und anschließend zwischen Whatmannpapier und Gel Drying Film im Geltrockner für 2 h getrocknet. Die ausgewählten Banden bzw. Spots wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten.

2.2.8.3 Co-Immunpräzipitation und Westernblot-Analyse

Um die potentielle Bindung zwischen zwei Proteinen zu überprüfen, wurde ebenfalls eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt werden. Dazu wurden *C. abortus* infizierte, CAB063-transfizierte und unbehandelte HeLa-Zellen verwendet und wie in Kapitel 2.2.9.1 beschrieben behandelt. Auch die anschließende Co-Immunpräzipitation wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde der Antikörper gegen den zu überprüfenden Bindungspartner (hier Anti-Lamin A) verwendet.

Anschließend wurde eine 1D-SDS-PAGE wie in Kapitel 2.2.8.2 beschrieben durchgeführt. Danach erfolgte das Blotting auf die PVDF-Blotting-Membran und die Blockierung der unspezifischen Bindungen mit Hilfe einer Blockierungslösung. Es folgten mehrere Waschschrte, die Inkubation mit dem Primärantikörper (hier Anti-CAB063) und mit dem passenden Sekundärantikörper. Die Detektion erfolgte wie in Kapitel 2.2.8.2 beschrieben. Anschließend konnte eine Bindung der möglichen Bindungspartner erkannt werden.

2.2.9 Durchflusszytometrie

2.2.9.1 Färbung intrazellulärer Proteine

Um die Transfektionseffizienz bestimmen zu können, wurden transfizierte und nicht behandelte HeLa-Zellen (als Kontrolle) mit den entsprechenden Antikörpern angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Dazu wurde der Zellüberstand abgenommen und in sterilen Röhrchen gesammelt. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und zusammen mit dem gesammelten Überstand für 10 min bei 4 °C und 1300 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 4 % PFA resuspendiert und für 30 min auf Eis im Dunkeln fixiert. Es wurde FACS-Puffer hinzugegeben und für 10 min bei 4 °C und 1300 rpm zentrifugiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift mit dem Waschpuffer für Durchflusszytometrie (Permwash) für 10 min bei 4 °C und 1300 rpm. Anschließend wurde das Pellet 60 min bei RT und im Dunkeln mit dem Primärantikörper (Anti-CAB063, 1:50 mit Permwash verdünnt) inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschrift mit Permwash. Der Sekundärantikörper (FITC-Donkey-Anti-Rabbit, 1:250 mit Permwash verdünnt) wurde 30 min bei RT und im Dunkeln mit dem Pellet inkubiert. Es erfolgten ein weiterer Waschschrift mit Permwash und ein Waschschrift mit FACS-Puffer. Anschließend wurde nach der Zentrifugation (10 min bei 4 °C und 1300 rpm) das Pellet in FACS-Puffer gelöst und in ein FACS-Röhrchen überführt.

Die Proben konnten dann mit dem Durchflusszytometer (BD FACSCalibur™, BD Biosciences Europe, Heidelberg) analysiert werden und mit dem Programm FlowJo ausgewertet werden.

2.2.9.2 Annexin V -, Propidiumiodid- und FLICA-Färbung

Die Annexin V- und FLICA (engl. Fluorescent Labeled Inhibitors of Caspase)-Färbung diente zum Nachweis von apoptotischen Zellen. Dabei bindet Annexin V an das Phosphatidylserin, welches bei apoptotischen Zellen auf der äußeren Zellmembran vorkommt. Bei FLICA handelt es sich um Inhibitoren, die rot fluoreszieren, wenn sie kovalent an aktive Caspasen binden. Hierbei handelt es sich um die Caspasen 1, 2, 3/7, 6, 8, 9, 10 und 13.

Mit dem Farbstoff PI (Propidiumiodid) werden tote Zellen nachgewiesen. Das PI gelangt nur bei toten Zellen in den Zellkern und färbt dort Zellkernproteine an.

Es wurden transfizierte (pCI-CAB063 und pCI-GFP) und unbehandelte HeLa-Zellen mit Trypsin geerntet. Zusätzlich wurden als Positivkontrolle für die Apoptose Zellen mit Staurosporin behandelt und als Positivkontrolle für den Zelltod wurden Zellen bei 60 °C erhitzt.

Die Färbungen mit Annexin-V, FLICA und PI erfolgten gemäß den jeweiligen Angaben der Hersteller.

Für die Annexin-V- und PI-Färbungen wurde der Zellkulturüberstand gesammelt und die Zellen mit Trypsin geerntet. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt (10 min, RT, 1300 rpm) und das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen. Eine weitere Zentrifugation erfolgte für 10 min bei RT und 1300 rpm. Danach wurden für jeden Ansatz $1,0 \times 10^5$ Zellen in Bindungspuffer aufgenommen und in Rundbodenröhrchen (Falcon, FACS-Röhrchen) verteilt. Anschließend wurden 2,5 µL Annexin V^{APC} hinzugegeben und im Dunkeln bei RT für 15 min inkubiert. Für die PI-Färbung wurden 12,5 µL PI-Färbelösung hinzugegeben und ebenfalls im Dunkeln bei RT für 15 min inkubiert. Anschließend wurde Bindungspuffer hinzugegeben und die Proben konnten analysiert werden.

Für die FLICA-Färbung wurde der Zellkulturüberstand gesammelt, die Zellen trypsiniert und alles zusammen zentrifugiert (5 min, RT, 1000 rpm). Anschließend wurde das Zellpellet in Zellkulturmedium gelöst und das Reagenz FLICA (30x) hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 30 min. Anschließend wurde gewaschen und zentrifugiert (5 min, 1000 rpm). Das Zellpellet wurde in Apoptosepuffer aufgenommen und für 10 min bei 37 °C inkubiert, um ungebundenes FLICA-Reagenz zu entfernen. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift mit Zentrifugation (5 min, 1000 rpm). Das Zellpellet wurde in Apoptosepuffer aufgenommen und konnte anschließend analysiert werden.

Anschließend wurden die Proben mit dem Durchflusszytometer (BD FACSCalibur™, BD Biosciences Europe, Heidelberg) analysiert und mit dem Programm FlowJo ausgewertet. Für die Darstellung der Ergebnisse wurde der Median und der Standardfehler mit „Microsoft Excel“ berechnet (siehe Kapitel 2.3). Zusätzlich wurde die Signifikanz bestimmt (siehe Kapitel 2.3).

2.2.10 Elektronenmikroskopie

Für die Untersuchung der ultramorphologischen Struktur der Wirtszellen und zur weiteren Überprüfung der Lokalisation von CAB063 wurden zum einen die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und zum anderen die Immunelektronenmikroskopie verwendet. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit der Zentralen Einrichtung Elektronenmikroskopie der Universität Ulm unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Paul Walther durchgeführt.

2.2.10.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zuerst wurden in 12-Loch-Gewebekulturplatten, in die zuvor ein Saphirplättchen gelegt wurde, HeLa-Zellen eingesät. Die Saphirplättchen (0,05 mm dick und 3 mm Durchmesser) wurden zuvor mit einer 20 nm dicken Kohleschicht bedampft und mit UV-Licht sterilisiert. Die Zellen wurden anschließend mit den Vektoren pCI-CAB063 und pCI-GFP transfiziert (siehe Kapitel 2.2.5). Nicht-infizierte und nicht-transfizierte HeLa-Zellen fungierten als Negativkontrolle.

Anschließend wurden die Saphirplättchen nach 24 h, 48 h und 72 h p. i. (post Infektion) mit einem Hochdruckgefriergerät (Wohlwend Compact 01, Engineering Office M. Wohlwend GmbH, Sennwald) innerhalb von 10 ms unter einem Druck von 2000 bar auf -180 °C bis -200 °C mit flüssigem Stickstoff cryofixiert. Zwischen zwei Saphirplättchen wurde ein in Hexadecene getauchter Goldring als Abstandshalter gebracht. Die tiefgefrorenen Proben wurden in flüssigem Stickstoff gelagert bis eine Gefriersubstitution durchgeführt wurde.

Für die Gefriersubstitution wurden die Proben in die -90 °C kalte Gefriersubstitutionslösung gegeben. Dann wurde diese Lösung mit Hilfe eines Gefriersubstitutionsgerätes innerhalb von 17 h auf 0 °C erwärmt. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei RT inkubiert und dann zweimal mit wasserfreiem Aceton gewaschen.

Danach wurden die Proben in drei Schritten eingebettet. Zuerst wurden sie für 1 h in einer 50 %igen Eponharz/Acetonmischung gelagert und dann für 6 h in 100 % Eponharz. Die Auspolymerisierung erfolgte für 48 h bei 60 °C.

Es wurden mit dem Ultramikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar) ca. 70 nm dicke Schnitte angefertigt, die auf ausglühte Kupfernetzchen gezogen und mit Bleicitrat nachkontrastiert wurden. Die Proben wurden anschließend mit dem

Transmissionselektronenmikroskop (JEM-1400, JOEL (Germany) GmbH, Eching) bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV betrachtet. Die digitalen Bilder wurden mit der Software iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster) gemacht.

Zusätzlich wurden pro Experiment und Ansatz je 30 Zellkerne auf ihre Kernkörperchen untersucht. Dazu wurden die Kernkörperchen pro Zellkern ausgezählt. Die Auswertung erfolgte mit „Microsoft Excel“ (siehe Kapitel 2.3).

2.2.10.2 Immunelektronenmikroskopie

Für die Immunelektronenmikroskopie wurden wie bei der TEM bewachsene Saphirplättchen mit transfizierten und nicht-transfizierten HeLa-Zellen inokuliert. Die geernteten Saphirplättchen wurden bis zum „high pressure freezing“ wie bei der TEM (siehe Kapitel 2.2.10.1) behandelt. Die Gefriersubstitutionslösung enthielt hier kein Osmiumtetroxid und die Endtemperatur nach 17 h betrug -20 °C statt 0 °C. Es wurde zweimal mit Aceton bei -20 °C gewaschen und anschließend wurden die Proben schrittweise für 2 h mit zur Hälfte in Aceton verdünntem LR-Gold-Einbettmedium und dann für 1 h mit unverdünntem LR-Gold-Einbettmedium eingebettet. Durch das UV-Licht ÜN und bei -18 °C erfolgte die Auspolymerisierung. Die Schnittdicke betrug ca. 90 nm. Die Schnitte wurden auf ausglühte Kupfernetzchen gezogen.

Für die Immunogoldfärbung wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 4 %igem Goat-Serum (verdünnt mit PBS) für 10 min bei RT geblockt. Anschließend wurde der Primärantikörper (1:50 in 4 %igem Goat-Serum verdünnt) für 30 min bei RT inkubiert. Es erfolgten 6 Waschschrte á 2 min mit 4 %igem Goat-Serum. Danach wurden die Proben mit dem Gold-konjugierten Sekundärantikörper (1:50 in PBS verdünnt) ebenfalls für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten wieder 6 Waschschrte á 2 min mit PBS. Die Proben wurden dann mit 1 % Glutaraldehydlösung (in PBS) für 5 min bei RT fixiert. Es erfolgten 4 Waschschrte á 2 min mit H₂O. Danach erfolgte eine Nachkontrastierung mit 1 % Uracilacetatlösung (in H₂O) für 5 min bei RT. Die Proben wurden anschließend mit H₂O gewaschen und getrocknet und sie konnten nun ebenfalls mit dem Transmissionselektronenmikroskop (JEM-1400, JOEL (Germany) GmbH, Eching) bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV untersucht werden.

2.3 Statistik

Für die Auswertung der Bestimmung der Apoptose- und Zelltodraten wurden aus den Messungen jeweils der Median berechnet. Außerdem wurde der Standardfehler „Standard Error of the Mean (SEM)“ für die Standardabweichung herangezogen. Dieser wurde in Form eines Fehlerbalkens dargestellt. Des Weiteren wurde die Signifikanz mit dem „Wilcoxon-Mann-Whitney-U“-Test bestimmt. Hierbei handelt es sich um einen Homogenitätstest für unabhängige Stichproben und um das nichtparametrische Äquivalent zum t-Test. Ein kleiner Stichprobenumfang reichte hierfür aus. Es wurde die Signifikanz zweier Verteilungen auf ihre Übereinstimmung überprüft. Das heißt es wurde getestet, ob die zwei Verteilungen zu einer Grundgesamtheit gehören. Die gesamte Auswertung erfolgte mit „Microsoft Excel“.

Für die Auszählung der Kernkörperchen wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils 30 Zellkerne pro Ansatz ausgezählt. Anschließend wurde der Median pro Ansatz berechnet. Die Mediane wurde zusammengefasst und es entstanden die Gruppe „ ≤ 2 Kernkörperchen“ und „ ≥ 3 Kernkörperchen“. Diese wurde in ein Kreisdiagramm zur besseren Veranschaulichung aufgetragen.

3. Ergebnisse

3.1 Experimentelle Infektion von HeLa-Zellen mit Chlamydien

Die sichere experimentelle Infektion von HeLa 299-Zellen mit Chlamydien ist die unbedingte Voraussetzung für Lokalisierungsexperimente, funktionelle und ultramorphologische Untersuchungen.

In Anlehnung an frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde ein Infektionsmodell von *Chlamydia abortus* und *Chlamydia pneumoniae* etabliert. Dafür wurden HeLa-Zellen mit einer MOI 5 (engl. Multiplicity of Infection) mit *C. abortus* oder *C. pneumoniae* inokuliert. Nach 12, 24, 48 und 72 Stunden wurden die experimentell *C. abortus* infizierten Zellen und nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden die experimentell *C. pneumoniae* infizierten Zellen mit Methanol fixiert und die Chlamydien dargestellt. Zur Darstellung der Chlamydien wurde ein FITC-konjugierter Anti-LPS-Antikörper (Pathfinder® Antikörper) verwendet. Die Gegenfärbung der Wirtszelle erfolgte mit Evansblue. Die eu- und prokaryotische DNS wurde mit Hilfe des Farbstoffes DAPI dargestellt.

3.1.1 Immunfluoreszenzdarstellung des Entwicklungszyklus von *Chlamydia abortus*

In Abbildung 8 sind die unterschiedlichen Stadien des Entwicklungszyklus von *C. abortus* mittels Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt. Wie erwartet zeigen sich 12 Stunden nach der experimentellen Infektion Elementarkörperchen außerhalb der Zellen als auch kleine Retikularkörperchen innerhalb der Zelle. 24 Stunden nach der Infektion hat die Mehrheit der Chlamydien die Wirtszellen infiziert und liegen als Retikularkörperchen in kleinen Einschlusskörperchen in den Zellen vor. 48 Stunden nach der Infektion sind deutliche und große Einschlusskörper in den HeLa-Zellen zu erkennen. Sie nehmen neben dem Wirtszellkern den gesamten Platz in der Zelle ein, so dass nur noch ein schmaler Streifen des Zytoplasmas erkennbar ist. Die Zellen sind 72 Stunden nach der Infektion nahezu komplett zerstört. Noch sind vereinzelt infizierte Zellen mit Einschlusskörper zu sehen. Ein Großteil der Chlamydien ist als Elementarkörperchen freigesetzt worden.

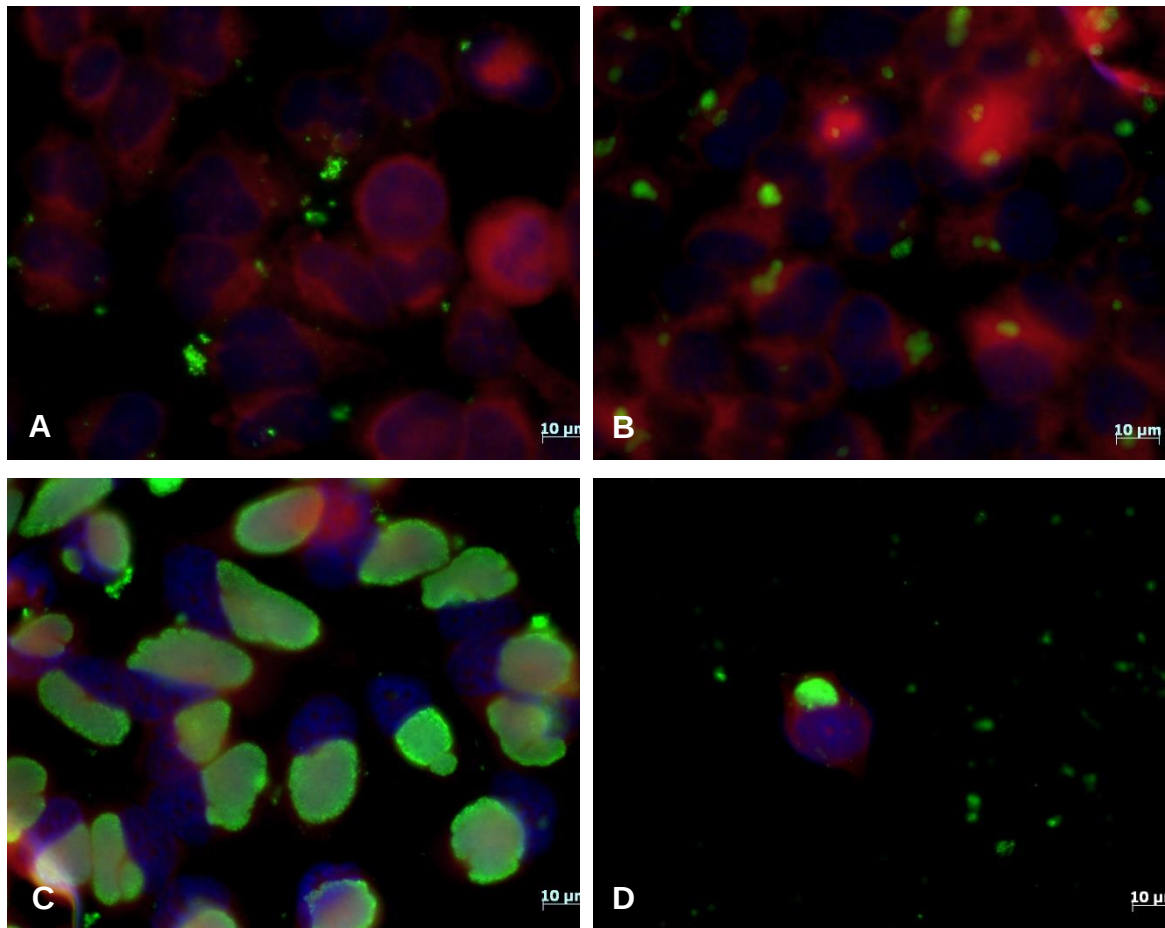


Abbildung 8: Immunfluoreszenzdarstellung des Entwicklungszyklus von *Chlamydia abortus*. Die HeLa-Zellen wurden experimentell mit *C. abortus* infiziert (MOI = 5). Die Chlamydien stellen sich durch den FITC-konjugierten Anti-LPS-Antikörper (Pathfinder®) leuchtend grün dar und das Zytoplasma der Wirtszelle durch Evansblue rot. Die DNS wurde mit DAPI dargestellt (blau). (A) Experimentell *C. abortus* infizierte HeLa-Zellen 12 h p. I. (B) Experimentell *C. abortus* infizierte HeLa-Zellen 24 h p. I. (C) Experimentell *C. abortus* infizierte HeLa-Zellen 48 h p. I. (D) Experimentell *C. abortus* infizierte HeLa-Zellen 72 h p. I.

3.1.2 Immunfluoreszenzdarstellung des Entwicklungszyklus von *Chlamydia pneumoniae*

Der Entwicklungszyklus von *Chlamydia pneumoniae* wurde ebenfalls mittels der Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt (Abbildung 9). 24 Stunden nach der experimentellen Infektion finden sich Elementarkörperchen außerhalb der Zellen und vereinzelt kleine Retikularkörperchen in kleinen Einschlusskörperchen innerhalb der Wirtszellen. 48 Stunden nach der Infektion sind ein Großteil der Zellen durch die Mehrheit der Chlamydien infiziert. Die Einschlusskörper sind 72 Stunden nach der Infektion deutlich in den Zellen erkennbar, vergleichbar mit dem Bild von

experimentell *C. abortus* infizierten Zellen 48 Stunden nach der Infektion. Das Zytosol wurde durch die Einschlusskörper fast vollständig verdrängt. Nach 96 Stunden sind nur noch vereinzelt infizierte Zellen erkennbar. Die übrigen Zellen sind nach der Freisetzung der Chlamydien weitestgehend zerstört.

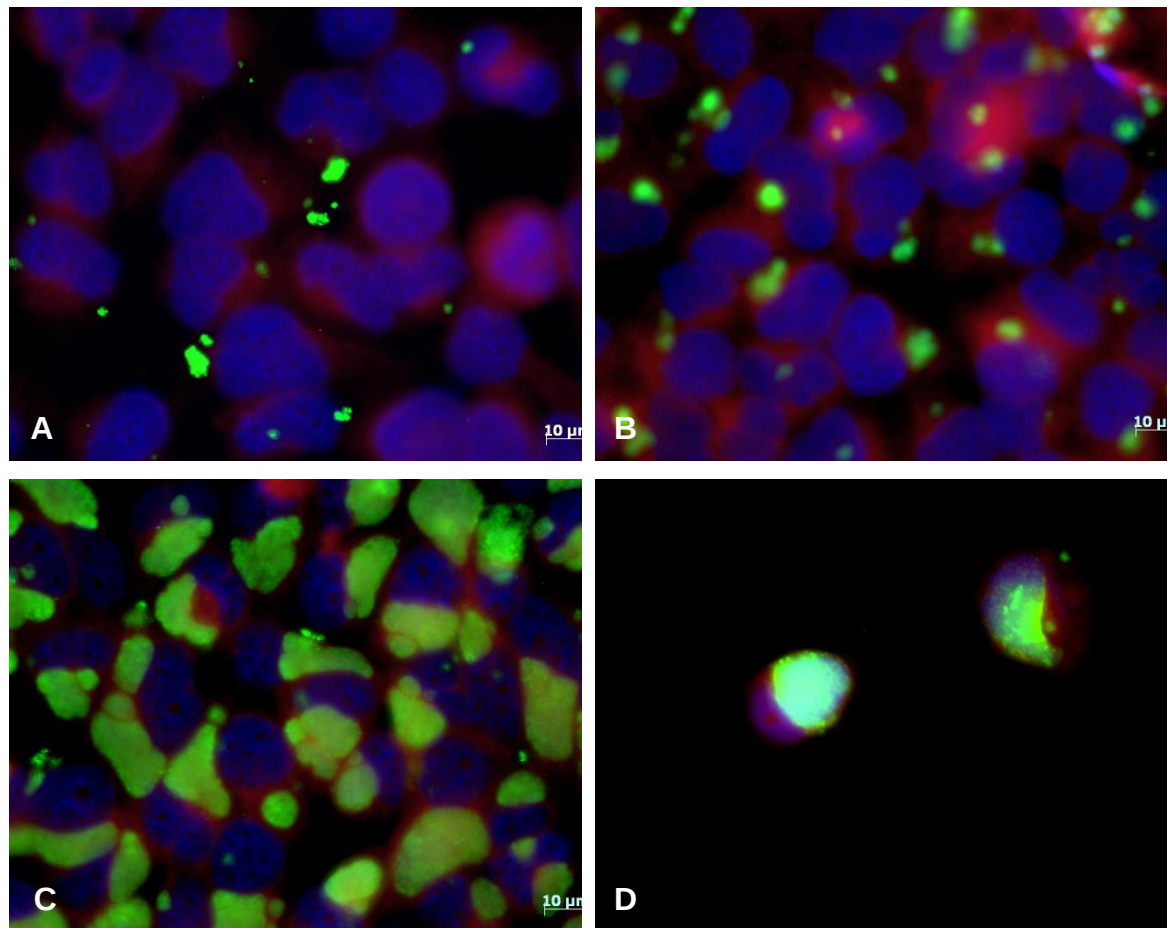


Abbildung 9: Immunfluoreszenzdarstellung des Entwicklungszyklus von *Chlamydia pneumoniae*. Die HeLa-Zellen wurden experimentell mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI = 5). Die Chlamydien stellen sich durch den FITC-konjugierten Anti-LPS-Antikörper (Pathfinder®) leuchtend grün dar und das Zytosol der Wirtszelle durch Evansblue rot. Die DNS wurde mit DAPI dargestellt (blau). **(A)** Experimentell *C. pneumoniae* infizierte HeLa-Zellen 24 h p. I. **(B)** Experimentell *C. pneumoniae* infizierte HeLa-Zellen 48 h p. I. **(C)** Experimentell *C. pneumoniae* infizierte HeLa-Zellen 72 h p. I. **(D)** Experimentell *C. pneumoniae* infizierte HeLa-Zellen 96 h p. I.

3.2 Herstellung und Überprüfung der Vektorplasmide für die Transfektion von Wirtszellen

Die Herstellung eines Vektorplasmids wird exemplarisch an dem Beispiel des Vektorplasmids pCI-CpB0704 dargestellt.

Für die erfolgreiche Klonierung des Vektorplasmids wurden passende Oligonucleotide (Primer) mit Hilfe einer entsprechenden Software (CloneManager 7) entworfen (siehe 2.2.3.1). Das gewünschte Gen (hier: *CpB0704*) wurde aus chlamydialer DNS (hier: *Chlamydia pneumoniae*) mittels PCR (Polymerasenkettenreaktion) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde zur Überprüfung auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 10). Es zeigte sich eine deutliche Bande bei 1000 bp, was in etwa der Größe von *CpB0704* entspricht. Die Visualisierung der Bande erfolgte durch Ethidiumbromid.

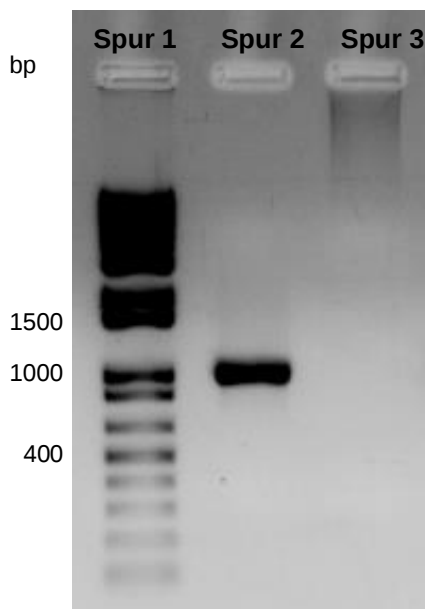


Abbildung 10: Produkt der PCR (Polymerasenkettenreaktion) auf einem 1%igen Agarosegel. Das Amplifikat des *CpB0704* Gens wird auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (Spur 2). Der DNS-Längenstandard ist in Spur 1 zu sehen und die Negativkontrolle „H₂O“ ist in Spur 3 aufgetragen worden. Produktgröße: 1000 bp

Für die anstehende Ligation wurden der Vektor und das PCR-Produkt mit den passenden Restriktionsenzymen (hier KpnI und SalI) behandelt. Die unterschiedlichen Ligationsansätze wurden in chemisch-kompetente *E. coli* DH5α transformiert. Es wurde von unterschiedlichen Kolonien (Klone) Flüssigkulturen angelegt und anschließend Plasmidisolierungen durchgeführt. Die isolierten Plasmide wurden auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 11). Der

unverdaute Kontrollvektor (hier: pCI) diene als Kontrolle. Es zeigte sich bei 9 Plasmidisolierungen eine Bande, die ca. 1000 bp größer war als der Kontrollvektor.

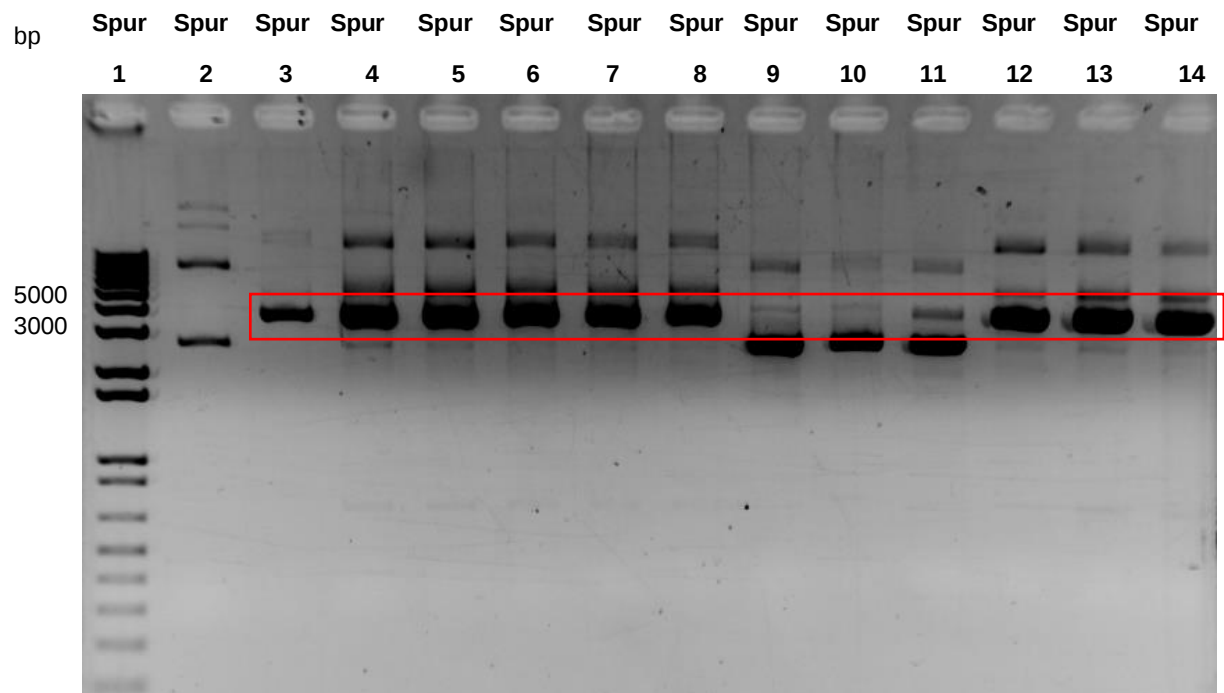


Abbildung 11: Plasmidisolierung ausgewählter Klone der Transformation von pCI-CpB0704 in *E. coli* DH5 α auf einem 1%igen Agarosegel. In Spur 1 wurde der DNS-Längenstandard aufgetragen und in Spur 2 ist der Kontrollvektor pCI zu sehen. In den darauffolgenden Spuren (Spur 3 – Spur 14) wurden die Plasmide aus den unterschiedlichen Flüssigkulturen der Klone aufgetragen. Die Plasmide von Spur 3 bis Spur 8 und von Spur 12 bis Spur 14 sind ca. 1000 bp größer als das Kontrollplasmid und sollten das Insert enthalten (roter Kasten).

Von den vermutlich positiven Plasmiden (9 von 12 Plasmide) wurde ein Kontrollverdau mit den o.g. Restriktionsenzymen durchgeführt, um zu überprüfen, ob das Insert im Vektor enthalten ist (siehe Abbildung 12). Bei acht von neun Plasmiden fand sich eine Bande mit einer Größe von ca. 4000 bp und damit vermutlich das Vektorplasmid mit dem gewünschten Insert *CpB0704*.

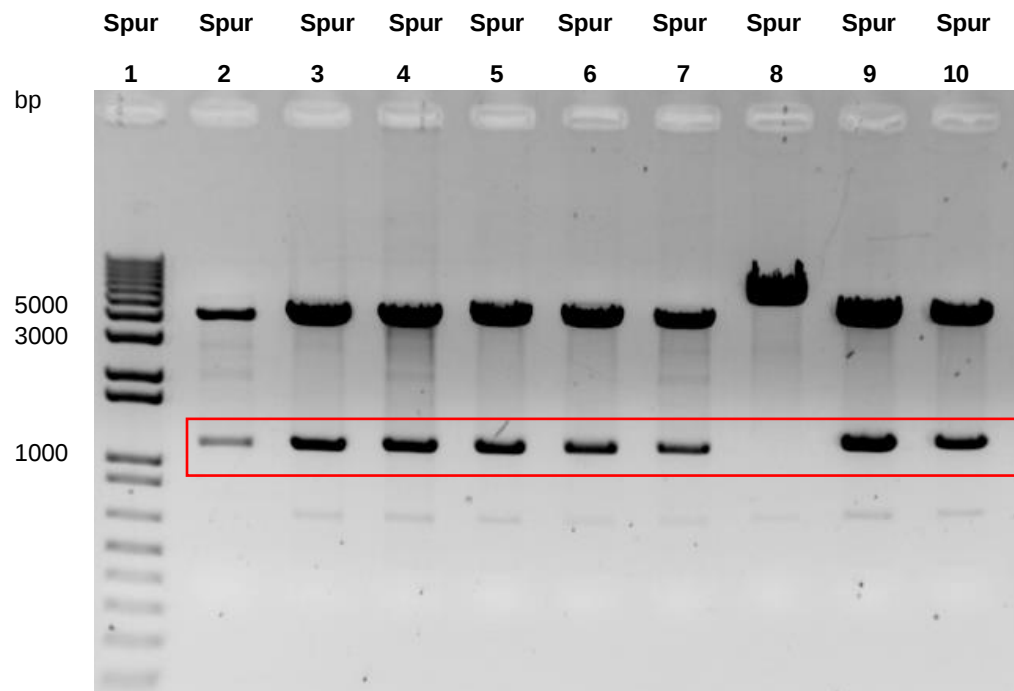


Abbildung 12: Kontrollverdau ausgewählter Plasmide wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. In Spur 1 ist der DNS-Längenstandard zu sehen. In den Spuren 2 – 10 wurden die verdauten Plasmide auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Mit Ausnahme des Plasmids in Spur 8 sind jeweils eine Bande bei ca. 4000 bp und eine Bande bei ca. 1000 bp zu sehen (roter Kasten).

Von zwei Plasmiden erfolgte eine Überprüfung der Sequenz des mutmaßlichen Inserts mittels Sanger-Sequenzierung. Es fand sich zu *CpB0704* eine Sequenzhomologie von 99 %, sodass von den entsprechenden Kolonien mit Nachweis des gewünschten Vektorplasmids Stammkulturen angelegt werden konnten, um weitere Plasmidisolierungen durchzuführen. Damit konnte pCI-CpB0704 für die weitere Transfektion von Wirtszellen eingesetzt werden (siehe 2.2.3.4)

Bei den anderen in dieser Arbeit verwendeten Vektoren (pCI-CAB063 und pCI-GFP) wurde analog verfahren (Daten nicht gezeigt).

3.3 Intrazelluläre Lokalisierung des *Chlamydia abortus* Proteins CAB063

Für die weitere Charakterisierung des *Chlamydia abortus* Proteins CAB063 interessierte zunächst die intrazelluläre Lokalisierung dieses Proteins, da man sich davon Aufschluss über eine mögliche Funktion des CAB063 erhoffte.

Für die Darstellung von CAB063 in der Wirtszelle wurden die Verfahren der direkten Immunfluoreszenz sowie der Immunelektronenmikroskopie gewählt. Neben den bildgebenden Verfahren wurden zur Lokalisation des Proteins die Wirtszellfraktionierung und anschließende Westernblot-Analysen durchgeführt.

3.3.1 Intrazelluläre Lokalisierung von CAB063 mittels direkter Immunfluoreszenz

Bei der Lokalisierung des Proteins mittels direkter Immunfluoreszenz wurden zum einen experimentell *Chlamydia abortus* infizierte HeLa-Zellen nach 48 h p. I. (post Infektion) und zum anderen pCI-CAB063 transfizierte HeLa-Zellen nach 48 h p. Tr. (post Transfektion) untersucht.

Die experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen wurden mit Methanol fixiert, dann mit dem Primärantikörper Anti-CAB063 und anschließend mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen) inkubiert. Die Gegenfärbung unspezifischer Proteine des Zellhintergrunds erfolgte mit dem Farbstoff Evansblue (in Rot). Die pro- und eukaryotische DNS wurde mit dem Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) dargestellt. Wie in Abbildung 13 dargestellt fanden sich vor allem im Einschlusskörper kräftige Signale für CAB063. Darüber hinaus ließ sich CAB063 auch im Zellkern nachweisen. In nicht-infizierten Zellen war kein Signal für CAB063 zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Somit war in experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen eine Lokalisation des CAB063 im Einschlusskörper und im Zellkern zu lokalisieren.

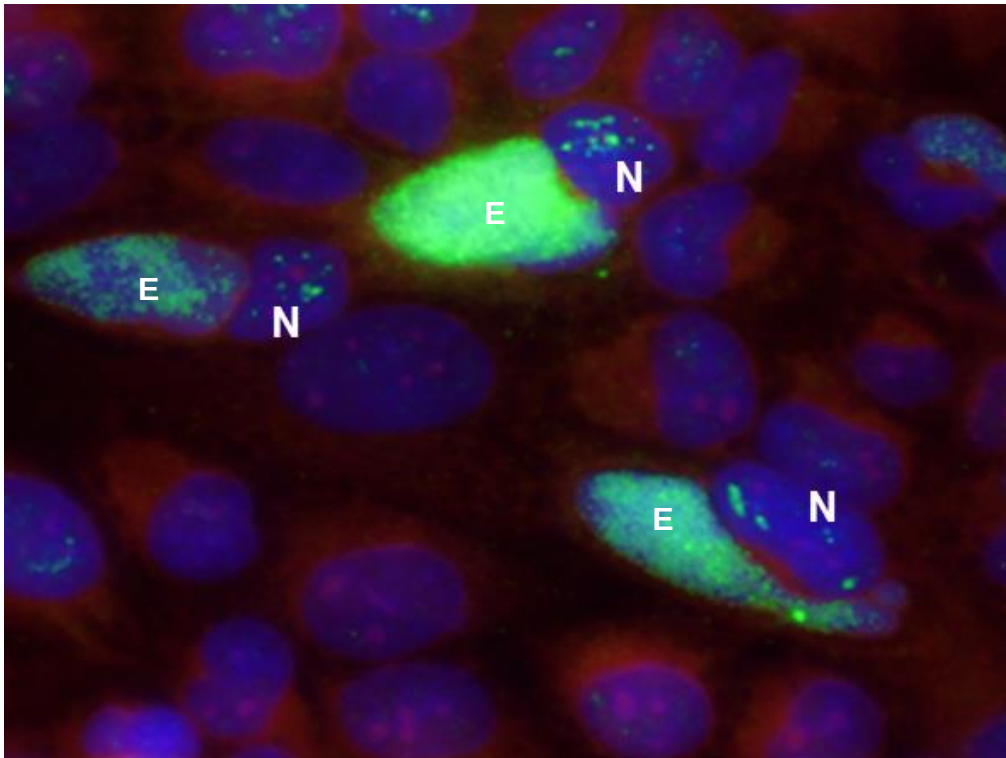


Abbildung 13: Intrazelluläre Lokalisierung von CAB063 in experimentell mit *Chlamydia abortus* infizierten HeLa-Zellen nach 48 h p. i. CAB063 (grün) wurde vor allem im Einschlusskörper (E), aber auch im Wirtszellkern (N) detektiert. In Blau ist die pro- und eukaryotische DNS dargestellt und rotgefärbt ist das Wirtszellzytoplasma. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei Versuchen.

Die pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen wurden, ebenso wie die experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen, mit Methanol fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem Primär- und Sekundärantikörper. Auch hier lässt sich erkennen, dass das CAB063 im Zellkern der Wirtszelle detektiert werden konnte (Abbildung 14). Allerdings reicherten sich die Fluoreszenzsignale hauptsächlich an der Kernmembran an. Zusätzlich lässt sich eine morphologische Veränderung des Wirtszellkerns beobachten. Es wurden bei transient CAB063 exprimierenden Zellen Zellkerne beobachtet, die nicht mehr rund waren, sondern Einschnürungen der Zellkernmembran aufwiesen. Auf diese Besonderheit wird in Kapitel 3.5.3 näher eingegangen.

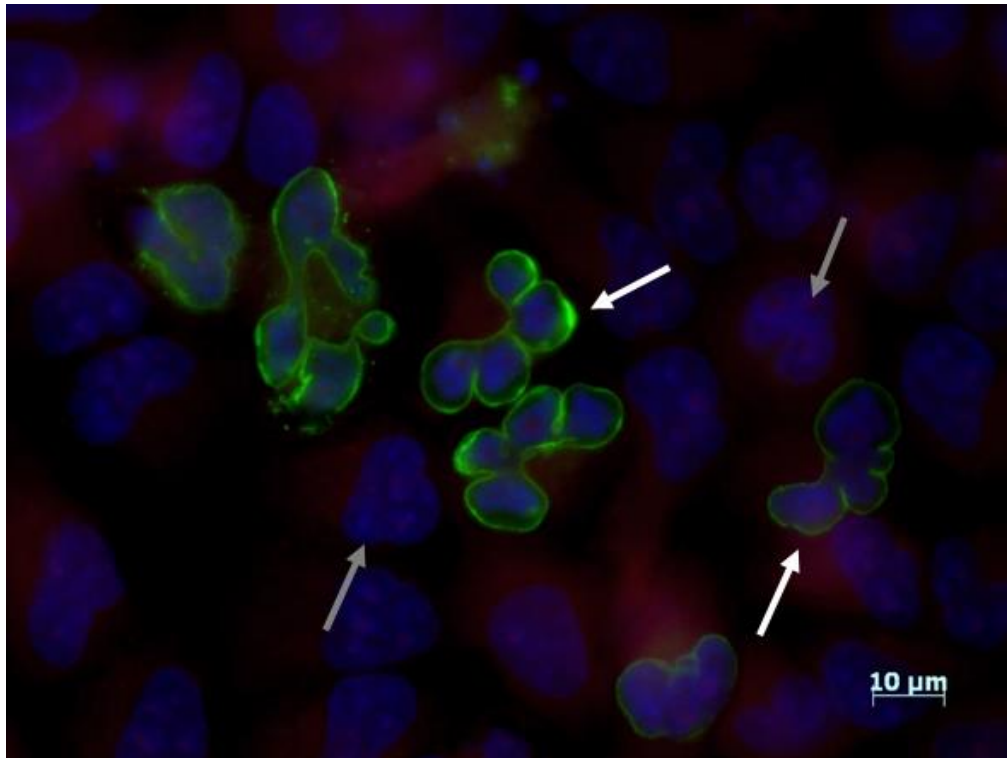


Abbildung 14: Intrazelluläre Lokalisation von CAB063 in pCI-CAB063 transfizierte HeLa-Zellen 48 h p. Tr. CAB063 (grün) konnte vor allem in der Zellkernmembran detektiert werden (weiße Pfeile). Die eukaryote DNS (blau) wurde mit DAPI angefärbt. Unspezifische Proteine wurden durch Evansblue (blau) angefärbt. Das Wirtszellzytoplasma wurde in Rot dargestellt. Nicht-transfizierte HeLa-Zellen sind mit einem grauen Pfeil markiert. Darüber hinaus konnte eine Einschnürung der Zellkerne bei transient CAB063 exprimierenden Zellen beobachtet werden. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei Versuchen.

Durch die intrazelluläre Markierung von CAB063 mit dem Primärantikörper Anti-CAB063 (aus dem Kaninchen) und der anschließenden Markierung einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen) wurde die Transfektionseffizienz von pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Ca. 12 % der transfizierten HeLa-Zellen waren CAB063 positiv (Abbildung 15 B). Durch Messung von nicht-transfizierten HeLa-Zellen wurde die Spezifität des Anti-CAB063 Antikörpers überprüft. Es wurden keine CAB063-positiven HeLa-Zellen in nicht-transfizierten HeLa-Zellen detektiert (Abbildung 15 A).

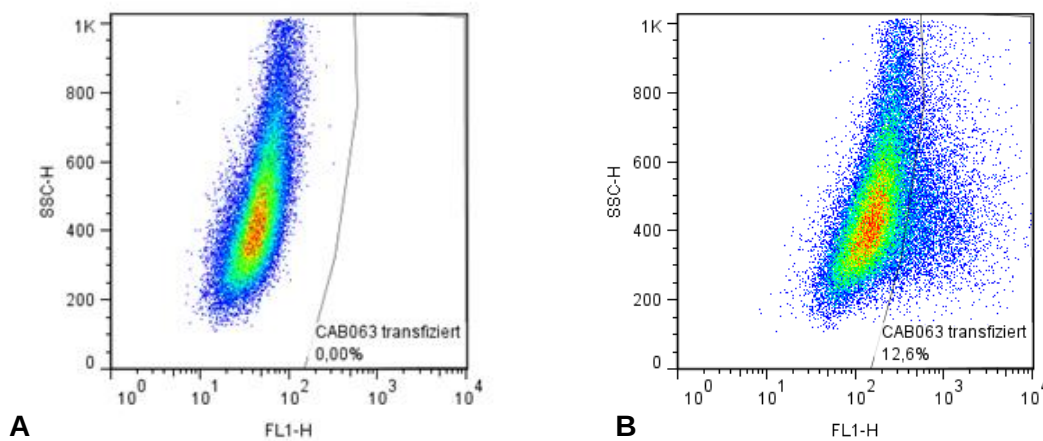


Abbildung 15: Bestimmung der Transfektionseffizienz in pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen mittels Durchflusszytometrie. (A) nicht-transfizierte HeLa-Zellen (B) pCI-CAB063 transfizierte HeLa-Zellen. SSC-H = Granularität der Zellen; FL1-H = FITC-Kanal, 525 nm Wellenlänge. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei Versuchen.

3.3.2 Intrazelluläre Lokalisierung von CAB063 mittels Immunelektronenmikroskopie

Eine weitere bildgebende Methode um das *C. abortus* Protein CAB063 zu lokalisieren ist die Immunelektronenmikroskopie. Bei dieser Methode wurden cryofixierte CAB063-transfizierte HeLa-Zellen mit einem in Kaninchen generierten Primärantikörper (hier Anti-CAB063) und dann mit einem goldgelabelten Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen) inkubiert. Die Proben wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop betrachtet (siehe 2.2.10.2).

Eine exemplarische transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme zeigt Abbildung 16 A. Dabei sind goldmarkierte Partikel in der CAB063-transfizierten HeLa-Zelle im Zellkern zu erkennen (Abbildung 16 B). Darüber hinaus können goldmarkierte Partikel in der Zellkernmembran nachgewiesen werden (Abbildung 16 C). Bei nicht-transfizierten Zellen waren keine goldmarkierten Partikel in der Zelle zu finden (Daten nicht gezeigt).

Ein weiteres morphologisches Phänomen von pCI-CAB063 transfizierten Zellen wird in dieser Aufnahme ebenfalls deutlich. Es sind auch hier Einschnürungen des Wirtszellkerns zu erkennen. Auf diese wird in Kapitel 3.5.3 näher eingegangen.

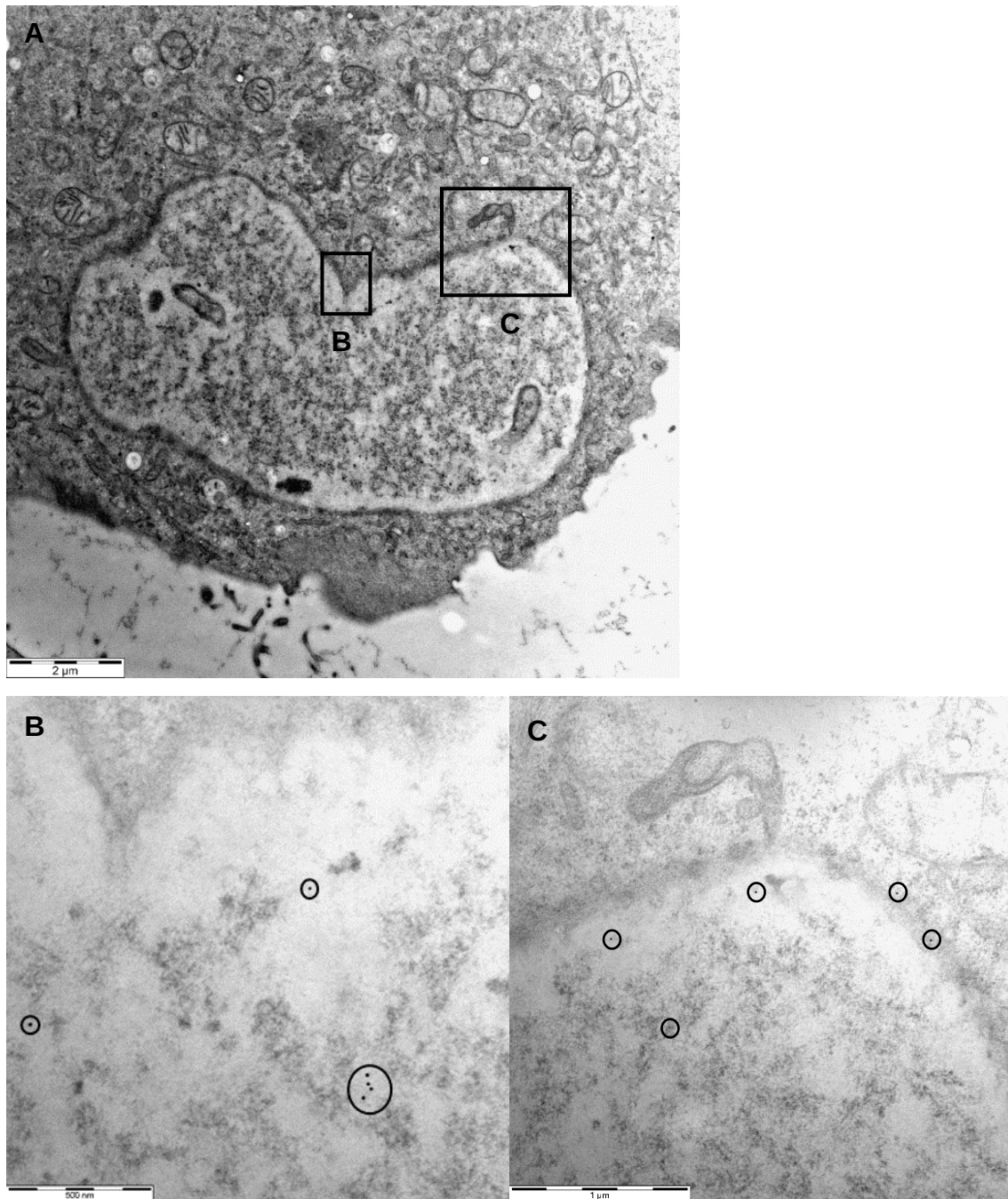


Abbildung 16: Immunelektronenmikroskopische Darstellung von CAB063 in pCI-CAB063 transfizierte HeLa-Zellen. In Bild **A** ist der Zellkern einer pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zelle zu erkennen (8 000x Vergrößerung). Für eine bessere Darstellung wurden 2 Ausschnitte mit einer höheren Vergrößerung betrachtet. In Ausschnitt **B** (14 000x Vergrößerung) werden die Goldpartikel im Zellkern und in Ausschnitt **C** (12 000x Vergrößerung) werden weitere Goldpartikel in der Zellkernmembran detektiert. Dargestellt ist eine repräsentative Zelle von insgesamt drei Experimenten.

3.3.3 Intrazelluläre Lokalisierung von CAB063 nach Zellfraktionierung mittels Westernblot-Analyse

Neben den bildgebenden Verfahren bot die Westernblot-Analyse fraktionierter Wirtszellen eine weitere Möglichkeit, die Lokalisierung des *Chlamydia abortus* Proteins CAB063 zu untersuchen. Hierfür wurden experimentell *C. abortus* infizierte HeLa-Zellen als Ganzzelllysate und zusätzlich mit Hilfe eines Fraktionierungskits geerntet. Es wurden vergleichend das Ganzzelllysate und die Kernfraktion der Wirtszellen analysiert. Dafür wurden die Proteinpräparationen mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle fungierte rekombinantes CAB063.

Die vergleichende Westernblot-Analyse zeigt im Ganzzelllysate eine deutliche Bande in Höhe von 52 kDa (Abbildung 17). Dies entspricht dem Molekulargewicht von CAB063. Zusätzlich ist eine deutliche Bande in der Kernfraktion auf Höhe des rekombinanten CAB063 zu erkennen. In der nicht-infizierten Kontrolle weder eine Bande im Ganzzelllysate noch in der Kernfraktion zu erkennen.

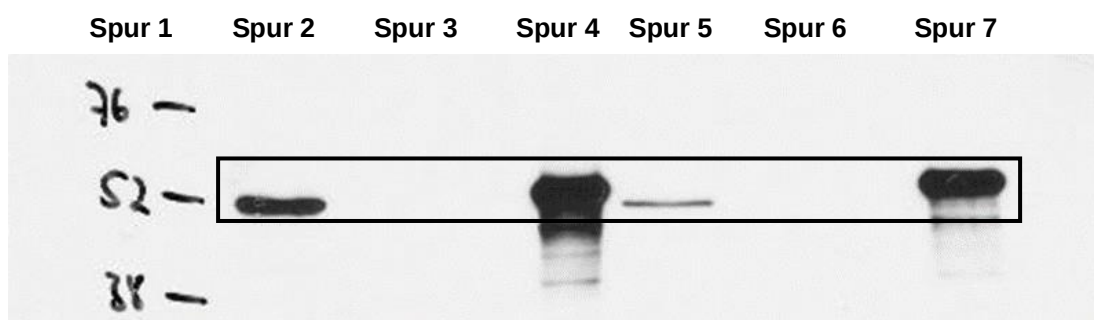


Abbildung 17: Lokalisierung von CAB063 nach Zellfraktionierung mittels Westernblot-Analyse. In Spur 1 wurde der Proteingrößenstandard (kDa) aufgetragen. Das Ganzzelllysate von experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen ist in Spur 2 und das Ganzzelllysate von nicht-infizierten HeLa-Zellen ist in Spur 3 aufgetragen. Das rekombinante CAB063 ist in den Spuren 4 und 7 zu sehen. Auf die Spur 5 wurde die Kernfraktion von experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen und in Spur 6 die Kernfraktion von nicht-infizierten HeLa-Zellen aufgetragen. **Schwarzer Kasten:** Proteinbande bei 52 kDa. Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot von insgesamt drei Versuchen.

3.4 Mögliche Bindungspartner des *Chlamydia abortus* Proteins CAB063

3.4.1 Identifizierung der möglichen Bindungspartner mittels Co-Immunopräzipitation in experimentell infizierten HeLa-Zellen

Um einen möglichen Bindungspartner identifizieren zu können, wurden Co-Immunopräzipitationen mit Ganzzelllysaten und Kernfraktionen durchgeführt. Hierfür wurden die Lysate mit dem Antikörper Anti-CAB063 und mit Sepharose inkubiert (siehe Kapitel 2.2.8.1). Durch eine anschließende SDS-PAGE wurden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt und mittels Silberfärbung dargestellt (Abbildung 18). In den Ganzzelllysaten von experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen wurde eine Bande auf Höhe von ca. 68 kDa detektiert, die beim Ganzzelllysate von nicht-infizierten HeLa-Zellen nicht zu erkennen ist. Auf Höhe von ca. 52 kDa ist eine prominente Bande in allen Proben, einschließlich Negativkontrolle, zu sehen. Dahinter dürfte sich am ehesten CAB063 (Molekulargewicht: 54 kDa) sowie vor allem Anteile des Anti-CAB063-Antikörpers verbergen. Eine weitere Bande ist bei den Proben der Kern- und Ganzzelllysate auf Höhe von ca. 45 kDa zu erkennen. Eine weitere diskrete Bande bei ca. 38 kDa ist bei der Zellkernfraktion und den Ganzzelllysaten von experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen zu sehen. Die für die infizierten Zellen spezifischen Proteinbanden auf Höhe von ca. 68 kDa und ca. 38 kDa wurden massenspektrometrisch analysiert.

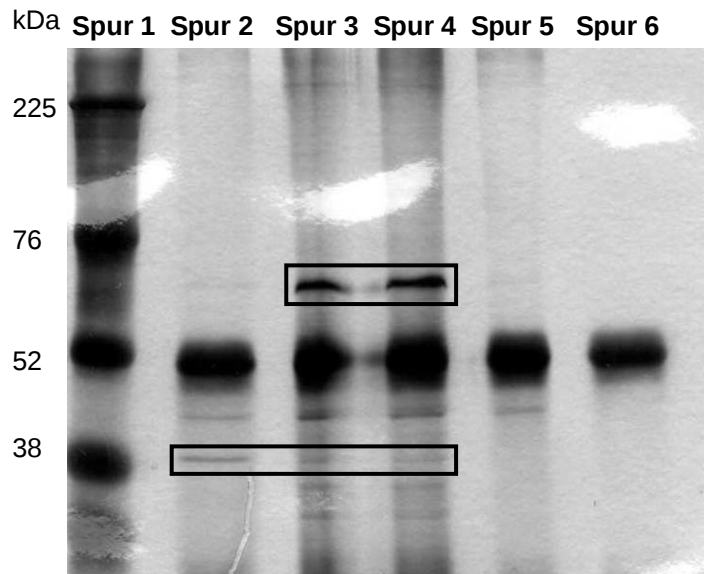


Abbildung 18: Silberfärbung der 1D-SDS-PAGE der Co-Immunpräzipitation von Ganzzelllysaten mit Anti-CAB063. In Spur 1 wurde der Proteingrößenstandard (kDa) aufgetragen. In Spur 2 ist die Zellkernfraktion von experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen aufgetragen worden. Das Ganzzelllysat von experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen wurde in den Spuren 3 und 4 aufgetragen. Als Negativkontrollen dienten das Ganzzelllysat von nicht-infizierten HeLa-Zellen in Spur 5 und H₂O in Spur 6. Die markierten Banden (**schwarzer Kasten**) bei ca. 68 kDa und 38 kDa wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei Versuchen.

Die massenspektrometrische Analyse ergab für die Proteinbanden die folgenden Proteinbande in Höhe von ca. 68 kDa zwei Proteinidentifizierungen: zum einen wurde das humane Protein Transketolase (Molekulargewicht: 68 kDa) und zum anderen das *Chlamydia abortus* Protein Chaperon Protein DnaK (Heat Shock Protein (HSP) 70) identifiziert. Mit einer Proteingröße von 38 kDa wurde das MOMP (engl. Major Outer Membrane Protein) von *Chlamydia abortus* durch die massenspektrometrische Analyse identifiziert.

Um die möglichen Bindungspartner genauer bestimmen zu können, wurde das Ganzzelllysat von experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen mit Hilfe der 2D-SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle diente ein Ganzzelllysat von nicht-infizierte HeLa-Zellen, das ebenfalls über eine 2D-SDS-PAGE aufgetrennt wurde. Anschließend erfolgte die Silberfärbung der Proteine und die massenspektrometrische Analyse. Für die Auswahl der zu untersuchenden Spots

wurden die Gele von infizierten und nicht-infizierten Proben verglichen. Dabei wurden mindestens 3 Spots (Spot 1, 2 und 5) gefunden, die nicht auf dem Gel von nicht-infizierten HeLa-Zellen zu sehen waren (Abbildung 19).

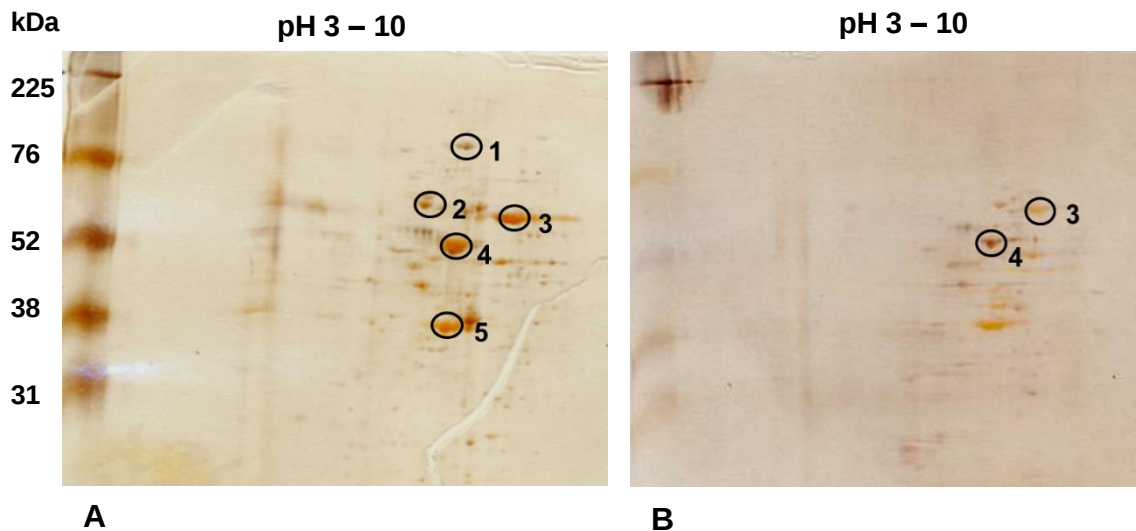


Abbildung 19: Silberfärbung der 2D-SDS-PAGE der Co-Immunpräzipitationen der Ganzzelllysate von experimentell *Chlamydia abortus* infizierten HeLa-Zellen und nicht-infizierten HeLa-Zellen mit Anti-CAB063. In Bild (A) ist die 2D-SDS-PAGE des Ganzzelllysats von experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen zu sehen. Im Vergleich zum Ganzzelllysat von nicht-infizierten HeLa-Zellen (B) fanden sich 3 eindeutig unterscheidbare Proteinspots (Spot 1, 2 und 5), die massenspektrometrisch untersucht wurden. Die Proteinspots 3 und 4 waren in beiden Ansätzen zu finden.

Durch die massenspektrometrische Analyse wurden folgende Proteine identifiziert. Es wurden als polymorphes Membranprotein D (PmpD) Proteinspot 1, als Chaperon Protein DnaK (Heat Shock Protein 70) Proteinspot 2 und als Elongationsfaktor Tu Proteinspot 5 aus *Chlamydia abortus* identifiziert. Aufgrund des isoelektrischen Punktes und der Proteingröße konnten zum einen die Transketolase (Proteinspot 3) und CAB063 (Proteinspot 4A) und der Antikörper Anti-CAB063 (Proteinspot 4B) ohne massenspektrometrische Untersuchung bestimmt werden. Die Transketolase und der Antikörper Anti-CAB063 wurden ebenfalls bei nicht-infizierten HeLa-Zellen detektiert.

3.4.2 Identifizierung der möglichen Bindungspartner mittels Co-Immunopräzipitation im Zellkern von experimentell infizierten HeLa-Zellen

Die Auftrennung von Kernfraktionen aus experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen mittels 2D-SDS-PAGE führte zu keinen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt). Um mögliche weitere Bindungspartner im Zellkern der Wirtszelle zu finden, wurde die Zellkernfraktion von experimentell *C. abortus* infizierter HeLa-Zellen zusätzlich mit rekombinantem CAB063 inkubiert.

Es wurden zum einen die Zellkernfraktionen von experimentell *C. abortus* infizierten und nicht-infizierten HeLa-Zellen mit dem rekombinanten CAB063 inkubiert und anschließend eine Co-Immunopräzipitation mit Anti-CAB063 durchgeführt. Zum anderen wurden auch die einzelnen Zellkernfraktionen für die Co-Immunopräzipitation verwendet. Anschließend erfolgte eine Auftrennung der Proteine über eine 1D-SDS-PAGE. Die Zellkernfraktionen, die mit rekombinantem CAB063 inkubiert wurden, wurden doppelt aufgetragen um mehr Ausgangsmaterial für die massenspektrometrische Identifizierung zu bekommen. Nach der Auftrennung wurden die Proteine mit Silber angefärbt (Abbildung 20). Im Vergleich zu den Kontrollen (Zellkernfraktion von nicht-infizierten HeLa-Zellen und H₂O Probe) war bei den Zellkernfraktionen, die mit rekombinanten CAB063 inkubiert wurden, und bei der Zellkernfraktion von experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen eine Bande bei ca. 70 kDa zu sehen, die auch massenspektrometrisch analysiert wurde. Relativ prominente aber unspezifische Banden, da sie auch in den Negativkontrollen auftraten, waren in Höhe von ca. 40 und ca. 60 kDa zu erkennen. Auf eine weitere Identifizierung wurde verzichtet, da es sich am ehesten um CAB063 sowie um Anteile des Anti-CAB063-Antikörpers handeln dürfte.

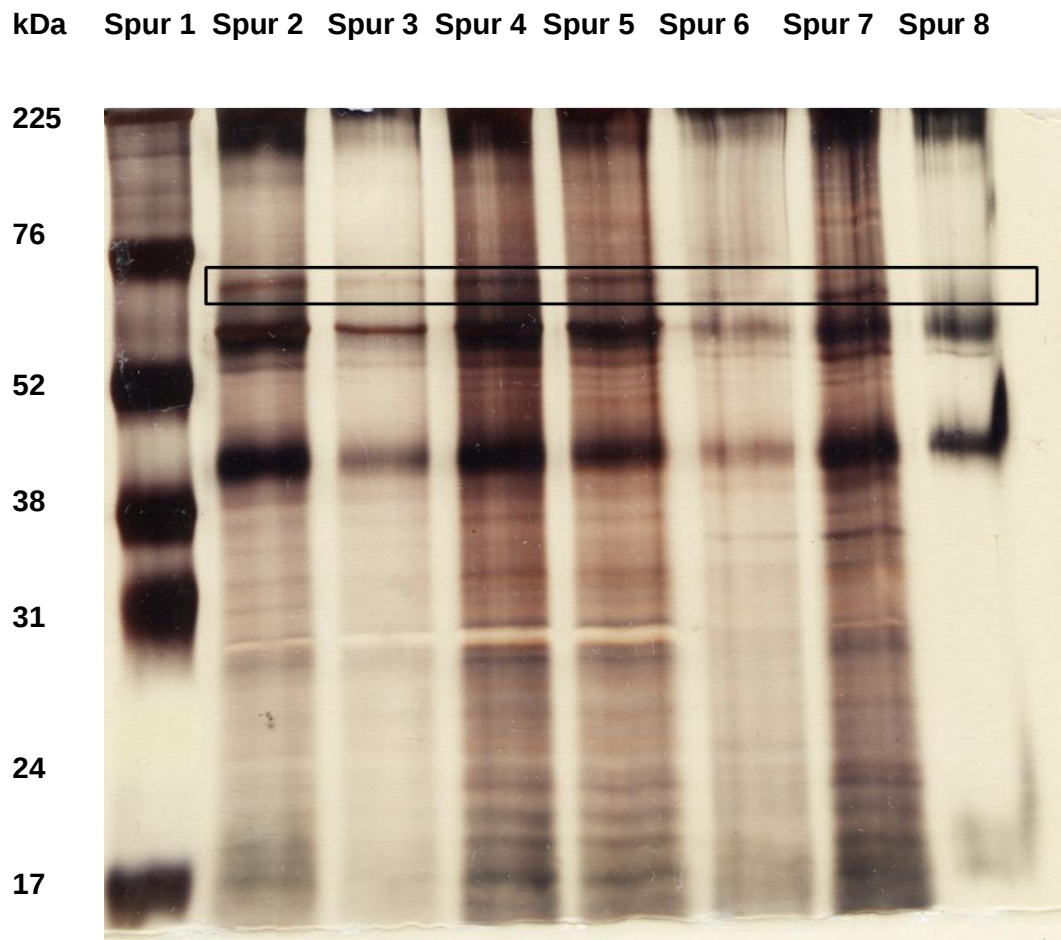


Abbildung 20: Silberfärbung der 1D-SDS-PAGE der Co-Immunpräzipitation von Zellkernfraktionen mit Anti-CAB063. Spur 1: Proteingrößenstandard. Spuren 2 und 3: Zellkernfraktion von experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen mit rekombinantem CAB063 inkubiert. Spuren 4 und 5: Zellkernfraktion von nicht-infizierten HeLa-Zellen mit rekombinantem CAB063 inkubiert. Spur 6: Zellkernfraktion von nicht-infizierten HeLa-Zellen. Spur 7: Zellkernfraktion von experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen. Spur 8: H₂O Kontrolle. **Schwarzer Kasten:** Proteinbande bei ca. 70 kDa.

Durch die massenspektrometrische Analyse wurden folgende Proteine identifiziert. Pre-Lamin A/C, heterogenes Kernribonukleoprotein K und ATP-unabhängige RNS Helicase DDX5. Es handelt sich um Proteine humanen Ursprungs.

3.4.3 Darstellung von Lamin A als möglichen Bindungspartner von CAB063

Um den potentiellen Bindungspartner Lamin A/C von CAB063 darzustellen, wurden sowohl pCI-CAB063 transfizierte HeLa-Zellen als auch experimentell *Chlamydia abortus* infizierte HeLa-Zellen mit den Antikörpern Anti-CAB063 und Anti-Lamin A inkubiert. Zur Kontrolle dienten nicht-infizierte HeLa-Zellen. Durch eine

Überlagerung der einzelnen Antikörper konnte eine Kolokalisation der beiden Proteine bestätigt werden.

In Abbildung 21 (A) reicherte sich der Antikörper Anti-CAB063 vor allem in der Zellkernmembran von pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen nach 48 h p. Tr. an. Der Antikörper Anti-Lamin A bindet ebenso wie der DNS-Farbstoff DAPI im Zellkern (B und C). Die Überlagerung der einzelnen Bilder zeigt eine Kolokalisation von CAB063 und Lamin A entlang der Zellkernmembran (D).

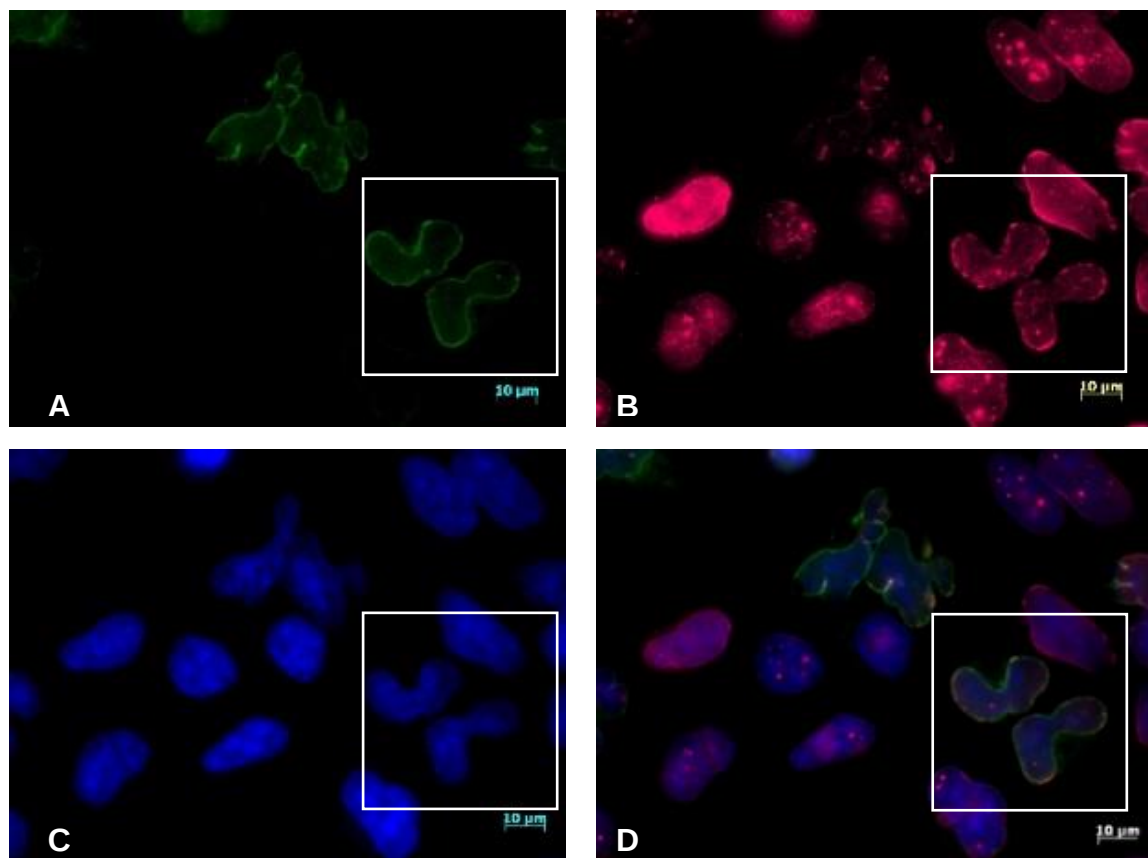


Abbildung 21: Kolokalisation von CAB063 und Lamin A in pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen. (A) Darstellung von CAB063 (grün) mit Primärantikörper Anti-CAB063 (Kaninchen) und Alexa Fluor® 488-gekoppeltem Sekundärantikörper. (B) Darstellung von Lamin A (rot) mit Primärantikörper Anti-Lamin A (Maus) und Alexa Fluor® 647-gekoppeltem Sekundärantikörper. (C) Darstellung von eukaryoter DNS (blau) mittels DAPI. (D) Überlagerung der Bilder A, B und C zeigt Kolokalisation von CAB063 und Lamin A entlang der Zellkernmembran (siehe exemplarisch **weißer Kasten**). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei Versuchen.

Ein ähnliches Bild ergab sich in experimentell *C. abortus* infizierten Zellen. Eine Detektion von CAB063 war im Zellkern der Wirtszelle infizierter HeLa-Zellen 48 h p. i. möglich (Abbildung 22 A). Lamin A und die DNS wurden im Wirtszellkern

gefunden (B und C). Bei der Überlagerung der Einzelbilder ergibt sich eine Kolokalisation von CAB063 und Lamin A im Zellkern (D).

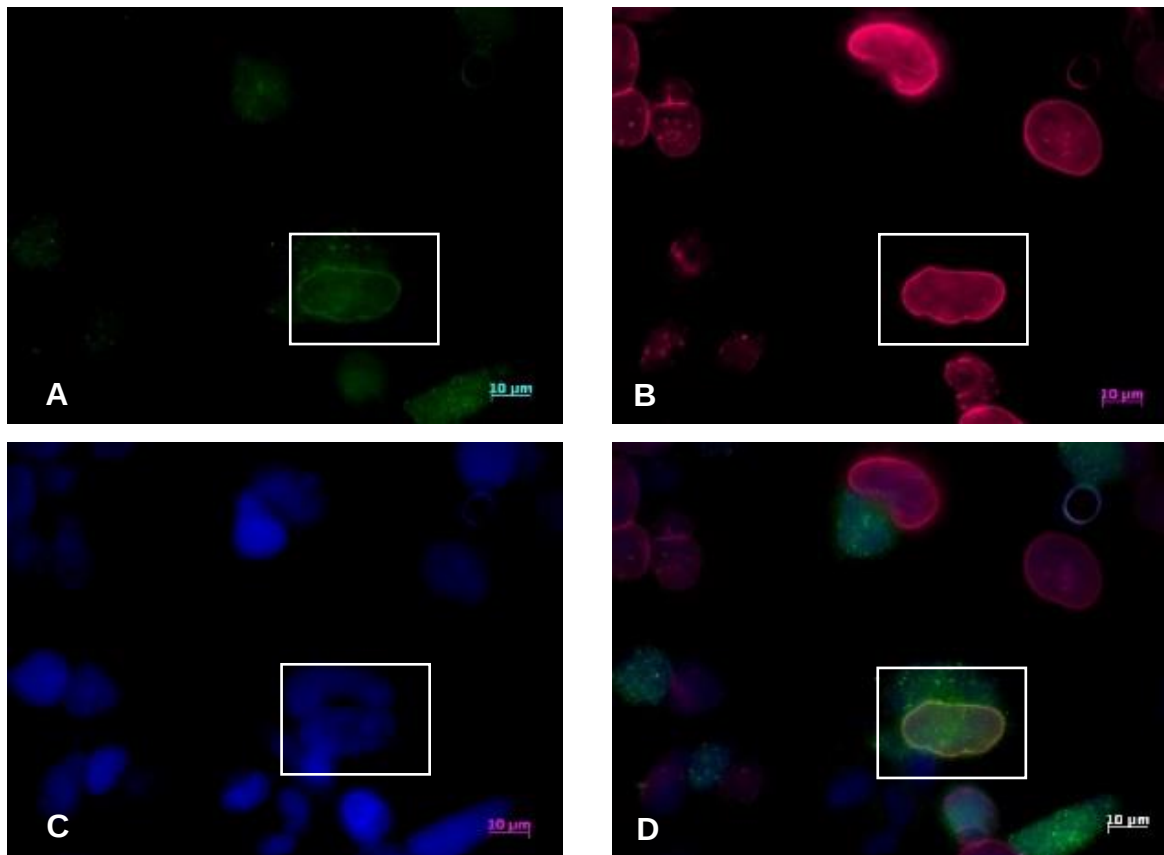


Abbildung 22: Kolokalisation von CAB063 und Lamin A in experimentell *Chlamydia abortus* infizierten HeLa-Zellen. (A) Darstellung von CAB063 (grün) mit Primärantikörper (Kaninchen) und Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488. (B) Darstellung von Lamin A (rot) mit Primärantikörper (Maus) und Sekundärantikörper Alexa Fluor® 647. (C) Darstellung von eukaryotischer DNS (blau) mittels DAPI. (D) Überlagerung der Bilder A, B und C zeigt Kolokalisation von CAB063 und Lamin A entlang der Zellkernmembran (siehe exemplarisch **weißer Kasten**). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei Versuchen.

Zur Kontrolle wurden nicht-infizierte HeLa-Zellen nach 48 h p. A. mit Methanol fixiert und anschließend mit Anti-CAB063, Anti-Lamin A und DAPI gefärbt. Es zeigte sich keine Reaktion des Antikörpers Anti-CAB063 und somit war auch keine Überlagerung zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

3.4.4 Verifizierung von Lamin A als Bindungspartner von CAB063 mittels Immunoblot-Analyse

Zur Verifizierung des Lamin A/C (Molekulargewicht 70 kDa) als Bindungspartner von CAB063 (Molekulargewicht 54 kDa) erfolgte eine Co-Immunopräzipitation mit

anschließender Westernblot-Analyse von experimentell *C. abortus* infizierten und pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen. Dafür wurden eine Co-IP mit dem Antikörper Anti-CAB063 und die Westernblot-Analyse mit dem Antikörper Anti-Lamin A durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Co-IP mit dem Antikörper Anti-Lamin A und eine anschließende Westernblot-Analyse mit dem Antikörper Anti-CAB063 gemacht.

In Abbildung 23 und 24 sind die Ergebnisse repräsentativer Immunoblot-Untersuchungen dargestellt. Die Co-IP mit Anti-CAB063 und anschließender Westernblot-Analyse mit Anti-Lamin A zeigte eine erwartete Proteinbande mit einer Größe von ca. 70 kDa bei den Ganzzelllysaten von experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen und pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen (Abbildung 23). Diese Proteinbande befand sich auf vergleichbarer Höhe wie die Proteinbande von rekombinantem Lamin A. Bei den Kontrollen (Ganzzelllysate von nicht-infizierten HeLa-Zellen, H₂O und rekombinantem CAB063) waren keine Proteinbanden auf dieser Höhe zu sehen.



Abbildung 23: Westernblot-Analyse mit Anti-Lamin A nach Co-Immunopräzipitation mit Anti-CAB063. In Spur 1 wurde der Proteingrößenstandard (kDa) aufgetragen. Es gibt deutlich erkennbare Banden in Höhe von ca. 70 kDa bei den Ganzzelllysaten von experimentell *C. abortus* infizierten und pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen (Spuren 2 und 3). In den Negativkontrollen (Ganzzelllysate von nicht-infizierten HeLa-Zellen, H₂O und rekombinantem CAB063) sind keine Banden auf Höhe von 70 kDa zu erkennen (Spuren 4, 5 und 6). Rekombinantes Lamin A (70 kDa) diente als Positivkontrolle (Spur 7). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei Versuchen.

Umgekehrt wurde eine Co-Immunopräzipitation mit den gleichen Ganzzelllysaten und dem Antikörper Anti-Lamin A (Abbildung 24) durchgeführt. Die Westernblot-Analyse der gefundenen Proteine erfolgte mit Anti-CAB063. Auf einer Höhe von ca. 54 kDa war eine deutliche Proteinbande beim Ganzzelllysate von experimentell *C.*

abortus infizierten HeLa-Zellen und eine diskrete Proteinbande beim Ganzzelllysate von pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen zu erkennen. Diese Proteinbanden waren auf ähnlicher Höhe wie die Proteinbande von rekombinantem CAB063. Bei den Kontrollen (Ganzzelllysate von nicht-infizierten HeLa-Zellen, H₂O und rekombinantem Lamin A) waren keine Proteinbanden mit dieser Proteingröße zu sehen.



Abbildung 24: Westernblot-Analyse mit Anti-CAB063 nach der Co-Immunopräzipitation mit Anti-Lamin A. Der Proteingrößenstandard (kDa) wurde in Spur 1 aufgetragen. Beim Ganzzelllysate von experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen (Spur 2) ist eine deutlich erkennbare Bande und beim Ganzzelllysate von pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen (Spur 3) ist eine diskrete Bande bei ca. 54 kDa zu sehen. Es sind keine Banden in den Negativkontrollen (Spur 3 = nicht-infizierte HeLa-Zellen, Spur 5 = H₂O und Spur 6 = rekombinantes Lamin A) zu erkennen. Als Positivkontrolle diente rekombinantes CAB0563 (54 kDa) in Spur 7. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei Versuchen.

3.5 Einfluss von CAB063 auf Apoptose und Zelltod

Um den Einfluss von CAB063 auf das Apoptose- und Zelltodverhalten von HeLa-Zellen zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen von transfizierten HeLa-Zellen durchgeführt. Darüber hinaus wurde das Apoptose- und Zelltodverhalten von experimentell *C. abortus* infizierter HeLa-Zellen untersucht.

Für die Bestimmung der Apoptoserate wurde zum einen der Anteil der Annexin V positiven und zum anderen der Anteil der FLICA positiven HeLa-Zellen bestimmt. Die Zelltodrate wurde mit dem Farbstoff PI (Propidiumiodid) bestimmt.

Zusätzlich wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie ultramorphologische Veränderungen in pCI-CAB063- bzw. pCI-GFP-transfizierten und nicht-infizierten HeLa-Zellen untersucht.

3.5.1 Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Analyse von Apoptose und Zelltod in *Chlamydia abortus* infizierten Zellen

In experimentell *Chlamydia abortus* infizierten HeLa-Zellen wurden die Apoptose- und Zelltodrate nach 0 h, 24 h und 48 h p. I. (post Infektion) untersucht. Zur Kontrolle dienten nicht-infizierte HeLa-Zellen. Es wurden die einzelnen Marker jeweils getrennt betrachtet.

Abbildung 25 zeigt die Rate der Annexin V positiven HeLa-Zellen. Dabei ist zu erkennen, dass die Apoptoserate nach 0 h und 24 h p. I. bei experimentell *C. abortus* infizierten und nicht-infizierten HeLa-Zellen vergleichbar bei 10 % ist. Nach 48 h p. I. stieg die Apoptoserate bei experimentell infizierten HeLa-Zellen auf 40 % und bei nicht-infizierten HeLa-Zellen auf 20 %. Die Apoptoserate nach 48 h p. I. unterscheidet sich damit signifikant ($p \leq 0,02$) zwischen experimentell *C. abortus* infizierten und nicht-infizierten HeLa-Zellen.

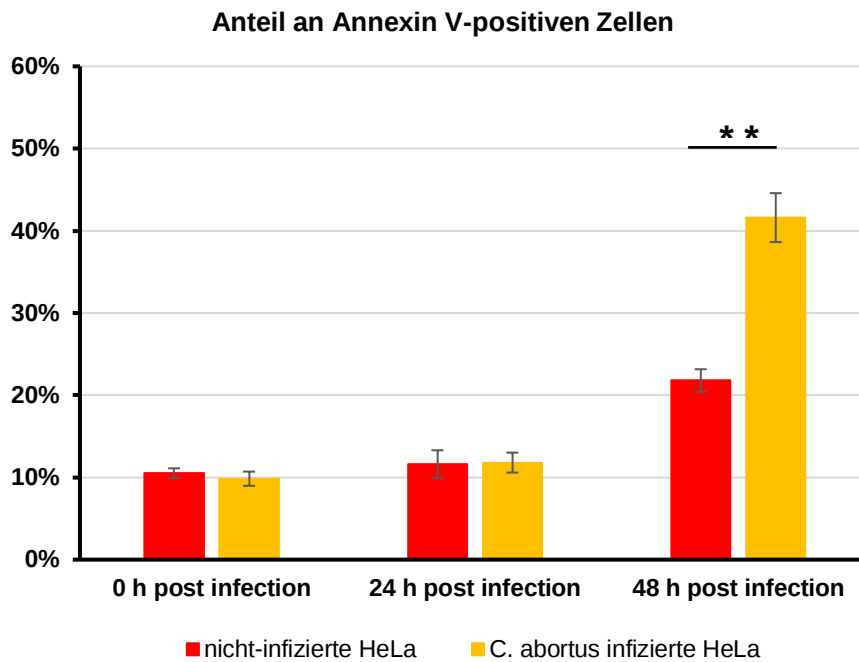


Abbildung 25: Anteil an Annexin V-positiven HeLa-Zellen nach 0 h, 24 h und 48 h p. I. (post Infektion). Es wurden experimentell *Chlamydia abortus* infizierte HeLa-Zellen und nicht-infizierte HeLa-Zellen nach 0 h, 24 h und 48 h p. I. durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurde der Anteil an Annexin V positiven Zellen bestimmt. 48 h p. I. hat sich der Anteil an Annexin V-positiver Zellen bei experimentell *C. abortus* infizierter HeLa-Zellen auf 40 % erhöht und sich damit vervierfacht im Vergleich zu den früheren Infektionszeitpunkten (** = $p \leq 0,02$). Dargestellt ist der Median mit dazugehörigem SEM von 5 Versuchen.

Der Caspasen-Nachweis erfolgte mit dem Marker FLICA (Abbildung 26). Auch hier war zu erkennen, dass beide Gruppen nach 0 h und 24 h p. I. eine vergleichbare Apoptoserate von 10 % zeigten. Nach 48 h p. I. wurde bei den nicht-infizierten HeLa-Zellen eine Apoptoserate von 20 % und bei experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen von 40 % gemessen. Auch hierbei handelt es sich um einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p \leq 0,02$).

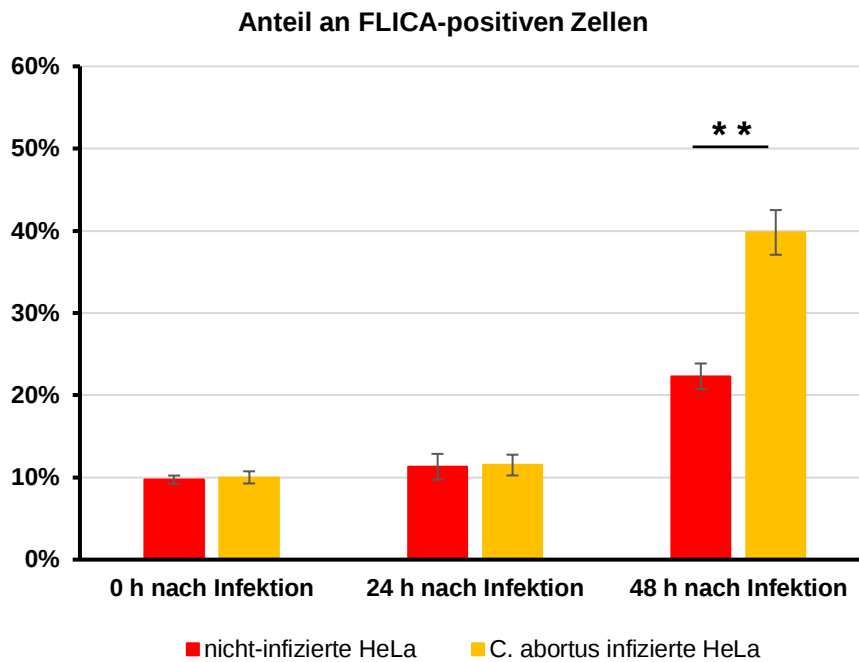


Abbildung 26: Anteil an FLICA- (engl. Fluorescent Labeled Inhibitors of Caspase) positiven HeLa-Zellen nach 0 h, 24 h und 48 h p. I. (post Infektion).

Es wurden experimentell *Chlamydia abortus* infizierte HeLa-Zellen und nicht-infizierte HeLa-Zellen nach 0 h, 24 h und 48 h p. I. durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurde der Anteil an FLICA positiven Zellen bestimmt. 48 h p. I. war ein Anstieg an FLICA-positiven Zellen bei experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen auf 40 % zu erkennen und damit eine Vervierfachung im Vergleich zu früheren Infektionszeitpunkten (** = $p \leq 0,2$). Dargestellt ist der Median mit dazugehörigem SEM von 5 Versuchen.

Die Zelltoderate wurde anhand des Anteils an PI-positiven Zellen gemessen (Abbildung 27). Es zeigte sich, dass sich die Zelltoderaten bei beiden Gruppen nach 0 h und 24 h p. I. nur minimal unterschieden. Es wurden jeweils 10 % PI positive Zellen bei nicht-infizierten HeLa-Zellen und ca. 15 % bei experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen detektiert. Nach 48 h p. I. wurde bei nicht-infizierten HeLa-Zellen eine Zelltoderate von 25 % gemessen. Bei experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen war die Zelltoderate auf 50 % angestiegen. Damit ergab sich in der Zelltoderate nach 48 h p. I. ein signifikanter Unterschied zwischen experimentell *Chlamydia abortus* infizierten und nicht-infizierten HeLa-Zellen Anstieg im Vergleich zu nicht-infizierten HeLa-Zellen ($p \leq 0,02$).

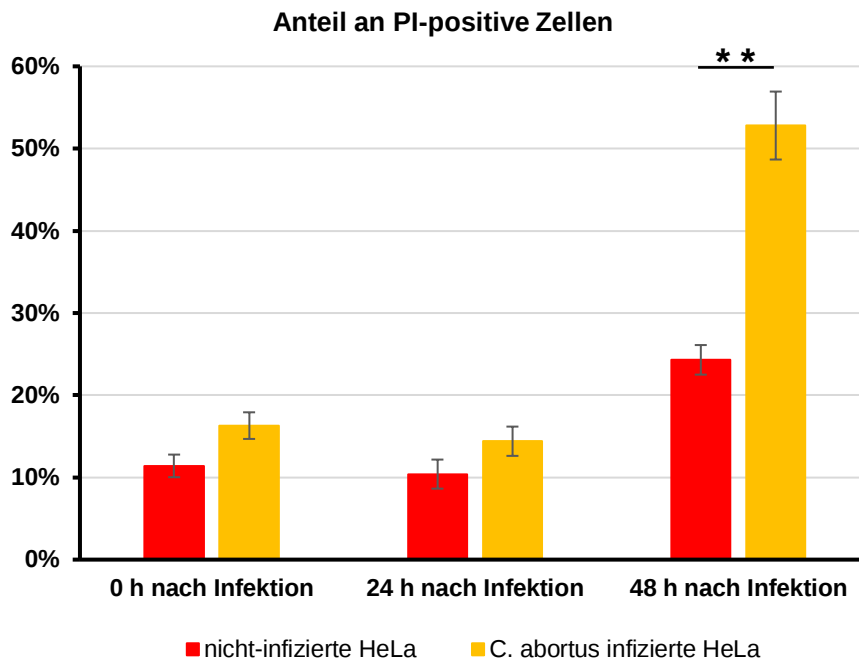


Abbildung 27: Anteil an PI-positiven HeLa-Zellen nach 0 h, 24 h und 48 h p. I. (post Infektion). Es wurden experimentell *Chlamydia abortus* infizierte HeLa-Zellen und nicht-infizierte HeLa-Zellen nach 0 h, 24 h und 48 h p. I. durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurde der Anteil an PI positiven Zellen bestimmt. 48 h p. I. hat sich der Anteil an PI-positiver Zellen bei experimentell *C. abortus* infizierter HeLa-Zellen auf 50 % erhöht und sich damit verfünffacht im Vergleich zu den früheren Infektionszeitpunkten (** = $p \leq 0,2$). Dargestellt ist der Median mit dazugehörigem SEM von 5 Versuchen.

3.5.2 Durchflusszytometrische Untersuchung der Apoptose und Zelltod von transient CAB063 exprimierenden HeLa-Zellen

Um das Apoptose- und Zelltodverhalten bei Zellen zu untersuchen, die CAB063 transient exprimieren, wurden die Apoptosemarker Annexin V und FLICA, sowie der Zelltodmarker PI (Propidiumjodid) durchflusszytometrisch bestimmt. Zur Kontrolle wurden nicht-transfizierte HeLa-Zellen untersucht. Um Einflüsse auf die Apoptose und den Zelltod durch den Transfektionsvorgang zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit dem Kontrollvektor pCI-GFP transfiziert. Die Zellen wurden nach 48 h p. Tr. (post Transfektion) mit den genannten Markern inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abbildung 28).

Die Apoptoserate bei pCI-CAB063 transfizierter HeLa-Zellen, die mit Hilfe der Apoptosemarker Annexin V und FLICA bestimmt wurde, lag bei pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen bei 30 %. Sie war damit signifikant höher als mit dem

Kontrollvektor transfizierter HeLa-Zellen und bei nicht-transfizierter HeLa-Zellen ($p \leq 0,02$). Bei pCI-GFP transfizierten HeLa-Zellen wurde eine Apoptoserate von 20 % und bei nicht-transfizierten HeLa-Zellen von 10 % gemessen.

Die Zelltodrate wurde mit Hilfe des PI bestimmt. Hierbei waren 20 % der pCI-CAB063 transfizierten und 17 % der pCI-GFP transfizierten HeLa-Zellen PI-positiv. Es wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt. Ein signifikanter Unterschied war jedoch zwischen den pCI-CAB063 transfizierten und den nicht-transfizierten HeLa-Zellen, welche eine Zelltodrate von 10 % zeigten, festzustellen ($p \leq 0,02$).

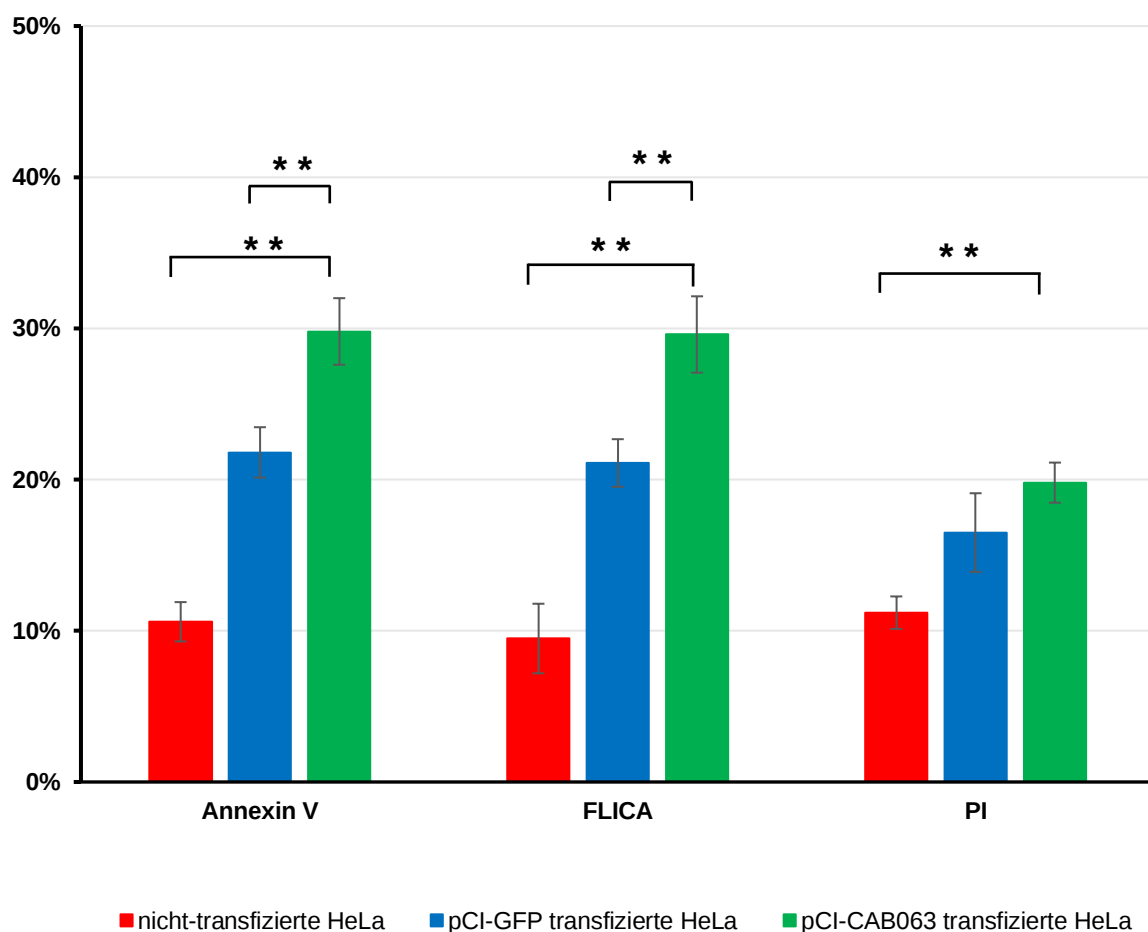


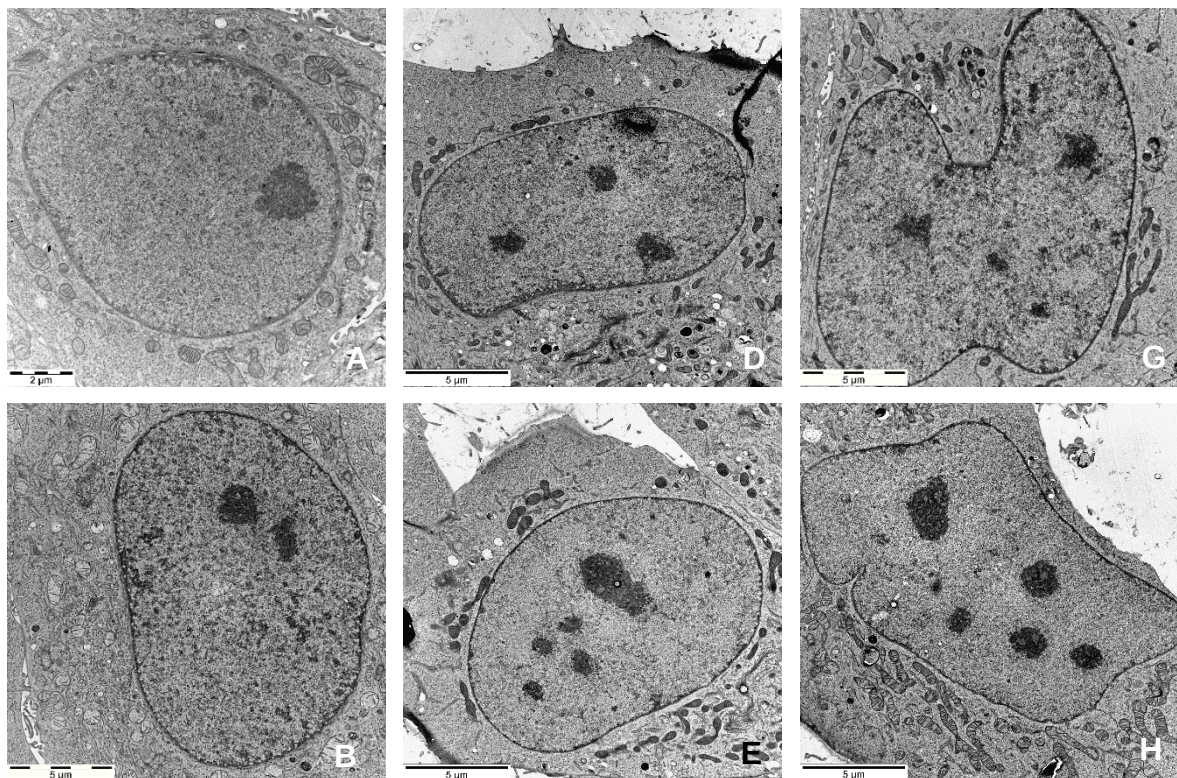
Abbildung 28: Apoptose und Zelltod in pCI-CAB063 und pCI-GFP transfizierten HeLa-Zellen. Es wurden pCI-CAB063 transfizierte, pCI-GFP transfizierte HeLa-Zellen und nicht-transfizierte HeLa-Zellen nach 48 h p. Tr. durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurde der Anteil an Annexin V, FLICA und PI positiven Zellen bestimmt. Die Apoptoserate von pCI-CA063 transfizierten Zellen lag bei 30 % und somit signifikant höher als bei nicht-transfizierten und pCI-GFP transfizierten Zellen (** = $p \leq 0,2$). Die

Zelltodrate zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen pCI-CAB063 transfizierten Zellen und nicht-infizierten Zellen (** = $p \leq 0,02$). Dargestellt ist der Median mit dazugehörigem SEM von 7 Versuchen.

3.5.3 Ultramorphologische Untersuchungen von transfizierten HeLa-Zellen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Es wurden pCI-CAB063, pCI-GFP transfizierte und nicht-transfizierte HeLa-Zellen 48 h p. Tr. mittels Transmissionselektronenmikroskopie analysiert.

Es fiel auf, dass bei pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen Einschnürungen der Kernmembran zeigten (Abbildung 29 G–I). Dies korrelierte mit dem fluoreszenzmikroskopischen Bild (Abbildung 14), wonach sich Einschnürungen der Zellkernmembran vor allem bei transfizierten HeLa-Zellen zeigten, die CAB063 in der Kernmembran exprimierten. Bei nicht-transfizierten und pCI-GFP transfizierten HeLa-Zellen war die Zellkernform rund (Abbildung 29 A–F).



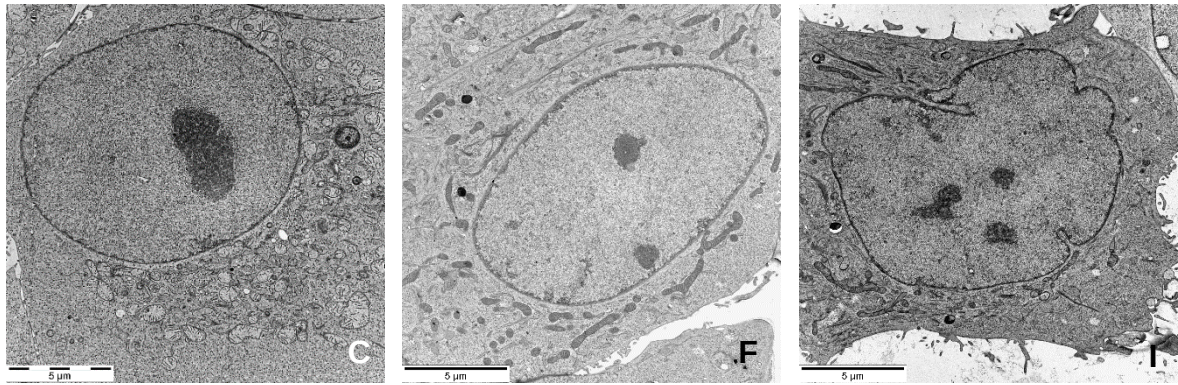


Abbildung 29: Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Zellkerne von nicht-transfizierten, pCI-GFP transfizierten und pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen. Es wurden unterschiedlich behandelte HeLa-Zellen nach 48 Stunden fixiert und für die Transmissionselektronenmikroskopie vorbereitet. Dabei wurden unterschiedliche Formationen des Zellkerns gefunden. Bei nicht-infizierten HeLa-Zellen (**A – C**) und pCI-GFP transfizierten HeLa-Zellen (**D – F**) waren die Zellkerne rund. Dagegen zeigten die Zellkerne von pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen (**G – I**) eine unterschiedlich ausgeprägte Lappung des Zellkerns. Zusätzlich war die Anzahl der Kernkörperchen zwischen den Zellkernen der unterschiedlich behandelten HeLa-Zellen verschieden. Bei nicht-transfizierten HeLa-Zellen (**A – C**) waren weniger Kernkörperchen als bei transfizierten HeLa-Zellen (**D – I**) zu erkennen.

Außerdem fiel auf, dass in den Zellkernen der transfizierten Zellen sich mehr Kernkörperchen fanden als in Zellkernen von nicht-transfizierten Zellen (siehe Abbildung 29). Daher wurden die Kernkörperchen in transfizierten und nicht-transfizierten HeLa-Zellen systematisch ausgezählt (Abbildung 30). Dabei wurde festgestellt, dass bei nicht-transfizierten HeLa-Zellen 78 % der Zellen zwei oder weniger und 22 % drei oder mehr Kernkörperchen hatten. Bei den pCI-GFP transfizierten HeLa-Zellen war das Verhältnis ausgeglichen. So hatten 50 % der Zellkerne zwei oder weniger und 50 % drei oder mehr Kernkörperchen. Bei pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen hatten die Zellkerne bei 27 % zwei oder weniger Kernkörperchen und 73 % drei oder mehr Kernkörperchen.

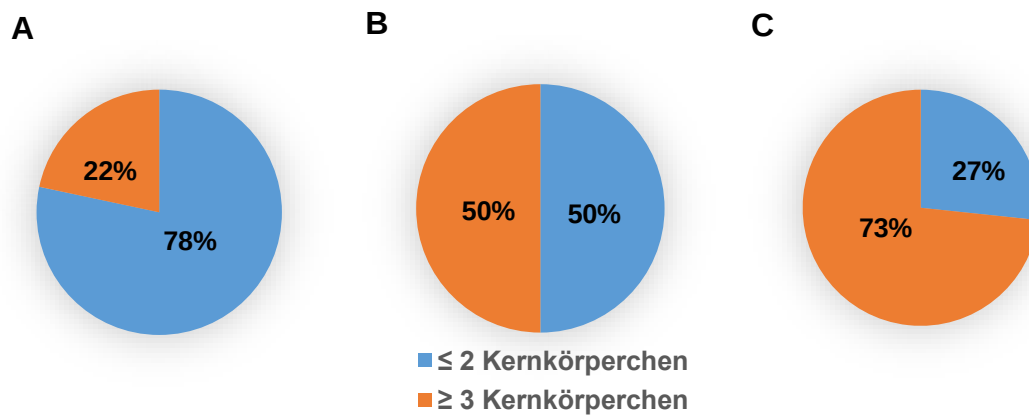


Abbildung 30: Zunahme der Kernkörperchen bei pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen. Es wurde die Anzahl der Kernkörperchen in den Zellkernen der unterschiedlich behandelten HeLa-Zellen bestimmt. **(A)** nicht-transfizierte HeLa-Zellen **(B)** pCI-GFP transfizierte HeLa-Zellen **(C)** pCI-CAB063 transfizierte HeLa-Zellen. Es handelt sich um die Mittelwerte von 3 Versuchen (es wurden jeweils 30 Zellen pro Ansatz und Versuch ausgezählt).

3.6 Lokalisierung des *Chlamydia pneumoniae* Proteins CpB0704

Aufgrund seiner Verwandtschaft zu CAB063 wurde CpB0704 des humanpathogenen Erregers *Chlamydia pneumoniae* vergleichend untersucht. Die Lokalisierung von CpB0704 wurde mittels direkter Immunfluoreszenz und Westernblot-Analyse durchgeführt.

3.6.1 Intrazelluläre Lokalisierung von CpB0704 mittels direkter Immunfluoreszenz

Für die direkte Immunfluoreszenz wurden zum einen experimentell *Chlamydia pneumoniae* infizierte HeLa-Zellen nach 72 h p. I. (post Infektion) und zum anderen pCI-CpB0704 transfizierte HeLa-Zellen nach 72 h p. Tr. (post Transfektion) untersucht.

In Vorversuchen zeigte sich, dass nach Fixierung der Zellen mit Methanol keine Darstellung von CpB0704 erreicht werden konnte (Daten nicht gezeigt). Daher wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, um somit eine bessere Darstellung zytoplasmatischer Proteine zu bekommen.

Die experimentell *C. pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen wurden mit dem im Kaninchen generierten Primärantikörper Anti-CpB0704 und anschließend mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen) inkubiert. Für die Gegenfärbung wurden mit dem Farbstoff Evansblue unspezifische Proteine verwendet. Die pro- und eukaryotische DNS wurde mit dem Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) dargestellt. CpB0704 lässt sich 72 h p. I. in experimentell *C. pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen vor allem im schmalen Zytoplasmasaum der Zelle nachweisen (Abbildung 31). In den Einschlüssen fand sich CpB0704 punktuell. In den Zellkernen der Wirtszelle wurde CpB0704 nicht nachgewiesen. Zu früheren Infektionszeitpunkten waren diese Beobachtungen weniger prominent (Daten nicht gezeigt).

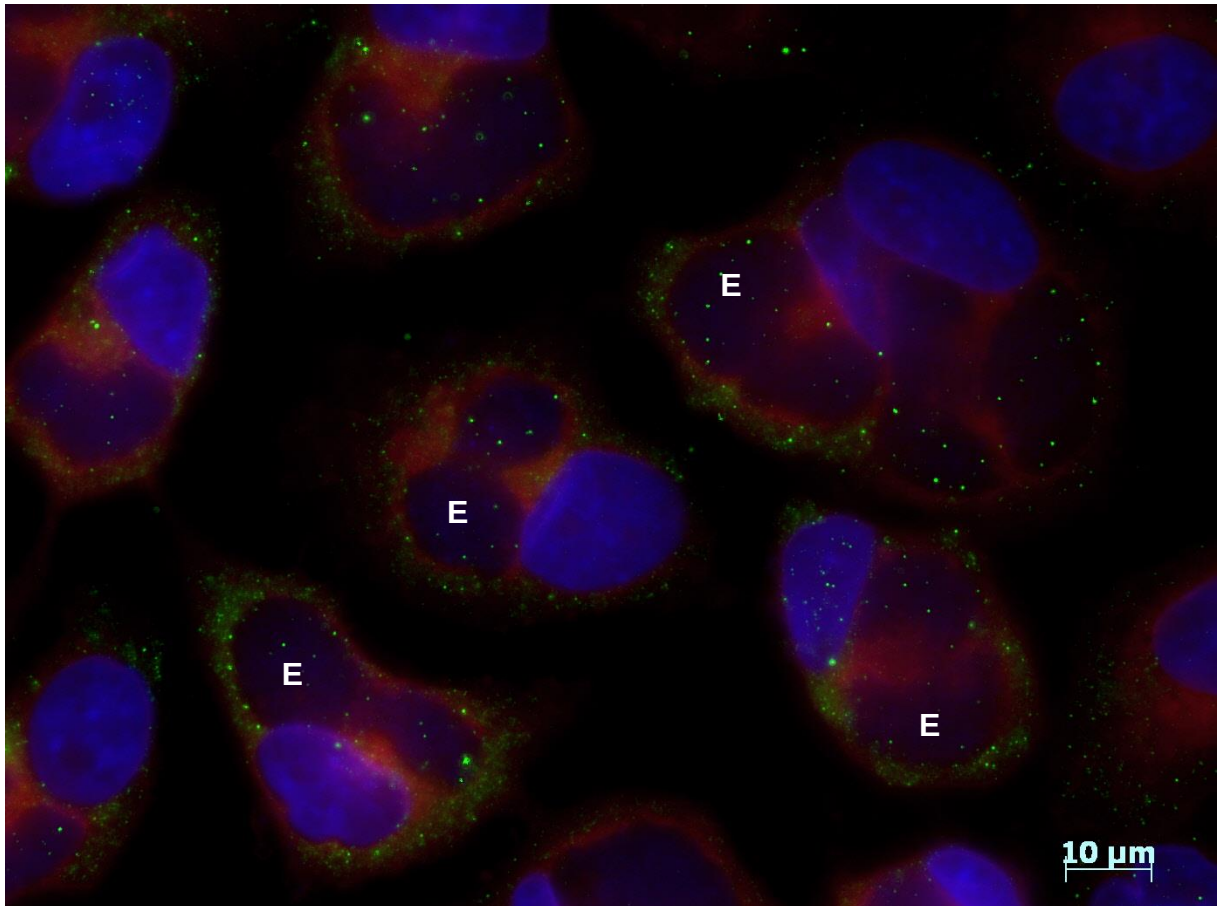


Abbildung 31: Intrazelluläre Lokalisierung von CpB0704 in experimentell mit *Chlamydia pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen nach 72 h p. i. CpB0704 (grün) wurde in den **E**inschlusskörpern (punktuell) und im Zytoplasma der Wirtszelle detektiert. In Blau ist die pro- und eukaryote DNS dargestellt und in Rot das Wirtszellzytoplasma. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei Versuchen.

Zum Vergleich wurden pCI-CpB0704 transfizierte HeLa-Zellen ebenfalls nach 72 h p. Tr. mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit dem Primär- und Sekundärantikörper inkubiert. Dabei lässt sich erkennen, dass CpB0704 ausschließlich im Zytoplasma der Wirtszelle detektiert werden konnte (Abbildung 32).

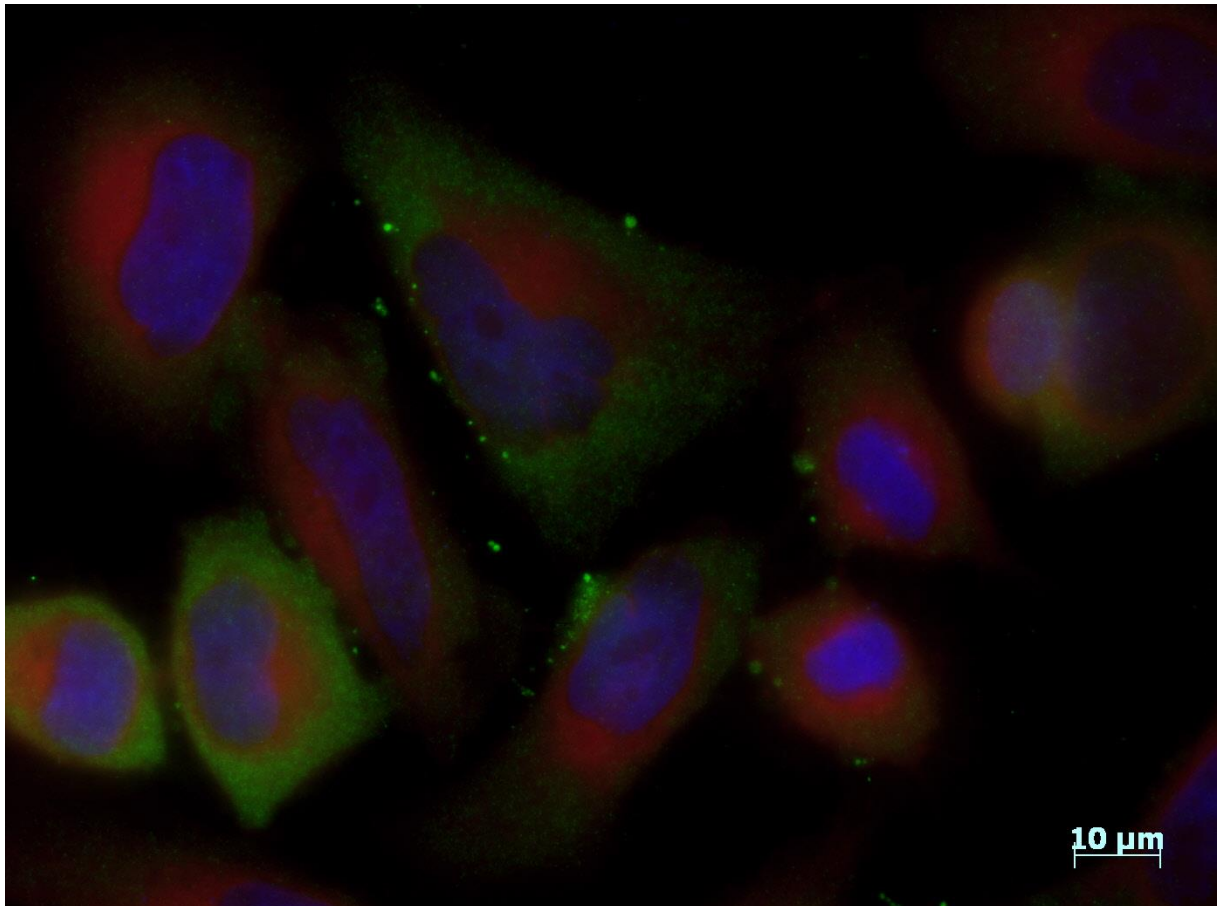


Abbildung 32: Intrazelluläre Lokalisation von CpB0704 in pCI-CpB0704 transfizierte HeLa-Zellen 72 h p. Tr. CpB0704 (grün) konnte nur im Zytoplasma der HeLa-Zelle nachgewiesen werden. Die eukaryote DNS (blau) wurde mit DAPI und das Zytoplasma der Wirtszelle wurde mit Evansblue (rot) dargestellt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei Versuchen.

3.6.2 Intrazelluläre Lokalisierung von CpB0704 mittels Westernblot-Analyse

Für die Westernblot-Analyse wurden Ganzzelllysate von experimentell *C. pneumoniae* infizierter HeLa-Zellen und von pCI-CpB0704 transfizierter HeLa-Zellen verwendet. Zusätzlich wurden die experimentell *C. pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen mit einem Zellfraktionierungskit geerntet. Als Kontrolle wurde das rekombinante CpB0704 (Molekulargewicht 38 kDa) dargestellt.

In Abbildung 33 zeigt sich in Höhe von ca. 38 kDa eine Bande in den Ganzzelllysaten von experimentell *C. pneumoniae* infizierten und pCI-CpB0704 transfizierten HeLa-Zellen. Zusätzlich ist eine diskrete Bande von 38 kDa bei der Zytoplasmafraktion auf Höhe des rekombinanten CpB0704 zu erkennen (Abbildung 33).

Die Spezifität des Antikörpers wurde durch das Mitführen des Ganzzelllysats von nicht-infizierten HeLa-Zellen kontrolliert. Es ist keine Bande auf Höhe des rekombinanten CpB0704 bei der aufgetrennten Probe des Lysats von nicht-infizierten Zellen zu erkennen.

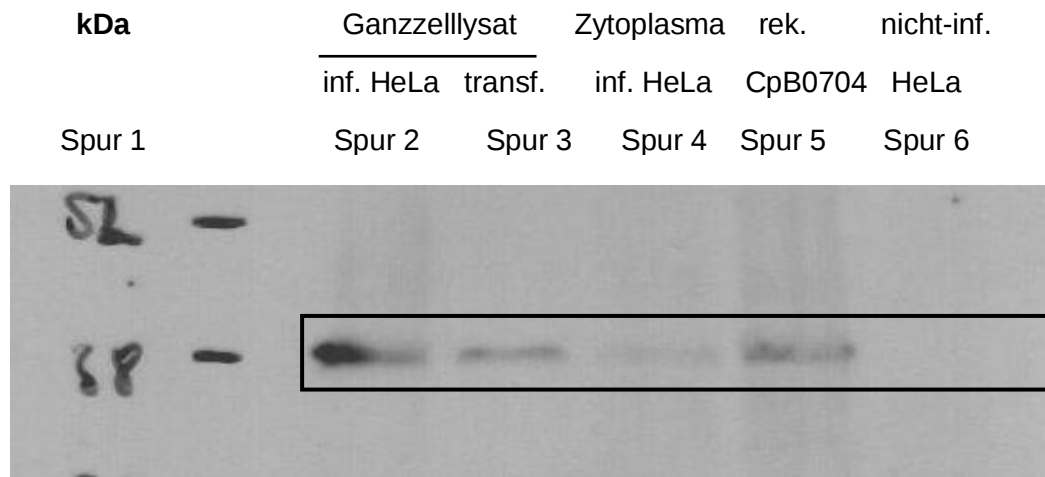


Abbildung 33: Intrazelluläre Lokalisierung von CpB0704 mittels Westernblot-Analyse. In Spur 1 wurde der Proteingrößenstandard (kDa) aufgetragen. Das Ganzzelllysats von experimentell *C. pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen ist in Spur 2 und das Ganzzelllysats von pCI-CpB0704 transfizierten HeLa-Zellen ist in Spur 3 aufgetragen. Auf die Spur 4 wurde die Zytoplasmafraktion von experimentell *C. pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen aufgetragen. Das rekombinante CpB0704 (Molekulargewicht 38 kDa) ist in Spur 5 zu sehen. In Spur 6 wurde das Ganzzelllysats von nicht-infizierten HeLa-Zellen aufgetragen. **Schwarzer Kasten:** Proteinbande bei ca. 38 kDa. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei Versuchen.

3.7 Einfluss von CpB0704 auf Apoptose und Zelltod

Um das Apoptose- und Zelltodverhalten von experimentell *Chlamydia pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen zu untersuchen, wurden der Apoptosemarker Annexin V und der Zelltodmarker Propidiumiodid (PI) verwendet. Zusätzlich wurde die Apoptose- und Zelltodrate von HeLa-Zellen untersucht, die das CpB0704 transient exprimieren. Als Kontrolle wurden zusätzlich nicht-transfizierte HeLa-Zellen mituntersucht. Die Einflüsse der Transfektion auf die Apoptose und Zelltodrate wurden mit HeLa-Zellen, die mit dem Kontrollvektor pCI-GFP transfiziert wurden, gemessen. Die Zellen wurden nach 48 h p. Tr./ p. I. (post Transfektion / post Infektion) mit dem Apoptose- und Zelltodmarker gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer untersucht

In Abbildung 34 ist eine Übersicht der Versuche über das Apoptose- und Zelltodverhalten zu sehen. Es waren nach 48 Stunden 17 % der nicht-infizierten HeLa-Zellen apoptotisch und 13 % tot. Bei den pCI-GFP transfizierten HeLa-Zellen zeigten 27 % der Zellen Apoptose und 23 % waren tot. Die Apoptoserate bei pCI-CpB0704 transfizierten HeLa-Zellen lag bei 24 % und die Zelltodrate bei 19 %. Einen signifikanten Anstieg der Apoptose- und Zelltodrate war bei experimentell *C. pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten HeLa-Zellennachweisbar. Es wurde eine Apoptoserate von 49 % und eine Zelltodrate von 65 % gemessen.

Es konnte gezeigt werden, dass die experimentelle Infektion mit *C. pneumoniae* zu einem Anstieg der Apoptose in HeLa-Zellen und zu einem Anstieg des Zelltods von HeLa-Zellen führt. Dahingegen hat offenbar CpB0704 keinen Einfluss auf die Apoptose- und Zelltodrate.

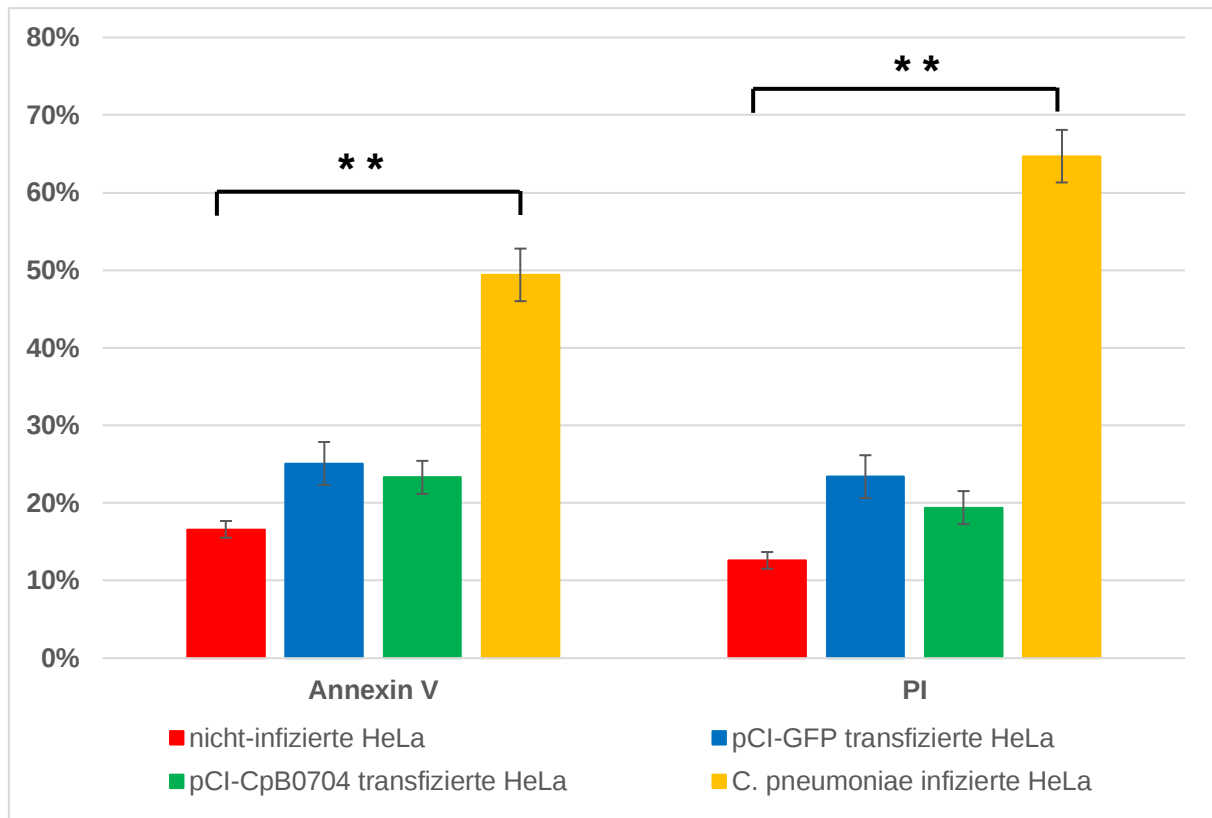


Abbildung 34: Apoptose- und Zelltodrate in pCI-CpB0704 und pCI-GFP transfizierten und in *C. pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen. Bei pCI-CpB0704 transfizierten, pCI-GFP transfizierten HeLa-Zellen, experimentell *C. pneumoniae* infizierten und nicht-infizierten HeLa-Zellen wurde nach 72 h p. Tr./p. l. der Anteil an Annexin V und PI positiven Zellen bestimmt. Bei pCI-CpB0704 transfizierten HeLa-Zellen ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Apoptose- und Zelltodrate im Vergleich zu nicht-infizierten und pCI-GFP transfizierten HeLa-Zellen. Bei experimentell *C. pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen war ein signifikanter Unterschied in der Apoptose- und Zelltodrate im Vergleich zu nicht-infizierten HeLa-Zellen zu erkennen (** = $p \leq 0,2$). Dargestellt ist der Median mit dazugehörigem SEM von 5 Versuchen.

4. Diskussion

Chlamydia abortus ist ein obligat intrazellulärer Erreger zoonotischer Infektionen. Veterinärmedizinisch bedeutsam ist *C. abortus* als Erreger des Schafaborts. *C. abortus* kann auch auf den Menschen übertragen werden. In seltenen Fällen kann es zu schwerwiegenden Schwangerschaftskomplikationen bei infizierten Frauen im letzten Drittel der Schwangerschaft kommen.

Wie auch von anderen Chlamydienspezies bekannt, exprimiert *C. abortus* Proteine, die als Virulenzfaktoren gelten. In diesem Zusammenhang spielt das Typ III Sekretionssystem (T3SS) eine wichtige Rolle.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es das putative Typ III sezernierte Protein CAB063 von *Chlamydia abortus* molekularbiologisch und ultramorphologisch näher zu charakterisieren.

In ersten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde CAB063 überwiegend im Einschlusskörper, aber auch im Zellkern von experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen detektiert. Bei pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen konnte CAB063 fluoreszenzmikroskopisch im Zellkern und in der Zellkernmembran nachgewiesen werden. Mit Hilfe immunoelektronenmikroskopischer Analysen von pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen konnte die Kernlokalisierung von CAB063 bestätigt werden. Die Lokalisation von CAB063 im Einschlusskörperchen und im Zellkern der experimentell *C. abortus* infizierten Wirtszelle konnte schließlich noch mittels Westernblot-Analysen der Zellfraktionen gesichert werden.

Im Rahmen der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung von pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen fielen ultramorphologische Veränderungen der Zellkerne auf, die einhergehen mit einer Zunahme an Kernkörperchen.

Um nun erste Anhaltspunkte für die mögliche Funktion des kernlokalisierten CAB063 zu bekommen, wurde mit Hilfe von Co-Immunopräzipitationsexperimenten nach möglichen Bindungspartnern von CAB063 gesucht. Ein Bindungspartner auf chlamydialer Seite wurde mit dem HSP70 (Heat Shock Protein) von *C. abortus* gefunden. Auf eukaryotischer Ebene wurden Pre-Lamin A/C, das heterogene Kernribonukleoprotein K und die ATP-unabhängige RNS Helikase DDX5 bestimmt. Durch fluoreszenzmikroskopische Kollokalisationsstudien, sowie weiteren Co-

Immunopräzipitationsexperimenten mit anschließender Westernblot-Analyse gelang es Lamin A als Bindungspartner von CAB063 zu bestätigen.

Aufgrund der eindeutigen Kernlokalisation und der späten Expression im *C. abortus* Entwicklungszyklus (Forsbach-Birk et al., 2014) wurde der Einfluss von CAB063 auf Apoptose und Zelltod der Wirtszelle untersucht. Dafür wurden die Apoptose- und Zelltodraten von experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen und von pCI-CAB063 transfizierten Zellen untersucht. Im Vergleich zu nicht-infizierten HeLa-Zellen zeigte sich bei infizierten Zellen eine signifikant erhöhte Apoptose- und Zelltodrate am Ende des Entwicklungszyklus von *C. abortus*. Außerdem steigerte sich die Apoptoserate signifikant bei pCI-CAB063 transfizierten Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten und pCI-GFP transfizierten HeLa-Zellen.

Der humanpathogene Erreger *Chlamydia pneumoniae* verfügt mit dem CpB0704 (auch YwbM genannt) über ein immunogenes Protein, welches zu CAB063 immerhin eine Sequenzübereinstimmung von 24,4 % aufweist. Zielzellen von *C. pneumoniae* sind die Epithelzellen des Respirationstrakts, während *C. abortus* Plazenta-Epithelzellen infiziert. Der Entwicklungszyklus von *C. pneumoniae* umfasst 72 h vs. 48 h bei *C. abortus*.

Im Vergleich zu CAB063 interessierte nun insbesondere die subzelluläre Lokalisation von CpB0704 aus *C. pneumoniae*, die mittels Fluoreszenzmikroskopie in experimentell *C. pneumoniae* infizierten und pCI-CpB0704 transfizierten HeLa-Zellen untersucht wurde. Dieses Protein ist überwiegend im Zytoplasma der Wirtszelle und im Einschlusskörperchen, jedoch nicht im Zellkern nachweisbar, was durch eine Westernblot-Analyse anhand der Zellfraktionen bestätigt wurde.

Vergleichend zu *C. abortus* wurde das Apoptose- und Zelltodverhalten bei experimentell *C. pneumoniae* infizierten und pCI-CpB0704 transfizierten HeLa-Zellen untersucht. Obwohl ein signifikanter Anstieg der Apoptose- und Zelltodrate bei experimentell *C. pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen nachweisbar war, konnte anhand der Untersuchung der pCI-CpB0704 transfizierten HeLa-Zellen kein Einfluss von CpB0704 auf das Apoptose- und Zelltodverhalten nachgewiesen werden.

4.1 Molekularbiologische und ultramorphologische Charakterisierung des *Chlamydia abortus* Proteins CAB063 und des *Chlamydia pneumoniae* Proteins CpB0704

4.1.1 Lokalisierung und Identifizierung potentieller Bindungspartner

In der vorliegenden Arbeit wurde CAB063 bei pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen in der Zellkernmembran mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie und Immunelektronenmikroskopie detektiert, sowie in Zellfraktionierungsexperimenten im Zellkern lokalisiert, wo eindeutige Banden auf Höhe des rekombinanten CAB063 bei den Zellkernfraktionen von *C. abortus* infizierten und pCI-CAB063 transfizierten Zellen nachgewiesen wurden. Damit wurde mit drei unterschiedlichen methodischen Ansätzen gezeigt, dass CAB063 im Zellkern und vor allem in der Zellkernmembran lokalisiert ist. Für *C. abortus* gelang damit erstmalig der Nachweis eines Proteins, das im Zellkern der Wirtszelle lokalisiert ist. Dazu passen Daten von Mojica et al., wonach das CAB063 Ortholog SINC (Secreted Innner Nuclear membrane-associated Chlamydia Protein) von *Chlamydia psittaci* ebenfalls im Zellkern mittels Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert wurde (Mojica et al. 2015). Das Protein SINC wurde dabei hauptsächlich an der Kernmembran bei GFP-SINC transfizierten Zellen lokalisiert. Funktionelle Aspekte wurde in dieser Arbeit nicht diskutiert. Für *C. trachomatis* sind bisher das Protein CT621 und das Protein NUE (Novel Nuclear Effector) bekannt, welche im Zellkern der Wirtszelle detektiert wurden. Diese werden durch das Typ III Sekretionssystem in den Zellkern geschleust und werden am Ende des Entwicklungszyklus detektiert. Es wird spekuliert, dass CT621 die Immunabwehr der Wirtszelle beeinflusst, in dem es die Expression bestimmter Gene für die Entzündungsreaktion reguliert (Hobolt-Pedersen et al. 2009). Durch in-vitro-Methylierungssassays wurde NUE als Methyltransferase für Histone identifiziert und spielt somit eine Rolle in der DNS-Transkription (Pennini et al. 2010).

Um nun auf die Funktion von CAB063 schließen zu können, wurde nach potentiellen Bindungspartnern gesucht. Hierfür wurden die Bindungspartner mittels Co-Immunopräzipitation mit experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zelllysaten und pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zelllysaten und dem passenden Antikörper gegen CAB063 ermittelt. Als prokaryotische Bindungspartner wurden das polymorphe das Chaperon Protein DnaK (Heat Shock Protein 70), das polymorphe Membranprotein D (PmpD) und der Elongationsfaktor Tu aus *Chlamydia abortus* identifiziert.

Bei HSP70 handelt es sich um ein Chaperon, welches für den Transport von Effektorproteinen im Typ III Sekretionssystem verantwortlich ist (Raulston et al. 2002; Mayer and Bukau 2005). Das T3SS zeigt ultramorphologisch eine typische Nadelstruktur und ermöglicht gram-negativen Bakterien, Proteine in eukaryotische Zellen zu injizieren (Salmond and Reeves 1993). Das *Translocon* formt eine Pore durch die Zytoplasmamembran des Wirts. Durch die sogenannten *Tip Proteine* (Tonoplast Intrinsic Protein) erkennt das T3SS die Anwesenheit seines Ziels. Durch die Nadel werden die Effektorproteine transportiert. Die *Chaperone* sorgen dafür, dass die Effektorproteine durch die *Basis* zum *Nadelapparat* transportiert werden (Johnson and Blocker 2008). Die *Basis* erstreckt sich durch die innere und äußere Membran der Bakterien (Chatterjee et al. 2013). Diese typischen Strukturen wurden für *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia abortus* aufgrund elektronenmikroskopischer Befunde beschrieben (Nans et al. 2015; Wilkat et al. 2014). Für *Chlamydia abortus* wurden durch die hiesige Arbeitsgruppe ebenfalls das ultramorphologe Korrelat einschließlich *Basis* und *Translocon* mittels Cryorasterelektronenmikroskopie detektiert (Abbildung 35) (Wilkat et al. 2014).

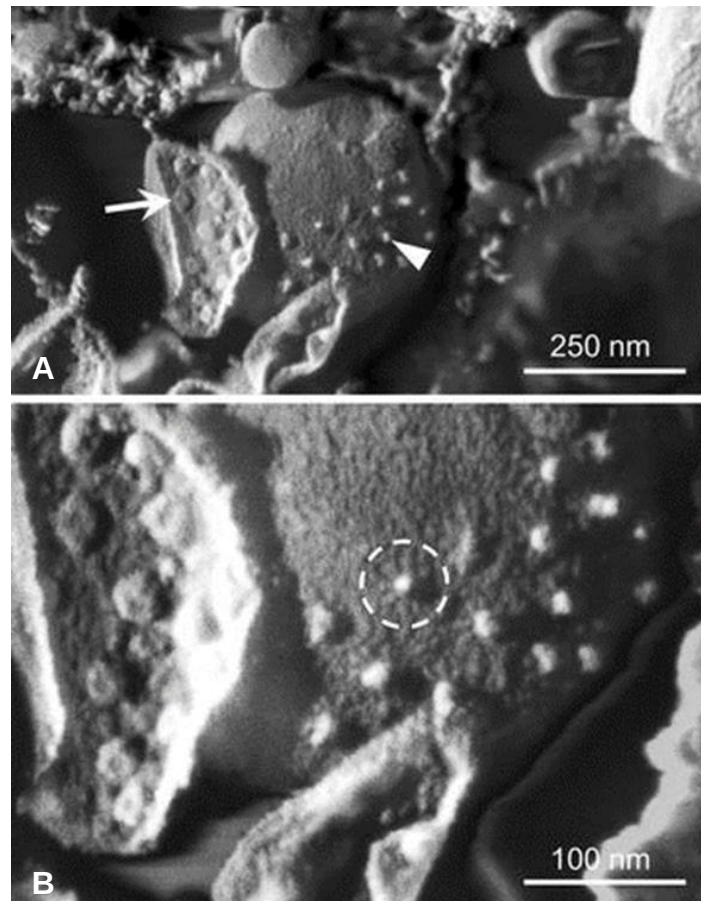


Abbildung 35: Typ III Sekretionssystem von *Chlamydia abortus*.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von einem Elementarkörperchen, das schockgefroren wurde. **(A)** weißes Dreieck: Oberflächenprojektion (*Translocon*) auf der äußeren, konvexen Oberfläche der äußeren Membran. Weißer Pfeil: B-Strukturen (*Base*) auf der konkaven Innenfläche der äußeren Membran. **(B)** Vergrößerung von (A) gestrichelter Kreis: Oberflächenprojektion (*Translocon*) auf der äußeren, konvexen Oberfläche der äußeren Membran (Wilkat et al. 2014, Seite 173). „With permission of Springer“.

Die T3SS Proteine können in drei Gruppen aufgeteilt werden. Es gibt die sogenannten Strukturproteine, die für den Aufbau der Nadelstruktur notwendig sind. Dann werden die Effektorproteine in den Wirt sezerniert und die Chaperone dienen dem Transport. Die Effektorproteine werden im Zytoplasma der Bakterien an die Chaperone gebunden und dadurch vor dem Abbau geschützt und anschließend durch den sogenannten *Nadelapparat* transportiert. Chaperone, auch Heat Shock Proteine (HSP) genannt, werden in drei Klassen eingeteilt. Chaperone der Klasse I sorgen dafür, dass die Effektorproteine durch den Nadelapparat transportiert werden. Aber Chaperone sind auch für die Bildung der Poren (Klasse II) und den

Aufbau des Nadelapparats (Klasse III) notwendig (Dai and Li 2014). Ein bekanntes Chaperon der Klasse I von *Chlamydia trachomatis* ist das Slc1. Dieses interagiert mit TARP (Brinkworth et al. 2011; Pais et al. 2013). Weitere wichtige Heat Shock Proteine der Chlamydien sind das HSP60 und das HSP70. Auch sie zählen zu Klasse I-Chaperone (Levy-Rimler et al. 2002). HSP60 und HSP70 sind für die korrekte Faltung der Proteinsekundärstruktur notwendig (Wegele, Muller, and Buchner 2004). Die Bindung von CAB063 an HSP70 deutet also darauf hin, dass CAB063 als Effektorprotein mit Hilfe von HSP70 durch den Nadelapparat des T3SS transportiert wird.

PmpD gehört zu den PMP's (engl. Polymorphic Membrane Proteins), die als chlamydiale Virulenzfaktoren in der initialen Phase der Infektion diskutiert werden (Wehrl et al. 2004; Finco et al. 2005; Kari et al. 2014). Sie könnten an der Regulation der Wirtszellgenexpression beteiligt sein (Forsbach-Birk et al. 2013) und fungieren als Autotransporter für Adhäsine (Kiselev et al. 2007; Vasilevsky et al. 2016). In der äußeren Membran der Chlamydien werden sie unterschiedlich exprimiert und zeigen immunmodulatorische Eigenschaften (Vandahl et al. 2002). Studien haben gezeigt, dass Zellen, die mit rekombinanten PMP's behandelt wurden, weniger effizient infiziert werden konnten (Yu et al. 2009; Yu et al. 2014; Johnson et al. 2012). Aus diesem Grund wurden die PMP's auch als potentielle Impfkandidaten diskutiert (Vasilevsky et al. 2016; Mölleken, Schmidt, and Hegemann 2010). Welche Auswirkungen die Bindung von CAB063 an PmpD in der Chlamydienentwicklungsbiologie hat, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und muss daher offenbleiben.

Der Elongationsfaktor Tu spielt bei der bakteriellen Proteinsynthese in der Elongationsphase eine wichtige Rolle (Hilgenfeld, Mesters, and Hogg 2000). Das Protein transportiert hierfür tRNS-Moleküle zu den Ribosomen und sorgt somit für eine reibungslose und schnelle Translation der mRNS in die korrespondierenden Proteine. Die Rolle von CAB063 hierbei muss zukünftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Als eukaryotische Bindungspartner wurden das heterogene Kernribonukleoprotein K, die ATP-unabhängige RNS Helicase DDX5 und das Pre-Lamin A/C massenspektrometrisch bestimmt.

Das Kernribonukleoprotein K ist ein multifunktionales Protein, welches in der Transkriptions- und Translationsregulation, am Kerntransport und in der Signaltransduktion involviert ist (Chen et al. 2002). Durch Bindung von CAB063 an das Kernribonukleoprotein K könnte es zu einer Inhibierung dieser Funktionen kommen und zur konsekutiven Störung des Zellzyklus.

Die Helicase DDX5 gilt als transkriptionaler Co-Aktivator für das p53 und spielt eine wichtige Rolle in der p53-abhängigen Apoptose (Bates et al. 2005). Durch Abnahme der Konzentration der DDX5 Helicase wurde eine Abnahme des Zellwachstums gefunden (Kokolo and Bach-Elias 2017).

Das Pre-Lamin A/C stellt die Vorstufe der Kernmembranproteine Lamin A und Lamin C, welche zu den Intermediärfilamenten gehören, dar (Dechat et al. 2008; Dittmer and Misteli 2011). Durch Farnesylierung, eine posttranslationale Modifikation von Proteinen, wird Pyrophosphat von Prelamin A/C abgespalten und durch weitere posttranslationale Modifikationen entsteht Lamin A und Lamin C. Bei der Farnesylierung werden unter anderem zytosolische Proteine über die angehängte Farnesylgruppe im Sinne eines Membranankers an der Zellmembran in einer Zelle befestigt (Kilic et al. 1997; Reddy and Comai 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von CAB063 und Lamin A, als Bestandteil der Kernmembran, detailliert untersucht. So ließen sich durch Co-Lokalisationsexperimente immunfluoreszenzmikroskopische Überlagerungen der beiden Proteine detektieren. Dies wurde zum einen in pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen, als auch in *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen gezeigt. Diese Befunde wurden durch eine Immunoblot-Analyse bestätigt, indem gezeigt werden konnte, dass das Lamin A und das CAB063 aneinanderbinden (siehe Abbildung 17).

Sowohl fluoreszenzmikroskopisch wie auch elektronenmikroskopisch fielen Veränderungen des Zellkerns auf, welche durch das CAB063 induziert werden könnten. In pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen sind deutliche Einschnürungen der Zellkernmembran auf den Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopiebildern zu erkennen. Dieses Phänomen lässt sich auch bei SINC-GFP transfizierten Zellen erkennen, allerdings wird darauf in der entsprechenden Publikation nicht näher eingegangen (Mojica et al. 2015). Offenbar führen CAB063 und sein Ortholog in *C. psittaci* SINC damit zu ähnlichen ultramorphologischen Veränderungen in den Zielzellen. Diese Einschnürungen sind auch auf elektronenmikroskopischen Bildern

bei apoptotischen Zellen zu finden (Pavelka 2015). Zusätzlich sind solche Einschnürungen der Zellkernmembran bei Mutationen von *LMNA*, dem codierenden Gen für Lamin A, bekannt. Durch Punktmutationen des *LMNA*-Gens, zeigen die Zellkerne Anomalitäten in Form von Einschnürungen, wie sie auch in pCI-CAB063 transfizierten Zellen zu erkennen waren (Goldman et al. 2004; Taimen et al. 2009; Barateau et al. 2017). Diese Einschnürungen können möglicherweise durch Bindung von CAB063 und Lamin A entstehen, was funktionell dann einer Mutation des *LMNA*-Gens gleichkommen würde. Mutationen des *LMNA*-Gens sind auch mit Apoptoseentstehung in Verbindung gebracht worden (Favreau et al. 2004; Attur et al. 2012). Die Aktivierung verschiedener Caspasen führt zu Veränderungen in der Kernmembran (Ruchaud et al. 2002; Raz et al. 2006). Durch Caspasenangriff bei der Apoptose werden Proteine der Kernmembran, wie Lamin A, abgebaut (Lazebnik et al. 1995; Rao, Perez, and White 1996). Durch Abbau von Lamin A und Akkumulation von Prelamin A/C wird oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion induziert. Dadurch wird das sogenannte ROS (Reactive Oxygen Species) Level erhöht (Schirmer and Gerace 2004) und es kommt zu Zellschädigungen und Apoptose (Sieprath et al. 2015).

Insgesamt führt in unseren Experimenten die Kernlokalisierung von CAB063 und Bindung an Lamin A zu morphologischen Veränderungen wie sie bei Zellen mit *LMNA*-Mutation und apoptotischen Zellen zu beobachten ist.

Im Unterschied zu CAB063 wurde das verwandte *C. pneumoniae*-Protein CpB0704 im Zytoplasmasaum und vereinzelt in den Einschlüssen in experimentell *C. pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen mittels direkter Immunfluoreszenz-mikroskopie detektiert. Ferner wurde CpB0704 im Zytoplasma der Wirtszelle, jedoch nicht im Zellkern der transfizierten Wirtszelle lokalisiert. Diese Ergebnisse wurden durch die Westernblot-Analysen der Zellfraktionen bestätigt. Auch anderen Autoren gelang es nicht CpB0704 im Zellkern nachzuweisen (Mojica et al. 2015). Auch die Morphologie der Zellkerne zeigt keine Veränderungen im Sinne der beobachteten Einschnürungen auf. Damit unterscheidet sich die subzelluläre Lokalisation und die morphologischen Auswirkungen auf die Wirtszelle von CpB0704 eindeutig von CAB063.

4.1.2 Apoptose- und Zelltodverhalten

Bei der Apoptose handelt es sich um den programmierten Zelltod. Dieser wird von der Zelle selbst aktiviert bzw. kann durch bestimmte Faktoren in der Zelle aktiviert werden. Es gibt zwei unterschiedliche Arten von Apoptose. Zum einen die intrinsische und zum anderen die extrinsische Apoptose. Bei der intrinsischen Apoptose wird der Zelltod durch intrazelluläre Stresssignale, wie oxidativer Stress, DNS-Schäden und fehlgefaltete Proteine, ausgelöst. Durch Auflösung der Mitochondrienmembran wird der oxidative Stress in den Zellen erhöht und es kommt dadurch zum Zelltod. Bei der extrinsischen Apoptose, die durch extrazelluläre Stresssignale ausgelöst wird, spielen vor allem die Caspasen eine Schlüsselrolle (Bohm and Schild 2003; Prokhorova et al. 2015). Die Caspasen 3, 6 und 7 sind unter anderem am Abbau von Lamin beteiligt (Ruchaud et al. 2002; Okinaga et al. 2007). Bei der p53-induzierten Apoptose kommt es zu einem Anstieg der Konzentration an p53 in der Zelle, wo weitere Faktoren, wie die Gene der Bcl2-Familie aktiviert werden, die wiederum die Caspasen 2, 8, 9 und 10 aktivieren (Bates et al. 2005; Prokhorova et al. 2015). Ab dem sogenannten „Point-of-no-return“ sind diese Veränderungen irreversibel und der Zelltod ist unumgänglich.

Charakteristische ultramorphologische und funktionelle Anzeichen sind der Verlust der Plasmamembranintegrität und die Entstehung der sogenannten „apoptotic bodies“ (Kroemer et al. 2009). Bei einer bakteriellen Infektion kann die Apoptose der Wirtszelle durch die Bakterien selbst inhibiert werden (Häcker 2001). Vor allem bei intrazellulär replizierenden Erreger ist die Inhibierung der wirtszelleigenen Apoptose zu Beginn des Entwicklungszyklus für eine erfolgreiche Vermehrung eine wichtige Voraussetzung. Ein solcher Mechanismus ist auch bei Chlamydien bekannt (Greene et al. 2004; Miyairi and Byrne 2006; Sixt, Valdivia, and Kroemer 2017). Hierbei spielen die Proteine CPAF und CpoS (Chlamydia promotor of Survival) eine wichtige Rolle (Faherty and Maurelli 2008; Bavoil and Byrne 2014; Sixt, Valdivia, and Kroemer 2017). Das Protein CPAF unterdrückt hierbei die Sensitivität der Zelle proinflammatorische Signale zu erkennen und darauf zu reagieren, indem es das zelleigene p65/RelA aus der NF- κ B-Proteinfamilie spaltet. Dadurch wird die inflammatorische Reaktion supprimiert und die Chlamydien können sich in der Zelle ungestört vermehren (Christian et al. 2010). Durch Inhibierung des CpoS, ein Membranprotein des Einschlusskörperchens, konnte gezeigt werden, dass eine Typ-1-Interferon Immunantwort induziert wird. Nach

Aktivierung von CpoS kommt es zur Inhibierung der Apoptose- und Nekroseentstehung der Zellen (Sixt, Valdivia, and Kroemer 2017), sodass der Entwicklungszyklus der Chlamydien fortgeführt werden kann. Allerdings muss für die Aufrechterhaltung der Infektion auch eine Freisetzung der infektiösen Elementarkörperchen am Ende des Entwicklungszyklus gewährleistet sein. Die molekularen Details der Freisetzung infektiöser Elementarkörperchen aus der Wirtszelle sind noch nicht verstanden. Möglicherweise wird der Untergang der Wirtszelle durch Chlamydien selbst induziert. Dazu kann die Induktion der Apoptose der Zelle zum Ziel führen.

Das Apoptose- und Zelltodverhalten der experimentell *C. abortus* infizierten und der pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Es wurden dabei Apoptosemarker, wie das Annexin V und FLICA sowie der Zelltodmarker Propidiumiodid zur Bestimmung der einzelnen Raten eingesetzt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches an der Zellmembran von apoptotischen Zellen gebildet wird. Bei FLICA handelt es sich um Inhibitoren, die kovalent an aktive Caspasen binden. Somit wurde mit zwei unterschiedlichen Markern das Apoptoseverhalten der Zellen untersucht. Darüber hinaus wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie nach charakteristischen ultramorphologischen Veränderungen bei Apoptose gesucht.

Bei der Untersuchung der experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen fiel auf, dass die Apoptoserate und Zelltodrate 48 Stunden nach der Infektion signifikant höher war als bei nicht-infizierten HeLa-Zellen. Zu früheren Infektionszeitpunkten waren keine Unterschiede der Apoptose- und Zelltodraten im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen zu erkennen. Das bedeutet, dass vermutlich erst am Ende des Entwicklungszyklus von *C. abortus*, die Apoptose eintritt. Welche chlamydialen Faktoren dabei eine Rolle spielen ist weitgehend unbekannt. Zu Beginn des Entwicklungszyklus wird die Apoptose durch CPAF inhibiert (Faherty and Maurelli 2008; Bavoil and Byrne 2014) und am Ende des Entwicklungszyklus offenbar induziert. Ein Hinweis, dass es sich bei dem apoptoseinduzierenden chlamydialen Faktor um CAB063 handeln könnte, liefern die Ergebnisse des folgenden Experiments. Hierbei wurde untersucht wie sich CAB063 auf die Apoptose- und Zelltodrate auswirkt. Dafür wurden pCI-GFP transfizierte und pCI-CAB063 transfizierte HeLa-Zellen miteinander verglichen. Dabei war die Apoptoserate der

pCI-CAB063- im Vergleich zu den pCI-GFP-transfizierten HeLa-Zellen signifikant höher. Damit konnte gezeigt werden, dass CAB063 bei der extrinsischen Apoptoseinduktion am Ende des Entwicklungszyklus beteiligt ist. Die Indizierung der Wirtszellapoptose durch CAB063 ist dabei durch unterschiedliche Mechanismen vorstellbar. Zum einen kann Apoptose durch die Bindung von CAB063 an Lamin A erfolge, wodurch es zur funktionellen Inaktivierung von Lamin A, Akkumulierung von Prelamin A/C und konsekutiven oxidativem Stress in der Wirtszelle kommt. Zum anderen könnte CAB063 direkt Caspasen aktivieren oder durch CAB063 induzierte Caspasen Angriff auf Lamin A zur Apoptose der Wirtszelle führen. Somit könnte eine CAB063 induzierte Apoptoseinduktion eine wichtige Rolle beim Untergang der Wirtszelle am Ende des Entwicklungszyklus spielen und damit entscheidend zur Freisetzung infektiöser *C. abortus* Elementarkörperchen betragen.

Ein weiterer wichtiger Punkt der mit diesen Erkenntnissen in den Kontext gebracht werden sollte, ist die signifikante Zunahme der Kernkörperchen in pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen, wobei es sich dabei um die sog. „apoptotic bodies“ (Kroemer et al. 2009) handeln könnte. Die „apoptotic bodies“ entstehen bei der Apoptose aus dem Zerfall von dicht gepackten Chromatin, wie in Abbildung 36 zu sehen ist (Doonan and Cotter 2008; Abdel Wahab et al. 2009; Strasser and Ferrando-May 2008). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass „apoptotic bodies“ beim Abbau von Lamin A durch die Caspase 6 entstehen können (Ruchaud et al. 2002).

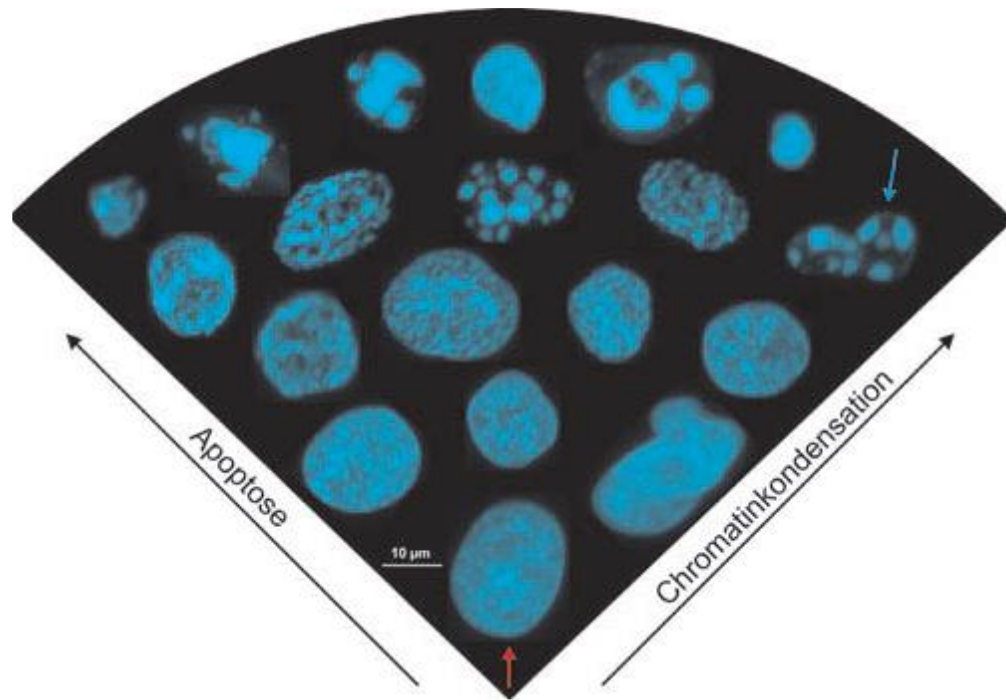


Abbildung 36: Laser-Scan-Konfokalmikroskopie der Kernfragmentierung und Chromatinkondensation in apoptotischen Zellkernen. Der unbehandelte Zellkern ist unten dargestellt (roter Pfeil) und zeigt eine gleichmäßige Verteilung des Chromatins. Mit Zunahme der Apoptose nimmt auch die Chromatinkondensation zu (entlang der Pfeile). Am Ende ist der Zellkern kondensiert und fragmentiert (kleiner blauer Pfeil) (Strasser and Ferrando-May 2008, Seite 597). Mit freundlicher Genehmigung von Elisa May (Autor).

Zusammenfassend deuten diese Befunde daraufhin, dass CAB063 bei der Apoptose in infizierten HeLa-Zellen beteiligt ist. Dies könnte ein wichtiger Mechanismus bei der Beendigung des Entwicklungszyklus und der Freisetzung von *Chlamydia abortus* aus der Wirtszelle sein.

Im Gegensatz dazu zeigt das verwandte *C. pneumoniae*-Protein CpB0704 keinen Einfluss auf die Apoptose- und Zelltodrate. Es ist davon auszugehen, dass CpB0704 aufgrund seiner unterschiedlichen subzellulären Expression andere Aufgaben im Vergleich zu CAB063 hat. Allerdings ist die Apoptoserate nach experimenteller *C. pneumoniae* Infektion am Ende des Entwicklungszyklus signifikant erhöht. Ebenso verhält es sich mit der Zelltodrate. Somit zeigt *C. pneumoniae* am Ende des Entwicklungszyklus die gleichen Eigenschaften hinsichtlich Apoptose und Zelltod wie *C. abortus*. Allerdings lassen sich diese Eigenschaften nicht auf das *C. pneumoniae* Protein CpB0704 zurückführen.

4.2 Schlussfolgerung und Ausblick

Das chlamydiale Protein CAB063 ist ein putativer Virulenzfaktor und wird vom Immunsystem erkrankter Tiere und Menschen erkannt. CAB063 wurde in dieser Arbeit eindeutig mit dem Verfahren der direkten Immunfluoreszenz, durch Zellfraktionierungsexperimente mittels Westernblot-Analysen und der Immunelektronenmikroskopie im Zellkern der Wirtszelle nachgewiesen. Mit Hilfe der Co-Immunopräzipitation konnten sowohl prokaryotische aus *C. abortus* als auch eukaryotische Bindungspartner dieses Chlamydienproteins gefunden werden. Als die wichtigsten Partner gelten das chlamydiale Heat Shock Protein 70 (HSP70), ein Typ III sezerniertes Protein, und das zelluläre Protein Lamin A als Bestandteil der Zellkernmembran. Durch Bindung an das HSP70, welches im Typ III Sekretionssystem eine entscheidende Rolle als Chaperon im Transport der Effektorproteine spielt, könnte das CAB063 durch den molekularen Spritzenmechanismus des Typ III Sekretionssystems in den Zellkern der Wirtszelle gelangen. Dort bindet CAB063 an das Lamin A der Zellkernmembran der Wirtszellen. Das CAB063 wäre somit als Effektorprotein des Typ III Sekretionssystems von *C. abortus* zu betrachten.

Durch weitere ultramorphologische Untersuchungen und durch die Bestimmung der Apoptoseraten konnten dem chlamydialen Protein CAB063 auch eine wichtige Rolle bei der Induktion der Wirtszellapoptose beigemessen werden. Diese Proteine könnten somit ein wichtiger Gegenpart zu den Proteinen CPAF und CpoS spielen, die zu Beginn des Entwicklungszyklus die Apoptose inhibieren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Transfektion der Wirtszelle mit CAB063 eine erhöhte Apoptoserate am Ende des chlamydialen Entwicklungszyklus zu detektieren ist. Ebenso entstehen vermehrt „apoptotic bodies“, die durch Chromatinkondensation bei apoptotischen Vorgängen gebildet werden. Zusätzlich zeigten sich in den Wirtszellkernen der CAB063-transfizierten Zellen Einschnürungen der Zellkernmembran, welche ebenfalls als zellmorphologische Anzeichen für die Apoptose zu bewerten sind. Bisher ist in keiner anderen Chlamydienart ein solcher apoptotischer Mechanismus gefunden worden, der durch ein zellkerngängiges Protein induziert wird. Es wurde zwar ein Ortholog von CAB063 in *C. psittaci* gefunden, allerdings wurde das Thema Apoptose in diesem Zusammenhang nicht diskutiert (Mojica et al. 2015). Es ist denkbar, dass SINC ebenfalls einen solchen Mechanismus auslöst, da es mit Lamin B einen ähnlichen

Bindungspartner wie CAB063 besitzt. In *C. pneumoniae* hatte das mit CAB063 verwandte Protein CpB0704 keine Auswirkungen auf die Apoptoseentstehung am Ende des Entwicklungszyklus.

Um funktionelle Eigenschaften putativer Virulenzfaktoren untersuchen zu können, werden in der mikrobiellen Pathogenitätsforschung meist Genmutationen eingeführt. Allerdings ist die genetische Manipulation von Chlamydien sehr schwierig. Erst in jüngster Vergangenheit gelang es einigen wenigen Arbeitsgruppen Chlamydien gentechnisch zu manipulieren, so dass es vorstellbar erscheint, eine Δ CAB063-Defektmutante zu generieren. Damit wären funktionelle Untersuchungen von CAB063 im Hinblick auf die Modifizierung des Entwicklungszyklus und damit des Wachstumsverhaltens möglich. Zu berücksichtigen wäre jedoch, dass das Ausschalten eines wichtigen Bestandteils des T3SS für Chlamydien letal sein kann und diese Strategie damit nicht zielführend ist. Deshalb spielen mittelfristig weiterhin andere Verfahren, wie die Co-Immunopräzipitation, die Elektronenmikroskope und Immunfluoreszenzmikroskopie in der chlamydialen Pathogenitätsforschung eine wichtige Rolle.

5. Zusammenfassung

Chlamydia abortus ist ein obligat intrazellulärer, weitverbreiteter Erreger bei Wiederkäuern. Als Erreger des Schafaborts kann *C. abortus* in betroffenen Landwirtschaften zu erheblich ökonomischen Schäden führen. In seltenen Fällen kann es zur zoonotischen Übertragung und bei infizierten Frauen zu schwerwiegenden Schwangerschaftskomplikationen kommen. Ein wichtiger Virulenzfaktor ist das chlamydiale Typ III Sekretionssystem (T3SS). Ziel dieser Arbeit war es, das putative T3SS Protein CAB063 von *Chlamydia abortus* molekularbiologisch und ultramorphologisch näher zu charakterisieren. In ersten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde CAB063 überwiegend im Einschlusskörper, aber auch im Zellkern von experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen detektiert. Bei pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen konnte CAB063 fluoreszenzmikroskopisch ebenfalls im Zellkern und in der Zellkernmembran nachgewiesen werden. Mit Hilfe immunelektronenmikroskopischer Analysen von pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen konnte die Kernlokalisierung von CAB063 bestätigt werden. Die Lokalisation von CAB063 im Einschlusskörperchen und im Zellkern der infizierten Wirtszelle konnte schließlich noch mittels Westernblot-Analysen gesichert werden. Im Rahmen der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung von pCI-CAB063 transfizierten HeLa-Zellen fielen ultramorphologische Veränderungen der Wirtszellkernmembran auf, die einhergehen mit einer Zunahme an Kernkörperchen. Um nun erste Anhaltspunkte für die mögliche Funktion des kernlokalisierten CAB063 zu bekommen, wurde mit Hilfe von Co-Immunopräzipitationsexperimenten nach möglichen Bindungspartnern von CAB063 gesucht. Ein Bindungspartner auf chlamydialer Seite wurde mit dem prokaryotischen HSP70 (Heat Shock Protein), ein T3SS Protein, von *C. abortus* gefunden. Auf zellulärer Ebene wurde Prelamin A/C, ein Bestandteil der Wirtszellkernmembran, identifiziert. Durch fluoreszenzmikroskopische Koloalisationsstudien sowie weiteren Co-Immunopräzipitationsexperimenten mit anschließenden Westernblot-Analysen gelang es, Lamin A als Bindungspartner von CAB063 zu bestätigen. Durch die Bindung des CAB063 an das HSP70 muss CAB063 als ein Effektorprotein des T3SS von *C. abortus* betrachtet werden. Aufgrund der eindeutigen Kernlokalisierung, der Zunahme an „apoptotic bodies“ und der späten Expression im *C. abortus* Entwicklungszyklus wurde der Einfluss von CAB063 auf Apoptose der Wirtszelle

untersucht. Dafür wurden die Apoptose- und Zelltodraten von experimentell *C. abortus* infizierten HeLa-Zellen und von pCI-CAB063 transfizierten Zellen untersucht. Im Vergleich zu nicht-infizierten HeLa-Zellen zeigte sich bei infizierten Zellen eine signifikant erhöhte Apoptoserate am Ende des Entwicklungszyklus von *C. abortus*. Außerdem steigerte sich die Apoptoserate signifikant bei pCI-CAB063 transfizierten Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten und pCI-GFP transfizierten HeLa-Zellen. Die Induzierung von Einschnürungen der Wirtszellkernmembran und Wirtszellapoptose durch CAB063 ist dabei durch unterschiedliche Mechanismen vorstellbar. Zum einen kann es durch die Bindung von CAB063 und Lamin A zu einer Inaktivierung von Lamin A kommen, was funktionell einer LMNA-Mutation gleichkommen und somit zu Einschnürungen und Apoptose der Wirtszelle führen kann. Ebenfalls werden durch CAB063 Caspasen aktiviert, die Lamin A abbauen und was somit ebenfalls funktionell einer LMNA-Mutation entsprechen könnte. Schließlich kann die Bindung von CAB063 an Lamin A zu einer Akkumulierung von Prelamin A/C und konsekutivem oxidativem Stress in der Wirtszelle und damit zur Wirtszellapoptose führen.

Die Suche nach orthologen Proteinen zu CAB063 bei humanpathogenen Erregern führte zur Untersuchung von CpB0704 in *C. pneumoniae*. Dabei handelt es sich um ein immunogenes Protein, welches eine Sequenzhomologie von 24,4 % zu CAB063 aufweist. Unsere Untersuchungen zeigten, dass CpB0704 überwiegend im Zytoplasma der Wirtszelle und im Einschlusskörperchen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und Westernblot-Analysen nachweisbar war. Obwohl ein signifikanter Anstieg der Apoptose- und Zelltodrate bei experimentell *C. pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen nachweisbar war, konnte anhand der Untersuchung der pCI-CpB0704 transfizierten HeLa-Zellen kein Einfluss von CpB0704 auf das Apoptose- und Zelltodverhalten der Wirtszellen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend sprechen die vorliegenden Befunde dafür, dass es sich bei CAB063 um ein Typ3-sezerniertes Protein handelt, welches in den Kern sezerniert wird und dort an das Kernmembranprotein Lamin A bindet. Dadurch kann CAB063 am Ende des Entwicklungszyklus die Wirtszellapoptose induzieren und somit zur Freisetzung infektiöser Chlamydienpartikel beitragen und damit den Infektionsprozess aufrechterhalten.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Abdel Wahab, Siddig Ibrahim, Ahmad Bustamam Abdul, Adel Sharaf Alzubairi, Manal Mohamed Elhassan, and Syam Mohan. 2009. 'In Vitro Ultramorphological Assessment of Apoptosis Induced by Zerumbone on (HeLa)', *JouRNSI of Biomedicine and Biotechnology*, 2009: 10.
- (2) AbdelRahman, Yasser M., and Robert J. Belland. 2005. 'The chlamydial developmental cycle', *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 949-59.
- (3) Aitken, I. D., and D. Longbottom. 2008. 'Chlamydial Abortion.' in, *Diseases of Sheep* (Blackwell Publishing Ltd).
- (4) Al-Younes, H. M., T. Rudel, V. Brinkmann, A. J. Szczepek, and T. F. Meyer. 2001. 'Low iron availability modulates the course of Chlamydia pneumoniae infection', *Cell Microbiol*, 3: 427-37.
- (5) Amin, J. D., and A. J. Wilsmore. 1995. 'In vitro survival of the BS isolate of Chlamydia psittaci (ovis) in ruminal and abomasal contents', *Res Vet Sci*, 59: 136-8.
- (6) Arnold, R., S. Brandmaier, F. Kleine, P. Tischler, E. Heinz, S. Behrens, A. Niinikoski, H. W. Mewes, M. Horn, and T. Rattei. 2009. 'Sequence-based prediction of type III secreted proteins', *PLoS Pathog*, 5: e1000376.
- (7) Attur, Mukundan, Ami Ben-Artzi, Qing Yang, Hayf E. Al-Mussawir, Howard J. Worman, Glyn Palmer, and Steven B. Abramson. 2012. 'Perturbation of nuclear lamin A causes cell death in chondrocytes', *Arthritis and Rheumatism*, 64: 1940-49.
- (8) Bannantine, John P., Walter E. Stamm, Robert J. Suchland, and Daniel D. Rockey. 1998. 'Chlamydia trachomatis IncA Is Localized to the Inclusion Membrane and Is Recognized by Antisera from Infected Humans and Primates', *Infection and Immunity*, 66: 6017-21.
- (9) Barateau, Alice, Nathalie Vadrot, Patrick Vicart, Ana Ferreira, Michèle Mayer, Delphine Héron, Corinne Vigouroux, and Brigitte Buendia. 2017. 'A Novel Lamin A Mutant Responsible for Congenital Muscular Dystrophy Causes Distinct Abnormalities of the Cell Nucleus', *PLoS ONE*, 12: e0169189.
- (10) Bastidas, R. J., and R. H. Valdivia. 2016. 'Emancipating Chlamydia: Advances in the Genetic Manipulation of a Recalcitrant Intracellular Pathogen', *Microbiol Mol Biol Rev*, 80: 411-27.

- (11) Bates, Gaynor J., Samantha M. Nicol, Brian J. Wilson, Anne-Marie F. Jacobs, Jean-Christophe Bourdon, Julie Wardrop, David J. Gregory, David P. Lane, Neil D. Perkins, and Frances V. Fuller-Pace. 2005. 'The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor', *The EMBO JouRNSI*, 24: 543-53.
- (12) Bavoil, P. M., and G. I. Byrne. 2014. 'Analysis of CPAF mutants: new functions, new questions (the ins and outs of a chlamydial protease)', *Pathog Dis*, 71: 287-91.
- (13) Bavoil, P. M., R. Hsia, and D. M. Ojcius. 2000. 'Closing in on Chlamydia and its intracellular bag of tricks', *Microbiology*, 146 (Pt 11): 2723-31.
- (14) Beare, Paul A., Kelsi M. Sandoz, Anders Omsland, Daniel D. Rockey, and Robert A. Heinzen. 2011. 'Advances in Genetic Manipulation of Obligate Intracellular Bacterial Pathogens', *Frontiers in Microbiology*, 2: 97.
- (15) Beeckman, D. S., T. Geens, J. P. Timmermans, P. Van Oostveldt, and D. C. Vanrompay. 2008. 'Identification and characterization of a type III secretion system in *Chlamydophila psittaci*', *Vet Res*, 39: 27.
- (16) Belland, R. J., G. Zhong, D. D. Crane, D. Hogan, D. Sturdevant, J. Sharma, W. L. Beatty, and H. D. Caldwell. 2003. 'Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 8478-83.
- (17) Bohm, I., and H. Schild. 2003. 'Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death', *Mol Imaging Biol*, 5: 2-14.
- (18) Brinkworth, Amanda J., Denise S. Malcolm, António T. Pedrosa, Katarzyna Roguska, Sevanna Shahbazian, James E. Graham, Richard D. Hayward, and Rey A. Carabeo. 2011. 'Chlamydia trachomatis Slc1 is a type III secretion chaperone that enhances the translocation of its invasion effector substrate TARP', *Mol Microbiol*, 82: 131-44.
- (19) Bush, R. M., and K. D. Everett. 2001. 'Molecular evolution of the Chlamydiaceae', *Int J Syst Evol Microbiol*, 51: 203-20.
- (20) Ceovic, Romana, and Sandra Jerkovic Gulin. 2015. 'Lymphogranuloma venereum: diagnostic and treatment challenges', *Infection and Drug Resistance*, 8: 39-47.

- (21) Chatterjee, S., S. Chaudhury, A. C. McShan, K. Kaur, and R. N. De Guzman. 2013. 'Structure and biophysics of type III secretion in bacteria', *Biochemistry*, 52: 2508-17.
- (22) Chen, Hui-Chin, Wei-Chin Lin, Yeou-Guang Tsay, Sheng-Chung Lee, and Ching-Jin Chang. 2002. 'An RNS Helicase, DDX1, Interacting with Poly(A) RNS and Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K', *JouRNSI of Biological Chemistry*, 277: 40403-09.
- (23) Christian, J., J. Vier, S. A. Paschen, and G. Hacker. 2010. 'Cleavage of the NF-kappaB family protein p65/RelA by the chlamydial protease-like activity factor (CPAF) impairs proinflammatory signaling in cells infected with Chlamydiae', *J Biol Chem*, 285: 41320-7.
- (24) Clifton, Dawn R., Cheryl A. Dooley, Scott S. Grieshaber, Reynaldo A. Carabeo, Kenneth A. Fields, and Ted Hackstadt. 2005. 'Tyrosine Phosphorylation of the Chlamydial Effector Protein Tarp Is Species Specific and Not Required for Recruitment of Actin', *Infection and Immunity*, 73: 3860-68.
- (25) Contreras, A., A. Gomez-Martin, A. PaterNS, J. Tatay-Dualde, M. Prats-Van Der Ham, J. C. Corrales, C. De La Fe, and A. Sanchez. 2016. 'Epidemiological role of birds in the transmission and maintenance of zoonoses', *Rev Sci Tech*, 35: 845-62.
- (26) Dai, W., and Z. Li. 2014. 'Conserved type III secretion system exerts important roles in Chlamydia trachomatis', *Int J Clin Exp Pathol*, 7: 5404-14.
- (27) Dechat, Thomas, Katrin Pflieghaar, Kaushik Sengupta, Takeshi Shimi, Dale K. Shumaker, Liliana Solimando, and Robert D. Goldman. 2008. 'Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin', *Genes & Development*, 22: 832-53.
- (28) Dille, Stephanie, Katharina Herbst, Larisa Volceanov, Thilo Nölke, Oliver Kretz, and Georg Häcker. 2014. 'Golgi Fragmentation and Sphingomyelin Transport to Chlamydia trachomatis during Penicillin-Induced Persistence Do Not Depend on the Cytosolic Presence of the Chlamydial Protease CPAF', *PLoS ONE*, 9: e103220.
- (29) Dittmer, T. A., and T. Misteli. 2011. 'The lamin protein family', *Genome Biol*, 12: 222.

- (30) Dong, F., Y. Zhong, B. Arulanandam, and G. Zhong. 2005. 'Production of a proteolytically active protein, chlamydial protease/proteasome-like activity factor, by five different Chlamydia species', *Infect Immun*, 73: 1868-72.
- (31) Doonan, F., and T. G. Cotter. 2008. 'Morphological assessment of apoptosis', *Methods*, 44: 200-4.
- (32) Essig, Andreas, and David Longbottom. 2015. 'Chlamydia abortus: New Aspects of Infectious Abortion in Sheep and Potential Risk for Pregnant Women', *Current Clinical Microbiology Reports*, 2: 22-34.
- (33) Everett, K. D., R. M. Bush, and A. A. Andersen. 1999. 'Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms', *Int J Syst Bacteriol*, 49 Pt 2: 415-40.
- (34) Faherty, C. S., and A. T. Maurelli. 2008. 'Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis during infection', *Trends Microbiol*, 16: 173-80.
- (35) Favreau, C., D. Higuete, J. C. Courvalin, and B. Buendia. 2004. 'Expression of a mutant lamin A that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy inhibits in vitro differentiation of C2C12 myoblasts', *Mol Cell Biol*, 24: 1481-92.
- (36) Fields, K. A., D. J. Mead, C. A. Dooley, and T. Hackstadt. 2003. 'Chlamydia trachomatis type III secretion: evidence for a functional apparatus during early-cycle development', *Mol Microbiol*, 48: 671-83.
- (37) Finco, O., A. Bonci, M. Agnusdei, M. Scarselli, R. Petracca, N. Norais, G. Ferrari, I. Garaguso, M. Donati, V. Sambri, R. Cevenini, G. Ratti, and G. Grandi. 2005. 'Identification of new potential vaccine candidates against Chlamydia pneumoniae by multiple screenings', *Vaccine*, 23: 1178-88.
- (38) Forsbach-Birk, Vera, Corinna Foddis, Ulrike Simnacher, Max Wilkat, David Longbottom, Gernot Walder, Christiane Benesch, Martin Ganter, Konrad Sachse, and Andreas Essig. 2013. 'Profiling Antibody Responses to Infections by Chlamydia abortus Enables Identification of Potential Virulence Factors and Candidates for Serodiagnosis', *PLoS ONE*, 8: e80310.
- (39) Friedman, Maureen G., Bella Dvoskin, and Simona Kahane. 2003. 'Infections with the chlamydia-like microorganism Simkania negevensis, a possible emerging pathogen', *Microbes and Infection*, 5: 1013-21.

- (40) Fritsche, T. R., M. Horn, M. Wagner, R. P. Herwig, K. H. Schleifer, and R. K. Gautam. 2000. 'Phylogenetic diversity among geographically dispersed Chlamydiales endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp', *Appl Environ Microbiol*, 66: 2613-9.
- (41) Gambhir, M., M. G. Basanez, F. Turner, J. Kumaresan, and N. C. Grassly. 2007. 'Trachoma: transmission, infection, and control', *Lancet Infect Dis*, 7: 420-7.
- (42) Goldman, R. D., D. K. Shumaker, M. R. Erdos, M. Eriksson, A. E. Goldman, L. B. Gordon, Y. Gruenbaum, S. Khuon, M. Mendez, R. Varga, and F. S. Collins. 2004. 'Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 8963-8.
- (43) Greene, Whitney, Yangming Xiao, Yanqing Huang, Grant McClarty, and Guangming Zhong. 2004. 'Chlamydia-Infected Cells Continue To Undergo Mitosis and Resist Induction of Apoptosis', *Infection and Immunity*, 72: 451-60.
- (44) Häcker, Georg. 2001. 'Microbial Inhibitors of Apoptosis.' in, *eLS* (John Wiley & Sons, Ltd).
- (45) Hagemann, Jürgen Benjamin, Ulrike Simnacher, David Longbottom, Morag Livingstone, Julia Maile, Erwin Soutschek, Gernot Walder, Katharina Boden, Konrad Sachse, and Andreas Essig. 2016. 'Analysis of Humoral Immune Responses to Surface and Virulence-Associated Chlamydia abortus Proteins in Ovine and Human Abortions by Use of a Newly Developed Line Immunoassay', *JouRNSI of Clinical Microbiology*, 54: 1883-90.
- (46) Halberstaedter, L. , and S. Von Prowazek. 1907. 'Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom. ', *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*, 26: 44-47.
- (47) Herrmann, Michael, Alexander Schuhmacher, Inge Mühlendorfer, Klaus Melchers, Christian Prothmann, and Sascha Dammeier. 2006. 'Identification and characterization of secreted effector proteins of *Chlamydia pneumoniae* TW183', *Research in Microbiology*, 157: 513-24.
- (48) Heuer, Dagmar, Anette Rejman Lipinski, Nikolaus Machuy, Alexander Karlas, Andrea Wehrens, Frank Siedler, Volker Brinkmann, and Thomas F. Meyer. 2009. 'Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction', *Nature*, 457: 731-35.

- (49) Hilgenfeld, Rolf, Jeroen Mesters, and Tanis Hogg. 2000. 'Insights into the GTPase Mechanism of EF-Tu from Structural Studies.' in, *The Ribosome* (American Society of Microbiology).
- (50) Ho, Theresa D., and Michael N. Starnbach. 2005. 'The Salmonella enterica Serovar Typhimurium-Encoded Type III Secretion Systems Can Translocate Chlamydia trachomatis Proteins into the Cytosol of Host Cells', *Infection and Immunity*, 73: 905-11.
- (51) Hobolt-Pedersen, Anne-Sofie, Gunna Christiansen, Evy Timmerman, Kris Gevaert, and Svend Birkelund. 2009. 'Identification of Chlamydia trachomatis CT621, a protein delivered through the type III secretion system to the host cell cytoplasm and nucleus', *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 57: 46-58.
- (52) Hodinka, R. L., C. H. Davis, J. Choong, and P. B. Wyrick. 1988. 'Ultrastructural study of endocytosis of Chlamydia trachomatis by McCoy cells', *Infect Immun*, 56: 1456-63.
- (53) Horn, M. 2008. 'Chlamydiae as symbionts in eukaryotes', *Annu Rev Microbiol*, 62: 113-31.
- (54) Horn, M., M. Wagner, K. D. Muller, E. N. Schmid, T. R. Fritsche, K. H. Schleifer, and R. Michel. 2000. 'Neochlamydia hartmannellae gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba Hartmannella vermiformis', *Microbiology*, 146 (Pt 5): 1231-9.
- (55) Hower, S., K. Wolf, and K. A. Fields. 2009. 'Evidence that CT694 is a novel Chlamydia trachomatis T3S substrate capable of functioning during invasion or early cycle development', *Mol Microbiol*, 72: 1423-37.
- (56) Hybiske, K., and R. S. Stephens. 2007. 'Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 11430-5.
- (57) Hyde, S. R., and K. Benirschke. 1997. 'Gestational psittacosis: case report and literature review', *Mod Pathol*, 10: 602-7.
- (58) Jewett, T. J., C. A. Dooley, D. J. Mead, and T. Hackstadt. 2008. 'Chlamydia trachomatis tarp is phosphorylated by src family tyrosine kinases', *Biochem Biophys Res Commun*, 371: 339-44.
- (59) Jewett, T. J., N. J. Miller, C. A. Dooley, and T. Hackstadt. 2010. 'The conserved Tarp actin binding domain is important for chlamydial invasion', *PLoS Pathog*, 6: e1000997.

- (60) Johnson, Raymond M., Hong Yu, Micah S. Kerr, James E. Slaven, Karuna P. Karunakaran, and Robert C. Brunham. 2012. 'PmpG(303-311), a Protective Vaccine Epitope That Elicits Persistent Cellular Immune Responses in *Chlamydia muridarum*-Immune Mice', *Infection and Immunity*, 80: 2204-11.
- (61) Johnson, Steven, and Ariel Blocker. 2008. 'Characterization of soluble complexes of the *Shigella flexneri* type III secretion system ATPase', *FEMS Microbiology Letters*, 286: 274-78.
- (62) Jorgensen, I., M. M. BeDNSr, V. Amin, B. K. Davis, J. P. Ting, D. G. McCafferty, and R. H. Valdivia. 2011. 'The *Chlamydia* protease CPAF regulates host and bacterial proteins to maintain pathogen vacuole integrity and promote virulence', *Cell Host Microbe*, 10: 21-32.
- (63) Kari, L., T. R. Southern, C. J. Downey, H. S. Watkins, L. B. Randall, L. D. Taylor, G. L. Sturdevant, W. M. Whitmire, and H. D. Caldwell. 2014. 'Chlamydia trachomatis polymorphic membrane protein D is a virulence factor involved in early host-cell interactions', *Infect Immun*, 82: 2756-62.
- (64) Kilic, F., M. B. Dalton, S. K. Burrell, J. P. Mayer, S. D. Patterson, and M. Sinensky. 1997. 'In vitro assay and characterization of the farnesylation-dependent prelamin A endoprotease', *J Biol Chem*, 272: 5298-304.
- (65) Kiselev, A. O., W. E. Stamm, J. R. Yates, and M. F. Lampe. 2007. 'Expression, processing, and localization of PmpD of *Chlamydia trachomatis* Serovar L2 during the chlamydial developmental cycle', *PLoS ONE*, 2: e568.
- (66) Kokolo, M., and M. Bach-Elias. 2017. 'Downregulation of p68 RNS Helicase (DDX5) Activates a Survival Pathway Involving mTOR and MDM2 Signals', *Folia Biol (Praha)*, 63: 52-59.
- (67) Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nuñez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, and G. Melino. 2009. 'Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009', *Cell death and differentiation*, 16: 3-11.
- (68) Lane, B. J., C. Mutchler, S. Al Khodor, S. S. Grieshaber, and R. A. Carabeo. 2008. 'Chlamydial entry involves TARP binding of guanine nucleotide exchange factors', *PLoS Pathog*, 4: e1000014.

- (69) Lazebnik, Y. A., A. Takahashi, R. D. Moir, R. D. Goldman, G. G. Poirier, S. H. Kaufmann, and W. C. Earnshaw. 1995. 'Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 9042-6.
- (70) Levy-Rimler, G., R. E. Bell, N. Ben-Tal, and A. Azem. 2002. 'Type I chaperonins: not all are created equal', *FEBS Lett*, 529: 1-5.
- (71) Liechti, G. W., E. Kuru, E. Hall, A. Kalinda, Y. V. Brun, M. VanNieuwenhze, and A. T. Maurelli. 2014. 'A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in *Chlamydia trachomatis*', *Nature*, 506: 507-10.
- (72) Longbottom, D., and L. J. Coulter. 2003. 'Animal chlamydioses and zoonotic implications', *J Comp Pathol*, 128: 217-44.
- (73) Longbottom, D., and M. Livingstone. 2006. 'Vaccination against chlamydial infections of man and animals', *Vet J*, 171: 263-75.
- (74) Lugert, R., M. Kuhns, T. Polch, and U. Gross. 2004. 'Expression and localization of type III secretion-related proteins of *Chlamydia pneumoniae*', *Medical Microbiology and Immunology*, 193: 163-71.
- (75) Lutter, E. I., C. Martens, and T. Hackstadt. 2012. 'Evolution and conservation of predicted inclusion membrane proteins in chlamydiae', *Comp Funct Genomics*, 2012: 362104.
- (76) Mayer, M. P., and B. Bukau. 2005. 'Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism', *Cell Mol Life Sci*, 62: 670-84.
- (77) Mehlitz, A., S. Banhart, A. P. Maurer, A. Kaushansky, A. G. Gordus, J. Zielecki, G. Macbeath, and T. F. Meyer. 2010. 'Tarp regulates early *Chlamydia*-induced host cell survival through interactions with the human adaptor protein SHC1', *J Cell Biol*, 190: 143-57.
- (78) Mehta, S. J., R. D. Miller, J. A. Ramirez, and J. T. Summersgill. 1998. 'Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* replication in HEp-2 cells by interferon-gamma: role of tryptophan catabolism', *J Infect Dis*, 177: 1326-31.
- (79) Meijer, A., A. Brandenburg, J. de Vries, J. Beentjes, P. Roholl, and D. Dercksen. 2004. '*Chlamydia abortus* infection in a pregnant woman associated with indirect contact with infected goats', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 24: 487-90.
- (80) Miyairi, I., and G. I. Byrne. 2006. '*Chlamydia* and programmed cell death', *Curr Opin Microbiol*, 9: 102-8.

- (81) Mojica, S. A., K. M. Hovis, M. B. Frieman, B. Tran, R. C. Hsia, J. Ravel, C. Jenkins-Houk, K. L. Wilson, and P. M. Bavoil. 2015. 'SINC, a type III secreted protein of *Chlamydia psittaci*, targets the inner nuclear membrane of infected cells and uninfected neighbors', *Mol Biol Cell*, 26: 1918-34.
- (82) Mölleken, Katja, Eleni Schmidt, and Johannes H. Hegemann. 2010. 'Members of the Pmp protein family of *Chlamydia pneumoniae* mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs', *Mol Microbiol*, 78: 1004-17.
- (83) Moulder, J. W. 1991. 'Interaction of chlamydiae and host cells in vitro', *Microbiol Rev*, 55: 143-90.
- (84) Mueller, K. E., G. V. Plano, and K. A. Fields. 2014. 'New frontiers in type III secretion biology: the *Chlamydia* perspective', *Infect Immun*, 82: 2-9.
- (85) Nans, A., M. Kudryashev, H. R. Saibil, and R. D. Hayward. 2015. 'Structure of a bacterial type III secretion system in contact with a host membrane in situ', *Nat Commun*, 6: 10114.
- (86) Navarro, J. A., J. N. Garcia de la Fuente, J. Sanchez, C. M. Martinez, A. J. Buendia, C. B. Gutierrez-Martin, E. F. Rodriguez-Ferri, N. Ortega, and J. Salinas. 2004. 'Kinetics of infection and effects on the placenta of *Chlamydophila abortus* in experimentally infected pregnant ewes', *Vet Pathol*, 41: 498-505.
- (87) Newman, L., J. Rowley, S. Vander Hoorn, N. S. Wijesooriya, M. Unemo, N. Low, G. Stevens, S. Gottlieb, J. Kiarie, and M. Temmerman. 2015. 'Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting', *PLoS ONE*, 10: e0143304.
- (88) Nietfeld, Jerome C. 2001. 'Chlamydial Infections in Small Ruminants', *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 17: 301-14.
- (89) Okinaga, T., H. Kasai, T. Tsujisawa, and T. Nishihara. 2007. 'Role of caspases in cleavage of lamin A/C and PARP during apoptosis in macrophages infected with a periodontopathic bacterium', *J Med Microbiol*, 56: 1399-404.
- (90) Pais, S. V., C. Milho, F. Almeida, and L. J. Mota. 2013. 'Identification of novel type III secretion chaperone-substrate complexes of *Chlamydia trachomatis*', *PLoS ONE*, 8: e56292.
- (91) Pavelka, Margit, Roth, Jürgen. 2015. 'Functional Ultrastructure - Atlas of Tissue Biology and Pathology', *Springer-Verlag*, Third Edition.

- (92) Pennini, Meghan E., Stéphanie Perrinet, Alice Dautry-Varsat, and Agathe Subtil. 2010. 'Histone Methylation by NUE, a Novel Nuclear Effector of the Intracellular Pathogen *Chlamydia trachomatis*', *PLOS Pathogens*, 6: e1000995.
- (93) Peters, J., D. P. Wilson, G. Myers, P. Timms, and P. M. Bavoil. 2007. 'Type III secretion a la *Chlamydia*', *Trends Microbiol*, 15: 241-51.
- (94) Pirbhai, M., F. Dong, Y. Zhong, K. Z. Pan, and G. Zhong. 2006. 'The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in *Chlamydia trachomatis*-infected cells', *J Biol Chem*, 281: 31495-501.
- (95) Pospischil, A., R. Thoma, M. Hilbe, P. Grest, and J. O. Gebbers. 2002. 'Abortion in woman caused by caprine *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1)', *Swiss Med Wkly*, 132: 64-6.
- (96) Prokhorova, E. A., A. V. Zamaraev, G. S. Kopeina, B. Zhivotovsky, and I. N. Lavrik. 2015. 'Role of the nucleus in apoptosis: signaling and execution', *Cell Mol Life Sci*, 72: 4593-612.
- (97) Ranjit, Roshni, Lynette Menezes, Mitchell Drucker, Gerald Msukwa, and Nkume Batumba. 2014. 'MateRNSI and Neonatal Risk Factors Associated with Vertical Transmission of Ophthalmia Neonatorum in Neonates Receiving Health Care in Blantyre, Malawi', *Middle East African JouRNSI of Ophthalmology*, 21: 240-43.
- (98) Rao, L., D. Perez, and E. White. 1996. 'Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis', *J Cell Biol*, 135: 1441-55.
- (99) Rashidi, Batool Hossein, Leili Chamani-Tabriz, Fadiéh Haghollahi, Mahmood Jeddi-Tehrani, Mohammad Mehdi Naghizadeh, Mamak Shariat, Mohammad Mehdi Akhondi, Rezvan Bagheri, Soheila Asgari, and Kevan Wylie. 2013. 'Effects of *Chlamydia trachomatis* Infection on Fertility; A Case-Control Study', *JouRNSI of Reproduction & Infertility*, 14: 67-72.
- (100) Raulston, J. E., C. H. Davis, T. R. Paul, J. D. Hobbs, and P. B. Wyrick. 2002. 'Surface accessibility of the 70-kilodalton *Chlamydia trachomatis* heat shock protein following reduction of outer membrane protein disulfide bonds', *Infect Immun*, 70: 535-43.
- (101) Raz, V., F. Carlotti, B. J. Vermolen, E. van der Poel, W. C. Sloos, S. Knaan-Shanzer, A. A. de Vries, R. C. Hoebe, I. T. Young, H. J. Tanke, Y. Garini,

and R. W. Dirks. 2006. 'Changes in lamina structure are followed by spatial reorganization of heterochromatic regions in caspase-8-activated human mesenchymal stem cells', *J Cell Sci*, 119: 4247-56.

(102) Reddy, Sita, and Lucio Comai. 2012. 'Lamin A, farnesylation and aging', *Exp Cell Res*, 318: 1-7.

(103) Robert-Koch-Institut. 2010. 'RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte: Infektionen durch Chlamydien (Teil 2): Erkrankungen durch Chlamydophila psittaci, Chlamydophila pneumoniae und Simkania negevensis', *Epidemiologisches Bulletin* 9/2010.

(104) Rohde, Gernot, Eberhard Straube, Andreas Essig, Petra Reinhold, and Konrad Sachse. 2010. 'Chlamydial Zoonoses', *Deutsches Ärzteblatt Internationales*, 107: 174-80.

(105) Ruchaud, Sandrine, Nadia Korfali, Pascal Villa, Timothy J. Kottke, Colin Dingwall, Scott H. Kaufmann, and William C. Earnshaw. 2002. 'Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation', *The EMBO Journal*, 21: 1967-77.

(106) Sachse, K., P. M. Bavoil, B. Kaltenboeck, R. S. Stephens, C. C. Kuo, R. Rossello-Mora, and M. Horn. 2015. 'Emendation of the family Chlamydiaceae: proposal of a single genus, Chlamydia, to include all currently recognized species', *Syst Appl Microbiol*, 38: 99-103.

(107) Salmond, G. P., and P. J. Reeves. 1993. 'Membrane traffic wardens and protein secretion in gram-negative bacteria', *Trends Biochem Sci*, 18: 7-12.

(108) Schirmer, Eric C., and Larry Gerace. 2004. 'The Stability of the Nuclear Lamina Polymer Changes with the Composition of Lamin Subtypes According to Their Individual Binding Strengths', *Journal of Biological Chemistry*, 279: 42811-17.

(109) Scidmore-Carlson, M. A., E. I. Shaw, C. A. Dooley, E. R. Fischer, and T. Hackstadt. 1999. 'Identification and characterization of a Chlamydia trachomatis early operon encoding four novel inclusion membrane proteins', *Mol Microbiol*, 33: 753-65.

(110) Sieprath, T., T. D. Corne, M. Nooteboom, C. Grootaert, A. Rajkovic, B. Buysschaert, J. Robijns, J. L. Broers, F. C. Ramaekers, W. J. Koopman, P. H. Willems, and W. H. De Vos. 2015. 'Sustained accumulation of prelamin A and

depletion of lamin A/C both cause oxidative stress and mitochondrial dysfunction but induce different cell fates', *Nucleus*, 6: 236-46.

(111) Sixt, Barbara S., Raphael H. Valdivia, and Guido Kroemer. 2017. 'Chlamydia trachomatis' struggle to keep its host alive', *Microbial Cell*, 4: 101-04.

(112) Snaveley, E. A., M. Kokes, J. D. Dunn, H. A. Saka, B. D. Nguyen, R. J. Bastidas, D. G. McCafferty, and R. H. Valdivia. 2014. 'Reassessing the role of the secreted protease CPAF in Chlamydia trachomatis infection through genetic approaches', *Pathog Dis*, 71: 336-51.

(113) Stephens, Richard S., Garry Myers, Mark Eppinger, and Patrik M. Bavoil. 2009. 'Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of Chlamydia resolved', *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 55: 115-19.

(114) Strasser, Christine, and Elisa Ferrando-May. 2008. 'Der illustrierte Zelltod: zur Mikroskopie apoptotischer Prozesse', *BioSpektrum*, 14. Jahrgang.

(115) Stuart, E. S., W. C. Webley, and L. C. Norkin. 2003. 'Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by Chlamydiae into host cells', *Exp Cell Res*, 287: 67-78.

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

(117) Taimen, P., K. Pfliegerhaa, T. Shimi, D. Moller, K. Ben-Harush, M. R. Erdos, S. A. Adam, H. Herrmann, O. Medalia, F. S. Collins, A. E. Goldman, and R. D. Goldman. 2009. 'A progeria mutation reveals functions for lamin A in nuclear assembly, architecture, and chromosome organization', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 20788-93.

(118) Ur-Rehman, T., A. Slepentin, H. Chu, A. Blomgren, M. K. Dahlgren, C. E. Zetterstrom, E. M. Peterson, M. Elofsson, and A. Gylfe. 2012. 'Pre-clinical pharmacokinetics and anti-chlamydial activity of salicylidene acylhydrazide inhibitors of bacterial type III secretion', *J Antibiot (Tokyo)*, 65: 397-404.

(119) van Ooij, C., G. Apodaca, and J. Engel. 1997. 'Characterization of the Chlamydia trachomatis vacuole and its interaction with the host endocytic pathway in HeLa cells', *Infection and Immunity*, 65: 758-66.

(120) Vandahl, Brian Berg, Anna Sofie Pedersen, Kris Gevaert, Arne Holm, Joël Vandekerckhove, Gunna Christiansen, and Svend Birkelund. 2002. 'The

expression, processing and localization of polymorphic membrane proteins in Chlamydia pneumoniae strain CWL029', *BMC Microbiology*, 2: 36-36.

(121) Vasilevsky, Sam, Milos Stojanov, Gilbert Greub, and David Baud. 2016. 'Chlamydial polymorphic membrane proteins: regulation, function and potential vaccine candidates', *Virulence*, 7: 11-22.

(122) Walder, G., H. Hotzel, C. Brezinka, W. Gritsch, R. Tauber, R. Wurzner, and F. Ploner. 2005. 'An unusual cause of sepsis during pregnancy: recognizing infection with chlamydia abortus', *Obstet Gynecol*, 106: 1215-7.

(123) Wang, Jie, Yingqian Zhang, Ping Yu, and Guangming Zhong. 2010. 'Immunodominant Regions of a Chlamydia trachomatis Type III Secretion Effector Protein, Tarp', *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*, 17: 1371-76.

(124) Wang, Sp. 2000. 'The microimmunofluorescence test for Chlamydia pneumoniae infection: technique and interpretation', *J Infect Dis*, 181 Suppl 3: S421-5.

(125) Wegele, H., L. Muller, and J. Buchner. 2004. 'Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding', *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 151: 1-44.

(126) Wehrl, W., V. Brinkmann, P. R. Jungblut, T. F. Meyer, and A. J. Szczepek. 2004. 'From the inside out--processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells', *Mol Microbiol*, 51: 319-34.

(127) Wheelhouse, N., K. Aitchison, K. Laroucau, J. Thomson, and D. Longbottom. 2010. 'Evidence of Chlamydia abortus vaccine strain 1B as a possible cause of ovine enzootic abortion', *Vaccine*, 28: 5657-63.

(128) Wheelhouse, Nick, Christopher Coyle, Peter G. Barlow, Stephen Mitchell, Gilbert Greub, Tim Baszler, Mick T. Rae, and David Longbottom. 2014. 'Waddlia chondrophila Infects and Multiplies in Ovine Trophoblast Cells Stimulating an Inflammatory Immune Response', *PLoS ONE*, 9: e102386.

(129) White, J. A. 2009. 'Manifestations and management of lymphogranuloma venereum', *Curr Opin Infect Dis*, 22: 57-66.

(130) Wilkat, M., E. Herdoiza, V. Forsbach-Birk, P. Walther, and A. Essig. 2014. 'Electron tomography and cryo-SEM characterization reveals novel ultrastructural features of host-parasite interaction during Chlamydia abortus infection', *Histochem Cell Biol*, 142: 171-84.

- (131) Wolf, K., H. J. Betts, B. Chellas-Géry, S. Hower, C. N. Linton, and K. A. Fields. 2006. 'Treatment of Chlamydia trachomatis with a small molecule inhibitor of the Yersinia type III secretion system disrupts progression of the chlamydial developmental cycle', *Mol Microbiol*, 61: 1543-55.
- (132) Wolf, Katerina, Elizabeth Fischer, and Ted Hackstadt. 2000. 'Ultrastructural Analysis of Developmental Events in Chlamydia pneumoniae-Infected Cells', *Infection and Immunity*, 68: 2379-85.
- (133) Wreghitt, T. 1993. 'Chlamydial infection of the respiratory tract', *Commun Dis Rep CDR Rev*, 3: R119-24.
- (134) Wuppermann, Frederik N., Johannes H. Hegemann, and Christian A. Jantos. 2001. 'Heparan Sulfate-like Glycosaminoglycan Is a Cellular Receptor for Chlamydia pneumoniae', *J Infect Dis*, 184: 181-87.
- (135) Yu, H., K. P. Karunakaran, X. Jiang, and R. C. Brunham. 2014. 'Evaluation of a multisubunit recombinant polymorphic membrane protein and major outer membrane protein T cell vaccine against Chlamydia muridarum genital infection in three strains of mice', *Vaccine*, 32: 4672-80.
- (136) Yu, Hong, Xiaozhou Jiang, Caixia Shen, Karuna P. Karunakaran, and Robert C. Brunham. 2009. 'Novel Chlamydia muridarum T cell Antigens Induce Protective Immunity against Lung and Genital Tract Infection in Murine Models', *JouRNSI of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182: 1602-08.
- (137) Zhong, Guangming. 2009. 'Killing me softly: chlamydial use of proteolysis for evading host defenses', *Trends Microbiol*, 17: 467-74.
- (138) Zhong, Guangming, Peiyi Fan, Hezhao Ji, Feng Dong, and Yanqing Huang. 2001. 'Identification of a Chlamydial Protease-Like Activity Factor Responsible for the Degradation of Host Transcription Factors', *The JouRNSI of Experimental Medicine*, 193: 935-42.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene, Uniklinikum Ulm durchgeführt. Hierfür danke ich Herrn Prof. Dr. med. Steffen Stenger für die großzügige Unterstützung.

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Andreas Essig. Er hat mir das Vertrauen und die Möglichkeit gegeben meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Prof. Essig stand mir stets mit seinem Rat zur Seite und hatte immer ein offenes Ohr. Für die Anregungen zu meinen Experimenten und meiner schriftlichen Arbeit möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Für die Bereitschaft als Referent meiner Promotion zu fungieren, danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Paul Walther, Zentrale Einrichtung Elektronenmikroskopie, Universität Ulm. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die Unterstützung im Bereich der Elektronenmikroskopie bedanken.

Ebenso möchte ich mich beim Tierforschungszentrum Universität Ulm, vor allem bei Frau Dr. Kirsch für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Besonderer Dank geht an Frau Ulrike Simnacher und Herr Dr. Benjamin Hagemann, für die stets sehr gute Betreuung, die Diskussionen und die Denkanstöße rund um meine Promotion. Ebenso möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Zentrale Einrichtung Elektronenmikroskopie, vor allem bei Renate und Chris, für die sehr schnelle Vorbereitung meiner elektronenmikroskopischen Präparate bedanken.

Ein großer Dank geht auch an meinen Kollegen Richi Bauer, Mark Grieshofer, Steffi Hauk, Michaela Hepperle, Steffi Kallert, Katrin Kennerknecht, Daniel Maier, Steffi Mauerer und den Praktikanten, vor allem Aniko Schrade. Insbesondere bei Steffi Mauerer und Michaela Hepperle möchte ich mich dafür bedanken, dass sie sich immer Zeit für mich genommen haben.

Meinen Eltern Marianne und Josef Hermanutz danke ich ganz besonders dafür, dass sie mir dieses Studium ermöglicht haben, in jeder Situation für mich da waren und mich immer in meinem Tun und meinen Entscheidungen unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund Philipp Marschall bedanken, der während der gesamten Zeit immer für mich da war, mich auch in schwierigen Zeiten aufgemuntert hat und mich in meiner Arbeit immer unterstützt hat.

Lebenslauf

„Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.“