

**Pathogen Wirtszellinteraktion -
Untersuchung der Rolle des Typ III Effektorproteins Tarp
für die Invasion von *Chlamydia trachomatis***

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Adrian Mehlitz
(geb. 19.03.1979 in Berlin)

im Fach medizinische Biotechnologie
eingereicht an der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Roland Lauster
Gutachter: Prof. Dr. Thomas F. Meyer
Prof. Dr. Ulf Stahl

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 20. November 2007

Berlin 2007

D 83

Die vorliegende Dissertation wurde am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in der Abteilung Molekulare Biologie unter Betreuung von Prof. Dr. Thomas F. Meyer durchgeführt.

Die universitäre Betreuung der Arbeit erfolgte durch Prof. Dr. Ulf Stahl.

Teile dieser Arbeit wurden unter den folgenden Titeln veröffentlicht:

Chlamydia avoids degradation through formation of a PIP₃ enriched early inclusion.

A. Mehlitz, H. Thorn, V. Brinkmann, M. Selbach and T.F. Meyer. 2007, submitted.

Src family kinases regulate entry and Tarp tyrosine phosphorylation during

Chlamydia trachomatis invasion. A. Mehlitz, S. Hess, M. Selbach and T.F. Meyer.

2007, submitted.

Gene expression profiles of *Chlamydomonas pneumoniae* during the developmental

cycle and iron depletion-mediated persistence. A. P. Mäurer, A. Mehlitz, H. J.

Mollenkopf, T.F. Meyer. 2007, PLOS Pathogens.

Umschlagsbild:

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Invasion von *C. trachomatis* LGV

L2 (rot) in humane Epithelzelle - HeLa (gelb). Pseudokolorierung mittels Adobe

Photoshop. Hans Thorn und Adrian Mehlitz, 2006.

Inhaltsverzeichnis

1. Abbildungsverzeichnis	6
2. Tabellenverzeichnis	8
3. Abkürzungsverzeichnis	9
4. Zusammenfassung	11
5. Einleitung	12
5.1 Biologie von <i>Chlamydia spp.</i>	12
5.2 Adhäsion an der Wirtszelle	15
5.3 Invasion der Wirtszelle	17
5.4 Signaltransduktion und Trafficking	19
5.5 Phosphoinositolmetabolismus	21
5.6 Das Typ III Sekretionssystem	24
5.7 Fragestellung	27
6. Material und Methoden	29
6.1 Zellkultur	29
6.2 Aufreinigung von <i>Chlamydia</i> Elementarkörperchen	29
6.3 Infektions- und Inhibitionsexperimente	29
6.4 Präparation von Plasmid-DNA	30
6.5 Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese	30
6.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
6.7 Restriktions- und Ligationsreaktionen	30
6.8 Herstellung und Transformation elektrisch kompetenter <i>E. coli</i>	31
6.9 DNA-Konstrukte	31
6.10 SDS-Page und Immunoblotting	32
6.11 Immunpräzipitation	33
6.12 <i>In vitro</i> Phosphorylierungsassays	34
6.13 Proteinarrays	34
6.14 Immunisierung zur Gewinnung von Anti-Serum	34
6.15 Immunfluoreszenzen	34
6.16 Automatische Mikroskopie	35
6.17 Konfokale Echtzeitmikroskopie	35
6.18 Immunoelektronenmikroskopie	35
6.19 Rasterelektronenmikroskopie	36
6.20 Lipidisolation und PIP ₃ – ELISA	36
6.21 Antikörper, Färbungen, Chemikalien	37
7. Ergebnisse	38
7.1 Tarp Phosphorylierung	38
7.1.1 Homologie zwischen ENIYESI-Motiven und Src-Substraten	38
7.1.2 Chemische Inhibition der Tarp-Phosphorylierung	42
7.1.3 <i>In vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Phosphorylierung von Tarp	43
7.1.4 Identifizierung der Tarp-Phosphorylierungsstelle	44

Inhaltsverzeichnis

7.1.5 Rolle der Tarp-Phosphorylierung für die Infektion	45
7.2 Untersuchung der Tarp-Interaktionspartner	48
7.2.1 Identifizierung von Tarp-Interaktionspartnern	49
7.2.2 Funktion der Phospholipase C gamma-Rekrutierung.....	52
7.3 Phosphoinositolmetabolismus während der <i>C. trachomatis</i> -Invasion	55
7.3.1 Bildung einer PstIns (3,4,5)-P ₃ -angereicherten frühen Inklusion.....	56
7.3.2 PI3K- und PLCγ-Abhängigkeit der PEEI-Bildung.....	60
7.3.3 Ultrastrukturelle Charakterisierung der PEEI.....	63
8. Diskussion	66
8.1 Die Rolle der Tarp-Phosphorylierung für die Infektion.....	66
8.2 Identifizierung von Tarp-Interaktionspartnern.....	68
8.3 PLCγ und die Bildung einer „PIP ₃ – enriched early inclusion“	71
8.4 Zusammenfassung der Diskussion	75
9. Ausblick.....	77
10. Literaturverzeichnis	78
11. Danksagung	88
13. Publikationsliste	89
14. Selbstständigkeitserklärung.....	90

1. Abbildungsverzeichnis

(1) Taxonomie der <i>Chlamydiales</i>	12
(2) Chlamydialer Entwicklungszyklus	14
(3) Schematischer Ablauf der Invasion	21
(4) Phosphoinositolstruktur	22
(5) Beeinflussung des Phosphoinositolmetabolismus durch Pathogene	23
(6) Das Typ III Sekretionssystem im Überblick	25
(7) <i>In silico</i> analyse des Tarp Proteins von <i>Chlamydia spp.</i>	39
(8) Sequenzalignment aus dem N-Terminus	40
(9) Sequenzalignment - Tarp Phosphorylierungsmotive	41
(10) Pharmakologische Inhibition der Tyrosinphosphorylierung	42
(11) <i>In vitro</i> Phosphorylierung von GST-Tarp	43
(12) Infektion von HeLa, SYF und SYF+Src Zellen	44
(13) SFKs phosphorylieren die Tarp ENIYE Motive	45
(14) Fluoreszenzfärbung der Infektion (HeLa, L929, SYF, SYF+Src)	46
(15) Infektivitätsassay mit L929, SYF und SYF+Src Zellen	47
(16) Infektivitätsassay nach Inhibition mit dem Src Inhibitor PP2	48
(17) SH2 Domänenarray - Interaktionsanalyse	49
(18) Sequenzalignment SH2 Interaktionsmotive gegen Tarp motive	50
(19) Koimmunopräzipitation von Tarp aus HeLa- und End-Zellen	50
(20) Koimmunopräzipitation von Tarp aus SYF+Src- und SYF-Zellen	51
(21) Immunfluoreszenzfärbung PLC γ und EKs	52
(22) Immunfluoreszenzfärbung der Infektion nach PLC γ Inhibition	52
(23) Quantifizierung der Inklusionsbildung nach PLC γ Inhibition	53
(24) Lamp-1 - EK - Immunfluoreszenz	54
(25) Quantifizierung der Lamp-1 Assoziation	55
(26) Echtzeitfluoreszenzmikroskopie der Chlamydieninvasion (BTK-PH-eGFP)	57
(27) Intensitätsmessung (Btk-PH-eGFP) Vakuolenbildung	57
(28) PIP ₃ – ELISA	58
(29) PI3K Tarp Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz	58
(30) Echtzeitfluoreszenzmikroskopie der Chlamydieninvasion (Rab11, Lgp-120)	59

Abbildungsverzeichnis

(31) Echtzeitfluoreszenzmikroskopie der Chlamydieninvasion (Rab5)	60
(32) Echtzeitfluoreszenzanalyse nach PI3K-Inhibition (BTK-PH-eGFP)	61
(33) Echtzeitfluoreszenzanalyse nach PLC γ -Inhibition (BTK-PH-eGFP)	62
(34) Vergleich der Intensitätsmessungen (Btk-PH-eGFP) nach Inhibition	63
(35) 3D-Rekonstruktion der PEEI	64
(36) Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie der PEEI	65
(37) Modell des Invasionstransports un der PEEI Bildung	72
(38) Steuerung des Lipidstoffwechsels durch PLC γ und PI3K	74
(39) Modell des Tarp-Interaktions	75

2. Tabellenverzeichnis

(1) PCR-Reaktionsansätze und -bedingungen	30
(2) Restriktions- und Ligationsreaktionen	31
(3) Tarp Klonierungen	32
(4) Klonierten Konstrukte – Übersicht	32
(5) Zusammensetzung Polyacrylamidgele	33
(6) Antikörper und Gegenfärbereagenzien	37

3. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
Akt	Alpha Serin/Threonin Kinase
bp	Basenpaar
CI-M6PR	eng.: Cation independent mannose-6-phosphate receptor
EEA1	eng.: Early endosomal antigen 1
EK	Elementarkörperchen
ERK1/2	eng.: externally regulated kinases 1/2
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia Coli</i>
CagA	eng.: Cytotoxicity associated protein A
CV	Chlamydiale Vakuole
CHX	Cycloheximid
COPD	eng.: Chronic obstructive pulmonary disease
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<i>C. pneumoniae</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (Gemisch aus d(A/T/C/G)TP)
FAK	eng.: Focal adhesion kinase
FCS	eng.: Foetal calf serum
GFP	eng.: Green fluorescent protein
GAG	Glykosaminoglykan
Grb-2	eng.: Growth factor receptor bound 2
GST	Glutathione-S-transferase
HeLa	Cervikalkrebszelllinie
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Lamp-1/2	eng.: Lysosomal associated membrane protein 1 and 2
LCK	eng.: Lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase
LGV	<i>Lymphogranuloma venereum</i>
MAPK	eng.: Mitogen-activated protein kinase
MTOC	Mikrotubuli Organisationszentrum
MOI	eng.: Multiplicity of infection
MOMP	eng.: Major Outer Membrane Protein

Abkürzungsverzeichnis

NP-40	Nonident P-40
PEEI	eng.: PtdIns(3,4,5)-P ₃ enriched early inclusion
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologiedomäne
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC γ 2	Phospholipase C gamma 2
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Pmp	eng.: Polymorphic Membrane Protein
Rab	eng.: Ras-related protein
Rac	eng.: Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Rho	eng.: Transforming protein Rho
RK	Retikularkörperchen
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Sodiumdodecylsulphat
SHC	eng.: Src homology containing
SHP2	eng.: Tyrosine-protein phosphatase, non-receptor type 11
SPG	Saccharose Phosphat Glutamat Puffer
SYF	<i>src, yes, fyn</i> dreifach Gendeletions-Mausfibroblasten
Tarp	eng.: Translocated actin recruiting phosphoprotein
TEMED	N,N,N,N -Tetramethyl-Ethylenediamine
Tir	eng.: Translocated intimin receptor
TTSS	eng.: Type III secretion system

4. Zusammenfassung

Chlamydia trachomatis, ein wichtiges humanpathogenes Bakterium, sekretiert während der Invasion in seine Wirtszelle das Typ III Effektorprotein Tarp. *In silico* Analysen offenbarten eine Homologie zwischen Tarp und Src-Kinasesubstraten. Diese Analyse ließ sich unter Verwendung verschiedener biochemischer Methoden bestätigen. So zeigte sich, dass sich die Tarp Tyrosinphosphorylierung durch einen Src-spezifischen Inhibitor blockieren lässt und dass Tarp durch rekombinantes Src *in vitro* phosphoryliert wird. *In vivo* konnte bestätigt werden, dass Tarp nicht in *src*-, *fyn*- und *yes*-defizienten Zellen phosphoryliert wird. Inhibiert man die Src-Kinasen während der Invasion, so führt dies zu einer um 60% abgeschwächten Chlamydieninfektion.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Interaktion von phosphoryliertem Tarp mit zellulären Komponenten untersucht. Experimente mit SH2-Domänenarrays haben eine Interaktion mit PLC γ , Shc, Lck und Shp-2 gezeigt. Die Interaktion zwischen Tarp und PLC γ , bzw. Tarp und Shc ließ sich mittels Immunpräzipitation bestätigen, eine morphologische Charakterisierung mittels Immunfluoreszenz im Anschluss zeigte, dass PLC γ mit den Bakterien während der Invasion kolokalisiert. Inhibiert man PLC γ während der Invasion verhindert dies die Inklusionsbildung der *C. trachomatis*-Infektion nahezu vollständig. Eine Inhibition nach der Invasion hingegen hatte nur einen sehr geringen Einfluss auf die Infektion.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, welche Bedeutung die Rekrutierung von PLC γ für den Invasionsprozess hat. Mit Hilfe konfokaler Echtzeitmikroskopie wurde der Phosphoinositolmetabolismus untersucht und es zeigte sich, dass Chlamydien eine PtdIns(3,4,5)-P₃-angereicherte frühe Inklusion bilden. Biochemische Experimente ließen erkennen, dass die Bildung dieser frühen Inklusion PI3K- und PLC γ - abhängig ist, und dass die Inhibition dieser Enzyme zur lysosomalen Degradation der Bakterien führt. Die Bildung einer PtdIns(3,4,5)-P₃-angereicherten frühen Inklusion stellt demnach einen bisher unbekanntem bakteriellen Mechanismus zur Vermeidung der Degradation dar.

5. Einleitung

5.1 Biologie von *Chlamydia spp.*

Die *Chlamydiales* sind eine Ordnung gram-negativer, obligat intrazellulärer, kokkoider Bakterien, welche einen spezifischen dimorphischen Entwicklungszyklus besitzen (Abdelrahman and Belland, 2005). Eine Infektion beginnt mit der Adhäsion des metabolisch inaktiven, sporenartigen Elementarkörperchens (Zhang and Stephens, 1992), welches im Infektionsverlauf zum metabolisch aktiven Retikularkörperchen differenziert (Matsumoto, 1982). Letzteres wächst und teilt sich in einer spezialisierten Vakuole, der Inklusion (Fields and Hackstadt, 2002), und redifferenziert am Ende eines Entwicklungszyklus zurück in ein Elementarkörperchen (Wyrick, 2000).

Eine Eingruppierung in die Ordnung *Chlamydiales* erfolgt aufgrund von 16S- und 23S-rRNA Sequenzanalysen bei >80% Ähnlichkeit. Die rRNA Analysen von Everett und Kollegen zeigten hierbei, dass die Ordnung der *Chlamydiales* eine wesentlich höhere Heterogenität aufweist, als bisher angenommen und dies führte zur Einführung einer neuen Taxonomie (Everett et al., 1999) (Abb. 1).

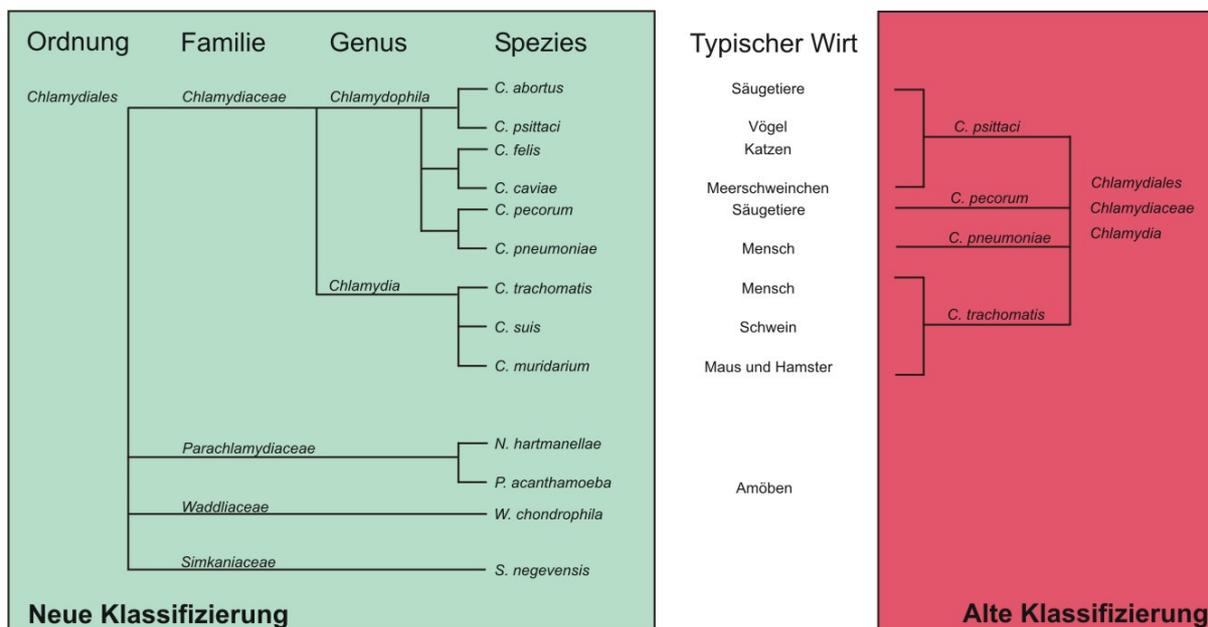


Abbildung 1: Neue Taxonomie der *Chlamydiales* nach Everett et al., 1999. Länge der Linien ist nicht proportional zu den tatsächlichen phylogenetischen Distanzen.

Von besonderem Interesse sind *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydophila pneumoniae*, da es sich bei diesen beiden Spezies um Humanpathogene handelt. *C. trachomatis* ist primär ein sexuell übertragbarer Erreger und ist der Auslöser von Augen-, Genital- und Atemwegserkrankungen. Er ist die häufigste bakterielle Ursache von sexuell übertragbaren Erkrankungen in der westlichen Welt und ist verantwortlich für ~90 Millionen neue Fälle pro Jahr weltweit (World Health Organisation, 2001). Das Pathogen ist eine der häufigsten Ursachen für inflammatorische Nierenbeckenerkrankungen (Wiesenfeld *et al.*, 2002), und Langzeitfolgen einer Infektion können chronische Schmerzen, ektopische Schwangerschaft und Unfruchtbarkeit sein (Buchan *et al.*, 1993). *C. pneumoniae* hingegen verursacht respiratorische Erkrankungen und ist assoziiert mit kardiovaskulären Erkrankungen (Belland *et al.*, 2004; Boman and Hammerschlag, 2002). Letztere stellen die weltweit häufigste Todesursache mit derzeit ~16.7 Millionen Toten pro Jahr dar (World Health Organisation, 2005), wobei der Anteil der *C. pneumoniae* Infektionen an dieser Zahl noch nicht geklärt ist.

Chlamydien durchlaufen während ihrer Vermehrung einen dimorphen Entwicklungszyklus (Abb. 2). Ihre extrazelluläre, infektiöse Form, das Elementarkörperchen (EK), bindet passiv an die Wirtszelle und induziert seine eigene Aufnahme. Einmal in die Zelle aufgenommen beginnt es innerhalb kurzer Zeit (~30-60 min.) mit der Redifferenzierung in die metabolisch aktive, nicht infektiöse Form, das Retikularkörperchen (RK) (Chi *et al.*, 1987; Rockey *et al.*, 1996). Unter Vermeidung der zellulären Pathogen-, „Degradationsmaschinerie“, den Phagolysosomen (Al Younes *et al.*, 1999; Scidmore *et al.*, 2003), wird das differenzierende EK, unter geschickter Ausnutzung von Wirtszellkomponenten, in eine perinukleäre Position nahe Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC), endoplasmatischen Retikulum und Golgiapparat transportiert (Hackstadt *et al.*, 1995; Grieshaber *et al.*, 2003). Dieser Prozess dauert ca. 4-8 Stunden und führt zur Bildung einer sogenannten Inklusion. Hat der Organismus einmal diese sichere Position erreicht, erhält er diese durch noch nicht vollständig geklärte, aber Proteinsynthese abhängige Mechanismen, aufrecht. In der Inklusion teilt sich das RK durch binäre Spaltung und erzeugt etwa 300-500 neue Bakterien. Am Ende des 48-72 Stunden dauernden Prozesses redifferenzieren die RK zu EK, die Wirtszelle wird durch einen noch nicht genauer geklärten Mechanismus lysiert (Perfettini *et al.*, 2003) und die EK können einen neuen Infektionszyklus starten.

Für Schwierigkeiten bei der Behandlung chlamydialer Infektionen sorgt ein sogenanntes „persistentes Stadium“, in das die Chlamydien durch bestimmte Induktoren, wie z.B. Interferon- γ oder Antibiotika getrieben werden können (Hogan et al., 2004). Es bilden sich sogenannte aberrante Körperchen, die durch ihre pleomorphische, vergrößerte Gestalt in der Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie erkennbar sind. In dieser Form können die Chlamydien eine unbestimmte Zeit im Körper des Wirts überdauern und unter für das Pathogen günstigen Bedingungen wieder in eine produktive Infektion übergehen (Abb. 2).

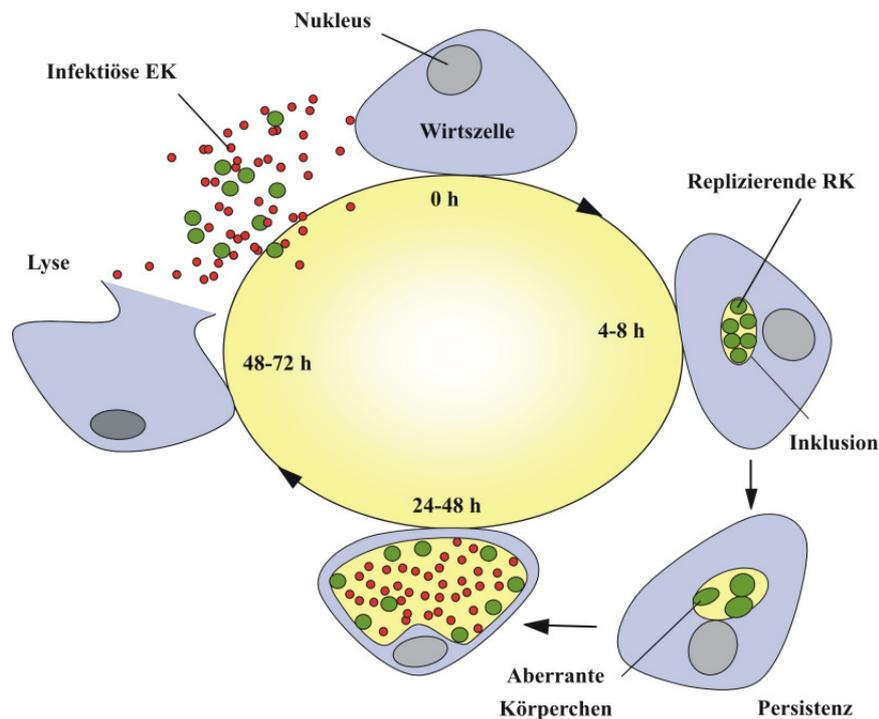


Abbildung 2: Der chlamydiale Entwicklungszyklus. Nach der Adhäsion der Elementarkörperchen (EKs, rot) an der Wirtszelle erfolgt die Aufnahme in ein eng anliegendes Phagosom. Transport und Beginn der Replikation benötigen je nach Spezies ~4-8 Stunden. In Zellkulturen teilen sich die Retikularkörperchen (RKs, grün) je nach Spezies ~24-48 Stunden in einer speziellen Vakuole, der Inklusion, um anschließend zu redifferenzieren. Ein neuer Infektionszyklus wird durch die Lyse der Wirtszelle nach ~48-72 Stunden eingeleitet. Ein Persistentes Stadium kann durch bestimmte "Induktoren" wie z.B. IFN- γ eingeleitet werden. Während der Persistenz teilen sich die EKs nicht, replizieren aber ihr Genom und schwellen zu sogenannten aberranten Körperchen (AKs) an. Entfernt man den Persistenzinduktor kann der Zyklus wieder fortgesetzt werden.

C. trachomatis EKs sind rund und elektronendicht mit einem Durchmesser von etwa 0,3-0,5 μm (Eb et al., 1976). *C. pneumoniae* EK besitzen zwar die gleiche Größe, werden jedoch häufig als birnenförmig beschrieben (Miyashita et al., 1993). Das EK gilt als die

infektiöse Form des Organismus, auch wenn es noch unbestätigte Daten gibt, dass die RKs des nahe verwandten Organismus *Simkania negevensis* (*S. negevensis*) ebenfalls infektiös sein könnten (Friedman et al., 2003). Funktionell kann das EK als eine Art „Sporen-Form“ angesehen werden, welche die Aufgabe hat, das Überleben in einer für Chlamydien lebensfeindlichen Umgebung zu sichern. EK gelten als metabolisch inaktiv, bis sie von einer geeigneten Wirtszelle mittels Endozytose aufgenommen werden (Soloff et al., 1982).

Die Elektronendichte der EK resultiert aus der extremen Kondensation der DNA der Chlamydien, die möglicherweise auf die histonartigen Proteine dieser Organismen zurückgeführt werden kann (Kaul and Wenman, 1998). Die Zellwand der Chlamydien enthält nur sehr geringe Mengen von Peptidoglykan als Gerüstsubstanz. Man nimmt an, dass die Zellwand ihre Stabilität durch Disulfidbrücken zwischen Cystein und Methioninresten der zahlreichen in die Zellwand eingebauten Proteine, erhält (Yen et al., 2005). Die Zellwand der EKs wird an vielen Stellen von nadelartigen Fortsätzen, den „Injektionsnadeln“, einem Teil des Typ III Sekretionssystems (TTSS), durchdrungen (Matsumoto, 1982) (s. Kapitel 5.6).

Das RK stellt das intrazelluläre-replikative Stadium des chlamydialen Lebenszyklus dar. RKs besitzen einen Durchmesser von ca. 1 µm, sind metabolisch aktiv und nicht infektiös (Matsumoto, 1982). RK sind reich an Ribosomen, ihre DNA ist im Gegensatz zum hochkondensierten Zustand der EK diffus und fibrillär. Mit ihrer trilaminaren Membran zeigen sie den typischen Membranaufbau gram-negativer Bakterien (Zytoplasmamembran, Mureinschicht, äußere Membran) (Matsumoto and Manire, 1970). Die äußere Membranschicht weist, wie beim EK, zahlreiche Fortsätze und Rosetten auf. Ultrastrukturelle Untersuchungen der Inklusion zeigen, dass diese Fortsätze in die Inklusionsmembran hineinragen (Matsumoto, 1973). Das Vorhandensein der zahlreichen Typ III-Translokationkanäle in EKs und RKs deutet auf die starke Interaktion zwischen Pathogen und Wirtszelle hin. Am Ende des chlamydialen Entwicklungszyklus redifferenziert das RK zum EK mit ultrastrukturell gut erkennbarer Kondensation seiner DNA und bereitet somit einen neuen Infektionszyklus vor.

5.2 Adhäsion an der Wirtszelle

Eine Chlamydieninfektion wird durch die Adhäsion des EKs an die Wirtszelle eingeleitet. Aufgenommen werden EKs nur bei Temperaturen über 20-22°C, darunter erfolgt zwar eine Adhäsion jedoch keine Invasion (Carabeo and Hackstadt, 2001). EKs sind

speziesabhängig unterschiedlich stark negativ geladen und werden daher von der ebenfalls negativ geladenen Wirtszelloberfläche abgestoßen (Vance, Jr. and Hatch, 1980). Einige Stämme weisen eine deutlich höhere negative Ladung auf und benötigen deshalb *in vitro* zusätzliche Maßnahmen um Wirtszellen zu infizieren, wie z.B. Zentrifugation auf Wirtszellmonolayer. Vertreter dieser stärker negativ geladenen Stämme sind z.B. die Trachoma Biovarianten von *C. trachomatis*. Für diese Stämme wurde auch beschrieben, dass positiv geladene Makromoleküle wie DEAE Dextran oder Poly-L-Lysin die Infektivität in Zellkultur erhöht (Soderlund and Kihlstrom, 1982; Donati et al., 1995).

Die in unserem Labor verwendete Biovariante *C. trachomatis* LGV L2 dagegen hat eine deutlich geringere negative Oberflächenladung und wird durch die oben genannten Makromoleküle kaum beeinflusst. Es handelt sich um einen sehr invasiven Stamm, der zur Infektion nicht auf Zentrifugation angewiesen ist und sich aufgrund seines schnellen Wachstums als Modellorganismus sehr gut eignet (Hackstadt, 1999).

Versuche, chlamydiale Adhäsine oder Wirtszellrezeptoren zu identifizieren, welche die Adhäsion vermitteln, sind bis heute nicht schlüssig. N-Acetylneuraminsäure und N-Acetylglukosamin konnten in Zellkulturen, denen diese Moleküle aufgrund von Neuraminidasebehandlung oder Mutation fehlen, nicht als Bestandteile eines Wirtszellrezeptors bestätigt werden (Allan and Pearce, 1987). Heparin und Heparansulfat dagegen konnten als reversible, Adhäsion-vermittelnde Moleküle identifiziert werden, auch wenn ihr tatsächlicher Wirkmechanismus immer noch umstritten ist (Zhang and Stephens, 1992). Sie gehören zu den Glykosaminoglykanen (GAG), linearen, negativ geladenen Polymeren, bestehend aus sich wiederholenden Einheiten von Aminosuktern und Uronsäure. Kovalent gekoppelt an Proteine bilden sie Proteoglykane und kommen auf den meisten Zellen vor. Heparansulfat übt verschiedene Funktionen aus, wie die Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix (z.B. Fibronectin, Kollagen und Laminin) (Coombe and Kett, 2005; Iozzo, 2005). Interessanter- und widersprüchlicherweise inhibieren die anderen Mitglieder dieser GAG-Familie (Hyaluronsäure, Chondroitin- und Keratansulfat) die Infektivität von *C. trachomatis* nicht signifikant und spiegeln somit die Kontroversität der Diskussion um potentielle Adhäsine wieder (Zaretzky et al., 1995).

Vermutlich ist der Adhäsionsprozess dynamisch und läuft unter Beteiligung mehrerer Rezeptoren ab. Interessant sind auch dünnschichtchromatographische Versuche, die zeigen, dass *Chlamydophila psittaci* an Phosphatidylethanolamin und die Glykolipide Asialo-GM1

und Asialo-GM2 binden (Krivan et al., 1991). Dieser wichtige Befund wurde überraschenderweise nicht weiter verfolgt, obwohl später noch gezeigt werden konnte, dass *Arum maculatum* Lektin, welches an die beiden Glykolipide bindet, die Aufnahme von *C. pneumoniae* verhindert (Mladenov et al., 2002).

Auch die Proteinkomponenten auf der chlamydialen Seite, die eine Adhäsion vermitteln könnten, wurden bisher nur unvollständig charakterisiert. Eine der Hauptschwierigkeiten stellt hierbei das fehlende System zur genetischen Modifikation der Chlamydien dar, was Gendeletions- (Knock-out) Strategien nicht zulässt (Tam et al., 1994). Verschiedene besonders häufige Moleküle, welche sowohl auf, als auch in der äußeren Membran lokalisiert sind, werden als potentielle Adhäsine in Betracht gezogen. Das Major Outer Membrane Protein (MOMP) ist eines dieser potentiellen Adhäsine. Es wird mit einer Mannose-Oligosaccharidseitenkette N-glykosyliert, eine für Eubakterien äußerst ungewöhnliche Modifikation (Swanson and Kuo, 1991; Lechner and Wieland, 1989). Eine Theorie ist, dass diese N-Glykosylierung von Wirtszellkomponenten ausgeführt wird. Interessanterweise blockiert eine mit Glykanase abgespaltene Seitenkette die Aufnahme von Chlamydien (Swanson and Kuo, 1991).

Abschließend bleibt zu bemerken, dass die zahlreichen Unterschiede zwischen den in den Studien verwendeten Spezies eine eindeutige Aussage schwierig machen. Arbeiten aus unserem Labor deuten darauf hin, dass auch die Familie der polymorphen Membranproteine (Pmps) an der Adhäsion beteiligt sein könnten, da Antiserum gegen diese Proteine die Infektivität in Zellkulturen stark senkt (Wehrl et al., 2004). Auch die extreme Expansion dieser Proteinfamilie über das chlamydiale Genom und die Oberflächenexposition dieser Proteine deutet auf eine wichtige Rolle während der Infektion hin (Christiansen et al., 2000; Grimwood and Stephens, 1999; Grimwood et al., 2001).

5.3 Invasion der Wirtszelle

Chlamydien werden in eng anliegende endozytotische Vesikel aufgenommen (Zeichner, 1982). Zwei Mechanismen der Aufnahme werden diskutiert: (i) sequentielle, reißverschlussartige, Mikrofilament-abhängige Phagozytose (Finlay and Cossart, 1997) und (ii) Aufnahme in Clathrin-ummantelte Vesikel durch rezeptorvermittelte Endozytose (Hodinka et al., 1988). Der exakte Aufnahmemechanismus wurde noch nicht vollständig

aufgeklärt (Ward and Murray, 1984), problematisch ist hierbei vor allem, dass sich die Aufnahme anscheinend abhängig von den Inokulationsbedingungen (z.B. mit oder ohne Zentrifugation) ändern kann (Prain and Pearce, 1989). Dies führt insbesondere für den zweiten Mechanismus zu einigen Unstimmigkeiten. Clathrin ummantelte Zellmembranvertiefungen besitzen normalerweise einen Durchmesser von ca. 50 nm, EK dagegen besitzen einen Durchmesser von ca. 300 nm. Eine Aufnahme über diesen Mechanismus erscheint daher zunächst unwahrscheinlich. Dennoch wurden abhängig von Inokulation (statische oder Zentrifugationsunterstützte Infektion) oder Kulturbedingungen (polarisierte Zellen auf Kollagen oder Plastik), Chlamydien in Clathrin-ummantelten Vesikeln gefunden (Prain and Pearce, 1989; Wyrick et al., 1989).

Im Gegensatz zu den Unstimmigkeiten, die bei der Erklärung des zweiten Mechanismus auftreten, finden sich zunehmend mehr Beweise, welche auf eine Aufnahme über eine sequentielle, zipperartige, Mikrofilament-abhängige Phagozytose hindeuten. So konnte z.B. gezeigt werden, dass Cytochalasin D (ein Aktin-Polymerisationsinhibitor) die Aufnahme von Chlamydien inhibiert (Schramm and Wyrick, 1995; Carabeo et al., 2002). Die Invasion ist zusätzlich abhängig vom Mikrotubulinetzwerk, da eine Blockierung der Motorproteine Kinesin und Dynein durch Antikörpermikroinjektion die Infektion blockieren. Vermutlich reflektiert diese Beobachtung das enge Zusammenspiel von Mikrofilamenten und Mikrotubuli während der Phagozytose (Clausen et al., 1997; Escalante-Ochoa et al., 1999; Grieshaber et al., 2003).

Eine weitere Membranstruktur rückt hinsichtlich der chlamydialen Invasion zunehmend in den Fokus: Die Rolle spezieller lipidreicher Membranmikrodomänen, den „Lipidrafts“, wird momentan untersucht. Für verschiedene Pathogene konnte eine Abhängigkeit von diesen Membranmikrodomänen für die Infektion gezeigt werden (Manes et al., 2003). Auch Chlamydien scheinen für ihre Aufnahme diese Domänen zu benötigen, wie durch Experimente mit Lipidchelatoren (Filipin und Nystatin) gezeigt werden konnte (Stuart et al., 2003). Es sollte allerdings in diesem Zusammenhang erwähnt werden, dass auch diese Beobachtung nicht unumstritten ist; so wurde die Assoziation mit Cholesterol kürzlich widerlegt und als experimentelles Artefakt bezeichnet (Gabel et al., 2004). Trotz der widersprüchlichen Aussagen ist die Hypothese einer Lipidmikrodomänenbeteiligung sehr attraktiv, da diese Domänen Zentren der Signaltransduktion darstellen und die Initiation der Aufnahme durch eine Interaktion von Pathogen und Wirt sehr gut erklären ließen.

Interessant ist auch der Befund, dass Chlamydien kurz nach der Aufnahme aus dem endozytotischen Transportweg in den exozytotischen Transportweg wechseln und dort mit sphingomyelinreichen Vesikeln interagieren. Die Bedeutung dieser Lipidanreicherung in der chlamydialen Vakuole könnte in der Vermeidung einer Ansäuerung (Degradation in den Lysosomen) oder in einer Transportsteuerung liegen (Fields and Hackstadt, 2002; Scidmore et al., 2003).

5.4 Signaltransduktion und Trafficking

Beim Eintritt in die Wirtszelle kommt es innerhalb von 15 Minuten zur Phosphorylierung von Wirtszellproteinen (Fawaz et al., 1997). Die Infektion führt zu einer schnellen Aktivierung der Kinasen MEK und ERK1/2, gefolgt von einer PI3K-abhängigen Aktivierung von Akt (Su et al., 2004; Coombes and Mahony, 2002). Eine Tyrosinphosphorylierung der Focal Adhesion Kinase (FAK) geht ihrer Assoziation mit der p85-Untereinheit der PI3-Kinase voraus. Die isoform-spezifische Aktivierung (Phosphorylierung) des Adapterproteins SHC begleitet ebenfalls die Invasion (Coombes and Mahony, 2002). Inhibition der Kinasen MEK und PI3-Kinase führt zu einer deutlichen Abnahme der Invasion. Zu den zahlreichen, durch Phosphorylierung aktivierten Signalmolekülen kommt noch die vor kurzem entdeckte Abhängigkeit der Aktinrekrutierung von der kleinen GTPase Rac1. Die Aktivierung von Rac1 scheint für die Chlamydieninvasion spezifisch zu sein, da die GTPasen Cdc42 und Rho experimentell keine Rolle spielen (Carabeo et al., 2004; Subtil et al., 2004).

„Second Messenger“ werden bei beinahe allen Signaltransduktionsprozessen freigesetzt, da sie eine Signalverstärkung und Übertragung zu nachfolgenden Signalkomponenten vermitteln. Verschiedene Studien haben den Einfluss von Second Messengern auf die Chlamydieninfektion untersucht. So führt das zyklische Nukleotid cGMP zu einer Verstärkung der Infektion, während cAMP die Infektion abschwächt (Ward and Salari, 1982). Außerdem erzeugt eine Infektion mit *C. trachomatis* in HeLa-Zellen einen erhöhten Kalziumfluß über die Zellmembran. Diese Beobachtung wird durch Experimente mit Kalziumionophoren ergänzt: Eine Inkubation mit diesen Substanzen führt zu einer schwachen Erhöhung der Infektivität in HeLa Zellen (Murray and Ward, 1984). Die Kalziumumverteilung wird mit der Rekrutierung kalziumbindender Proteine, wie den

Annexinen, während der Invasion in Zusammenhang gebracht (Majeed et al., 1999b; Majeed et al., 1994b; Majeed et al., 1994a).

Kurz nach der Aufnahme weist die frühe Inklusion Marker der frühen Endosomen (EEA1) auf (Wissel et al., 2003). Da die frühe Inklusion den normalen endozytotischen Transportweg schnell verlässt, zeigt sie bereits nach 6 Stunden weder eine Assoziation mit Markern der frühen oder der späten Endosomen (Kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphatrezeptor), noch mit Markern der Lysosomen (Lysosomen assoziiertes Membranprotein-1 oder -2) (Al Younes et al., 1999; Heinzen et al., 1996). Die frühe Inklusion fusioniert auch nach UV-Inaktivierung oder Antibiotika-vermittelter Inhibition der Proteinsynthese nicht sofort mit Lysosomen, was auf eine intrinsische Eigenschaft der EK hindeutet, eine Fusion mit den Lysosomen zu blockieren. Erst kürzlich wurde ein Protein gefunden, welches zur frühen Inklusion von *C. pneumoniae* in Makrophagen transloziert. Dieses Protein (Amphiphysin II_m) scheint die Fusion der frühen Inklusion mit Lysosomen zu inhibieren (Gold et al., 2004), ganz ähnlich wie dies durch TACO bei Mykobakterien geschieht (Pieters, 2001). Bei beiden Proteinen handelt es sich um Hüllproteine der Endosomen. Werden diese nicht abgebaut, ist eine Fusion, bzw. Reifung zum Lysosom nicht möglich.

Es wird zunehmend deutlicher, dass die Interaktion der Chlamydien mit der Wirtszelle eine hohe Komplexität aufweist. Unklar ist, wie bestimmte Prozesse durch die Bakterien eingeleitet werden, da bislang die genetischen Möglichkeiten für Gendelektionsstrategien fehlen. Zusammenfassend lässt sich jedoch eine zeitliche Abfolge der Signaltransduktion während der Chlamydieninvasion formulieren: (i) *Chlamydia spp.* adherieren an der Wirtszelle, (ii) Rekrutierung und Aktivierung von Signalmolekülen (u.a. PI3K, Ras, Raf, MEK, Erk1/2), (iii) Second Messenger werden freigesetzt (u.a. Ca²⁺, cGMP, cAMP), (iv) Aktinremodellierung (GTPasen: u.a. Rac1), (v) Bildung der CV (unbekannte Wirtszellmembrankomponenten), (vi) Rekrutierung von endosomalen Hüllproteinen (z.B. Amphiphysin II_m, Annexine) und (vii) verlassen der endosomalen Aufnahmeroute sowie Rekrutierung weiterer Proteine (z.B. Rab GTPasen und 14-3-3 β) (Abb. 3).

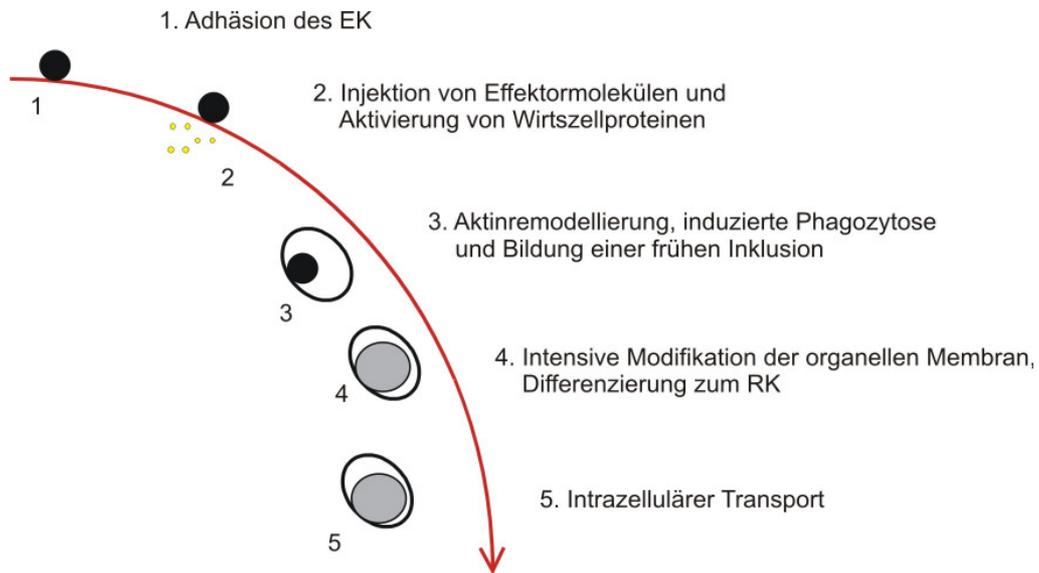


Abbildung 3: Schematischer Ablauf der Invasion. EK adherieren zunächst wie unter 3.2 beschrieben an der Wirtszelle (roter Pfeil) (1) um sofort einen Cocktail von Effektorproteinen in die Zelle zu sekretieren (2). Die Effektorproteine modulieren die Wirtszellsignaltransduktion derart, dass es zu einer induzierten Phagozytose kommt (3). Diesem Schritt folgen die intensive Modifikation der Inklusionsmembran (mit bislang weitgehend unbekannt Proteinen) (4), die beginnende Differenzierung zum RK und der intrazelluläre Transport (5) zum Replikationsort (perinukleäre Position).

5.5 Phosphoinositolmetabolismus

Eine bei den bisherigen Betrachtungen der Invasion kaum berücksichtigte Komponente soll an dieser Stelle näher betrachtet werden, der Phosphoinositolmetabolismus der Wirtszelle. Aus Abbildung 3 wird bereits ersichtlich, dass die Bildung einer CV nicht ohne die Beteiligung von Wirtszellmembranlipiden ablaufen kann. Der entscheidenden Rolle, die den Phosphoinositolen während der Signaltransduktion an der Membran zukommt wird dieses Schema jedoch kaum gerecht. Phosphoinositole spielen eine Schlüsselrolle bei der rezeptorvermittelten Signaltransduktion, der Aktinremodellierung und dem Membrantransport in eukaryontischen Zellen (Corvera and Czech, 1998; Janmey and Lindberg, 2004). Phosphoinositole regulieren diese Prozesse durch ihre Interaktion mit zellulären Proteindomänen in einer zeitlichen und nach Membranorganellen räumlich getrennten Weise (Cockcroft and De Matteis, 2001). Bei den Phosphoinositolen handelt es sich um

Glycerolipide, die aus zwei hydrophoben Seitenketten (meist Arachidonsäure und Stearylsäure) und einer D-myo-inositol Kopfgruppe zusammengesetzt sind (Abb. 4).

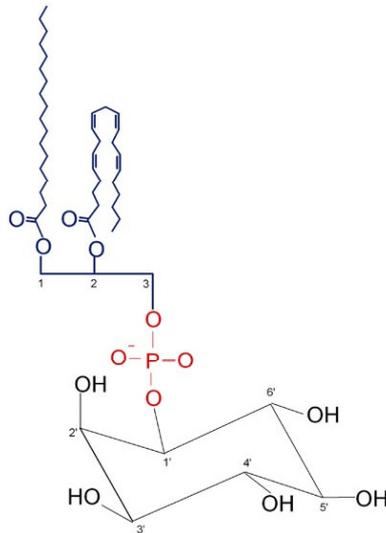


Abbildung 4: Chemische Struktur von sn-1-stearoyl-2-arachidonoyl phosphatidylinositol

Reguliert werden die Phosphoinositole durch spezielle Kinasen, Phosphatasen und Phospholipasen, die durch ihre Rekrutierung und Aktivierung infolge bestimmter Stimuli, an definierten Organellen, die oben beschriebene zeitlich und räumlich begrenzte Aktivierung herbeiführen. Interessant ist auch, dass die meisten zellulären Kompartimente eine spezifische Phosphoinositolzusammensetzung aufweisen, so weist z.B. der Golgiapparat eine erhöhte Phosphatidylinositol(4)-P (PI(4)-P) Konzentration auf, die Plasmamembran dagegen eine erhöhte PI(4,5)-P₂ Konzentration, was den Organellen eine spezifische Lipididentität gibt (Di Paolo and De Camilli, 2006). Es wird deutlich, dass eine erfolgreiche Invasion, bzw. Infektion einer Wirtszelle nur möglich ist, wenn neben der proteinvermittelten Signaltransduktion auch der Lipidmetabolismus durch das jeweilige Pathogen gemeistert wird.

Während der Invasion muss vor allem die von der PI3K vermittelte PI(3,4,5)-P₃ - Bildung kontrolliert werden, um der lysosomalen Degradation zu entgehen (Hilbi, 2006). Die Bildung von PI(3,4,5)-P₃ ist normalerweise der Ausgangspunkt für eine bestimmte Reihenfolge von Proteinrekrutierungen über z.B. PH (Pleckstrin Homologie) – Domänen (Lemmon, 2003), mit dem Ziel ein „reifes“ PI(3)-P positiven Phagosoms zu bilden (Gillooly et al., 2001). Eine Deregulation des Phospholipidmetabolismus scheint meist diesen Effekt auszuüben (Abb. 5), so führt beispielsweise die Infektion mit *Shigella flexneri*, zu einer Umwandlung von PI(4,5)-P₂ an der Plasmamembran in PI(5)P, während gleichzeitig die PI(3,4)-P₂, PI(3,5)-P₂ und PI(3,4,5)-P₃-Konzentration erhöht wird (Niebuhr et al., 2000). *Salmonella enterica* dagegen degradiert zwar ebenfalls Inositolpolyphosphate (Abb. 5),

allerdings bevorzugt PI(3,4)-P₂, PI(3,5)-P₂ und PI(3,4,5)-P₃ und erhöht so die Konzentration an PI(3)-P, was ebenfalls den normalen Ablauf der Phagosomenreifung unterbricht (Marcus et al., 2001; Norris et al., 1998).

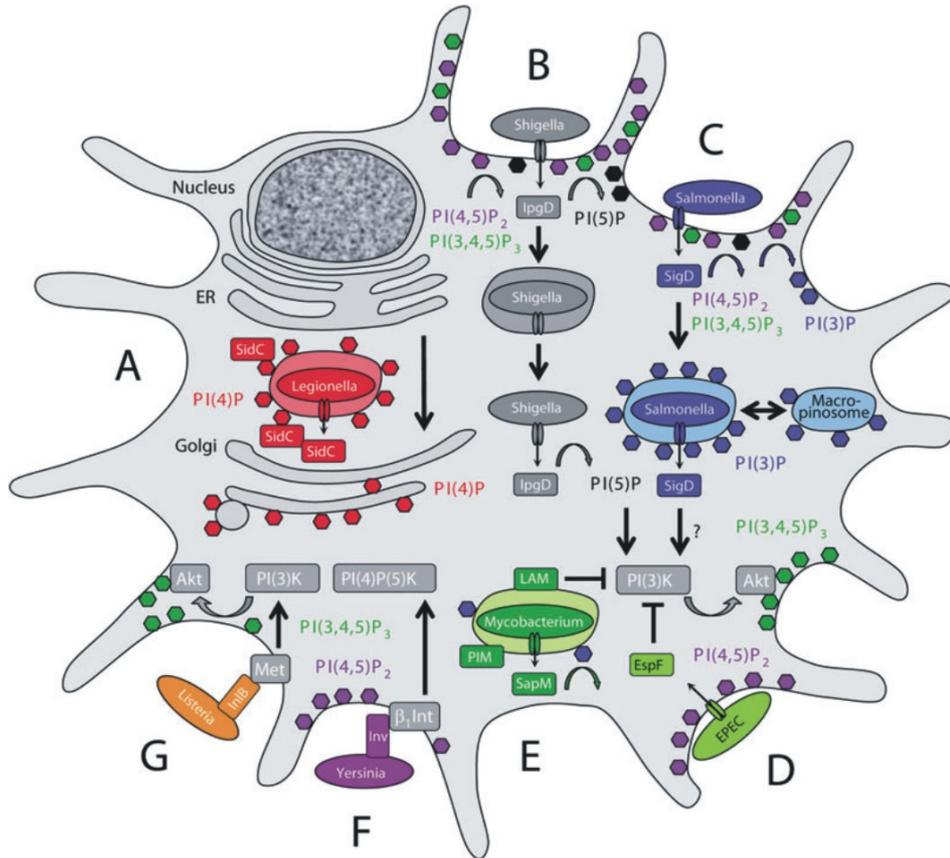


Abbildung 5: Übersicht über die von verschiedenen Pathogenen verwendeten Strategien zur Beeinflussung des Phosphoinositidmetabolismus der Wirtszelle (aus Hilbi 2006). **A**, *Legionella pneumophila* repliziert in einer ER-abstammenden Vakuole, die durch Klasse I PI3Ks reguliert wird. Das Protein SidC wird durch das Icm/Dot Typ IV Sekretionssystem injiziert und bindet spezifisch an PI(4)-P. **B**, *Shigella flexneri* invadiert die Wirtszelle und entkommt dem Phagosom durch Mxi/Spa Typ III abhängige Sekretion von IpgD und anderen Effektorproteinen. Die Produktion von PI(5)P aus PI(4,5)-P₂ durch IpgD unterstützt die Invasion und aktiviert Klasse I PI3Ks, was durch die darauf folgende Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt antiapoptotisch wirkt. **C**, *Salmonella enterica* löst die Aufnahme in die Wirtszelle durch Sekretion der Phosphatidylinositol-Phosphatase SigD/SopB und verschiedener GEFs (engl.: guanine nucleotide exchange factors) aus. Das Pathogen erhält eine hohe PI(3)-P Konzentration über SigD/SopB aufrecht, um die Fusion mit PI(3)-P positiven Makropinosomen zu unterstützen, aktiviert analog zu *Shigella* Akt und löst durch die Erhöhung des Inositol(1,4,5,6)-P₄ Spiegels eine Flüssigkeitssekretion der Wirtszelle aus. **D**, Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) vermehren sich extrazellulär, wobei sie an ihrer Wirtszelle mittels induzierter Aktin-Podeste haften. Sie vermeiden die Phagozytose durch Inaktivierung des Effektorproteins EspF, welches auf noch unbekannte Weise die PI3K inaktiviert, was zu einer PI(4,5)-P₂ Akkumulation führt. **E**, *Mycobacterium tuberculosis* unterbricht die endosomale Reifung durch PI(3)-P Degradation. Das Phosphatidylinositolanalog LAM (Lipoarabinomanan)

blockiert die Aktivierung der PI3K durch Unterbrechung der Ca^{2+} /Calmodulin/Calmodulin Kinase II-abhängigen Signaltransduktion und durch die Aktivität des Effektorproteins SapM, welches PI(3)-P dephosphoryliert. PIM (Phosphatidylinositol Mannoside) führt zur Fusion des Phagosoms mit frühen Endosomen. **F**, *Yersinia spp.* werden durch den Kontakt zwischen einem Oberflächenmolekül der Bakterien, dem Invasin, und zellulärem β_1 Integrin phagozytiert. Die Interaktion zwischen den beiden Oberflächenmolekülen führt zur Arf6-abhängigen Aktivierung der PI4P5K α und somit zur PI(4,5)-P₂ Produktion an der Invasionsstelle. **G**, *Listeria monocytogenes* invadiert die Wirtszelle durch rezeptorvermittelte Phagozytose. Es kommt zu einer Bindung zwischen dem InlB und dem Wirtszellrezeptor Met, was zur Aktivierung von PI3K und Akt führt.

Für *Chlamydia* ist relativ wenig über die Modulation des Phosphoinositol-metabolismus bekannt. Wie unter 5.4 beschrieben kommt es im Verlauf der Chlamydieninfektion zur Aktivierung der PI3K, inhibiert man dieses Enzym so blockiert dies die Invasion (Coombes and Mahony, 2002). Diese Untersuchung wurde an *C. pneumoniae* durchgeführt, was eine Verallgemeinerung schwierig macht, da die Invasionsmechanismen sich zwischen den Spezies unterscheiden. Neuere Untersuchungen scheinen die PI3K Abhängigkeit der Invasion jedoch indirekt für *C. trachomatis* zu bestätigen. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass es während der Invasion zur Rekrutierung des Rac-Abi1-Wave2 Komplexes im Rahmen der Aktinremodellierung kommt (Carabeo et al., 2007), diese Rekrutierung ist abhängig von der PI(3,4,5)-P₃ Bildung (Takenawa and Suetsugu, 2007) und bestätigt damit die PI3K-Abhängigkeit der Invasion für *C. trachomatis*.

Auch auf der bakteriellen Seite ist wenig über die Beeinflussung des Lipidmetabolismus der Wirtszelle bekannt. Es wurden bis jetzt keine Effektorproteine beschrieben, die direkt in den Phosphoinositolmetabolismus eingreifen. Aus dem Vergleich mit anderen Organismen, wie *S. flexneri* oder *S. enterica*, die entsprechende Effektoren über ihre Mxi/Spa- oder SPI1/SPI2 – TTSS injizieren, lassen sich jedoch ähnliche Mechanismen vermuten (Niebuhr et al., 2000; Zhou et al., 2001).

5.6 Das Typ III Sekretionssystem

Den Schlüssel zur Interaktion zwischen *Chlamydia spp.* und der Wirtszelle könnte das TTSS, welches im Genom von *Chlamydia spp.* entdeckt wurde, darstellen (Stephens et al., 1998; Subtil et al., 2000). Das TTSS ist eine Art molekulare Nadel, die es gram-negativen Bakterien ermöglicht, virulenzassoziierte Proteine in das Zytoplasma der Wirtszelle zu injizieren (Abb. 6) (Ghosh, 2004; Tampakaki et al., 2004).

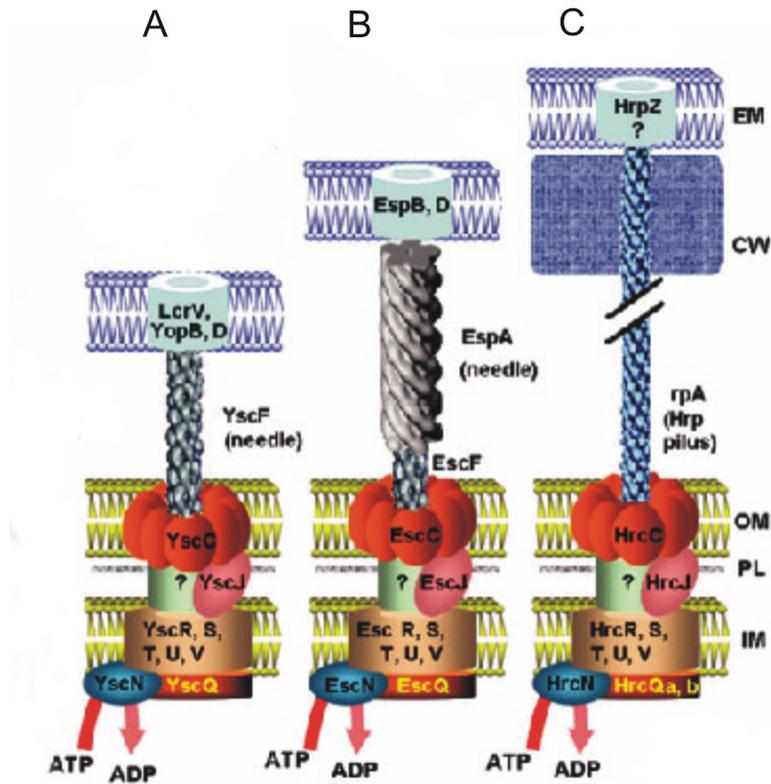


Abbildung 6: Schematische Repräsentation des bakteriellen Typ III Sekretionssystems (aus Tampakaki et al., 2004) in *Yersinia* (A), *Escherichia coli* (B) und *Pseudomonas syringae* (C). Ein Fragezeichen im TTSS weist darauf hin, dass z.B. die Kanalstruktur in der inneren Membran (IM) des Bakteriums noch nicht identifiziert wurde. Die Hauptkomponente der Nadel in *Yersinia* ist YscF, EspA in *E. Coli* und HrpA in *P. syringae*. Die porenbildenden Proteine sind alle mit der gleichen Farbe in die eukaryotische Membran (EM) eingezeichnet worden: LcrV, YopB, YopD für *Yersinia*, und EspB und D für *E. coli*. In Pflanzenpathogenen werden die Translokatorproteine durch HrpZ (*P. syringae*) und HrpF (*X. campestris*) repräsentiert. Abkürzungen aus dem Original: Outer Membrane (OM); Peptidoglycane Layer (PL); Eukaryotic Membrane (EM); Cellwall (CW) [Anm.: bei der Pflanzenzelle]. Der Maßstab der Modelle stimmt nicht mit der Realität überein.

Für eine Translokation von Proteinen in das Wirtszellzytoplasma ist ein direkter Kontakt mit der Wirtszelle nötig. Unter bestimmten Bedingungen ist es jedoch z.B. *Yersinia spp.* möglich, durch das TTSS Proteine in das umgebende Medium zu sekretieren (Francis et al., 2001). Interessanterweise findet man das TTSS in einer großen Zahl von phylogenetisch entfernten gram-negative Bakterien: So weisen sowohl *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, *Shigella spp.*, *Escherichia spp.*, *Bordetella spp.*, *Burkholderia spp.* als auch Pflanzenpathogene wie *Ralstonia spp.* diese supramolekulare Struktur auf (He et al., 2004).

Bakterielle Proteine, die durch das TTSS injiziert werden, dienen dazu, Wirtszellfunktionen zum Nutzen der Bakterien zu beeinflussen. Für *Chlamydia spp.* nimmt

man an, dass es zwei Phasen der Typ III abhängigen Sekretion gibt. Zum einen werden vermutlich in den EKs vorsynthetisierte Proteine direkt nach dem Kontakt mit der Wirtszelle in das Wirtszellzytoplasma transloziert (Fields et al., 2003), zum anderen werden Proteine über und in die Inklusionsmembran transloziert (Subtil et al., 2000; Subtil et al., 2001).

Eine genauere Betrachtung der Genomsequenz von *Chlamydia* hat gezeigt, dass in der Tat die meisten Gene für ein TTSS vorhanden sind (Stephens et al., 1998). Interessanterweise ist jedoch die genetische Organisation im Vergleich zu anderen Organismen grundlegend verschieden. Während bei den meisten Bakterien wie *Salmonella spp.* oder *Yersinia spp.* die für das TTSS kodierenden Gene in einem Cluster, der sogenannten Pathogenitätsinsel, zusammengefaßt sind, liegen die TTSS Gene von *Chlamydia* in mindestens 4 Regionen auf dem Genom verstreut vor (Stephens et al., 1998; Tampakaki et al., 2004).

Obwohl die Einzelkomponenten für ein TTSS vorhanden sind, steht der direkte Beweis, dass diese Komponenten auch ein funktionelles Sekretionssystem bilden noch aus. Die Beweisführung läuft vor allem über heterologe Expressionssysteme, da nur auf diese indirekte Art und Weise Komponenten aus *Chlamydia* auf ihre Funktion getestet werden können (Fields and Hackstadt, 2000). Dreizehn Gene in *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* weisen eine Homologie mit bekannten TTSS Komponenten auf und sind somit zumindestens theoretisch in der Lage, ein vollständiges TTSS zu bilden (Stephens et al., 1998; Fields et al., 2003). Eine zusätzliche Schwierigkeit ergibt sich jedoch aus der differentiellen Expression des TTSS. Einige Gene weisen eine frühe (1.5-8 Stunden), mittlere (12-18 Stunden) oder späte (24 Stunden) expression auf (Slepenkin et al., 2003) und stehen somit anscheinend nur zeitversetzt für die Synthese des TTSS zur Verfügung.

Ein weiterer Beweis für ein funktionelles TTSS ist das Vorhandensein von sogenannten Typ III Effektorproteinen (Effektoren) in *Chlamydia*. Zuerst entdeckt wurde IncA, ein Protein, das in der Inklusionsmembran während der Chlamydieninfektion gefunden werden kann und für die Fusogenität multipler Inklusionen verantwortlich ist (Rockey et al., 1995; Suchland et al., 2000). IncA wurde mit Hilfe eines heterologen TTSS sekretiert und somit indirekt als Effektor charakterisiert (Subtil et al., 2001). Inc-Proteine haben ein ungewöhnliches Hydrophobizitätsprofil, was die bioinformatische Identifikation weiterer in der Mitte des Entwicklungszyklus exprimierter Inklusionsmembranproteine ermöglichte (Rockey et al., 2002). Die weitere Identifikation von Effektorproteinen wurde jedoch durch die oben erwähnte ungewöhnliche genomische Organisation des TTSS und das fehlende

genetische System stark eingeschränkt (Stephens et al., 1998; Tam et al., 1994; Heuer et al., 2007). So wurde z.B. das Effektorprotein Tarp (eng.: translocated actin-recruiting phosphoprotein) eher zufällig, bei dem Versuch phosphorylierte Wirtszellproteine zu charakterisieren, entdeckt (Clifton et al., 2004). Andere Proteine, wie CADD (eng.: chlamydial protein associated with death domains) wurden dagegen über bioinformatische Suchen nach wirtszellähnlichen Domänen identifiziert (Schwarzenbacher et al., 2004; Stenner-Liewen et al., 2002). Von Nachteil ist, dass für CADD auf diese Weise zwar eine Funktion, nicht aber die Typ III Sekretion gezeigt wurde. Ein neuerer Ansatz zur Effektoridentifizierung ist die Verwendung heterologer Sekretionssysteme, so konnten mittels eines *Shigella* - Sekretionssystems 24 neue potentielle Typ III-Effektoren identifiziert werden, deren Funktion jedoch zum größten Teil ungeklärt ist (Subtil *et al.*, 2005).

5.7 Fragestellung

Während der Aufnahme von *Chlamydia* kommt es zur Tyrosinphosphorylierung mehrerer Proteine (Clausen et al., 1997; Fawaz et al., 1997; Birkelund et al., 1994). Eines dieser Proteine wurde als chlamydiales Protein identifiziert (Clifton et al., 2004). Dieses Protein, CT456 oder Tarp scheint ein Typ III-Effektorprotein zu sein, da es in einem heterologen *Yersinia* Typ III-Sekretionssystem exportiert wird (Clifton et al., 2004). Transloziertes Tarp wird schnell tyrosinphosphoryliert, was der Aktinpolymerisation an der Eintrittsstelle vorausgeht. Die Hypothese, dass die Tyrosinphosphorylierung von Tarp für die Aktinrekrutierung notwendig ist, bestätigte sich nicht (Clifton et al., 2005). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Tarp Aktin *in vitro* direkt nukleieren kann (Jewett et al., 2006). Während die Phosphorylierung im N-terminus des Proteins stattfindet, scheint die Aktinnukleation vom C-Terminus des Proteins auszugehen.

Tyrosinphosphorylierung an bakteriellen Effektorproteinen ist ein häufig beobachtetes Phänomen der bakteriellen Pathogenese (Backert and Selbach, 2005; Covacci and Rappuoli, 2000). Enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC) und *Helicobacter pylori* translozieren Tir and CagA und induzieren auf diese Art und Weise lokale bzw. globale Aktinpolymerisationsreaktionen. Im Falle von EPEC führt dies zu einer Aktinpodestbildung an der Adhäsionsstelle, während *H. pylori* durch CagA einen stark elongierten zellulären Phänotyp induziert (Kenny et al., 1997; Segal et al., 1999). Da die Tyrosinphosphorylierung für beide Effektorproteine funktionell essentiell ist, hat die Identifizierung der

Phosphorylierungsstellen und der Wirtszellkinasen von Tir und CagA wichtige Einblicke in die Funktion dieser Effektoren ermöglicht (Backert et al., 2001; Kenny, 1999). Im Gegensatz zu diesen beiden gut untersuchten bakteriellen Effektoren ist wenig über die Rolle der Tarp Tyrosinphosphorylierung für die molekulare Pathogenese von *Chlamydia spp.* bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es die Funktion des Effektorproteins Tarp, bzw. dessen Tyrosinphosphorylierung zu untersuchen. Zunächst wird das Protein hierzu *in silico* analysiert um potentielle Phosphorylierungsstellen aufzudecken. Die so gewonnenen Daten werden zur Charakterisierung der Wirtszellkinasen und der Phosphorylierungsstellen verwendet. Es wird weiterhin untersucht, welche Rolle diese Kinasen für die Invasion und Inklusionsbildung spielen. Im nächsten Schritt der funktionellen Analyse werden zelluläre Interaktionspartner identifiziert. Welche Bedeutung die identifizierten Proteine für die Infektion haben wird dann molekularbiologisch und biochemisch charakterisiert. Ziel ist es die von den Interaktionspartnern induzierten Signaltransduktionsprozesse mechanistisch zu charakterisieren. Die Aufklärung der von Tarp beeinflussten Signalwege soll helfen, ein besseres Verständnis der molekularen Pathogenese und der Wirtszellinvasion von *Chlamydia* zu erlangen.

6. Material und Methoden

6.1 Zellkultur

HeLa- (Cervixepithelzellen ATCC CCL-2), HeLa-EZ01 (stabile Expression von Calreticulin-ER-Motiv fusioniert mit dsRed2), Hep-2 (Lungenepithelzellen ATCC CCL-23), SYF- (Mausfibroblasten ATCC CRL-2459), SYF+Src- (Mausfibroblasten ATCC CRL 2498), L929- (Mausfibroblasten ATCC CCL-1) und End1&6/ε7-Zellen (Immortalisierte Cervixepithelzellen ATCC CRL2615) wurden in DMEM (Invitrogen), supplementiert mit L-Glutamin, Na-Pyruvat und 10% FCS kultiviert. Transfektionen wurden mit Lipofectamin2000 (Invitrogen), gefolgt von einer 20 stündigen Inkubation, durchgeführt. *Chlamydia trachomatis* LGV L2/434/Bu (ATCC VR-902B) und *C. trachomatis* D UW-3/Cx (ATCC VR-885) wurden in Helazellen, *C. pneumoniae* TW-183 (ATCC VR2282) wurde in Hep-2 Zellen kultiviert. Als Infektionsmedium wurde DMEM mit L-Glutamin, Na-Pyruvat, 1 µg/ml Cycloheximid und 5% FCS verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert, Infektionen wurden bei 35°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit durchgeführt.

6.2 Aufreinigung von *Chlamydia* Elementarkörperchen

Infizierte Zellen (10 x 250 cm² Flaschen) wurden seriell in 20 ml Medium abgeschabt. Die Zellsuspension wurde zur Lyse mit 10 ml 1-3 mm Glaskügelchen versetzt und 3 Minuten bei 2500 u/min und Raumtemperatur (RT) durchmischt. Kerne und grobe Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 2000 g bei 4°C für 10 Minuten beseitigt. Im Anschluss erfolgte ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 18500 g und 4°C. Das entstandene Chlamydienpellet wurde mittels Spritze (G20, dann G18, je 3 Schläge) und Ultraschallbehandlung (5 min) in 5 ml SPG (Saccharose Phosphat Glutamat) resuspendiert und auf einen 50%-20% Urografingradienten (w/v) aufgetragen (7 ml 50%, 25 ml 20%). Nach der Ultrazentrifugation für 1 Stunde bei 4°C und 18500 g, wurde die EK-haltige Interphase abgenommen und einmal gewaschen (10 ml SPG, 18500 g, 4°C, 30 min). Das entstandene Chlamydienpellet wurde erneut mittels Spritze (G20, dann G18, je 3 Schläge) und Ultraschallbehandlung (5 min) resuspendiert, aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt. Für Experimente, die keine gradientenaufgereinigten Chlamydien benötigten, wurden Kerne und Zelltrümmer wie oben beschrieben beseitigt und die EKs einmal gewaschen (nach dem ersten Zentrifugieren: Pellet in 10 ml SPG resuspendieren). Anschließend wurden die Chlamydien aliquotiert und bei -70°C eingelagert.

6.3 Infektions- und Inhibitionsexperimente

Zellen wurden mit der im Experiment angegebenen "Multiplicity of infection" (MOI), unter Standardbedingungen (s.o.) infiziert. Die Kinaseinhibitoren Genestein und PP2 (Biosource) oder der PLCγ-Inhibitor Edelfosine (Calbiochem) wurden wie in den einzelnen Experimenten beschrieben zu den Zellen gegeben. Als Kontrollen dienten die entsprechendem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Ethanol. Nach der Inkubation mit EKs und Inhibitoren wurden die Zellen entweder mit eiskaltem PBS gewaschen und in Ripa-Puffer (50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% Nonident P-40; 1% Triton X-100; 0,1% SDS) mit 1 mM Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich) und COMPLETE Proteaseinhibitoren (Roche) lysiert oder wurden für 24- (*C. trachomatis*) oder 48 Stunden (*C. pneumoniae*) infiziert, bevor sie fixiert, gefärbt und ausgewertet wurden.

6.4 Präparation von Plasmid-DNA

Bakterienstämme wurden über Nacht in 100 ml Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) (10 g/l Trypton (Caseinhydrolysat); 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl) mit einem geeigneten Antibiotikum angezogen. Die Plasmidaufreinigung wurde mit dem Midi-Plasmidkit (Machery-Nagel) aus 40 ml der Kultur durchgeführt. Reinheit und Ausbeute wurden photometrisch bestimmt ($1 A_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g/ml}$). Die durchschnittliche Ausbeute betrug etwa 100-150 μg DNA aus 40 ml Kultur. Die DNA-Konzentration wurde auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt und die Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

6.5 Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese

Die Analyse verschiedener DNA-Arbeitsschritte (Restriktion, Ligation, PCR) erfolgte mittels horizontaler Gelelektrophorese. DNA-Auftrennung und Detektion erfolgten mit 0,5-2% Agarosegelen (Seakam) in TBE (89 mM Tris Base; 89 mM Borat; 2 mM EDTA; pH 8.0) mit 5 μl Ethidiumbromid (10 mg/ml; Sigma-Aldrich). Alle Proben wurden vor dem Lauf mit einem entsprechenden Volumen 6x Ladebuffer (0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 30% Glycerin; 1 mM EDTA) angefärbt und in je eine Geltasche aufgetragen. Die DNA wurde bei 90-180 V für 30-120 Minuten im elektrischen Feld aufgetrennt und durch Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Farbstoffes Ethidiumbromid auf einem Transilluminator sichtbar gemacht. Als Größenstandart dienten eine 50 bp- und eine 1 kb-DNA Leiter (Fermentas).

6.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technik wurde für verschiedene Schritte verwendet: (i) Amplifikation von Fragmenten mit definierten 3'- und 5'-Restriktionsschnittstellen für Klonierungen, (ii) Amplifikationen von Genen zu Kontrollzwecken und (iii) gezielte Punktmutationen. Alle Reaktionen wurden in Perkin Elmer Gene Amp 2400 (Perkin Elmer) PCR Maschinen durchgeführt. In Tabelle 1 sind die verwendeten Reaktionsgemische und -temperaturen dargestellt.

Tabelle 1: PCR-Ansätze und Reaktionsbedingungen

Standart PCR		Klonierungs-PCR	
2,5 μl 10x PCR Puffer	1 Minuten 94°C	5 μl 10x PCR Puffer	2 Minuten 94°C
2 μl dNTPs (200 nM)	30 Zyklen:	4 μl dNTPs (200 nM)	30 Zyklen:
1 μl MgCl_2 (2 mM)	30 s bei 94°C	2 μl MgCl_2 (2 mM)	30 s 94°C
1 μl Primer Forward (400 nM)	30 s bei $55-60^\circ\text{C}$	2 μl Primer Forward (400 nM)	30 s $55-60^\circ\text{C}$
1 μl Primer Reverse (400 nM)	60 s (pro 1000 bp) bei	2 μl Primer Reverse (400 nM)	60 s (pro 1000 bp) 68°C
2 μl RedTaq Polymerase	72°C	0,4 μl Platinum Taq High Fidelity	1 Zyklus:
(5 U/ μl)	1 Zyklus:	(5 U/ μl)	2 Minuten 68°C
5-100 ng Probe	2 Minuten 72°C	5-100 ng Probe ad 50 μl dH_2O	
ad 25 μl dH_2O			

6.7 Restriktions- und Ligationsreaktionen

Restriktionsenzyme für Doppelverdaureaktionen wurden so gewählt, dass beide Restriktionsenzyme ihr Reaktionsoptimum im gleichen Puffer haben. Der Zusatz von BSA erfolgte, falls dies nach Hersteller

vorgesehen war (New England Biolabs). PCR-Fragmente wurden vor der Restriktion mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Nach 2 Stunden Restriktion bei 37°C wurde die Reaktion beendet und erneut über das PCR Purification Kit aufgereinigt. Die Restriktionsreaktionen setzten sich wie in Tabelle 2 angegeben zusammen. Für die nachfolgende Ligationsreaktion wurde die Konzentration photometrisch bestimmt. Die Menge an benötigtem geschnittenen PCR Fragment für die Ligation errechnet sich nach folgender Formel: $x = \text{Masse Fragment [ng]} = 125 \text{ ng} \times \text{PCR Fragmentlänge [bp]} / \text{Vektorlänge [bp]}$. Die Ligation wurde für 1 Stunde bei RT mit einer abschließenden 10-minütigen Inaktivierungsreaktion bei 70°C durchgeführt. Die Zusammensetzung der Ligationsreaktionen ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen Restriktions- und Ligationsreaktionen

Standard Restriktionen	PCR-Produkte	Ligation
0,3-7 µg Vektor	30 µl PCR Produkt	
20 U Restriktionsenzym 1 (NEB)	20 U Restriktionsenzym 1 (NEB)	25 ng geschnittener Vektor
20 U Restriktionsenzym 2 (NEB)	20 U Restriktionsenzym 2 (NEB)	x ng geschnittenes PCR Fragment
5 µl 10x Puffer NEB (1-4)	5 µl 10x Puffer NEB (1-4)	1 µl T4 DNA Ligase (NEB) 2 µl 2x Ligasepuffer
0,5 µl 100x BSA (NEB)	0,5 µl 100x BSA (NEB)	(NEB)
ad 50 µl dH ₂ O	ad 50 µl dH ₂ O	

6.8 Herstellung und Transformation elektrisch kompetenter *E. coli*

2,5 ml *E. coli* - Vorkultur (DH5α) wurden in 250 ml LB-Medium überimpft und bei 37°C bis zu einer OD₅₉₅ von 0,3 - 0,4 inkubiert. Die Kulturen wurden 15 Minuten auf Eis gekühlt und ab hier auf Eis weiterbearbeitet. 250 ml Kultur wurden 15 Minuten bei 5000 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde mit 20 ml gekühltem destilliertem Wasser vorsichtig gespült ohne das Pellet zu lösen. Anschließend wurde das Pellet in 250 ml gekühltem destilliertem Wasser resuspendiert. Es erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 5000 g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml 15% Glycerin resuspendiert und erneut 15 Minuten bei 5000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 15% Glycerin aufgenommen. Die Zellen wurden in 50 µl-Aliquots bei -70°C gelagert. Für die Transformation wurden 50 µl elektrokompetente Zellen in Elektroden-Küvetten überführt und mit 50 µl 15% Glycerin gemischt. Die Elektroporation erfolgte mit 200 Ω bei 2,5 kV (12 kV/cm Küvettenweite) und 25 µF. Im Anschluss wurden die Transformierten *E. colis* mit 200 µl vorgewärmten SOC-Medium bei 37°C für 1 Stunde inkubiert und auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 37°C für 24 Stunden.

6.9 DNA-Konstrukte

Verwendete Primer sind in Tabelle 3, Konstrukte, die in dieser Arbeit kloniert wurden, sind in den Tabelle 4 aufgelistet. Alle Klonierungsreaktionen wurden entweder nach der Disc-Trisec-Methode (Dietmaier et al., 1993), über Invitrogen TA-Klonierung (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen) oder konventionell (siehe 5.7) durchgeführt. Zielvektoren waren die Plasmide pGEX4T-3 (Amersham), eGFP-C1-3 (Clontech), pCR4-Topo (Invitrogen).

Material und Methoden

Tabelle 3: Tarp Klonierungen. Primer, Zielregion, Schnittstellen und Vektorbezeichnungen. a: Mittels Disc-Trisec kloniert (Dietmaier et al. 1993), b: Invitrogen TA-Cloning Kit für Sequenzierungen

Template	Zielregion [bp]	Primer	Restriktions-schnittstellen	Ziel Vektor
				Neue Bezeichnung
<i>C. trachomatis</i> L2 Tarp	6-1134	5'–AAT TCC AAT TCT ATA TCA GGT GAT CAA CC	Keine ^a	pGEX4T-3
		5'–GAC TTA GCC GAA TAC ACC CTC GTT AC		pGEX-N-Tarp
<i>C. trachomatis</i> D Tarp	406-941	5'–ATT AGC AAC AAC TAC GAT GAC G	Keine ^b	pCR4-Topo
		5'–GCC GAA TAC ACC CTC GTT AC		pCR-ENIYE3x
pCR-ENIYE3x	295-529	5'–CCA AGC TTG TAT TAG CAA CAA CTA CGA TGAC	<i>HindIII</i> <i>PstI</i>	peGFP-C1
		5'–GGC TGC AGC TAG CCG AAT AAC ACC CTC GTT		peGFP-ENIYE
peGFP-ENIYE	peGFP-ENIYE	5'–TAC ATA TCT CGA GCT CAA GCT TG	Disc-Trisec	pKC689
		5'–TAG GAT CAG TTA TCT AGA TCC GGT G		pKC689-ENIYE

Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Arbeit klonierten Konstrukte

Vektor	Kloniertes Fragment [bp] oder Literatur	Modifikation	Resultierender Vektor
pGEX-N-Tarp	6-818 von L2 Tarp	keine	-
pCR-ENIYE3x	406-941 von D Tarp	Restriktion mit <i>XbaI</i> und Religation	pCR-ENIYE
pCR-ENIYE	406-538 und 815-941 von D Tarp	keine	-
peGFP-ENIFE	406-538 und 815-941 von D Tarp	1. Zielgerichtete Mutation an Position 1466 (A->T)	peGFP-ENIFE
		5'–AAG AAC TAC TGA AAA TAT TTT TGA GAG TAT TGG TGG CTC TA 5'–TAG AGC CAC CAA TAC TCT CAA AAA TAT TTT CAG TAG TTC TT	

Zusätzlich zu den in Tabelle 4 beschriebenen Konstrukten wurden noch die folgenden Vektoren verwendet: eGFP-Btk-PH (zur Verfügung gestellt von T. Balla), PLC δ -PH-eGFP (Stauffer et al., 1998), Rab11-eGFP (Sonnichsen et al., 2000), Rab5-eGFP (Sonnichsen et al., 2000), Caveolin (Intern), Lgp120-eGFP (zur Verfügung gestellt von J. Lippincott-Schwartz) und Calreticulin-ER-dsRed2 (Invitrogen).

6.10 SDS-Page und Immunoblotting

Proteinlysate wurden durch Aufnahme von 5×10^5 - 1×10^6 Zellen in 100-200 μ l 2x Laemmli-Puffer (50 mM Tris/HCl; pH 6,8; 2 μ M EDTA pH 8,0; 2% SDS; 125 mM β -ME; 10% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau),

gefolgt von 10 Minuten Erhitzen bei 94°C und 1000 rpm für 10 Sekunden alle 2 Minuten, hergestellt. Ein Konzentrationsabgleich erfolgte später mittels Tubulinblot und Messung der integrierten Bandendichte. Aufgetrennt wurden die Proben elektrophoretisch nach ihrem apparenten Molekulargewicht, unter Verwendung der Methode von Laemmli, in kontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Tabelle 3). Als Standard diente der Bench Mark Prestained Protein-Marker (Invitrogen). Die Elektrophorese wurde 1-2 h bei einer Spannung von 90-140 V bei RT in SDS-Laufpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris; 3,5 mM SDS) durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-Gelelektrophorese wurden diese mittels Semi-Dry-Blot auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran transferiert. Die Membran wurde mit Methanol aktiviert und mit Semi-Dry-Transferpuffer (192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS; 25 mM Tris HCl; 20% (v/v) Methanol) äquilibriert. Der Transfer wurde für 1-2 h bei 55 mA/Gel durchgeführt.

Für die nachfolgenden Immunreaktionen wurden die Inkubationsschritte entweder bei RT für 1 h oder über Nacht bei 4°C durchgeführt, zwischen den einzelnen Schritten erfolgten 3 jeweils 10-minütige Waschschritte mit TBST (20 mM Tris/HCl; pH 7,6; 0,8% NaCl; 0,5% Tween 20). Zunächst wurde die PVDF Membran mit 5% BSA in TBS-T Puffer geblockt, gefolgt von einer Inkubation mit dem Primär- und dem Sekundärantikörper. Die Signaldetektion erfolgte über an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase (HRP) und das Enhanced Chemoluminescence (ECL) Kit (Roche). Die Chemilumineszenz wurde mit einem Phosphoimager detektiert (Fuji Luminescent Image Analyzer Las-3000). Zur sequentiellen Detektion mehrerer Antigene wurden die Blots gestrippt. Hierzu wurde die Membran für 20 Minuten bei 56°C in Stripping-Puffer (62,5 mM Tris/HCl; pH 6,7; 100 mM β -Mercaptoethanol; 2% SDS) inkubiert und danach zweimal in TBST gewaschen. Anschließend konnten wieder die oben beschriebenen Immunreaktionen durchgeführt werden.

Tabelle 5: Zusammensetzung Polyacrylamidgelen

Trenngel			
Anteil Acrylamid	7,5%	10%	13%
Lower Puffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Bisacrylamid (30%)	2,5 ml	3,38 ml	4,3 ml
dH ₂ O	5 ml	4,15 ml	3,2 ml
Polymerisation durch Zugabe von 75 μ l APS und 7,5 μ l TEMED pro 10 ml			
Sammelgel			
Upper Puffer	2,5 ml		
Bisacrylamid (30%)	1,0 ml		
dH ₂ O	6,5 ml		
Polymerisation durch Zugabe von 100 μ l APS und 20 μ l TEMED pro 10 ml			

6.11 Immunpräzipitation

1x10⁶ Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 1 ml nicht-denaturierendem RIPA-Puffer (1% (w/v) Triton X-100; 50 mM Tris HCl pH 7,4; 300 mM NaCl; 0,02% (w/v) Natriumazid; Complete Proteaseinhibitoren und 1 mM NaVO₄) vom Boden einer 10 cm² Zellkulturplatte abgelöst und bei gleichmäßiger Rotation auf einem Orbitalschüttler für 15 Minuten bei 4°C lysiert. Anschließend wurden die unlöslichen Proteine durch Zentrifugation (15 min, 4°C, 14.000 g) abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 1-5 μ g eines präzipitierenden Antikörpers zugegeben, und die Proben wurden entweder 2

Stunden oder ü/n bei 4°C mit dem Zellysat im Orbitalschüttler inkubiert. Die Inkubation wurde nach Zugabe von 30 µl Protein G-gekoppelten Magnetkügelchen (Invitrogen) wiederholt. Die Proben wurden nun 3x mit je 1 ml PBS gewaschen und schließlich in 60 µl 1x SDS Probenpuffer aufgenommen und 10 Minuten bei 94°C denaturiert.

6.12 *In vitro* Phosphorylierungsassays

Rekombinantes GST-Tarp-Fusionprotein oder Kontrollen wurden mit eiskaltem Kinasepuffer (25 mM HEPES pH 7,0; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 1% Nonidet P-40; 5 mM Dithiothreitol; 1 mM Na₃VO₄; 1x Roche COMPLETE Proteaseinhibitoren), 5 U rekombinantes humanem *c-Src* oder *c-Abl* (Upstate Technologies) und 40 µM ATP gemischt. Die Reaktion wurde dann für 30 Minuten bei 30°C durchgeführt und durch Zugabe von 4x reduzierendem Probenpuffer (200 mM Tris-HCl; pH6,8; 10% β-Mercaptoethanol; 10% SDS; 0,4% Bromphenolblau; 40% Glycerol) durch 10-minütiges Denaturieren bei 94°C gestoppt.

6.13 Proteinarrays

GST-Tarp wurde, während es noch an GST-Sepharosekügelchen (Pharmacia) gekoppelt war, *in vitro* phosphoryliert. Zur Phosphorylierung wurde Zellysat von 1x10⁶ Zellen in eiskaltem Kinasepuffer (25 mM HEPES pH 7,0; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 1% Nonident P-40; 5 mM Dithiothreitol; 1 mM Na₃VO₄; 1x Roche COMPLETE Proteaseinhibitoren) verwendet. Die Phosphorylierungsreaktion wurde wie beschrieben durchgeführt (siehe 5.12), jedoch erfolgten 4 Waschschrte mit eiskaltem Kinasepuffer bevor die GST-Tarp-gekoppelten Sepharosekügelchen weiterbehandelt wurden. GST-Tarp wurde eluiert (20mM Gluthation in 50 mM Tris pH 8,0), und 7,5 µg Phospho-GST-Tarp wurden mit dem SH2-Domänenarray (Version von 2005, Panomics) inkubiert. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde der Biotinmarkierungsschritt ausgelassen, und alle Waschschrte wurden mit TBST durchgeführt. Da die SH2 Domänen auf dem Array mit GST fusioniert waren, wurde zur Detektion der phosphotyrosin-spezifische monoklonale Antikörper PY99 (Santa Cruz) verwendet. Die Detektion erfolgte mittels Phosphoimager (siehe 5.10) in Intervallen von 30 s im Modus „high sensitivity“. Die Zuordnung der Spots erfolgte per Überbelichtung, da eine Biotin-Avidin basierte Detektion nicht möglich war.

6.14 Immunisierung zur Gewinnung von Anti-Serum

Das N-terminale GST-fusionierte Fragment von Tarp wurde mittels Gluthation-Sepharosekügelchen (Pharmacia Biotech) aufgereinigt und von der Firma SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) für eine Standard-Immunisierung von Ratten verwendet. Ein Aliquot Präimmunserum wurde an Tag 0 genommen, gefolgt von einer Injektion mit GST-Tarp und komplettem Freundschem Adjuvans (kFA). Den Ratten wurde weiterhin an den Tagen 21, 49 und 77 GST-Tarp verabreicht. Blut wurde an den Tagen 35 and 63 zur Testung der Immunreaktivität des Serums entnommen. Die Ratten wurden an Tag 98 eingeschläfert und Seren wurden per Western Blot von *C. trachomatis*-infizierten Zellysaten auf Spezifität untersucht.

6.15 Immunfluoreszenzen

Zellen wurden auf Deckgläschen in 12, 24 Well-Platten oder ohne Deckgläschen in 48 Well-Platten ausgesät und je nach Versuch für 1-48 h mit *C. trachomatis* LGV L2, *C. pneumoniae* TW-138 und einer MOI

von 1-50 infiziert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 250-500 µl Paraformaldehyd (2 % PFA) 10-20 Minuten oder eiskaltem Methanol für 10 Minuten bei RT fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (PFA Fixierung) oder im Fall einer vorhergegangenen Methanolfixierung über Nacht mit 70% Ethanol inkubiert. Zur Immunfluoreszenzfärbung nach PFA-Fixierung mussten die Zellen zunächst mit 0,2% Triton X-100 in PBS (0,2 g KCl; 0,2 g KH₂PO₄; 8 g NaCl; 2,16 g Na₂HPO₄·x7H₂O ad 1 l dH₂O) 30 Minuten permeabilisiert werden. Danach wurde für beide Fixierungsarten 30-45 Minuten in 2% FCS in PBS blockiert. Die Antikörper wurden in 2% FCS in PBS verdünnt, und jedes Deckglas wurde mit 30 µl für 1 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation mit Primär- bzw. Sekundäntikörper wurde jeweils dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Am Ende der Färbung wurden die Deckgläschen einmal kurz mit dH₂O gespült und mit Mowiol (2,4 g Mowiol 4-88; 6 g Glycerin; 6 ml H₂O; 12 ml 0,2 M Tris; pH8,5) auf einem Objektträger aufgeklebt. Die Analyse erfolgte an einem konfokalen Leica TCS-SP Laser Scanning Mikroskop mit Krypton/HeNe-Laser, mit einem Leica Epifluoreszenz-Mikroskop oder mit einem automatischen Mikroskop Scan^R (Olympus Bioystems).

6.16 Automatische Mikroskopie

In jedem Well einer 48 Well-Platte wurden jeweils 4 Bilder, im UV- und rotem-Kanal, aufgenommen. Auf jedem der Bilder wurden die Inklusionen und Zellkerne automatisch mittels der Scan^R Analyse Software (Biosystems) identifiziert. Die auf diese Art und Weise ermittelte Anzahl und Größe der Objekte wurde zur Datenanalyse und Visualisierung in Microsoft Excel importiert.

6.17 Konfokale Echtzeitmikroskopie

HeLa-Zellen wurden über Nacht in 3,5 cm² Glasbodenzellkulturschalen (MaTek) ausgesät und transfiziert (s. 4.1). Das Zellkulturmedium wurde 4 Stunden nach Transfektion durch neues Zellkulturmedium (s.o.) ausgetauscht. 30 Minuten vor Beginn der Echtzeitmikroskopie wurden die Zellen in einer 37°C, 5% CO₂-Kammer mit einer Luftfeuchtigkeit von 95% platziert und mit Inhibitoren, wie in den entsprechenden Experimenten angegeben, inkubiert (Edelfosine oder Wortmannin, Calbiochem). Im Anschluss wurden die Zellen mit Alexa488- oder Alexa568-markierten Bakterien (*C. trachomatis* L2) infiziert (Subtil et al., 2004). Die Echtzeitmikroskopie wurde dann nach Fokussierung auf transfizierte Zellen gestartet. Verwendet wurde ein VT-Infinity-System (Visitron Systems) welches sich aus den folgenden Einzelkomponenten zusammensetzt: 1. Mikroskop Olympus IX81 (Olympus, Japan), 2. VT-Infinity Galvo Scanner Confocal Head (Visitron Systems) und 3. Hamamatsu C9100-02 CCD-Kamera (Hamamatsu Photonics K.K, Japan). Hellfeldbilder wurden mit einem x63 Phasenkontrastobjektiv (NA 1,25 oil, Olympus) und einem Hochgeschwindigkeits-schließsystem aufgenommen. Fluoreszenzbilder wurden bei 488 nm und 100 mV und 568 nm und 50 mV aufgenommen. Verwendet wurde hierbei ein 488bp/568bp/6471p-Emissionsfilterset (Chroma Technologies). Die aufgezeichneten Bilder wurden wie in den einzelnen Experimenten angegeben bearbeitet, hierzu wurden die Bildbearbeitungsprogramme Metamorph (Universal Imaging Corporation) und Imaris (Bitplane AG) verwendet.

6.18 Immunoelektronenmikroskopie

Zellen wurden 45 Minuten nach der Infektion mit *C. trachomatis* in Mikrotubuli-Stabilisierungspuffer (MBS) (1 mM EGTA; 4% Polyethylenglykol 6000; 100 mM PIPES ohne K⁺; pH6,9; Phenolrot) mit 4% PFA

und 0,05% GA fixiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurden diese in Gelatine eingebettet und mit 2,3 M Saccharose infiltriert (Peters et al., 2006). Ultradünnschnitte wurden bei -120°C auf einem RMC MTX/CRX Kryo-Ultramikrotom angefertigt (Boeckeler Instruments Inc). Die Schnitte wurden auf Kohlenstoff-Pioloform-überzogene Gitter für die Elektronenmikroskopie aufgezogen. Blockierung und Markierung wurden in Blockierungspuffer (1% BSA; 0,02 M Glycin; 10% CWFG in PBS) durchgeführt. Der Ablauf der Markierung entspricht einer Immunfluoreszenzfärbung. Nach der Markierung erfolgte ein Kontrastierungs- und Einbettungsschritt mit Uranyl-Acetat/Methyl-Zellulose (Slot et al., 1991) und anschließend die Analyse auf einem Leo906E- Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss) mit einer Morada-Digitalkamera (SIS). Schnitte und Färbungen wurden mit Hilfe der Core Facility Mikroskopie erstellt.

6.19 Rasterelektronenmikroskopie

Proben für die Rasterelektronenmikroskopie wurden nach einer Standardmethode vorbereitet (Lindroth et al., 1992). Hierzu wurden auf einem Deckgläschen gewachsene Zellen in MBS für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und Lipide wurden durch 10-minütige Inkubation in MTSB (MSB + 0,5% Triton X-100) bei 37°C extrahiert. Für eine Immunogoldmarkierung wurden die Zellen 20-30 Minuten bei RT präfixiert (3% PFA; 0,05% GA), dreimal 5 Minuten in PBS bei RT gewaschen und mit 0,15 M Glycin in PBS für 15 Minuten bei RT inkubiert. Die Proben wurden mit Blockpuffer (PBS; 1% BSA) eine Stunde bei RT blockiert und im Anschluss 1-2 Stunden bei RT oder ü.N. bei 4°C mit dem Primärantikörper markiert. Der Markierung folgten viermal 5 Minuten Waschen in Inkubationspuffer (PBS; 0,1% BSA) und die Behandlung mit dem Sekundärantikörper. Vor der Postfixierung wurden die Proben viermal 5 Minuten in PBS gewaschen. Die Postfixierung bestand aus einem 10-minütigen Fixierungsschritt in Fixativ1 (2% Glutaraldehyd (GA); 0,15 M Na-Cacodylat) bei RT, gefolgt von einem Fixierungsschritt in Fixativ2 (2% GA in 0,1 M Saccharose; 0,1 M Na-Cacodylat; pH7,2) bei 4°C ü.N. Zum Abschluss wurden die Proben dreimal 5 Minuten gewaschen (0,1 M Saccharose; 0,1 M Na-Cacodylat) und über eine aufsteigende Alkoholreihe 50%, 70%, 95% und zweimal absoluten Ethanol für jeweils 30 Minuten dehydriert. Die Proben wurden anschließend mittels CO_2 einer Trocknung am kritischen Punkt unterzogen und auf Halterungen für die Rasterelektronenmikroskopie befestigt. Nach einer kurzen Bedampfung (2-3 nm Platin/Kohlenstoff) konnten die Proben im Rasterelektronenmikroskop LEO 1550 betrachtet werden. Die CO_2 Trocknung und Rasterelektronenmikroskopie wurden mit Hilfe von Dr. Hans Thorn durchgeführt.

6.20 Lipidisolation und PIP_3 – ELISA

Die Lipidisolation wurde im wesentlichen wie beschrieben durchgeführt (Bligh and Dyer, 1959; Schuetze and Kroenke, 1995). Infektionen wurden in 125 cm^2 Zellkulturflaschen mit einer MOI von 400 für 45 Minuten unter Standardbedingungen durchgeführt. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 1 ml Methanol abgeschabt und in ein Glasgefäß mit 1 ml H_2O und 1,5 ml Methanol überführt. Die Proben wurden nun 5 Minuten in einem Ultraschallbad behandelt und mit 1,25 ml Chloroform versetzt. Nach einem kurzem Vortexen wurden die Proben bei 6000 g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde in neue Glasgefäße transferriert. Das Pellet wurde erneut durch die oben beschriebenen Schritte mit 1 ml H_2O , 2,5 ml Methanol und 1,25 ml Chloroform extrahiert. Der Überstand vom zweiten Schritt wurde mit dem Überstand aus dem ersten Schritt vereinigt und durch Zugabe von 4 ml Chloroform und 5 minütige Zentrifugation bei 4000 g

Material und Methoden

Phasengetrennt. Die untere Phase wurde in ein neues Glasgefäß transferiert, die obere Phase wurde mit 4 ml Chloroform versetzt und erneut aufgetrennt. Die chloroformhaltige Phase wurde unter Stickstoff getrocknet und die PIP₃ – Konzentration nach Herstellerprotokoll bestimmt (PIP₃ Mass ELISA Kit, Echelon Biosciences Inc).

6.21 Antikörper, Färbungen, Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Antikörper und Gegenfärbungsreagenzien

Primärantikörper	Kaninchen (polyklonal)	Mouse (monoklonal)	Ratte (polyklonal)
Immunpräzipitationen und Western Blots	anti-GFP sc-8334 (Santa Cruz) anti-GST (Pharmacia) anti-PI3K p85α sc-423	anti-PLCγ2 sc-5283 (Santa Cruz), HRP-gekoppelter phosphotyrosin-spezifischer Antikörper PY99 (Santa Cruz), anti-α-Tubulin (Sigma-Aldrich), anti-GFP Antikörper sc-9996 (Santa Cruz), anti-PI3K p85α sc-1637	anti-Tarp Antikörper
Immunofluoreszenz	anti- <i>C. trachomatis</i> LPS-spezifischer Antikörper (Chemicon)	anti-PLCg2-Antikörper sc-5283 (Santa Cruz) anti- <i>C. trachomatis</i> L2 MOMP-Antikörper KK12 (University of Washington, USA), anti-PI3K p85α sc-1637	
Immunelektronenmikroskopie	anti-GFP A11122 (Invitrogen-Molecular Probes)		
Spezielle Sekundärantikörper	Ziege (polyklonal)	Mouse (monoklonal)	
Immunelektronenmikroskopie	anti-Kaninchen 12 nm Gold (Jackson Immuno Research)	anti-Maus 6 nm Gold (Jackson Immuno Research)	
Chemische Färbungen			
Hoechst33342 (Sigma-Aldrich), Phalloidin Alexa 488 (Invitrogen, Molecular Probes)			
Chemikalien, Medienzusätze			

Chemikalien stammten, falls nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich.
Medienzusätze stammten, falls nicht anders angegeben, von Invitrogen.

7. Ergebnisse

7.1 Tarp Phosphorylierung

Tarp wird während der Invasion von *Chlamydia spp.* durch das chlamydiale Typ III Sekretionssystem in das Wirtszellzytoplasma transloziert. Kurz nach dieser Translokation wird Tarp an Tyrosinresten phosphoryliert (Clifton et al., 2004). Funktionelle Untersuchungen zeigten, dass die Transfektion von Tarp in eukaryontischen Zellen zur Bildung von Aktinaggregaten führt und legten die Vermutung nahe, dass die Tarp-Translokation während der Invasion ebenfalls der Aktinrekrutierung dient. Vor kurzem konnte jedoch gezeigt werden, dass die Aktinrekrutierung und die Phosphorylierung nicht - wie ursprünglich angenommen - gekoppelt sind. Stattdessen zeigte sich, dass die Aktinrekrutierung vom C-Terminus abhängig ist, während die Phosphorylierung im N-Terminus stattfindet (Clifton et al., 2005). Während Tarp von *C. trachomatis* phosphoryliert wird, kann man diese Phosphorylierung für das *C. pneumoniae* Tarp Homolog Cpn0572 nicht nachweisen (Virok et al., 2005). Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der Tarp Proteine von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* zeigt, dass Cpn0572 um 250 Aminosäuren kürzer ist und lässt vermutend, dass die Phosphorylierung in dieser Region stattfindet (Abb. 7). Es ist wahrscheinlich, dass die Tarp Phosphorylierung eine wichtige Rolle für die Pathogenese von *C. trachomatis* spielt. Da Tarp im Wirtszellzytoplasma von einer bislang unbekanntem Tyrosinkinase phosphoryliert wird (Clifton et al., 2004; Clifton et al., 2005), war das erste Ziel dieser Arbeit die Identifizierung der eukaryontische Kinase.

7.1.1 Homologie zwischen ENIYESI-Motiven und Src-Substraten

Da Tarp von *C. pneumoniae* nicht phosphoryliert wird (Clifton et al., 2005, Virok et al. 2005), haben wir einen Homologievergleich aller sequenzierten Tarp-Homologe hinsichtlich Länge und Existenz potentieller Phosphorylierungsstellen durchgeführt. Phosphorylierungsstellen wurde durch *in silico* Analyse mittels Scansite Motif Scanner im Modus "hohe Stringenz" (www.scansite.mit.edu) identifiziert. Neun potentielle Tyrosin-phosphorylierungsstellen mit sehr hohen Wahrscheinlichkeitswerten wurden in sechs nahezu identischen ungefähr 50 AS langen, sich wiederholenden Einheiten in der N-terminalen Hälfte von *C. trachomatis* L2-Tarp identifiziert (Abb. 7, 8). *C. trachomatis* D-Tarp hingegen zeigt nur drei ungefähr 50 AS lange

Wiederholungsregionen mit drei Phosphorylierungsstellen (Abb. 7, 8). Das Verhältnis von Wiederholungseinheiten zu Phosphorylierungsstellen bei *C. trachomatis* L2 (6 zu 9) deutete an, was sich bei näherer Analyse bestätigte: drei der sechs Wiederholungseinheiten enthalten eine Doppelphosphorylierungsstelle (ENIYENIYESI), und wurden daher als YY-Wiederholungseinheiten bezeichnet (Abb. 7, 8). Die ungefähr 50 AS lange Wiederholungseinheit mit einer Einfachphosphorylierungsstelle (ENIYESI), welche in beiden Serovarianten vorkommt, wurde als Y-Wiederholungseinheit bezeichnet (Abb. 7). Wir haben außerdem eine potentielle Phosphorylierungsstelle in *C. muridarum*, nicht jedoch in *C. pneumoniae*, *C. caviae* oder *C. abortus* gefunden (Abb. 8). Da die beiden Phosphorylierungsstellen in der YY-Wiederholungseinheit nicht zu 100% identisch sind, wurde das erste Phosphorylierungsmotiv als Motiv A und das zweite als Motiv B bezeichnet (Abb. 7). Wie zu erkennen ist Motiv A in beiden Serovarianten identisch (Abb. 7, 8).

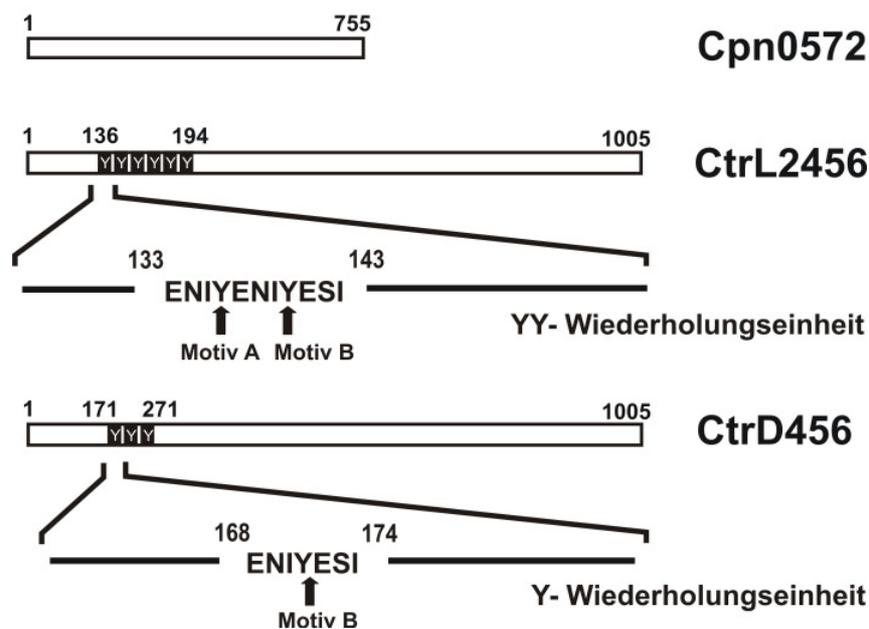


Abbildung 7: *In silico* Analyse des Tarp-Proteins von *Chlamydia spp.* - Vergleich der homologen Tarp-Proteine der verschiedenen Spezies und Serovarianten. Die Kurzbezeichnungen für Gen und Organismus sind rechts angegeben (Ctr = *C. trachomatis*, Cpn = *C. pneumoniae*). Tarp der *C. trachomatis* Serovarianten L2 und D hat sechs, bzw. drei Kopien einer ~50 Aminosäure (AS)-Wiederholungseinheit (schwarze Boxen). Während YY-Wiederholungseinheiten zwei vorhergesagte Tyrosin-Phosphorylierungsstellen besitzen (Motive A und B) weisen Y-Wiederholungseinheiten nur eine potentielle Phosphorylierungsstelle auf (Motiv B). Die Serovariante L2 verfügt sowohl über YY- als auch über Y-Wiederholungseinheiten, die Serovariante D dagegen besitzt nur Y-Wiederholungseinheiten.

dieser Arbeit. *Parachlamydia*, die einzige Familie außerhalb der *Chlamydiaceae* (Everett et al., 1999), die zur Zeit einen sequenzierten Organismus enthält (Horn et al., 2004) enthält in ihrem Genom kein Tarp-Homolog. Es scheint also, dass Tarp eine für die *Chlamydiaceae* spezifische Funktion ausübt.

Die Computeranalyse von Tarp hat nicht nur potentielle Phosphorylierungsstellen identifiziert, sondern Tarp auch als ein potentielles Substrat für Kinasen der Src-Familie (SFK) ausgewiesen. Um diese Vorhersage zu überprüfen, wurde zunächst ein manueller Abgleich der vorhergesagten Phosphorylierungsstellen mit der Konsensussequenz für Substrate der Src Kinasen (EEIYE) erstellt. Tatsächlich stimmt die Sequenz der Tarp-Motive beinahe exakt mit der Konsensussequenz überein (Abb. 9). Interessanterweise ähneln die ENIYE-Motive den EHIYD- und EPIYA-Sequenzen, die als Tyrosin-Phosphorylierungsstellen für das EPEC-Protein Tir und das *H. pylori* Protein CagA identifiziert wurden (Abb. 9). Während CagA von Kinasen der Src-Familie phosphoryliert wird, ist Tir ein Substrat verschiedener redundanter Kinasen, einschließlich der Src-Familie (Backert and Selbach, 2005; Swimm et al., 2004).

-3	0	+3	
D	E	E	Src Zielsequenz
T	E	E	Tarp Motiv A
T	E	E	Tarp Motiv B
E	E	E	Tir (EPEC)
P	E	E	CagA (<i>H. pylori</i>)

Abbildung 9: Manueller Sequenzabgleich der vorhergesagten Tarp-Phosphorylierungsmotive mit der Konsensussequenz für Substrate der SFK und bekannte Tyrosinphosphorylierungsstellen anderer bakterieller Effektorproteine. Position 0 stellt die potentielle Phosphorylierungsstelle dar. Bemerkenswert ist die hohe Homologie der Motive A und B mit der Src Konsensussequenz in den Positionen -3, -1, +1 und +3.

Zusammenfassend unterstützt der Sequenzabgleich die Hypothese, dass die ENIYE-Motive Substrate für SFKs sind. In beiden vorhergesagten Tarp-Phosphorylierungsmotiven, Motiv A und Motiv B (Abb. 7-9), stimmen die Aminosäuren an den Positionen -3, -1 and +1 mit der Src-Kinase-Zielsequenz überein. In der +3-Position befindet sich bei beiden Motiven ein Isoleucin anstatt eines Phenylalanins, beides Aminosäuren von nahezu identischer Hydrophobizität. Die Homologie zwischen SFK-Erkennungssequenz und Tarp-Motiven deutet auf einen langen Prozess der Koevolution hin. Da von Src-Kinasen phosphorylierte Proteine normalerweise mit zellulären Proteinen interagieren lässt sich vermuten, dass die stark konservierten Tarp Motive A und B ebenfalls dazu in der Lage sind.

7.1.2 Chemische Inhibition der Tarp-Phosphorylierung

Um die mit Hilfe der *in silico*-Analysen gemachten Vorhersagen zu überprüfen, wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt. Zunächst wurde die Phosphorylierung von Tarp an Tyrosinresten durch den Breitband-Tyrosinkinaseinhibitor Genestein unterdrückt (Abb. 10A). Eine Quantifizierung durch Messung der integrierten Bandenintensität, mit Normalisierung auf die Bandenintensität von Tubulin, zeigte eine dosisabhängige Reduzierung der Tarp-Phosphorylierung mit steigender Inhibitorkonzentration. Bei einer Inhibitorkonzentration von 350 μM Genestein ließ sich die Tyrosinphosphorylierung um ~70% inhibieren (Abb. 10A). 350 μM Genestein ist laut Literatur die Konzentration Genestein, die benötigt wird, um die EGF-stimulierte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors in A431- Epidermoidkrebszellen vollständig zu inhibieren (Dhar et al., 1990; Mustelin et al., 1990; Tago et al., 2001). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Tarp tatsächlich von einer Wirtszellkinase phosphoryliert wird.

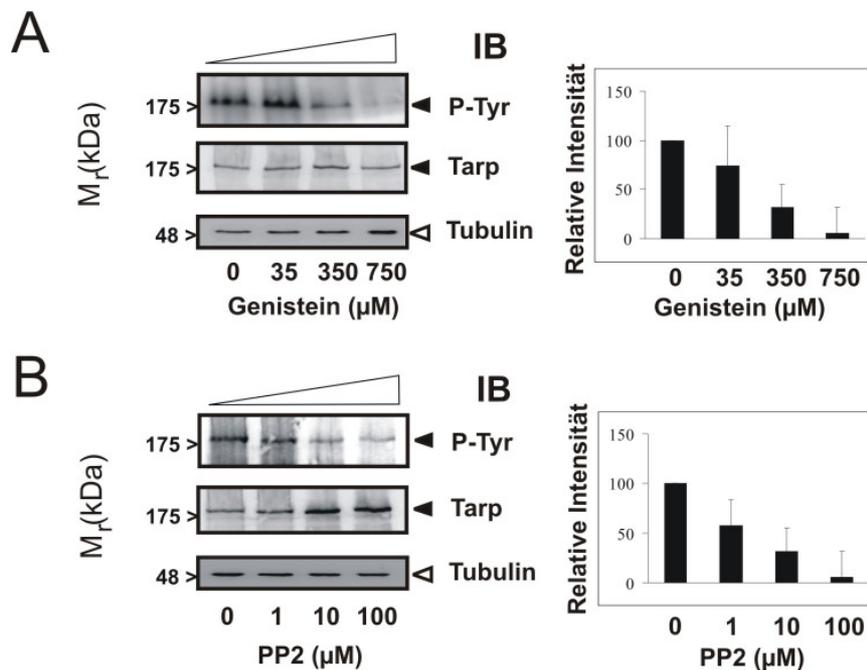


Abbildung 10: Pharmakologische Inhibition der Tyrosinphosphorylierung durch den Breitband-Tyrosinkinaseinhibitor Genestein (A) und den SFK-spezifischen Inhibitor PP2 (B). Die Inhibitoren wurden zusammen mit EKs von *C. trachomatis* (MOI 200) appliziert. Nach einer Stunde wurden die Zellen geerntet, und die Lysate wurden per Western Blot analysiert. Die Intensität der Tarp-Banden (schwarze Pfeilköpfe) auf den Phosphotyrosinblots wurde durch eine Messung der integrierten Bandendichte (ImageJ) bestimmt und auf die Tubulinladekontrolle (weißer Pfeilkopf) normalisiert. Fehlerbalken = Standardabweichung (n=2). IB = Immunblot, P-Tyr = Phosphotyrosin

Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung tatsächlich auf Kinasen der Src-Familie zurückzuführen ist, haben wir den Src spezifischen Inhibitor PP2 verwendet (Hanke et al., 1996). Tatsächlich ist PP2 in der Lage, die Tarp-Phosphorylierung dosisabhängig zu inhibieren (Abb. 10B). PP2 inhibiert die Tarp-Phosphorylierung bei einer Konzentration von 10 μ M um ~70% (Abb. 10B). Zusammenfassend unterstützen unsere Daten aus den Experimenten mit chemischen Inhibitoren die Hypothese, dass Tarp von einer Wirtszellkinase phosphoryliert wird, und dass Kinasen der Src-Familie eine Rolle für die Tarp-Phosphorylierung spielen.

7.1.3 *In vitro*- und *in vivo*-Phosphorylierung von Tarp

Um zu klären, ob weitere zelluläre Komponenten eine Rolle für die Src vermittelte Tyrosinphosphorylierung von Tarp spielen, wurde ein Fusionsprotein aus dem N-Terminus von Tarp (~500 AS) und der Glutathion-S-Transferase erzeugt (GST-Tarp). Dieses Fusionsprotein wurde für eine *in vitro*-Phosphorylierungsreaktion mit rekombinantem humanem Src verwendet. Tatsächlich wird GST-Tarp von humanem Src phosphoryliert (Abb. 11). Diese Phosphorylierung ist spezifisch, da entsprechende Kontrollen (Src+GST) nicht phosphoryliert werden (Abb. 11). Dies bedeutet, dass Tarp direkt von Src phosphoryliert wird und dass die Phosphorylierungsstelle -wie vorhergesagt- im N-Terminus von Tarp lokalisiert ist.

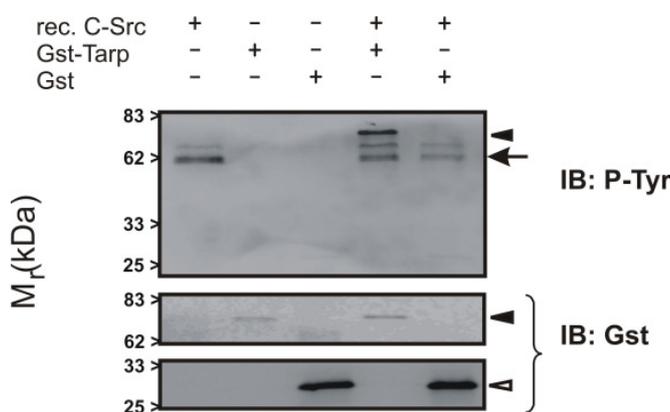


Abbildung 11: *In vitro* - Phosphorylierung von GST-Tarp. SFK vermitteln die Tarp Phosphorylierung *in vitro*. GST-Tarp (schwarze Pfeilköpfe) wird durch rekombinantes c-Src *in vitro* phosphoryliert. Der Pfeil zeigt auf die Src Autophosphorylierung.

Drei Mitglieder der Src-Familie, Src, Yes und Fyn werden ubiquitär exprimiert und man nimmt an, dass diese teilweise redundante Funktionen ausüben. Um zu untersuchen, ob SFK die Tarp-Phosphorylierung auch *in vivo* vermitteln, wurden Zellen, die von Mausfibroblasten mit funktionellen Nullmutationen in den Genen für *src*, *yes* und *fyn*

abstammen, verwendet (SYF-Zellen). Als Kontrolle wurden SYF-Zellen, die exogen *src* exprimieren (SYF+Src), verwendet. Im Gegensatz zu einer Infektion in SYF+Src- und HeLa-Zellen führt eine Infektion in SYF-Zellen nicht zu einer Tarp-Phosphorylierung (Abb. 12). Die Phosphorylierung von Tarp in HeLa-Zellen erfolgt innerhalb weniger Minuten und erreicht nach etwa 20-30 Minuten ihren Höhepunkt. Diese Verzögerung entsteht dadurch, dass der Großteil der Elementarkörperchen, die nicht über einen aktiven Bewegungsmechanismus verfügen, zeitverzögert auf die Zellen sinkt. Eine Analyse einzelner Elementarkörperchen deutet jedoch darauf hin, dass Tarp sehr schnell transloziert werden könnte, da es innerhalb von 90 Sekunden zu einer EK-assoziierten Tyrosinphosphorylierung kommt (Clifton et al., 2004).

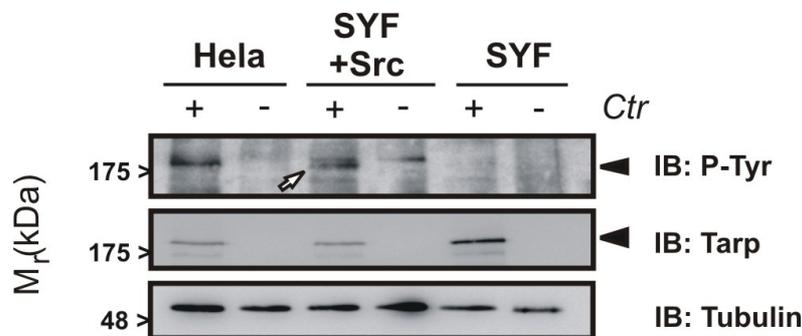


Abbildung 12: Infektion von HeLa-, SYF- und SYF+Src-Zellen mit *C. trachomatis* (MOI 500). Tarp wird nicht in *src*-, *yes*- und *fyn*- defizienten Zellen phosphoryliert (schwarzer Pfeilkopf). Im Gegensatz dazu wird Tarp in SYF-Zellen, die stabil mit *src* transfiziert sind (SYF+Src, untere Bande, weißer Pfeil), und in HeLa-Zellen phosphoryliert. Als Ladekontrollen wurden Hsp60 und Tubulin verwendet. IB = Immunblot, P-Tyr = Phosphotyrosin

7.1.4 Identifizierung der Tarp-Phosphorylierungsstelle

Der Identifizierung der Phosphorylierungsstellen kommt eine entscheidende Bedeutung zu, da diese die Interaktion mit zellulären SH2- und PTB-Domänenproteinen vermitteln (Schlessinger and Lemmon, 2003). Um zu untersuchen, ob die oben beschriebenen ENIYE-Motive in der Tat die Tyrosinphosphorylierungsstellen des Tarp-Proteins darstellen, wurde ein Fusionsprotein zwischen einer ENIYE-enthaltenden Y-Wiederholungseinheit von Tarp und dem „Enhanced Green Fluorescent Protein“ (eGFP) erzeugt (ENIYE-GFP). Der Tyrosinrest wurde durch gezielte PCR-Mutagenese gegen einen Phenylalaninrest ausgetauscht (ENIFE-

GFP). Beide Konstrukte, sowie der leere eGFP-Vektor, wurden in SYF- und SYF+Src-Zellen transfiziert. Es zeigte sich, dass nur das ENIYE-GFP, nicht aber das ENIFE-GFP-Protein nach Transfektion und Expression in SYF+Src-Zellen phosphoryliert wird (Abb. 13). Weiterhin werden weder das ENIYE-GFP, noch das ENIFE-GFP-Fusionsprotein in SYF-Zellen phosphoryliert (Abb. 13). Das ENIYE-Motiv stellt somit die Phosphorylierungsstelle auf dem Tarp-Protein dar. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das ENIYE-Motiv ein Src-Kinase spezifisches Substrat ist.

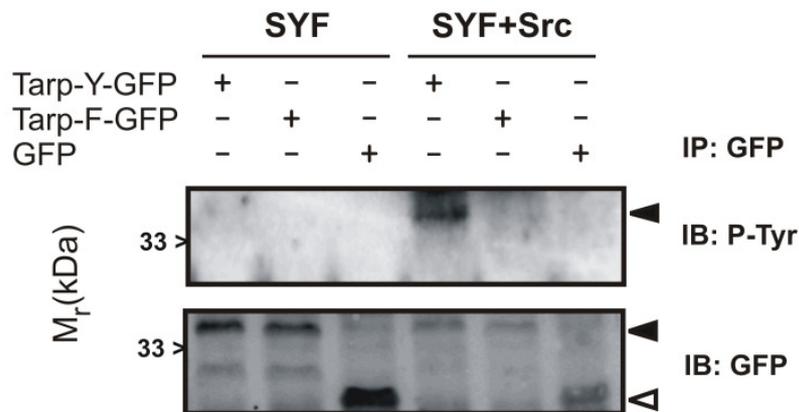


Abbildung 13: SFKs phosphorylieren die Tarp-ENIYE-Motive. SYF- und SYF+Src-Zellen wurden transient mit einem einzelnen ENIYE-Motiv (fusioniert mit GFP) transfiziert. Das ENIYE-GFP wird nur in SYF+Src Zellen phosphoryliert, was demonstriert, dass Src für die Tarp-Phosphorylierung in ENIYE-Motiven wichtig ist. Wenn der Tyrosinrest gegen einen Phenylalaninrest ausgetauscht wird (ENIFE-GFP), wird das Fusionsprotein weder in SYF- noch in SYF+Src-Zellen phosphoryliert.

7.1.5 Rolle der Tarp-Phosphorylierung für die Infektion

Die bisher durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass Tarp Src-abhängig an ENIYE-Motiven phosphoryliert wird, und dass hierfür außer Src keine weiteren zellulären Komponenten notwendig sind. Für Tir und CagA, von EPEC bzw. *Helicobacter pylori*, konnte gezeigt werden, dass die Tyrosinphosphorylierung von diesen Pathogenen benötigt wird, um eine spezifische Funktion auszuüben (Backert and Selbach, 2005). Für das Tarp-Protein wurde gezeigt, dass es in der Lage ist, unabhängig von der Phosphorylierung Aktin zu rekrutieren (Clifton et al., 2005). Da die Tyrosinphosphorylierung unmittelbar nach der Translokation in die Wirtszelle erfolgt, ist es wahrscheinlich, dass die Phosphorylierung eine

wichtige Rolle für die Invasion spielt. Um zu überprüfen, welchen Einfluss die SFK-vermittelte Tarp-Phosphorylierung auf die *C. trachomatis*-Invasion hat, haben wir die Infektivität in HeLa-, SYF-, SYF+Src- und L929- Zellen verglichen. L929 wurden als Kontrolle verwendet, da es sich hierbei um wildtyp Mausfibroblasten ohne Gendelektionen handelt. Hierbei ließ sich feststellen, dass sich SYF-Zellen bei niedriger MOI so gut wie nicht infizieren lassen (Abb. 14). Betrachtet man die unterschiedliche Größe der Zellen, so erkennt man, dass ein normaler Infektivitätsassay mit konfluenten Monolayern kein exaktes quantitatives Bild der Infektion liefert. Die Oberfläche der SYF-Zellen ist etwa 2-3 mal so groß wie SYF+Src-Zellen, so dass jede SYF-Zelle von 2-3 mal mehr infektiösen EK getroffen wird. Dies hat zur Folge, dass ein Infektivitätsunterschied von 2-3 nicht detektierbar wäre. Weiterhin ist es wichtig, unter einer MOI von 1 bei der niedrigsten Zelldichte, also den SYF-Zellen zu bleiben, da sonst eine Absättigung der Zellen mit EK eintritt und Infektivitätsunterschiede ebenfalls nicht mehr detektierbar sind.

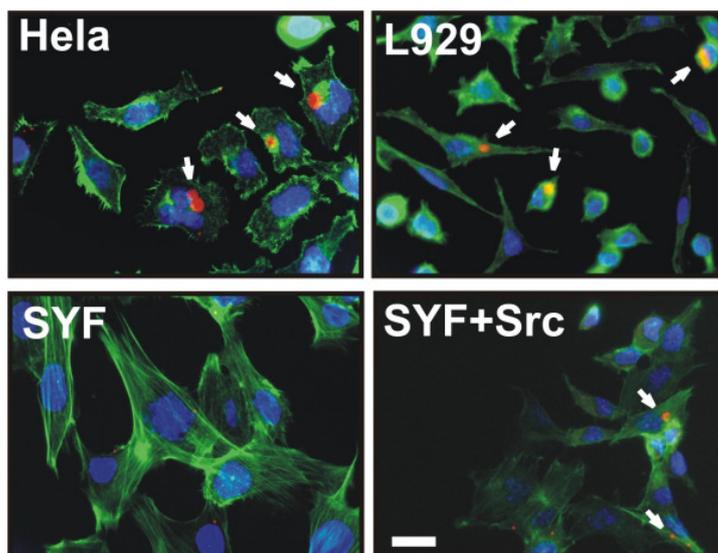


Abbildung 14: Fluoreszenzfärbung einer Infektion in HeLa-, L929-, SYF- und SYF+Src-Zellen. Die Pfeile deuten auf *C. trachomatis* LGV-L2-Inklusionen (rot). Zellkerne sind mit Hoechst (blau) und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin (grün) gefärbt. In SYF Zellen sind nur vereinzelte Bakterien zu erkennen, jedoch keine Inklusionen. Balken = 20 µm

Die aus dem vorangegangenen Experiment gewonnenen Daten wurden zur Quantifizierung der Infektion in einer automatisierten Messung verwendet. L929-, SYF- und SYF+Src-Zellen wurden in 48-Wellzellkulturplatten in serieller Verdünnung ausgesät. Alle Wells wurden am nächsten Tag mit der gleichen Zahl *C. trachomatis* L2 (5×10^4 IFU) infiziert. Nach einem Wachstum von 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und gefärbt (*C. trachomatis* und Zellkerne). Die Auswertung dieser Experimente zeigte, dass die Infektivität sowohl in SYF- als auch in SYF+Src-Zellen im Vergleich zu L929 Zellen stark verringert ist (Abb. 15). Da sich SYF+Src-Zellen in einem Überexpressionsstadium (mit

starker zellulärer Hyperphosphorylierung) befinden (Abb. 12) und SYF-Zellen eine *src*-, *yes*-, *fyn*- Dreifachdeletion aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass die SFK-Deregulation die Infektivität im allgemeinen negativ beeinflusst. Nichtsdestotrotz ließ sich ein Unterschied zwischen den letzten beiden Zelltypen erkennen. Während die Infektivität in SYF-Zellen auf 6.9% +/- 4.1 verringert war, läßt sich in SYF+Src-Zellen eine partielle Wiederherstellung der Infektivität auf 19.4% +/- 7.6 erkennen (Abb. 15).

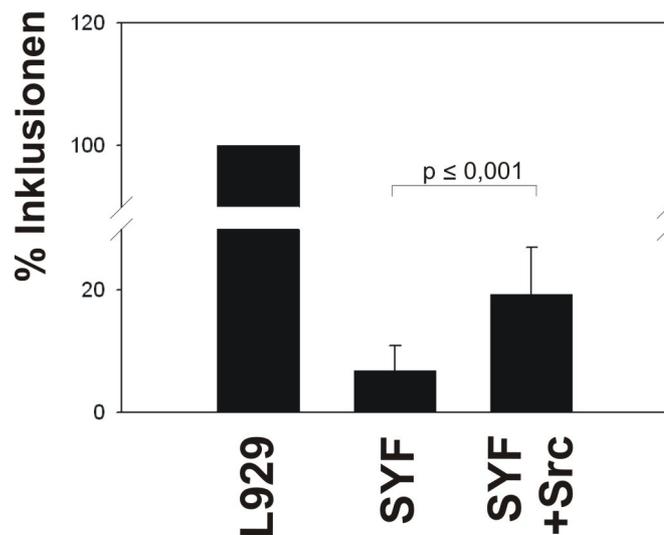


Abbildung 15: Infektivitätsassay mit L929-, SYF- und SYF+Src-Zellen. Die Zellen wurden mit *C. trachomatis* L2 infiziert und nach weiteren 24 Stunden fixiert, gefärbt und ausgewertet. Die Analyse erfolgte mittels automatischer Mikroskopie, gezählt wurden Inklusionen und Kerne und deren relatives Verhältnis wurde oben graphisch dargestellt. Es zeigte sich, dass die Infektivität in SYF-Zellen stark verringert ist (6.9% +/- 4.1) und sich durch *src*-Rekomplementation partiell wiederherstellen lässt (19.4% +/- 7.6). n=3, Fehlerbalken = Standardfehler

Berechnet man das Verhältnis der Infektivität von SYF- zu SYF+Src-Zellen, so ergibt sich ein etwa 3-facher Unterschied. Es bleibt jedoch aus dem oben beschriebenen Experiment offen, ob dieser Unterschied auf der Invasion oder der späteren Entwicklung der Chlamydien beruht. Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Invasion beeinflusst wird, wurde das Experiment mit HeLa-Zellen und dem Src-Inhibitor PP2 wiederholt. Die Tarp-Phosphorylierung wurde entweder während der Invasion oder nach der Invasion inhibiert. Um zu untersuchen, ob die Inhibition der Invasion spezifisch für *C. trachomatis* ist, wurde das Experiment parallel mit *C. pneumoniae* durchgeführt. Die Infektion mit *C. trachomatis* konnte durch PP2-Applikation während der Invasion auf 30.8% +/- 7.3 gesenkt werden, was für *C. pneumoniae* nicht möglich war (70.6% +/- 8.7) (Abb. 16). Interessant ist auch, dass die

Inhibition der SFKs nicht zu einer vollständigen Blockierung der Infektion führt, was auf eine Redundanz der Kinasen *in vivo* oder einen alternativen Invasionsmechanismus hindeutet. Letzteres erscheint wahrscheinlich, da *C. pneumoniae* auch in der Abwesenheit einer Tarp-Phosphorylierung in der Lage ist, in die Wirtszelle einzudringen. Weder *C. trachomatis* noch *C. pneumoniae* waren betroffen wenn die Inhibition nach der Invasion erfolgte (Abb. 16).

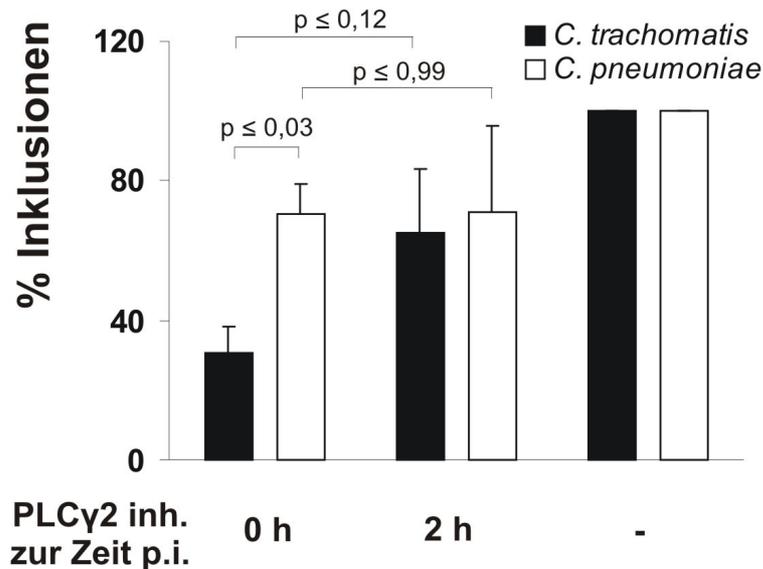


Abbildung 16: Infektivitätsassay - HeLa-Zellen wurden mit dem Src-Inhibitor PP2 behandelt zu den angegebenen Zeitpunkten behandelt und für 24 Stunden mit *C. trachomatis* L2 oder 48 Stunden mit *C. pneumoniae* infiziert. Das Experiment wurde durch Fixierung gestoppt und die Proben anschließend gefärbt und ausgewertet. Die Analyse erfolgte mittels automatischer Mikroskopie, gezählt wurden Inklusionen und Kerne. Wie zu erkennen ist, verhindert die PP2 Applikation während der Invasion die Inklusionsbildung von *C. trachomatis*, während die *C. pneumoniae* Invasion kaum betroffen ist. Keiner der beiden Organismen ist betroffen, wenn die Inhibition nach der Invasion erfolgt. Deren relatives Verhältnis wurde oben graphisch dargestellt. Fehlerbalken = Standardfehler (n=3).

7.2 Untersuchung der Tarp-Interaktionspartner

Die Deregulation der Src-Kinasen übt -wie unter 7.1.5 gezeigt werden konnte- einen negativen Einfluss auf die Infektivität, genauer gesagt auf die Invasion von *C. trachomatis* aus. Da die Tarp-Phosphorylierung nicht für die Aktinrekrutierung benötigt wird (Clifton et al., 2005) und auch nur in *Chlamydia*, nicht aber in *Chlamydomphila* stattfindet, läßt sich eine für diesen Organismus spezifische Funktion postulieren. Von anderen tyrosinphosphorylierten

bakteriellen Effektorproteinen ist eine Interaktion mit zellulären SH2-Domänenproteinen bekannt (Bourzac and Guillemin, 2005; Campellone and Leong, 2003). So interagiert z.B. das *H. pylori* Protein CagA phosphorylierungsabhängig mit Src-homology (SH) 2-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2) (Higashi et al., 2002b), Growth factor receptor bound 2 (Grb2) (Mimuro et al., 2002), Carboxy-terminal Src kinase (Csk) (Selbach et al., 2003) und Hepatocyte growth factor (HGF) (Churin et al., 2003). Um also zu erklären, wie und welche Funktionen Tarp ausübt, ist es von entscheidender Bedeutung, zunächst die Tarp Interaktionspartner zu charakterisieren. In Analogie zum *H. pylori*-Protein CagA, welches kurz nach der Adhäsion in die Wirtszelle eingeschleust wird, dessen Wirkung aber über die Adhäsionsphase hinaus bestehen bleibt (Segal et al., 1999), ist auch für Tarp eine langanhaltende Wirkung denkbar. Die Interaktionspartner des Tarp-Proteins könnte entscheidende Hinweise auf molekulare Mechanismen der Pathogenese von *C. trachomatis* geben und eine Differenzierung von der molekularen Pathogenese des verwandten Lungenpathogens *C. pneumoniae* zulassen.

7.2.1 Identifizierung von Tarp-Interaktionspartnern

Zur initialen Identifizierung von Tarp-Interaktionspartnern wurde eine besonders empfindliche und schnelle Methode verwendet: Auf PVDF-Membranen immobilisierte, GST-markierte SH2-Domänen unterschiedlicher Proteine wurden mit *in vitro* phosphoryliertem GST-Tarp inkubiert und mittels eines phosphotyrosinspezifischen Antikörpers detektiert (Abb. 17). Wie sich zeigte interagiert GST-Tarp besonders stark mit Phospholipase C gamma 2 (PLC γ 2, Abb. 17, oben links), während andere Proteine wie: Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK), SHP-2 (Abb. 17, oben rechts) und Src homology 2 domain containing (SHC) (Abb. 17, unten links) erst später ein Signal erzeugen.

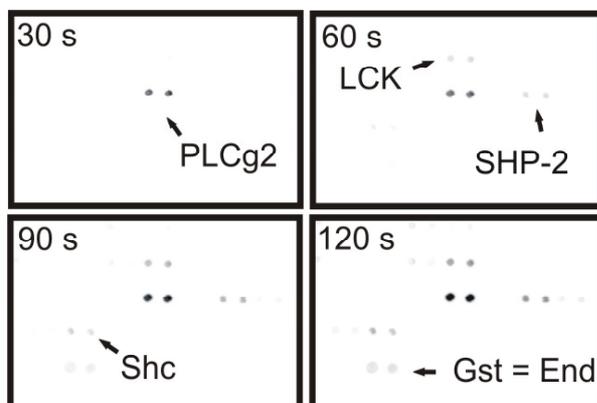


Abbildung 17: Tyrosinphosphoryliertes GST-Tarp-Fusionsprotein wurde mit einem SH2-Domänenarray inkubiert. Die Detektion der Interaktion mit den SH2-Domänen erfolgte mittels Chemilumineszenz nach Markierung tyrosinphosphorylierter Proteine. Die Detektionszeit ist in der linken oberen Ecke angegeben, je früher ein Signal erscheint, desto stärker ist die Interaktion. Positionierung erfolgte durch Überexposition (s. Materialien und Methoden).

Die Signalstärke der verwendeten Technik ist laut Hersteller linear zur Stärke der Interaktion zwischen den Proteinen. Die oben angegebene Reihenfolge könnte also Hinweise darauf liefern, dass Tarp unterschiedlich stark mit verschiedenen Molekülen interagieren kann. Um die Ähnlichkeit der optimalen Interaktionsmotive der detektierten SH2-Proteine und die Tarp-Motive zu vergleichen, wurde ein manueller Sequenzabgleich durchgeführt. Die identifizierten Proteine weisen in ihrer Bindungspräferenz eine hohe Ähnlichkeit zueinander und zu den beiden Tarp-Motiven auf (Abb. 18). Interessanterweise besitzt das optimale PLC γ 2- Interaktionsmotiv an der +1-Position nach dem Tyrosinrest einen Isoleucinrest, was in Kontrast zu den Tarp-Motiven steht, die an dieser Stelle jeweils einen Glutaminsäurerest aufweisen.

pY	E	X	I	ShcA
pY	E	E	I	Src
pY	E	N	I	Tarp Motiv A
pY	E	S	I	Tarp Motiv B
pY	I	I	I	PLC γ 2
pY	I	X	I	Shp-2

Abbildung 18: Manueller Sequenzabgleich optimaler SH2-Domänenbindungspartnern mit Tarp Motiven A und B. Auffällig ist die Homologie zwischen den Tarp Motiven und den zellulären Motiven.

Um die auf diese Weise identifizierten Interaktionspartner *in vivo*, d.h. im Zellkulturmodell, zu bestätigen, wurde zunächst eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. Da für *C. trachomatis* – Infektionen ein Epithelzellkulturmodell verwendet wurde, LCK jedoch eine Lymphozyten-spezifische Kinase ist, wurden Koimmunpräzipitationen über das homologe Protein Src, welches in diesem Zelltyp ausreichend exprimiert wird, durchgeführt. Tarp ließ sich aus *C. trachomatis*-infizierten HeLa- und End1 ϵ 6/ ϵ 7-Zellen mit PLC γ 2 und SHC (Abb. 19), nicht jedoch mit Src und SHP-2 (Daten nicht gezeigt) koimmunpräzipitieren.

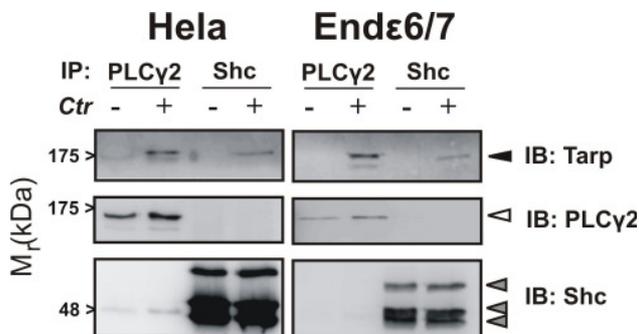


Abbildung 19: Koimmunpräzipitation von Tarp (schwarze Pfeilspitze) mittels PLC γ 2- (weiße Pfeilspitze) und SHC- (graue Pfeilspitzen) Antikörpern aus HeLa- und End ϵ 6/7-Zellen. IB = Immunblot, IP = Immunpräzipitation.

Interessanterweise zeigte sich bei der Koimmunpräzipitation, dass PLC γ 2 in Epithelzellen exprimiert wird, was der verbreiteten Meinung einer rein hämatopoietischen

Expression widerspricht (Wilde and Watson, 2001). Es ist nicht klar, ob es sich hierbei um einen Effekt der Transformation (HeLa) oder der viralen Immortalisierung (End1ε6/ε7) handelt oder ob dies ein physiologischer Zustand ist. Eine Suche in einer Gewebemikroarray-Expressionsdatenbank unterstützte unsere Beobachtung einer PLCγ2-Expression in verschiedenen Geweben wie z.B. dem Uterus, und deutet nicht auf ein Zellkulturartefakt hin (Su et al., 2002). Um die Phosphorylierungsabhängigkeit der Tarp-PLCγ2- und der Tarp-SHC- Interaktion zu überprüfen, wurden Immunpräzipitationen aus SYF- und SYF+Src-Zellen durchgeführt. Da Tarp in SYF-Zellen nicht phosphoryliert wird, sollte hier auch keine Koimmunpräzipitation zu beobachten sein. Diese Vermutung bestätigte sich, dass Tarp nur in SYF+Src Zellen mit PLCγ2 und SHC interagiert (Abb. 20).

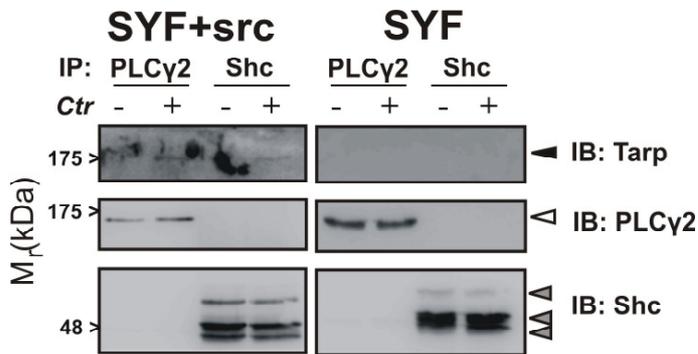


Abbildung 20: Koimmunpräzipitation von Tarp (schwarze Pfeilspitze) mittels PLCγ2- (weiße Pfeilspitze) und SHC- (graue Pfeilspitzen) Antikörpern aus HeLa- und Endε6/7-Zellen. IB = Immunblot, IP = Immunpräzipitation.

Um die Koimmunopräzipitation mit morphologischen Informationen zu ergänzen, wurden Kolokalisationsexperimente durchgeführt. PLCγ2 translozierte bei diesen Experimenten an die der Zelle zugewandte Seite der EK (Abb. 21). Aufgrund der großen Ähnlichkeit zwischen PLCγ2 und PLCγ1 wurde ein weiteres Kolokalisationsexperiment mit PLCγ1 durchgeführt und es zeigte sich, dass auch dieses Protein polar an die EK rekrutiert wird (Abb. 21). Eine Kolokalisation mit SHC ließ sich nicht bestätigen (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend konnten in diesem Abschnitt die Interaktion von Tarp mit zellulären SH2-Domänenproteinen zeigen, von den vier identifizierten Interaktionspartnern konnte die Interaktion von PLCγ2 mit Tarp auf biochemischer und morphologischer Ebene bestätigt werden.

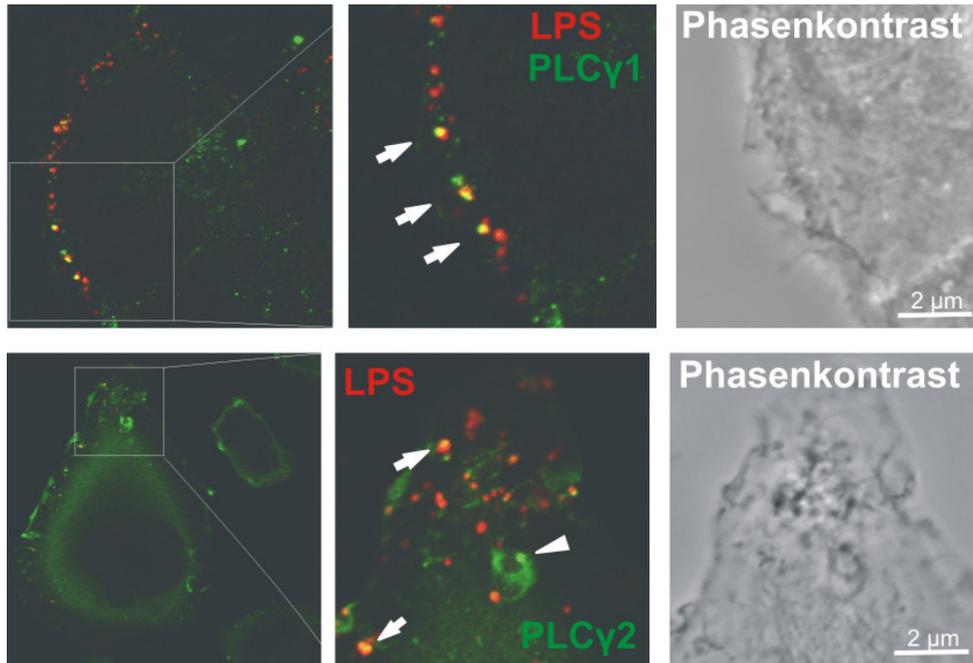


Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung von *C. trachomatis* L2 EKs (Rot) und PLCγ1 (grün, obere Reihe) und PLCγ2 (grün, untere Reihe). Es ist deutlich erkennbar, dass PLCγ2 polar an die EK rekrutiert (Pfeile).

7.2.2 Funktion der Phospholipase C gamma-Rekrutierung

Weder die Assoziation von PLCγ mit *C. trachomatis* noch deren Funktion für die Infektion sind bisher untersucht worden. Um zu klären, ob PLCγ eine Rolle für die Infektion mit diesem Pathogen spielt, haben wir den PLCγ Inhibitor ET-18-OCH(3) (Edelfosine) verwendet (Sano et al., 2001). Applikation dieses Inhibitors verhindert, wie mikroskopische Untersuchungen zeigen die Entwicklung von Inklusionen vollständig (Abb. 22).

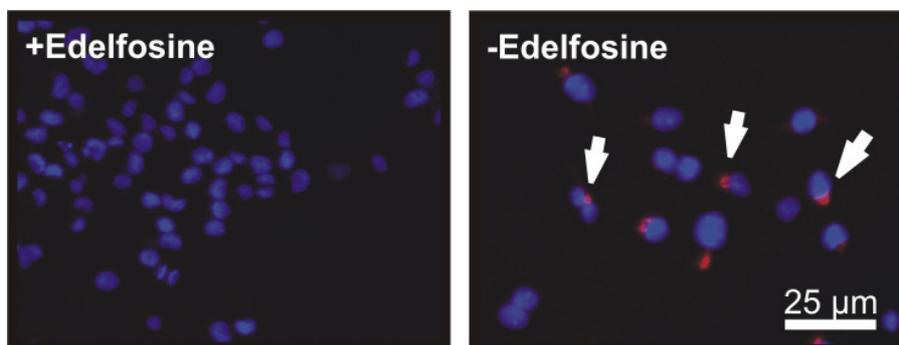


Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbung der Infektion mit *C. trachomatis* L2 nach Applikation des PLCγ-Inhibitors Edelfosine. *C. trachomatis* L2 wurde mit anti-OMP1 gefärbt (rot), Wirtszellkerne wurden mit Hoechst gegengefärbt (blau). Es ist erkennbar, dass die Infektion in den Edelfosine-behandelten Zellen nach 24 Stunden drastisch reduziert ist.

Zur quantitativen Untersuchung dieses Effekts verwendeten wir den bereits für den Src-Inhibitor PP2 entwickelte Messung (s. Abschnitt 7.6): In 48-Wellplatten kultivierte HeLa-Zellen wurden entweder mit *C. trachomatis* oder *C. pneumoniae* infiziert und während oder nach der Invasion mit Edelfosine behandelt (PLC γ inhibiert). Die Auswertung mittels Immunfluoreszenz- und automatischer Mikroskopie ergab, dass die Infektion in *C. trachomatis*-infizierten Zellen auf 2,8 % +/- 3,4 reduziert war (Abb. 23). Dem gegenüber steht eine um 41 % +/- 15,1 reduzierte Infektion von *C. pneumoniae* (Abb. 23). Die Applikation des Inhibitors nach der Invasion erzeugte nur einen basalen Effekt auf die Inklusionsbildung der beiden Pathogene.

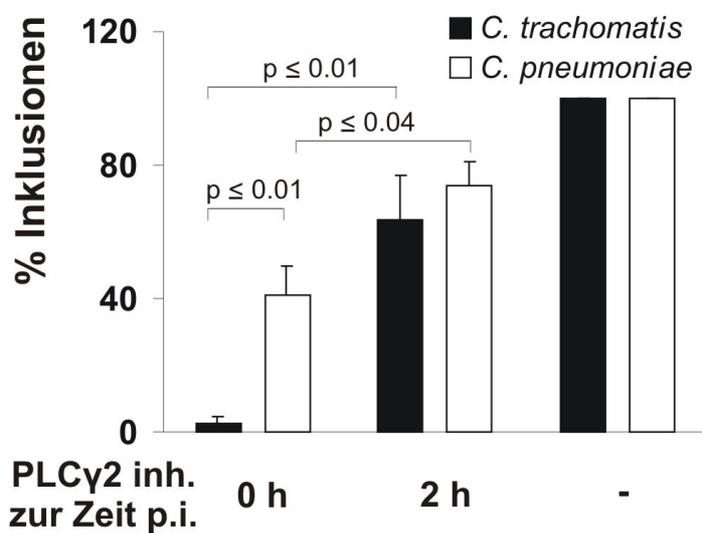


Abbildung 23: Quantifizierung der Inklusionsbildung nach PLC γ -Inhibition. PLC γ wurde mit 7,5 μ M Edelfosine (EF) während (0 h) oder nach der Invasion (2 h) inhibiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert, gefärbt und mittels automatischer Mikroskopie analysiert. Die Anzahl der Inklusionen war auf 2,8 % +/- 3,4 für *C. trachomatis* und 41 % +/- 15,1 für *C. pneumoniae* gegenüber der unbehandelten Kontrolle reduziert. Fehlerbalken = Standardfehler, n=3.

Mit der Quantifizierung bestätigte sich die Vermutung aus der optischen Analyse (Abb. 22). *C. trachomatis* weist im Gegensatz zu *C. pneumoniae* eine hohe Sensitivität gegenüber der PLC γ -Inhibition auf. Im nächsten Schritt wurde daher untersucht, welche Auswirkung diese Inhibition auf die Chlamydien hat. Zwei Möglichkeiten scheinen besonders wahrscheinlich und sind gut experimentell untersuchbar: (i) der Inhibitor könnte auf die Internalisierung wirken, dann müssten alle EKs auf der Oberfläche der Zelle verbleiben oder (ii) der Inhibitor verändert den intrazellulären Transport und führt zur Degradation der EK. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden wurden Zellen für 4 Stunden mit *C. trachomatis* infiziert und während der ersten 2 Stunden mit Edelfosine inhibiert. Die Lokalisation der EK an oder in der Zelle wurde im Anschluss mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Mikroskopie untersucht. Es zeigte sich, dass die *C. trachomatis*-EK in die Zelle transportiert werden, also deren Aufnahme nicht inhibiert wird. Eine Färbung gegen Lamp-1

(engl.: Lysosomal associated membrane protein-1) bestätigte, dass *C. trachomatis* nach Inhibition von PLC γ in die Nähe lysosomaler Kompartimente transportiert wird (Abb. 24) und demnach PLC γ den intrazellulären Transport der EKs entscheidend reguliert.

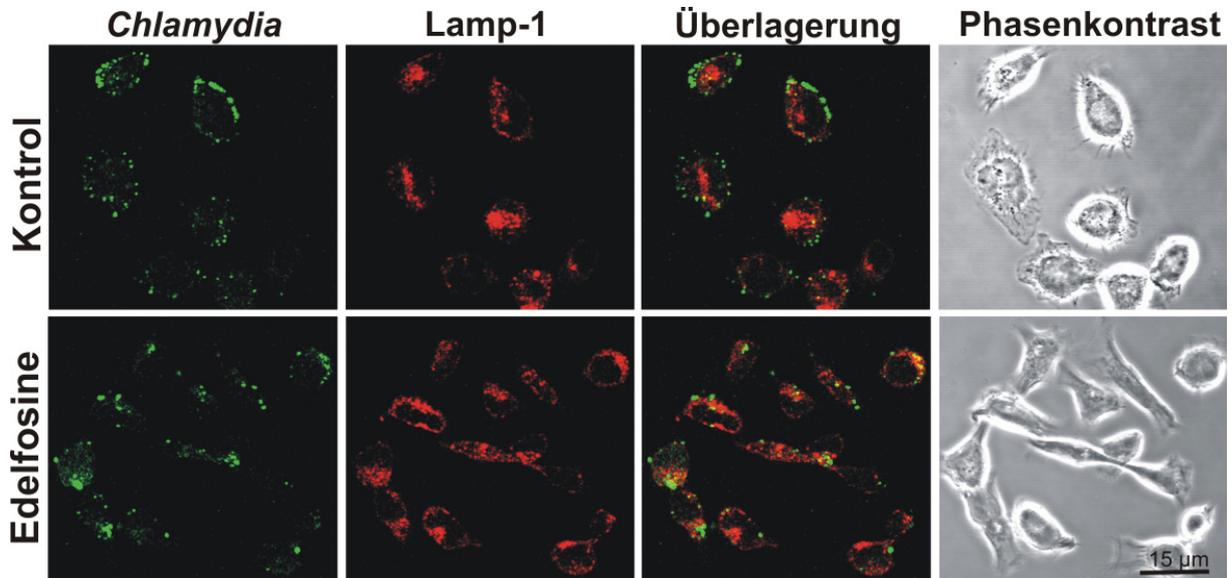


Abbildung 24: Konfokale Mikroskopie einer Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen, die 4 Stunden mit *C. trachomatis* (Grün) infiziert wurden. Die Bilder in der oberen Reihe zeigen den normalen nicht inhibierten Zustand, die untere Reihe zeigt die Morphologie der Infektion nach Edelfosineinhibition für 2 Stunden. Die Lamp-1 (rot) Färbung zeigt, dass EKs ohne Inhibition kaum mit Lysosomen in Kontakt kommen. Im Gegensatz hierzu befinden sich EKs in inhibierten Zellen in engem Kontakt mit Lysosomen (Pfeilspitzen).

Um diesen Effekt quantitativ zu beschreiben, wurden in zwei Wiederholungen jeweils 25 Zellen pro Bedingung ausgezählt. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Lysosomen-assoziierten EKs von 15 % +/- 11 auf 58 % +/- 23 steigt (Abb. 25). Zusammenfassend lässt sich also schließen, dass der Transport von *C. trachomatis* PLC γ - abhängig reguliert ist. Eine Inhibition führt zum Transport zu den Lysosomen und der Degradation der EK.

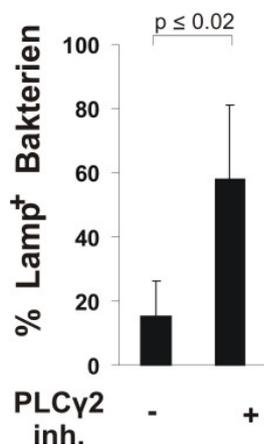


Abbildung 25: Quantifizierung der Färbung von Abbildung 20. Lamp-1- positive und -negative Bakterien wurden ausgezählt. Dargestellt ist der relative Anteil an Lamp-1-positiven EKs mit oder ohne PLC γ -Inhibition. Es zeigt sich eine signifikante Steigerung der Lamp-1- positiven EKs ($p \leq 0,02$) nach PLC γ -Inhibition. Fehlerbalken = Standardfehler (n=2; 25 Zellen pro Experiment).

7.3 Phosphoinositolmetabolismus während der *C. trachomatis*-Invasion

Warum führt die Inhibition von PLC γ zur Degradation in den Lysosomen? Um ein molekulares Verständnis für die Funktion von PLC γ für die Chlamydieninvasion zu bekommen, wurde ein konfokales Echtzeitmikroskopiesystem eingesetzt. Zur Echtzeitbeobachtung der Aufnahme von Chlamydien in die Wirtszelle wurde die Färbung von Chlamydien durch Verwendung photostabiler Alexafarbstoffe oder DNA-Farbstoffe (Hoechst) etabliert, was ermöglichte, die genetische Unzugänglichkeit der Chlamydien zu umgehen (s. Materialien und Methoden). Ein weiterer Vorteil der chemischen Markierung liegt darin, dass diese kaum Einschränkungen bei der Auswahl der Fluorochrome unterliegt und dass die Fluorochrome optimal an das eGFP (engl.: enhanced green fluorescent protein) und die Filter des hier verwendeten Mikroskops angepasst werden können.

Um die Bedeutung der PLC γ für die Invasion zu verstehen, ist es zunächst wichtig, einige grundlegende Fakten des Lipidmetabolismus zu betrachten. Eine optimale PLC γ -Aktivierung wird auf zwei Arten reguliert: (i) die Bindung der PLC γ -SH2-Domäne an eine tyrosinphosphorylierte Zielsequenz und (ii) die Bindung der PLC γ -PH-Domäne an PstIns(3,4,5)-P₃ (PIP₃) (Falasca et al., 1998; Wilde and Watson, 2001). Die erste Bedingung ist durch die Interaktion mit tyrosinphosphoryliertem Tarp gegeben (Abb. 19-20). Die Bildung von PIP₃ ist die Voraussetzung für die Interaktion mit der PLC γ -PH-Domäne. PIP₃ wird durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) gebildet, für die bisher nur eine Aktivierung während der Invasion von *C. pneumoniae* gezeigt wurde (Coombes and Mahony, 2002). Zur Überprüfung der PI3K-Aktivität während der Invasion von *C. trachomatis* wurde die Btk-PH-Domäne, gekoppelt an eGFP, verwendet. Btk-PH-eGFP besitzt die gleiche Bindungsspezifität wie PLC γ -PH, bindet also an PIP₃ (DiNitto et al., 2003). Über die Rekrutierung von Btk-PH-eGFP ist es also möglich, die Aktivität der PI3K fluoreszenzmikroskopisch zu analysieren und den Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die PIP₃-Bildung mittels Echtzeitmikroskopie zu untersuchen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt darin, dass zusätzlich morphologische Informationen über den Invasionsprozess gewonnen werden können.

7.3.1 Bildung einer PstIns (3,4,5)-P₃-angereicherten frühen Inklusion

Das Ergebnis eines solchen echtzeitmikroskopischen Versuchs ist in Abbildung 26 dargestellt. Man kann erkennen, dass es zu einer massiven Rekrutierung von Btk-PH-eGFP, und damit zu einer starken PIP₃ – Bildung, kommt (Abb. 26). Dieses Ergebnis ist äußerst interessant, da PIP₃ normalerweise eine äußerst kurzlebige Lipidspezies ist, die nur für membranassoziierte Signaltransduktionsprozesse benötigt wird (Yeung et al., 2006). Verfolgt man jedoch den Verlauf der Chlamydieninvasion, so zeigt sich, dass die Rekrutierung von Btk-PH-eGFP eher zunimmt (Abb. 26). Im Verlauf der Echtzeitmikroskopie wurden zusätzlich häufig tubuläre Fortsätze beobachtet, welche in das Zytosol der Wirtszelle ragen (Abb. 26, mittlere und untere Reihe Überlagerungsbilder). Zur Kontrolle der Spezifität der Rekrutierung von Btk-PH-eGFP wurde die PH-Domäne von PLCδ1 (PLCδ1-PH-eGFP) verwendet. Die PH-Domäne von PLCδ1 besitzt eine Bindungsaffinität für PstInst(4,5)-P₂ (PIP₂) und sollte demnach kaum rekrutiert werden. In der Tat bestätigte sich diese Vermutung, PLCδ1-PH wird nur kurz und schwach rekrutiert, was darauf hindeutet, dass PIP₂ nur transient gebildet oder für andere Reaktionen verbraucht wird (Daten nicht gezeigt). Es lässt sich vermuten, dass PI3K während der *C. trachomatis*-Infektion aktiviert wird, und hierdurch größere Mengen PIP₃ in der Membran des Pathogen-Endosoms bildet.

Um zu überprüfen, ob dieser Effekt nicht nur in einzelnen Zellen auftritt wurde eine Messung der Fluoreszenzintensität über mehrere Zellen durchgeführt und es bestätigte sich, dass das PIP₃ -Niveau nach etwa 15 Minuten stark ansteigt und für die Dauer des Experiments auf einem stark erhöhtem Level verbleibt (Abb. 27). Zur biochemischen Unterstützung dieser über Fluoreszenzmarkerdomänen gewonnenen Daten wurde ein kompetitiver PIP₃ – ELISA durchgeführt. Ergebnis dieses Versuchs war, dass die relative PIP₃ – Konzentration um ~27% in einem für 45 Minuten infiziertem Ansatz ansteigt (Abb. 28). Der unerwartete Befund, dass *C. trachomatis* eine PIP₃ – angereicherte frühe Inklusion bildet legt nahe, dass PLCγ in der Tat während der Invasion rekrutiert und aktiviert wird. Offensichtlich greift also *C. trachomatis* in den Phosphoinositolmetabolismus der Wirtszelle ein. Ein weiterer Aspekt wird nun ersichtlich, nämlich wie die PI3K aktiviert wird. PI3K wird durch die Bindung der tandem SH2 – Domänen der regulatorische Untereinheit p85 rekrutiert (Okkenhaug and Vanhaesebroeck, 2001). Da Tarp über eine große Zahl potentieller Bindungsstellen verfügt, lag es nahe die Interaktion mit diesem Effektorprotein zu untersuchen. Sowohl eine Immunpräzipitation als auch ein Kollokalisationsexperiment über Immunfluoreszenzfärbung

bestätigten die Interaktion zwischen Tarp und der PI3K (Abb. 29A und B). Das zunächst keine Interaktion zwischen Tarp und PI3K auf dem SH2 – Array detektierbar war (Abb. 17) könnte darauf hindeuten, dass beide SH2-Domänen für die Interaktion mit Tarp benötigt werden (diese waren auf dem Array getrennt).

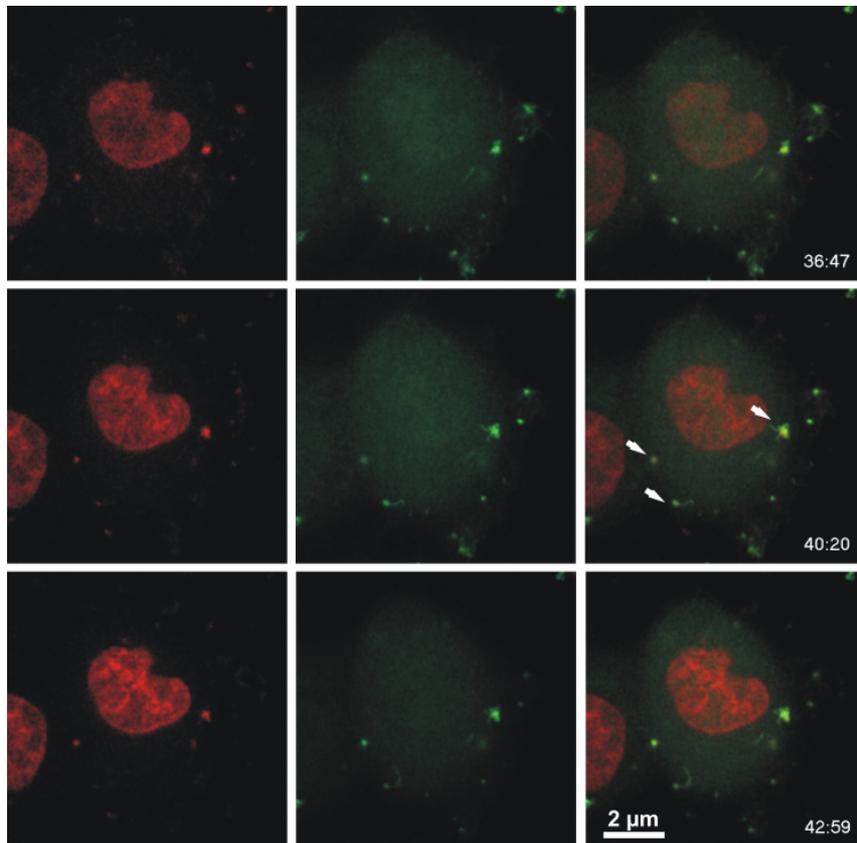


Abbildung 26: Konfokale Echtzeitfluoreszenzmikroskopie der Chlamydieninvasion. *C. trachomatis* Alexa568 (rot) invadiert Btk-PH-eGFP-transfizierte HeLa Zellen (grün). Hierbei akkumuliert sich Btk-PH um die EKs herum (weiße Pfeile). Häufig lassen sich, wenn sich die PIP₃-Konzentration erhöht tubuläre Fortsätze, die in das Zytoplasma hineinragen, erkennen.

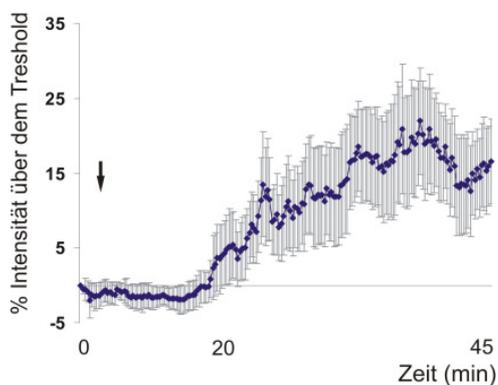


Abbildung 27: Messung der Intensität der chlamydialen Vakuolenbildung in Btk-PH-eGFP transfizierten Zellen (n=8). Der schwarze Pfeil markiert die Zugabe der Bakterien. Die Messung wurde mittels Metamorph-offline über gesamte Zellen durchgeführt und zeigt einen starken Anstieg der PIP₃-Konzentration nach ungefähr 20 Minuten. Fehlerbalken = SEM

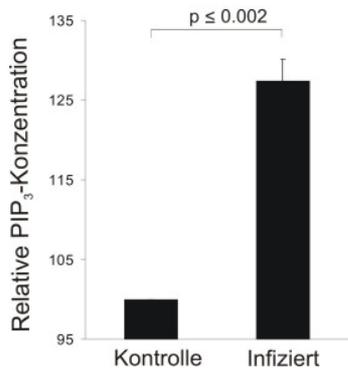


Abbildung 28: Kompetitiver PIP₃ – ELISA. Gesamtzelllipide wurden aus mit Zellysate „pseudo-infizierten“ HeLa Zellen (Kontrolle) oder *C. trachomatis* infizierten Zellen (Infiziert, MOI 400 für 45 Minuten) extrahiert und per kompetitivem ELISA auf ihre PIP₃ – Konzentration untersucht. Die relative PIP₃ – Konzentration steigt um 27 % ± 3 (p≤0.002, n=2) gegenüber der Kontrolle an. Fehlerbalken = SEM.

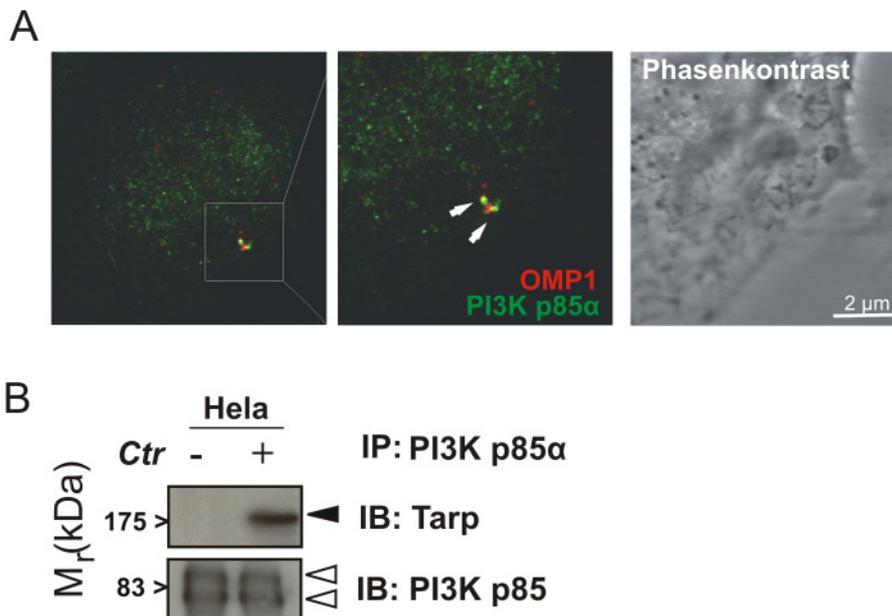


Abbildung 29: **A**, Konfokale Mikroskopie einer Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen. Die Zellen wurden für 45 Minuten mit *C. trachomatis* (rot) infiziert (MOI 20) und zusätzlich gegen PI3K α (grün) gefärbt. Es ist erkennbar, dass die PI3K zu den EK rekrutiert wird. **B**, Koimmunpräzipitation von Tarp (schwarze Pfeilspitze) mittels PI3K α - (weiße Pfeilspitze) Antikörper aus HeLa - Zellen. IB = Immunblot, IP = Immunpräzipitation.

Die Beobachtung tubulärer Fortsätze (Abb. 26) führte zu der Vermutung einer Interaktion mit dem endosomalen System. Diese Annahme bestätigte sich im weiteren Verlauf der Experimente nur teilweise: So ließ sich zwar keine Interaktion mit Rab11- und Lgp120- (Golgi/Recycling-Endosomen und Lysosomen) Vesikeln in transfizierten Zellen während der ersten 45 Minuten der Infektion zeigen (Abb. 30), jedoch konnte im selben Zeitrahmen eine Interaktion mit Rab5-eGFP Vesikeln (Frühe/“Sorting“ Endosomen) beobachtet werden (Abb.31) (Watson et al., 2005). Die Interaktion mit Rab5-positiven

Vesikeln erfolgt in einer transienten Art und Weise, hierbei wird die frühe Inklusion jedoch nicht dauerhaft Rab5-positiv.

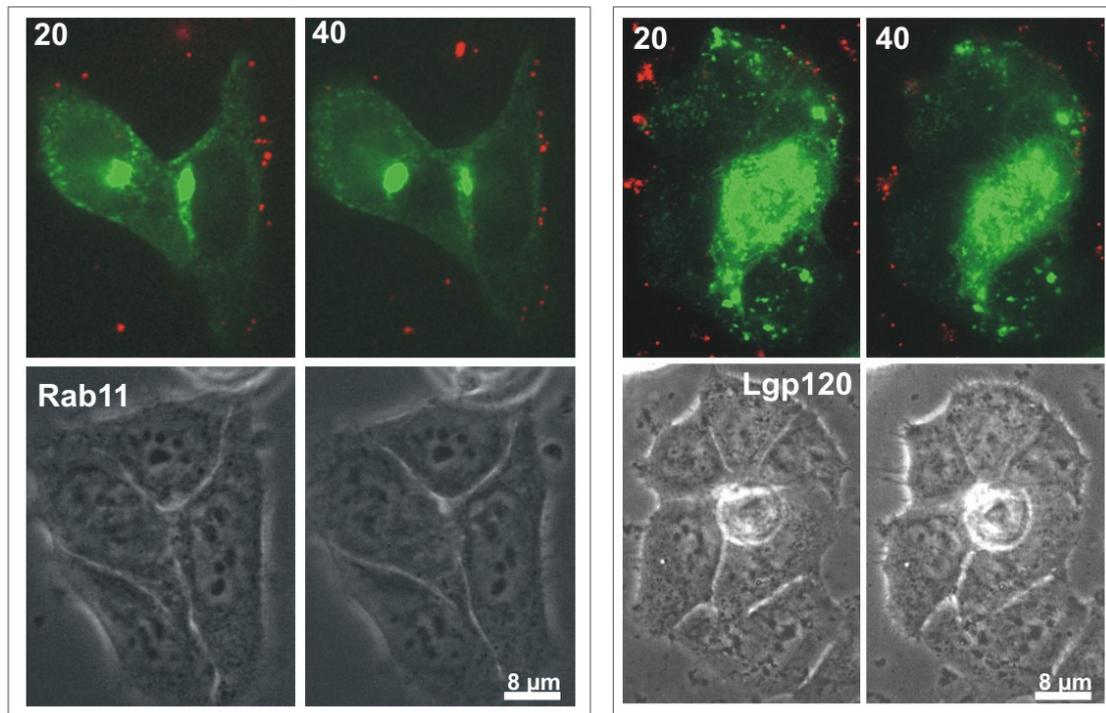


Abbildung 30: Einzelzeitpunkte aus einer Konfokalen Echtzeitfluoreszenzmikroskopie der Chlamydien - Invasion. *C. trachomatis* Alexa568 (rot) invadiert Rab11 - oder Lgp120 - transfizierte Zellen (grün). Die unteren Bilder zeigen den jeweiligen Phasenkontrast. Eine Assoziation von Chlamydien und markierten Vesikeln lässt sich nicht beobachten.

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt dargestellt werden, dass *C. trachomatis* seine frühe Inklusion in einer einzigartigen Art und Weise durch Rekrutierung der PI3K mit dem Membranlipid PstIns(3,4,5)-P₃ anreichert, und dass diese Vakuole vom endozytotischem System weitgehend getrennt ist. Alle Voraussetzung für eine Rekrutierung und Aktivierung von PLC γ sind somit gegeben. Da eine PIP₃-angereicherte endosomale Struktur für Chlamydien noch nicht beschrieben wurde, wird dieses im weiteren Verlauf als „PstIns(3,4,5)-P₃ enriched early inclusion“ (PEEI) bezeichnet. Die PEEI besitzt die in der Literatur für die frühe Inklusion beschriebenen Eigenschaften (s. 5.4), sprich Vermeidung der endosomalen Route und der Lysosomen. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist also die PEEI-Bildung ein kritischer Punkt in der Invasion und stellt vermutlich den Angriffspunkt der Edelfosine-vermittelten Inhibition der Inklusionsbildung dar (s. 7.2.2). Der Einfluss von PI3K und PLC γ für die Aufrechterhaltung der PEEI wurde daher im folgenden genauer untersucht.

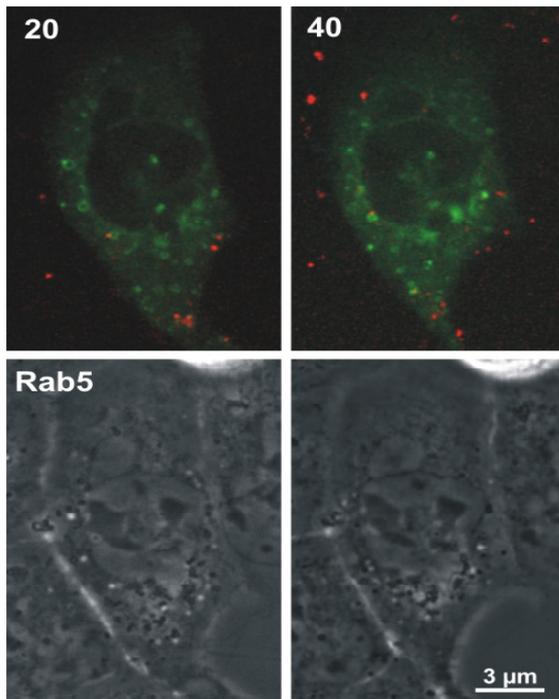


Abbildung 31: Einzelzeitpunkte aus einer Konfokale Echtzeit-fluoreszenzmikroskopie der Chlamydien-Invasion. *C. trachomatis* Alexa568 (rot) invadiert Rab5-transfizierte Zellen (grün). Es lässt sich eine transiente Interaktion mit Rab5-positiven Vesikeln beobachten (Kontakte zwischen EK und grünen Vesikeln). Es wurden exemplarisch zwei Zeitpunkte dargestellt (oben Links, in Minuten). Die untere Reihe zeigt den Phasenkontrast.

7.3.2 PI3K- und PLC γ -Abhängigkeit der PEEI-Bildung

Zur Überprüfung der Abhängigkeit der PEEI-Bildung von Wirtszellenzymen wurde die unter Abschnitt 7.3.1 beschriebene Messung der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von von PI3K- und PLC γ -Inhibitoren wiederholt. Tatsächlich bestätigte sich, dass die Bildung der PEEI mittels Wortmannin, einem PI3K-Inhibitor, nahezu vollständig verhindert werden kann (Abb. 32). Führt man dieses Experiment mit Edelfosine durch, so ergibt sich ein anderes Bild: Nach etwa 20 Minuten kommt es zu einem starken Anstieg des Btk-PH-Signals, dass im Gegensatz zum Kontrollexperiment jedoch nicht aufrechterhalten werden kann und nach weiteren 20 Minuten beinahe bis auf das Grundniveau absinkt (Abb. 33). Vergleicht man die getesteten Konditionen (PI3K- und PLC γ – Inhibition) direkt miteinander (Abb. 34), so kann man erkennen, dass es unmittelbar nach oder während der Invasion zu einer PI3K-Aktivierung kommen muss, da nur so die PIP₃ – Bildung erklärbar ist. Im Gegensatz hierzu scheint die Rolle von PLC γ „downstream“ von der PI3K zu liegen, da die Inhibition erst nach 40 Minuten zu einem Absinken der Fluoreszenzintensität führt. Es lässt sich vermuten, dass PLC γ in einer noch unbekanntem Art und Weise die Aufrechterhaltung der Struktur reguliert.

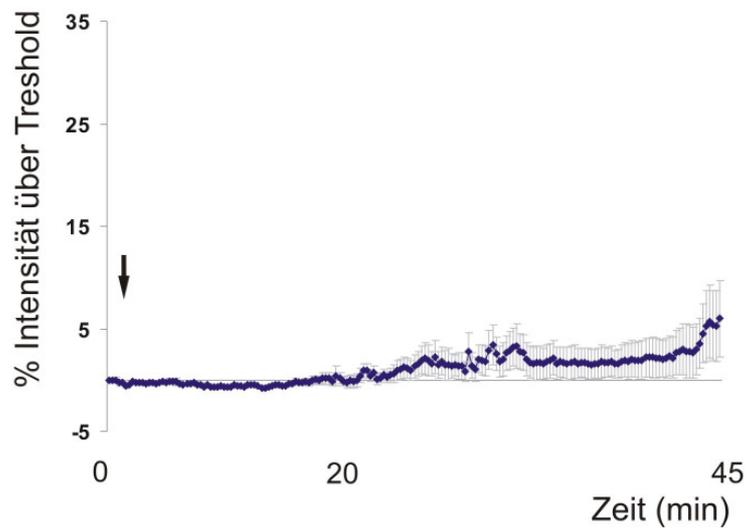
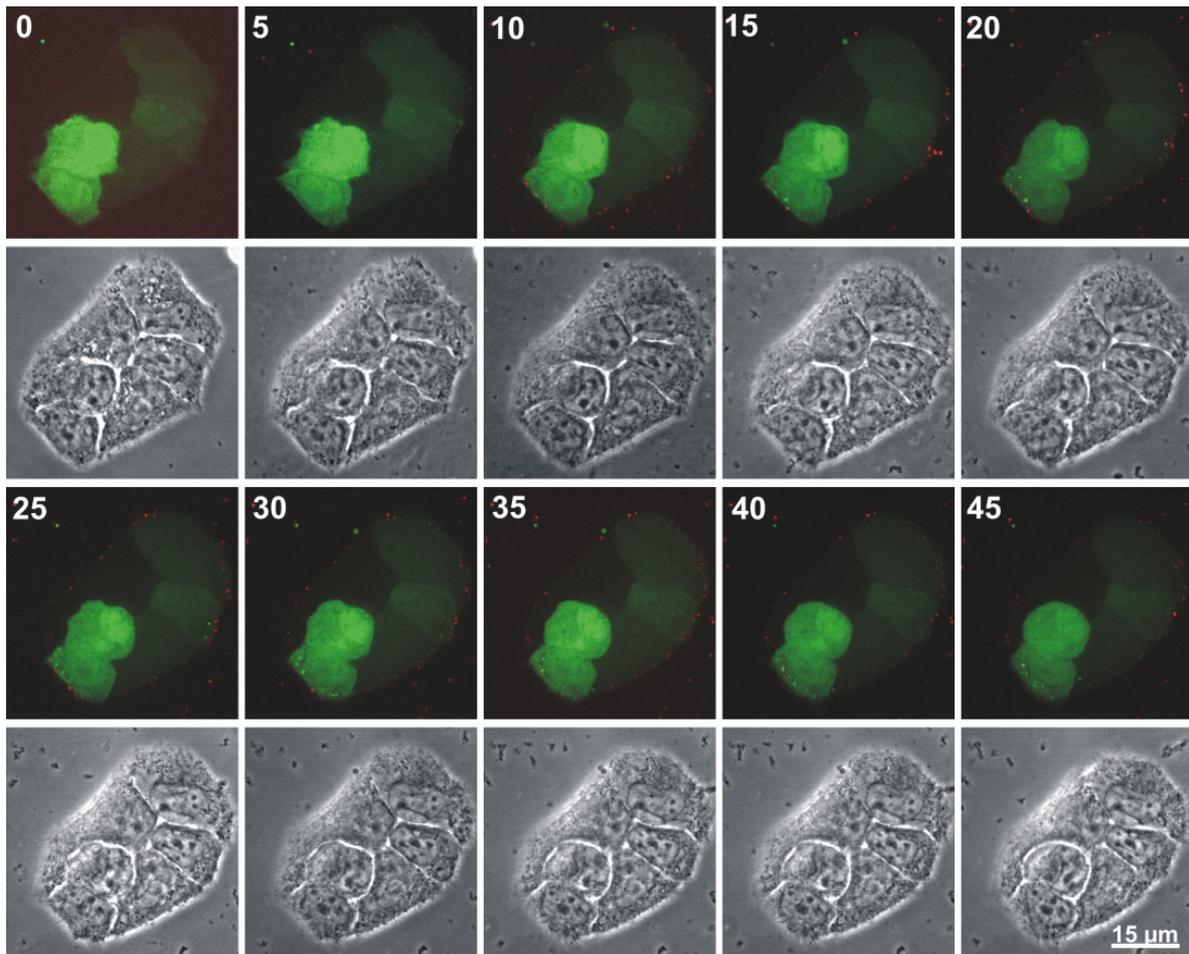


Abbildung 32: Oben - Echtzeitfluoreszenzanalyse der PI3K-Inhibition mittels 100 nM Wortmannin. HeLa-Zellen wurden mit Btk-PH-eGFP transfiziert (grün) und mit *C. trachomatis* infiziert (rot). Die „PEEI“ lässt sich nur stark abgeschwächt beobachten. Unten - Betrachtet man die relative Fluoreszenzintensität über mehrere Zellen (n=12), kann man erkennen, dass diese kaum ansteigt. Fehlerbalken = Standardfehler

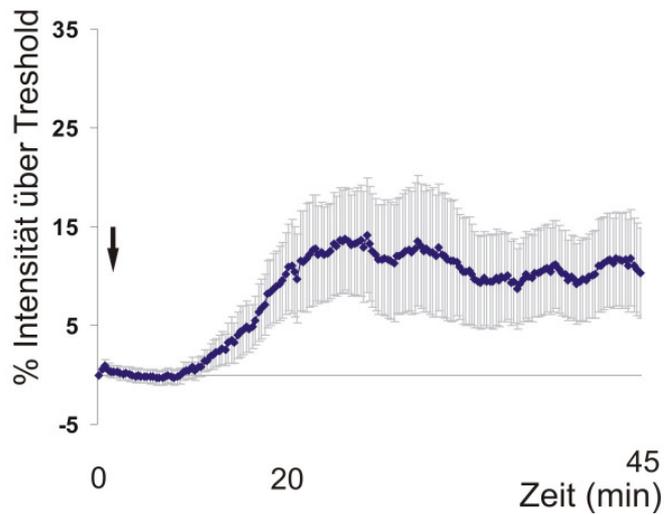
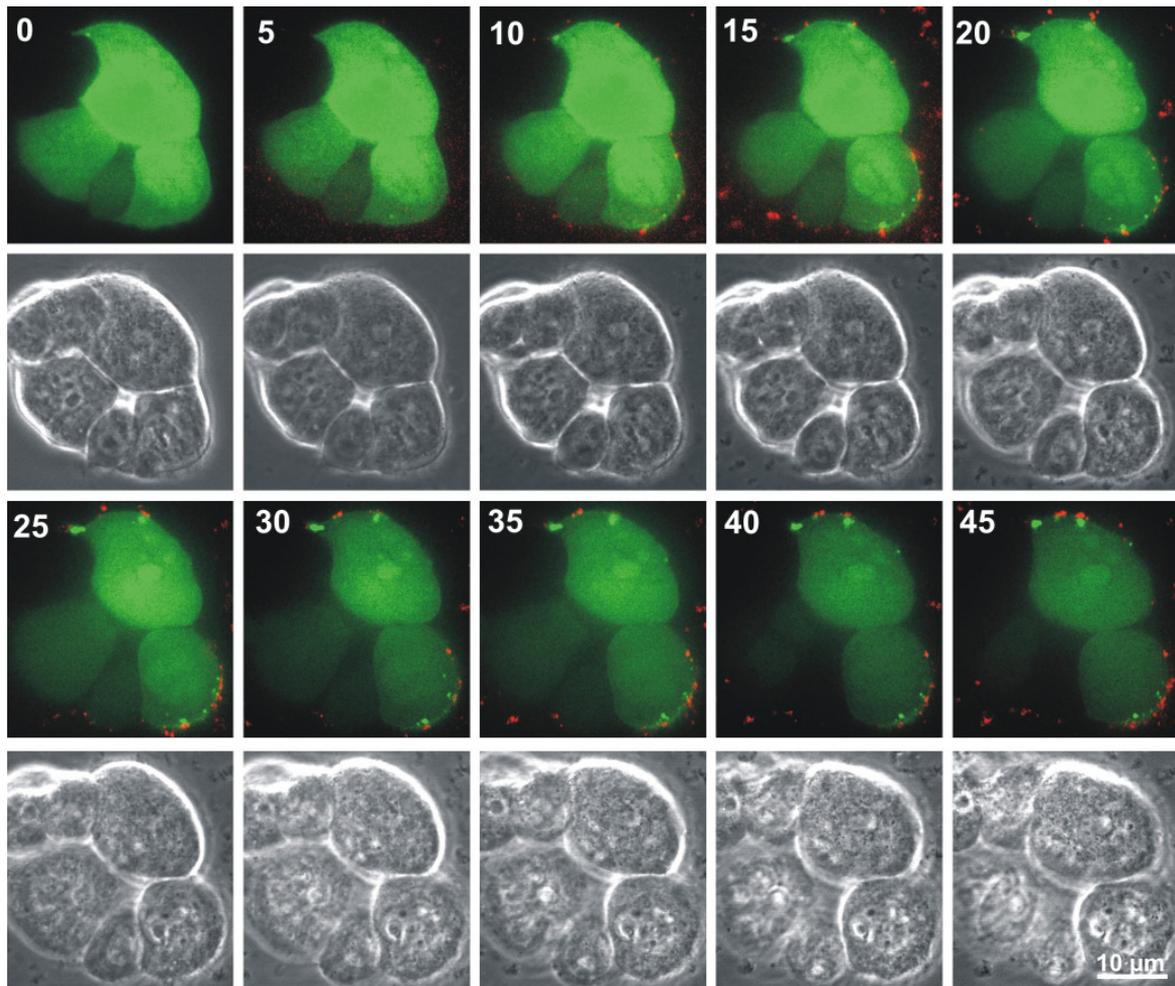


Abbildung 33: Oben: Echtzeitfluoreszenzanalyse der PLC γ -Inhibition mittels 7,5 μ M Edelfosine. HeLa-Zellen wurden mit Btk-PH-eGFP transfiziert (grün) und mit *C. trachomatis* infiziert (rot). Die „PEEI“ bildet sich zwar, kann jedoch nicht wie in dem Kontrollexperiment (Abb. 22) aufrechterhalten werden. Unten: betrachtet man die Fluoreszenzintensität über mehrere Zellen (n=16) kann man erkennen, dass diese sich nach einem initialen Anstieg langsam wieder dem Grundniveau annähert. Fehlerbalken = Standardfehler

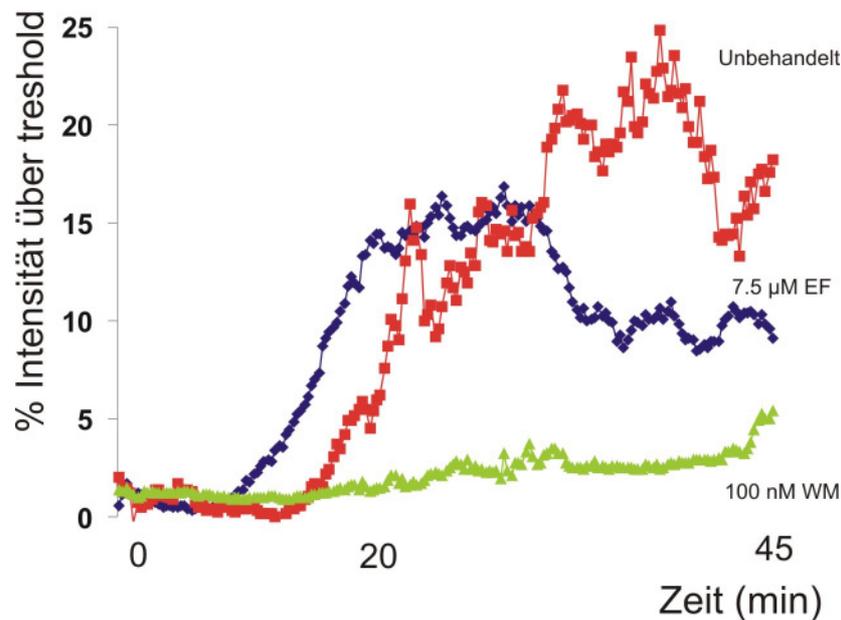


Abbildung 34: Vergleich der Intensitätsmessungen der chlamydialen Vakuolenbildung in Btk-PH-eGFP-transfizierten Zellen, ohne Inhibition (rot), nach Inhibition mit 7,5 μ M Edelfosine (blau) oder nach Inhibition mit 100 nM Wortmannin (grün). Die Einzelmessungen sind den Abbildungen 27, 32-33 entnommen und zum besseren Vergleich kombiniert worden.

7.3.3 Ultrastrukturelle Charakterisierung der PEEI

Um die PEEI auf strukturellem Level zu charakterisieren, wurde zunächst eine 3D-Rekonstruktion nach einer konfokalen Echtzeitmikroskopie durchgeführt. Wie man erkennen kann, befinden sich Alexa568- markierte Bakterien innerhalb einer BTK-PH-eGFP positiven Struktur (Abb. 35, weiße Pfeile). Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass die Bakterien nicht überall in die Zelle eindringen, sondern bestimmte Regionen bevorzugen (Abb. 26). Treffen mehrere Bakterien während der Invasion auf eine Region, so können sie die bis zu 2-3 μ m PEEI Strukturen bilden (Abb. 35). Die Bildung dieser Strukturen ist höchstwahrscheinlich das Ergebnis einer frühen Inklusionsfusion. In der 3D-Rekonstruktion kann man ebenfalls die tubulären Fortsätze erkennen, die auch in Filmen mit weniger „z-Ebenen“ zu erkennen waren (Abb. 26, 35). Eine Echtzeitmikroskopie in einem höheren Geschwindigkeitsbereich (Sekunden- und Millisekundenbereich) offenbarte keine weiteren Details, sondern zeigte, dass die PEEI im Minutenbereich stabil ist (Daten nicht gezeigt).

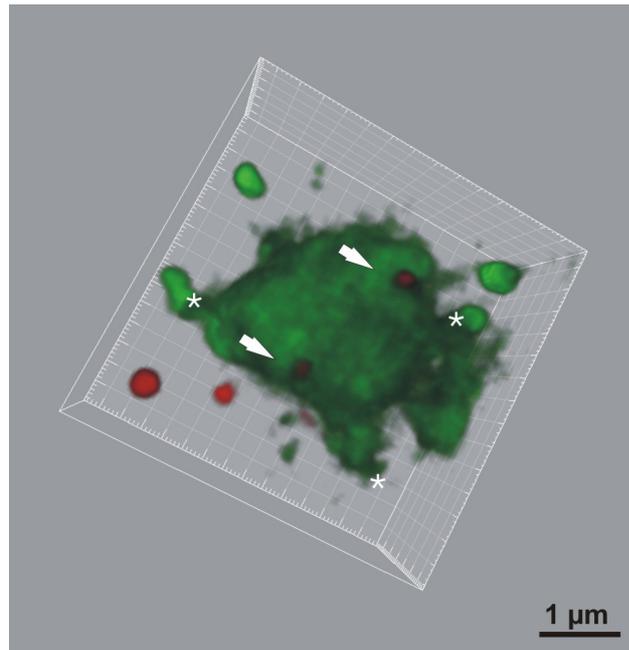


Abbildung 35: 3D-Rekonstruktion einer PEEI-Struktur (grün), die mehrere *C. trachomatis*-Elementarkörperchen (rot) enthält. Die Elementarkörperchen befinden sich in dichtem Kontakt mit der Membran (Pfeile). Das Endosom scheint nicht eng anzuliegen. Es ist möglich tubuläre Fortsätze zu erkennen, die von der PEEI in das Zytoplasma ragen (Sterne).

Um rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchzuführen, wurden zunächst Zellmembranlipide extrahiert. Diese Extraktion sollte einen Blick in das Innere der Zelle erlauben, um die Chlamydieninvasion zu verfolgen, ohne durch Ultradünnschnitte verursachte Strukturveränderungen hervorzurufen. Interessanterweise wurde die PEEI hierbei nicht vollständig zerstört und in der Zelle erkennbare Strukturen stimmten sehr gut mit der 3D-Rekonstruktion aus der Echtzeitmikroskopie überein (Abb. 36A). Betrachtet man die PEEI genauer, erkennt man, dass diese Strukturen von einem Protein- und/oder Zytoskelettmantel umgeben sind. Die Markierung von extrahierten Proben (die Zellen waren hier mit Btk-PH-eGFP transfiziert) mit anti-eGFP-Antikörpern und 15 nm - goldmarkierten Sekundärantikörpern zeigte, dass die Oberfläche der beobachteten Struktur wie erwartet eGFP-positiv ist (Abb. 36B). Um das Innere der PEEI zu untersuchen, wurden Ultradünnschnitte mit Omp1 und eGFP-Antikörper markiert (Abb. 36C). Wie man erkennen kann, befinden sich die Bakterien (6 nm Goldpartikel – Omp1) tatsächlich im Inneren großer Endosomen/Vakuolenstrukturen (12 nm Goldpartikel – eGFP).

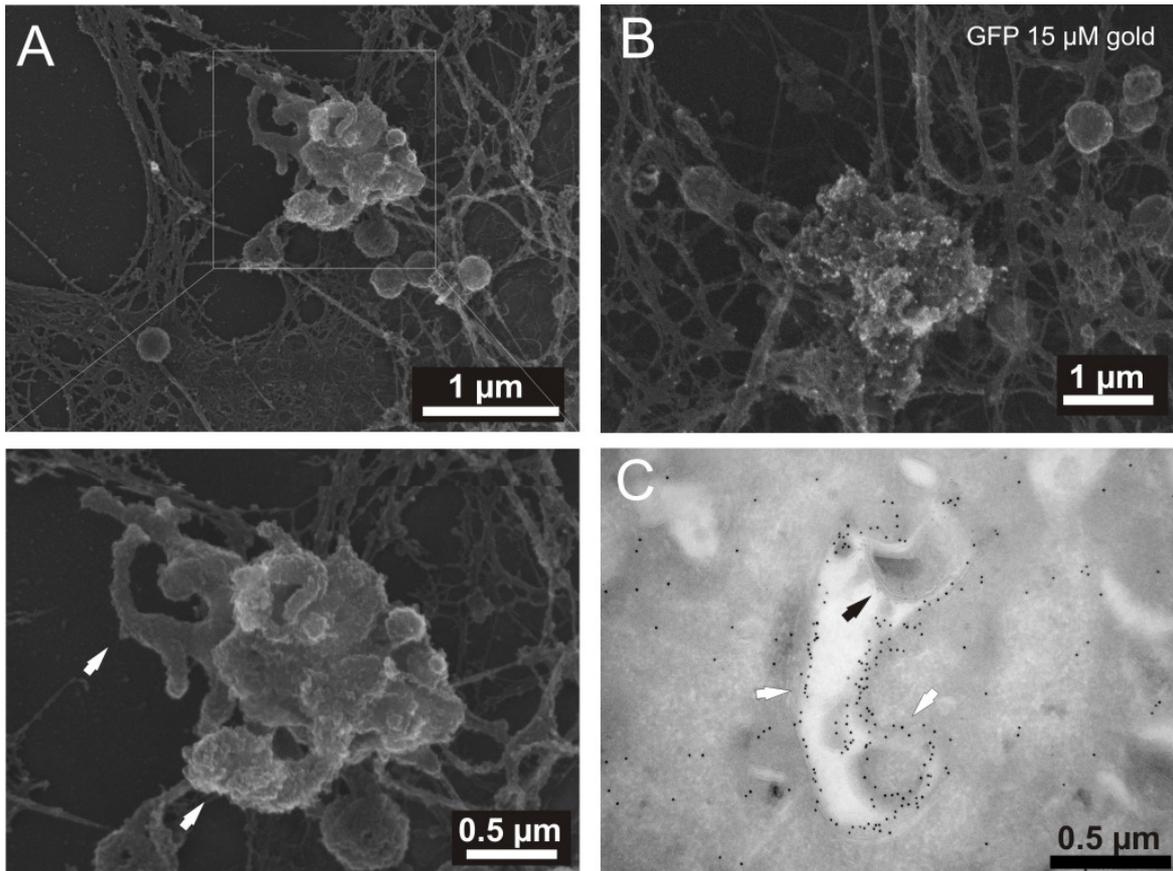


Abbildung 36: Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie von HeLa Zellen nach Infektion mit *C. trachomatis* MOI 40 und 45 Minuten Infektion. **A**, PEEI in untransfizierten Zellen nach einer kurzen Lipidextraktion. Die konservierten Strukturen ähneln den in der Echtzeitmikroskopie beobachteten Strukturen. Tubulare Fortsätze ragen in das Zytoplasma (unten rechts, Pfeile). Mehrere Elementarkörperchen sind in unmittelbarer Nähe der PEEI zu erkennen und befanden sich scheinbar gerade im Prozess der Fusion. **B**, PEEI in Btk-PH-eGFP-transfizierten Zellen nach Lipidextraktion und Markierung mit anti-eGFP-Antikörpern. Die weißen Punkte stellen 15 nm Goldpartikel dar. Wie man erkennen kann sind die im Rasterelektronenmikroskop beobachteten Strukturen Btk-PH-eGFP positiv. **C**, Transmissions-Elektronenmikroskopie der PEEI nach Anfertigung von Ultradünnschnitten und Goldmarkierung: *C. trachomatis* Omp1 (6 nm Gold, schwarzer Pfeil) und eGFP (12 nm-Goldpartikeln, weiße Pfeile). *C. trachomatis* ist von einer hohlen Endosomal/Vakuolen-Struktur umgeben, welche eGFP-positiv ist und tubulare Fortsätze aufweist. Die Elektronenmikroskopie wurde von der Core Facility Microscopy des MPIIB durchgeführt.

Auch die zuvor beobachteten tubulären Fortsätze sind hier zu erkennen und bestätigen somit die zuvor gemachten Beobachtungen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die PEEI eine vom Pathogen induzierte endosomale Struktur ist, in der EKs sich in einer membranassoziierten Position befinden. Die Struktur weist tubuläre, in das Zytoplasma reichende Fortsätze auf und ist Btk-PH-eGFP-positiv.

8. Diskussion

8.1 Die Rolle der Tarp-Phosphorylierung für die Infektion

Effektorproteine und Modulation der *C. trachomatis* Invasion sind bis heute - hauptsächlich durch das Fehlen eines genetischen Systems - kaum untersucht (Heuer et al., 2007). Tarp ist gegenwärtig der einzige Faktor, für den bekannt ist, dass er während der Invasion sekretiert wird (Clifton et al., 2004). Das Protein vermittelt die Aktinnukleation über eine Interaktion zwischen noch nicht genauer eingegrenzten Motiven im C-Terminus und Aktin (Jewett TJ et al., 2006a). Interessanterweise enthält der N-Terminus mehrere Tyrosinphosphorylierungsstellen, von denen bisher nur bekannt ist, dass sie für die C-Terminus vermittelte Aktinnukleation keine Rolle spielen (Clifton et al., 2005). Im ersten Teil dieser Arbeit konnten initiale *in silico* Analysen bestätigt werden: (i) SFK wurden als Kinasen für Tarp identifiziert und (ii) ENIYE – Motive wurden als Phosphorylierungsstellen eingegrenzt. Die Phosphorylierung von Tarp ist für den Infektions- bzw. Invasionsprozess wichtig, allerdings führte die SFK – Inhibition nicht zu einer vollständigen Blockierung der Invasion, was auf eine Redundanz der genutzten Kinasen oder der Invasionsmechanismen hindeutet.

Die Tyrosinphosphorylierung translozierter bakterieller Effektorproteine hat sich als ein von verschiedenen Pathogenen genutzter Mechanismus zur Manipulation der Wirtszelle herausgestellt (Backert and Selbach, 2005; Covacci and Rappuoli, 2000). Die Phosphorylierung bakterieller Effektorproteine an Tyrosinresten ist hierbei von entscheidender Bedeutung, da erst sie die Interaktion mit zellulären SH2-Domänen ermöglicht. Tatsächlich zeigte sich, dass Punktmutationen an den Stellen, an denen Effektorproteine wie das EPEC-Protein Tir oder das *H. pylori*-Protein CagA normalerweise tyrosinphosphoryliert werden, zu einer kompletten Blockierung der Funktion führen (Backert et al., 2001; Kenny, 1999; Gruenheid et al., 2001; Higashi et al., 2002a). Die Identifizierung der Phosphorylierungsstellen bakterieller Effektorproteine und deren zellulärer Kinasen gibt wesentliche Einblicke in die Funktion dieser Faktoren, da die Phosphorylierung eine Manipulation der Wirtszelle ermöglicht.

Kinasen der Src-Familie (SFK) wurden zunächst als Kinasen des *H. pylori*-Proteins CagA identifiziert und sind außerdem in der Lage, das EPEC-Protein Tir zu phosphorylieren

(Phillips et al., 2004; Selbach et al., 2003; Stein et al., 2002). Obwohl sich bereits seit einiger Zeit ein Modell redundanter Kinasen abzeichnet, etabliert sich erst seit kürzerem die Erkenntnis, dass auch zeitliche Faktoren eine entscheidende Rolle bei der Effektorphosphorylierung spielen. So ist für z.B. für Tir eine Redundanz der Kinasen beobachtet worden (Swimm et al., 2004), während CagA initial durch SFK und später durch Kinasen der Abl Familie phosphoryliert werden kann (Pope et al., 2007). Tarp ist somit das dritte bakterielle Effektorprotein, für das eine Phosphorylierung durch Kinasen der Src-Familie gezeigt werden konnte. Aber auch hier deutet sich an, dass noch weitere Kinasen involviert sind. So lässt sich in einem Phosphorylierungszeitverlauf zeigen, dass es im Gegensatz zur ursprünglichen Annahme auch in SYF Zellen zu einer Tarp-Phosphorylierung kommt. Diese Phosphorylierung weist jedoch eine deutlichen Zeitverzögerung auf, was auf eine Phosphorylierung durch andere Kinasen hindeutet (Daten nicht gezeigt). Somit ähnelt die Situation für Tarp der *H. pylori* CagA-Phosphorylierung und es scheint als ob SFK eine Rolle in der frühen oder schnellen Phosphorylierung der betrachteten Effektoren einnehmen. Ein erst kürzlich entdeckter Effektor, BepD aus *Bartonella henselae*, stellt vermutlich das vierte bakterielle SFK-„Substrat“ dar und es wird spannend zu beobachten ob hier ähnliche Effekte beschrieben werden (Schulein et al., 2005).

Eine zeitverzögerte Tarp-Phosphorylierung durch multiple Kinasen würde auch die Beobachtung erklären, warum die *C. trachomatis*-Invasion durch SFK-Inhibition nicht vollständig blockiert wird (Abb. 16) und warum es auch in SYF-Zellen noch zur Inklusionsbildung kommen kann (Abb. 15). Interessanterweise zeigt ein Vergleich mit *C. pneumoniae*, dass dieser Organismus nur schwach durch die SFK-Inhibition beeinflusst wird (Abb. 16), was sehr gut mit dem Fehlen der Phosphorylierungsstellen in *C. pneumoniae* korreliert (Abb. 7). Dies würde bedeuten, dass die Tarp-Phosphorylierung für die initiale Invasion nicht unbedingt notwendig ist, sondern einen anderen Effekt ausübt, der auch durch eine spätere Phosphorylierung noch induziert werden kann.

Vergleicht man CT456 (Tarp) und Cpn0572 so bleibt offen, ob die N-terminalen Wiederholungseinheiten von *C. trachomatis* hinzugewonnen oder ob diese genetischen Elemente von *C. pneumoniae* verloren wurden (Abb. 7). Interessant ist jedoch, dass die Anzahl der N-terminalen Wiederholungseinheiten auch innerhalb der Spezies *C. trachomatis* nach Serovariante variiert, so besitzt die LGV-Serovariante 6 Wiederholungseinheiten, während Urogenital- und Trachoma-Serovarianten jeweils nur 3 solche

Wiederholungseinheiten aufweisen (Carlson et al., 2005). Da die LGV-Servovarianten besonders invasiv sind und sich auch sehr gut in den Lymphknoten vermehren, ist eine spezifische Rolle dieser Elemente während der Infektion von Immunzellen oder immunzellreichen Geweben unwahrscheinlich. Im Rahmen dieser Arbeit war es leider nicht mehr möglich eine Untersuchung an Immunzellen durchzuführen, es könnte sich jedoch als interessant erweisen den Effekt der Tarp-Phosphorylierung in verschiedenen Wirtszelltypen zu untersuchen.

8.2 Identifizierung von Tarp-Interaktionspartnern

Um die molekulare Funktion von Tarp zu verstehen ist die Identifizierung zellulärer Interaktionspartnern der logische nächste Schritt. Initial konnte gezeigt werden, dass Tarp die Aktin-Polymerisation induziert, womit es in seiner Wirkung an das EPEC-Effektorprotein Tir erinnert und einen ähnlichen Wirkmechanismus impliziert (Clifton et al., 2004). Während Tir jedoch die Aktin-Polymerisation durch die tyrosinabhängige Rekrutierung des Adaptorproteins Nck stimuliert (Gruenheid et al., 2001), ist dieser Prozess bei Tarp nicht von der Phosphorylierung abhängig (Clifton et al., 2005). Unter Nutzung eines SH2-Domänenarrays konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass phosphoryliertes Tarp mit den verschiedenen zellulären SH2-Domänen interagiert (Abb. 17). Ein manueller Sequenzabgleich der Tarp-Phosphorylierungsmotive mit den Bindungssequenzen der potentiellen Interaktionspartner weist auf eine hohe Homologie hin. Wie wird die Spezifität dieser Interaktionen gesteuert?

Eine Analyse des SH2-Arrays zeigte, dass Tarp nicht mit SH2-Domänen der Grb2 – artigen Gruppe interagiert. Die SH2-Domänen von PLC γ 2 und SHP-2 gehören zur Gruppe der PLC γ 1-artigen SH2-Domänen, während die SH2-Domänen von LCK und SHC zu den Src-artigen SH2-Domänen zählen (Roque and Lowe, 2005). Domänen vom PLC γ 1 – Typ besitzen eine lange hydrophobe Spalte um aliphatische Aminosäurereste in der +1 und +5 Position zu binden (Ala, Val, Ile, Leu). SH2 – Domänen vom Src – Typ binden negativ geladene Reste in der +1 und +2 Position (Asp, Glu) und nutzen eine hydrophobe Tasche um aliphatische Reste in der +3 Position zu binden (Yaffe, 2002). Grb2 – artige SH2 – Domänen besitzen dagegen einen sperrigen Tryptophanrest, der die +3 Position des Phosphopeptids blockiert, falls dieses nicht eine β -Drehung durchführt. Dies ist nur möglich falls in der +2

Position ein Asparaginrest vorliegt, der durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem Lysinrest in der SH2 – Domäne die β -Drehung stabilisiert (Yaffe, 2002). Interessanterweise bindet PLC γ besonders stark an GST-Tarp, was der Aminosäuresequenz eigentlich widerspricht (Asparaginsäure in Position +1 und Glutaminsäure in Position +5). Zwei mögliche Erklärungen liegen nahe: (i) bei der *in vitro* Phosphorylierung mit HeLa-Lysat hat ein weiterer Faktor an Tarp gebunden, der die Interaktion mit PLC γ vermittelt oder (ii) die Analyse der PLC γ -artigen SH2-Domänen ist fehlerhaft oder unvollständig. Die Bindung von Src-artigen SH2-Domänen erscheint hingegen logisch, da die entsprechenden Positionen den ermittelten Optima entsprechen, allerdings ließen sich für SHC diese Interaktionen *in vivo* nicht morphologisch bestätigen, was jedoch an einer unzureichenden Markierung durch den Antikörper liegen könnte. Theoretisch sollten auch Grb2-artige SH2-Domänen in der Lage sein mit Tarp zu interagieren, da zumindestens in den YY-Wiederholungseinheiten die Voraussetzungen für eine Interaktion gegeben sind (Asparaginrest in der +2 Position von Motiv A, s.a. Abb. 7). Vermutlich spiegelt die Interaktion *in vitro*, auf dem SH2-Array jedoch nur einen kleinen Teil der Komplexität der *in vivo* möglichen Interaktionen wieder. *In vivo* müssen auch räumliche und zeitliche Faktoren berücksichtigt werden, wie z.B. die Tarp-Konzentration an der Invasionsstelle und die subzelluläre Lokalisation der Interaktionspartner. Vorstellbar ist auch, dass verschiedene Faktoren nacheinander mit den Phosphomotiven interagieren, abhängig von der Anwesenheit anderer Faktoren.

Während die Geschwindigkeit ein großer Vorteil der SH2-Arraytechnologie bei der Identifizierung von Interaktionspartnern ist, liegt der Hauptnachteil der Technologie darin, dass die SH2-Domänen außerhalb ihres normalen zellulären Kontextes betrachtet werden. Dieser Nachteil ist vermutlich auch die Erklärung dafür, warum einige Interaktionspartner nicht detektiert wurden. Als Beispiel sei an dieser Stelle auf die Interaktion zwischen Tarp und der PI3K verwiesen, die wir hier nur mittels Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz nachweisen konnten. Vermutlich wurde die Interaktion mit PI3K mit dem SH2-Array übersehen, da für eine ausreichende Interaktion beide SH2-Domänen benötigt werden (Falasca et al., 1998) und diese auf dem verwendeten Array voneinander getrennt waren.

Von den vier potentiellen über den SH2-Array identifizierten Interaktionspartnern konnte nur PLC γ biochemisch und morphologisch als Interaktionspartner von Tarp identifiziert werden. Für Shc gelang zwar eine Koimmunopräzipitation, jedoch konnte diese im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht mehr über Immunfluoreszenz bestätigt werden

(fehlende Immunreaktivität von zwei Shc Antikörpern in der Immunfluoreszenz). PLC γ ist ein Schlüsselenzym des Phospholipidmetabolismus, welches durch eine ganze Reihe von extrazellulären Stimuli reguliert wird (Cockcroft and Thomas, 1992). Die PLC γ -Signaltransduktion induziert eine Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺ und die Aktivierung von PKC über die Umwandlung von PI(4,5)-P₂ in IP₃ und DAG (Patterson et al., 2005). Die PLC γ - Aktivierung wirkt auf die Zelle mitogen und reguliert die Membrankrümmung, zytoskelettale Organisation (Seedorf et al., 1994; Goni and Alonso, 1999) und Phagozytose, letztere durch PI(4,5)-P₂-Degradation (Yeung et al., 2006). Das Enzym existiert in zwei Isoformen, PLC γ 1 und PLC γ 2. Während PLC γ 1 als ubiquitär exprimiert betrachtet wird, nimmt man an, dass PLC γ 2 hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, in welchen PLC γ 2 an der T- und B-Zellsignaltransduktion beteiligt ist (Wilde and Watson, 2001). Hier konnte gezeigt werden, dass PLC γ 2 nicht nur in hämatopoetischen Zellen, sondern auch in Epithelzellen und Fibroblasten exprimiert wird. Es ist zur Zeit unklar, ob dies ein Ergebnis der Immortalisierung der Zellen ist, oder ob es sich um eine physiologische Situation handelt (Abb. 19).

Die Rolle, die PLC γ bei verschiedenen Infektionen spielt, wurde bis jetzt kaum untersucht. Ein erster Befund war die Interaktion von PLC γ 1 mit dem *Listeria monocytogenes* Protein InlB, die funktionelle Bedeutung dieser Wechselwirkung für den Invasionsprozess oder die *Listeria*-Infektion im Allgemeinen konnte jedoch nicht geklärt werden (Bierne et al., 2000). PLC γ 1 wird ebenfalls während der *E. coli* K-1 Invasion von Endothelzellen der Mikrovaskulatur zur Adhäsionsstelle rekrutiert und aktiviert. Eine PLC γ -Inhibition führte in diesem Fall zu einer Blockierung der *E. coli* Invasion (Sukumaran et al., 2003). Für *C. trachomatis* konnten hier ebenfalls eine Rekrutierung zur Invasionsstelle beobachtet werden. Interessanterweise führt die Inhibition von PLC γ bei der Chlamydieninfektion nicht zu einer Blockierung der Invasion, sondern zur lysosmalen Degradation der Bakterien und verhindert somit die Bildung einer Inklusion (Abb. 24-25, 37).

PLC γ scheint also den Transport der Bakterien in der Zelle zu regulieren. Mindestens genauso wichtig ist jedoch die Interaktion zwischen Tarp und der PI3K, die den „Initialzündler“ für die massive Modifikation der Inklusion darstellt. Verbindet man die Ergebnisse der Phosphorylierungsstudie mit der Untersuchung der Interaktionspartner so ergibt sich bereits ein relativ vollständiges Bild der Invasion: (i) Die Bakterien dringen in einer Tarp-Phosphorylierungsunabhängigen Weise in die Wirtszelle ein, dort „verharren“ sie

eine bestimmte Zeit ohne degradiert zu werden, bis der nächste Schritt ihrer Invasion einsetzt, (ii) Tarp wird phosphoryliert, dies kann sehr schnell geschehen, falls SFKs vorhanden sind und (iii) Interaktionspartner werden rekrutiert (PI3K und PLC γ) die den weiteren Transport der Bakterien regulieren (Abb. 37). Die Tatsache, dass *C. pneumoniae* diesen Mechanismus nicht über Tarp auslöst deutet entweder auf einen redundanten Mechanismus oder weitere involvierte Faktoren, die die beschriebenen Funktionen übernehmen können, hin. Interessant ist, dass weder die SFK- noch die PLC γ -Inhibition einen starken Einfluss auf *C. pneumoniae* ausübt. Es zeigt sich also, dass es bei der Invasion der beiden Pathogene *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* einen deutlichen Speziesunterschied gibt.

8.3 PLC γ und die Bildung einer „PIP₃ – enriched early inclusion“

Wieso stört die Inhibition von PLC γ den Transport der Chlamydien? Um die Frage zu beantworten musste zunächst ein System etabliert werden, mit dem Invasion und Transport von *C. trachomatis* beobachtet werden können. Bei der Entwicklung dieses Systems wurde nach fluoreszenten Markerproteinen gesucht, die es ermöglichen sollten, den Lipidmetabolismus während der Invasion zu beobachten. Bei der Testung verschiedener Markerproteine für ein echtzeitmikroskopisches System, fiel das Augenmerk auf die PH-Domäne von BTK, gekoppelt an eGFP stellt sie ein Markerprotein für PIP₃ dar. Interessant für die hier durchgeführte Untersuchung war, dass diese BTK-PH-Domäne die gleiche Spezifität wie die PLC γ -PH Domäne besitzt (DiNitto et al., 2003). Überraschenderweise zeigte sich, dass die frühe chlamydiale Inklusion mit BTK-PH-eGFP, bzw. PI(3,4,5)-P₃ angereichert ist (Abb. 26 und 39). Dieser Befund ist ungewöhnlich, da man angenommen hat, dass die PIP₃-Bildung transient ist und nur bei bestimmten membranassoziierten Ereignissen -wie der Phagozytose- stattfindet (Yeung et al., 2006).

Da die PIP₃-Rekrutierung kurz nach der Adhäsion der Bakterien an die Wirtszelle beginnt, lässt sich annehmen, dass es sich hier um einen von *C. trachomatis* ausgelösten Prozess handelt. Die Modifikation der Phospholipid-Zusammensetzung durch verschiedene Pathogene stellt eine Möglichkeit zur Vermeidung der Degradation in den Lysosomen dar. Eine starke PIP₃-Bildung, wie sie hier beobachtet wurde, steht jedoch in direktem Kontrast zu Beobachtungen, die bei anderen Pathogenen gemacht wurden. So wurde z.B. gezeigt, dass *Salmonella* eine hohe PtdIns(3)-P durch die Wirkung der bakteriellen Phosphatidyl-inositol

Phosphatase SopB aufrechterhält (Degradation von Phosphatidylinositolen mit mehreren Phosphatresten). Für *Salmonella*-Mutanten mit einer Deletion des SopB-Gens wurde eine Degradation des Pathogens in den Lysosomen gezeigt (Hernandez et al., 2004). Eine andere Strategie zur Vermeidung der intrazellulären Degradation wird von *Mycobacteria* verfolgt: Mykobakterien verhindert die Bildung von PtdIns(3)-P durch ihre Phosphatasen und damit die Fusion mit den Lysosomen (Deretic et al., 2006). Bei der Aufrechterhaltung hoher PIP₃-Konzentrationen während der *C. trachomatis*-Invasion handelt es sich also vermutlich um einen bisher unbekanntenen Mechanismus zur Vermeidung der Degradation. Die hohe PIP₃-Konzentration könnte auch die Fusion mit exozytotischen, sphingomyelin-reichen Vesikeln während der Invasion erklären (Heinzen et al., 1996), da die langanhaltende PIP₃-Bildung für die Wirtszelle wie ein Prozess aktiver Endozytose erscheint, so dass die Zelle weitere Membranen zur Verfügung stellen muss (Abb. 37).

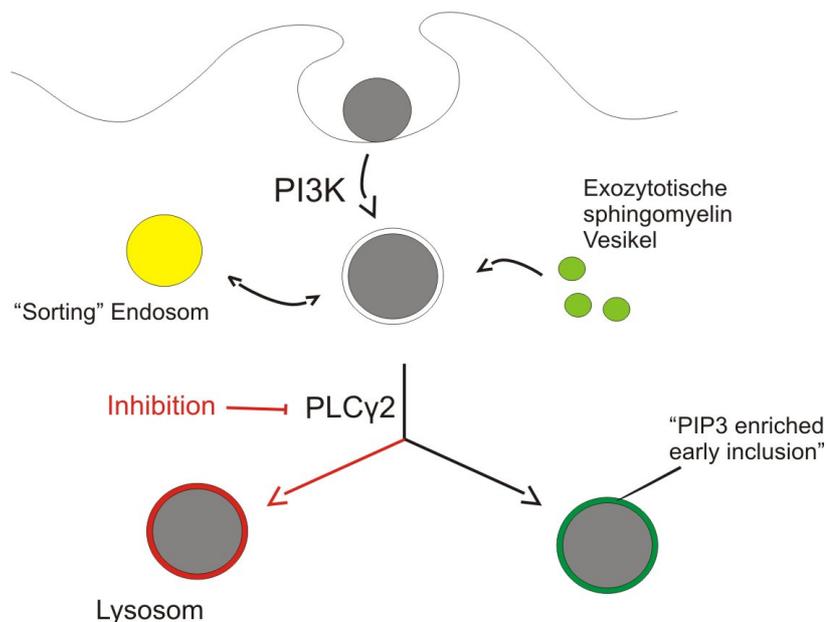


Abbildung 37: Modell des PEEI-Transports während der chlamydialen Invasion. *C. trachomatis* dringt PI3K/PLC γ -abhängig in die Zelle ein und bildet die hier als PEEI bezeichnete Struktur. Das Pathogen vermeidet dabei die Fusion mit endosomalen Kompartimenten (späten Endosomen und Lysosomen). Die PEEI interagiert dagegen mit Rab5-positiven Vesikeln in einer transienten Weise („sorting“ Endosomen), dabei beginnt die PEEI etwa 2 Stunden nach der Infektion damit mit sphingomyelinreichen Vesikeln zu fusionieren. Wird PLC γ -inhibiert, führt dies zu einer lysosomalen Degradation des Pathogens.

Die hier beobachtete Struktur wurde „PtdIns(3,4,5)-P₃-enriched early inclusion“ (PEEI) genannt. Sie bildet tubuläre, in das Zytoplasma ragende Fortsätze (Abb. 26, 35-36),

die endosomalen tubulären Strukturen, wie sie für das endosomale Netzwerk der Zelle beschrieben wurden, ähneln (Bonifacino and Rojas, 2006). Die funktionelle Bedeutung dieser Strukturen konnte noch nicht aufgeklärt werden. Eine mögliche Bedeutung könnte jedoch darin liegen, Kontakte mit dem endosomalen System herzustellen, was die transienten Interaktionen mit Rab5-positiven „sorting“/frühen-Endosomen erklären würde (Abb. 31 und 37). Eine Interaktion mit „Recycling“-Endosomen (Rab11) oder Lysosomen (Lgp-120) wurde nicht beobachtet (Abb. 30). Die selektive Fusion mit dem endosomalen System lässt vermuten, dass dieser Prozess einer Steuerung durch das Pathogen unterliegt. Erst im späteren Verlauf der Infektion rekrutiert die PEEI Rab4, Rab11 und Rab1, und etabliert sich als eine perinukleäre „heranwachsende“ Inklusion (Rzomp et al., 2003). Für Rab4, einen Marker des exozytotischen endosomalen Systems und der „Sorting“-Endosomen (Watson et al., 2005), konnte inzwischen gezeigt werden, dass die Akkumulation an der Inklusionsmembran von *C. trachomatis* über die Interaktion mit dem sekretierten Inklusionsmembranprotein (CT229) vermittelt wird (Rzomp et al., 2006).

Kehren wir noch einmal zurück zur ursprünglichen Frage nach dem Zusammenhang zwischen der PLC γ – Inhibition und der Transportstörung. Lokalisation und Aktivität der PLC γ werden über zwei wichtige regulatorische Elemente beeinflusst: (i) die Membranlokalisation wird durch die PH-Domäne vermittelt, welche an PIP₃ bindet (Anm.: Die PH – Domänen von PLC γ und BTK besitzen die selbe Spezifität) und (ii) die Aktivität des Enzyms wird durch die Bindung der Src-Homologiedomäne an tyrosinphosphorylierte Zielsequenzen reguliert (Falasca et al., 1998; Wilde and Watson, 2001). Beide Voraussetzungen für eine optimale Aktivierung sind gegeben: Während Tarp die nötigen tyrosinphosphorylierten Zielsequenzen zur Verfügung stellt, weist die Membran einen hohen PIP₃-Gehalt auf. Tatsächlich zeigte sich in den hier durchgeführten echtzeitmikroskopischen Experimenten, dass die Inhibition von PLC γ dazu führt, dass die PEEI nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Unklar ist jedoch noch, wie die PLC γ -Aktivität die PEEI-Aufrechterhaltung reguliert, und warum die Inhibition zu einer Verminderung des PIP₃-Signals führt. PLC γ spaltet PtdIns(4,5)-P₃ und nicht PtdIns(3,4,5)-P₃ (Abb. 38), hier besteht also kein direkter Zusammenhang. Es ist wahrscheinlicher, dass die von PLC γ erzeugten „Second Messengern“ (Diacylglycerol (DAG) und Inositol(1,4,5)-P₃ (IP₃)) eine entscheidende Rolle spielen.

Die DAG – Konzentration in der Membran der PEEI könnte eine mögliche Erklärung für die Störung der Aufrechterhaltung liefern. DAG reguliert nicht nur die Aktivität von PKC, sondern auch das Fusionsverhalten intrazellulärer Vesikel (Goni and Alonso, 1999). Mit einer Erhöhung der DAG-Konzentration steigt die Wahrscheinlichkeit für die Vesikelfusion (Herabsetzung der Membrankrümmung). Diese Fusionsereignisse könnten wichtig sein, um die PEEI mit neuem Substrat für die PI3K zu versorgen und die hohe PIP₃ Konzentration aufrechtzuerhalten. Ein weiterer Faktor, der die Stabilisierung der PEEI entscheidend beeinflussen könnte, ist die PLC γ -abhängige IP₃-Bildung. IP₃ reguliert die intrazelluläre Kalziumfreisetzung und die kalziumabhängige Rekrutierung bestimmter Proteine. Tatsächlich wurde gezeigt, dass die Annexine während der Chlamydieninfektion kalziumabhängig rekrutiert werden (Majeed et al., 1999a). Annexine regulieren Kalzium- und Phospholipidabhängig die Bildung bestimmter Membranmikrodomänen und scheinen an die Regulation des endosomalen Systems beteiligt zu sein (Gerke, 2001; Gerke and Moss, 2002; Gerke et al., 2005; Rescher and Gerke, 2004). Die exakte Regulation der PEEI und des Lipidmetabolismus während der chlamydialen Infektion konnte hier noch nicht vollständig aufgeklärt werden und ist Objekt aktuell laufender Forschung.

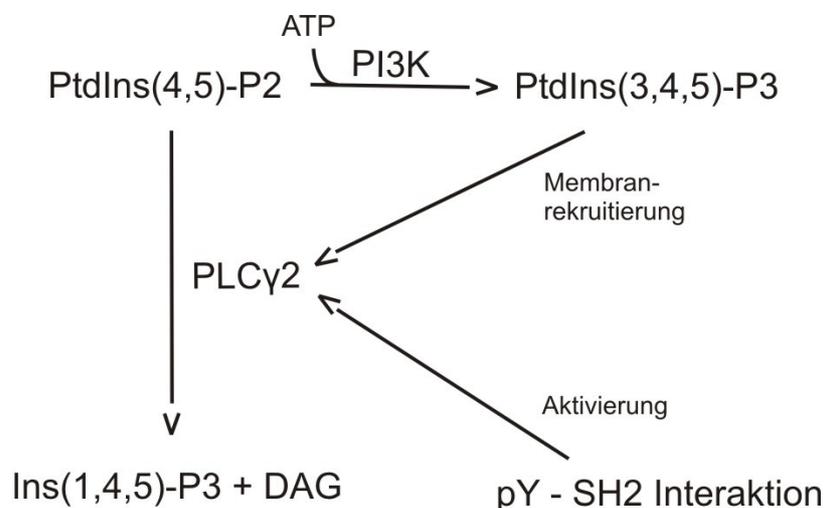


Abbildung 38: PstIns(4,5)-P₂ ist das Substrat von PI3K und PLC γ . PI3K bildet PtdIns(3,4,5)-P₃, welches der Membranrekrutierung von PH-Domänenproteinen, wie z.B. PLC γ dient. Die PLC γ Rekrutierung findet also „downstream“ von PI3K statt. PLC γ entzieht wiederum der PI3K durch seine Aktivität das Substrat und bildet daraus Ins(1,4,5)-P₃ und DAG. Falls kein neues Material „geliefert“ wird bricht die Reaktion an dieser Stelle ab. Weitere Enzyme wie z.B. die Polyinositolphosphatase PTEN, die auch PtdIns(3,4,5)-P₃ abbaut sind hier der Einfachheit halber nicht dargestellt.

8.4 Zusammenfassung der Diskussion

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Aufrechterhaltung hoher PIP_3 -Konzentrationen in der Membran des *C. trachomatis*-Endosoms von entscheidender Bedeutung für die Infektion der Wirtszelle ist (Abb. 37). Während der Invasion wird das Effektorprotein Tarp in die Wirtszelle injiziert, wo es die Aktinpolymerisation durch seinen C-Terminus vermittelt (Jewett TJ et al., 2006b) und sehr schnell an Tyrosinresten im N-Terminus phosphoryliert wird (Abb. 39). $\text{PLC}\gamma$ wird durch die hohe PIP_3 -Konzentration zur Invasionsstelle rekrutiert und wahrscheinlich durch die SH2-Domänenabhängige Interaktion mit Tarp aktiviert (Abb. 39). Während die PEEI-Bildung von PI3K abhängt, wird die Aufrechterhaltung der Struktur zusätzlich durch die $\text{PLC}\gamma$ -Aktivität reguliert (Abb. 37, 39).

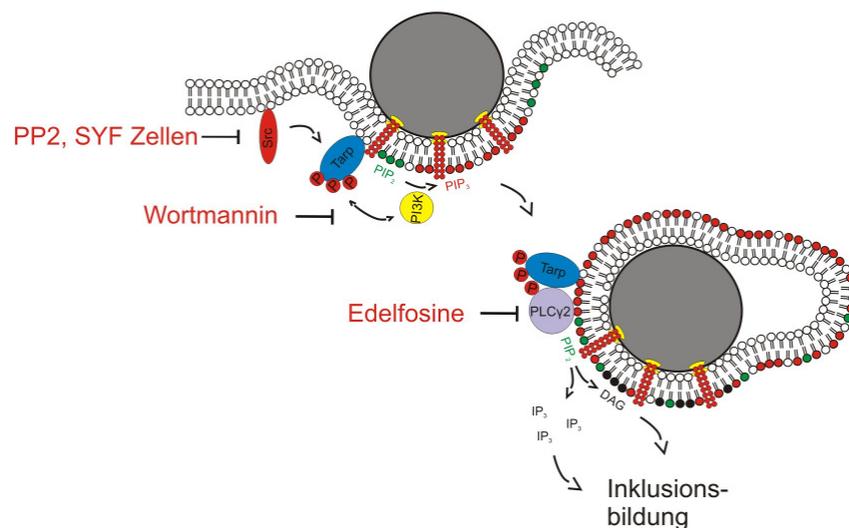


Abbildung 39: Modell der Tarp-Interaktionen und der Bildung der PEEI. Tarp wird durch Kinasen der Src-Familie an ENIYE-Resten im N-Terminus phosphoryliert. Die SFK-Inhibition mit PP2 blockiert die *C. trachomatis*-Inklusionsbildung um ~70%. $\text{PLC}\gamma 2$ wird während der Bildung der PEEI rekrutiert. Inhibition der $\text{PLC}\gamma$ -Signaltransduktion blockiert die Inklusionsbildung durch *C. trachomatis* um ~97% und stört den Elementarkörperchentransport innerhalb der Zelle, was schließlich zu einer lysosomalen Degradation führt.

Die PEEI ist von der normalen endozytotischen Route getrennt, interagiert aber transient mit Rab5-positiven Vesikeln (Abb. 37). Die hier erhaltenen Erkenntnisse werfen ein neues Licht auf den Mechanismus der *C. trachomatis*-Wirtszellinvasion und enthüllen einen neuen Mechanismus zur Vermeidung der lysosomalen Degradation. Weitere Untersuchungen

dieses Invasionsmechanismus werden Rückschlüsse darauf erlauben, wie *Chlamydia* exozytotische Vesikel abfängt und wie die PEEI durch den Lipidmetabolismus reguliert wird. Die Untersuchung der PEEI könnte weiterhin als „Readout-System“ zur Untersuchung des zellulären Lipidmetabolismus verwendet werden. Vergleiche zwischen verschiedenen Zelltypen (z.B. Epithel- vs. Immunzellen) könnten entscheidende Erkenntnisse über die Pathogenität oder Immunregulation in verschiedenen Geweben zulassen.

9. Ausblick

Welche Aussichten bietet die Entdeckung der PEEI für die Zukunft der Chlamydienforschung im Allgemeinen und welche Perspektiven bieten sich für die Invasion im speziellen? Die Entdeckung der PEEI bietet die Gelegenheit verschiedenste Aspekte des Transports und der Etablierung der Inklusion aufzuklären. Wichtige Fragestellungen sind: (i) mit welchen Vesikeln fusioniert die PEEI, (ii) wie wird der Transport in die perinukleäre Position gesteuert und (iii) welche Bedeutung hat die PEEI –Bildung *in vivo*? Möglicherweise können auch bisher unbekannte Wirtszellfunktionen aufgedeckt werden. Ungeklärt ist z.B. ob es außer der Phagozytose noch weitere endogene Situationen gibt, in denen es zu einer vermehrten Bildung von PIP_3 kommt. Besonderer Bedeutung könnten erhöhte PIP_3 -Konzentrationen für die Entstehung von Cervixkrebs haben, da PIP_3 ein proliferationsfördernder Stimulus ist und so bei chronischen Infektionen möglicherweise ein Effekt auf das Krebswachstum erfolgt. Tatsächlich sind *C. trachomatis* Infektionen mit Cervixkrebs assoziiert und lösen, wie kürzlich gezeigt werden konnte, zentrosomale Defekte aus (Grieshaber et al., 2006).

Experimentell einfacher zu untersuchende Fragestellungen beziehen sich auf die Interaktionspartner von PIP_3 : Bisher wurden nur PH-Domänenproteine untersucht, welche Rolle aber z.B. polybasische Proteine für die Steuerung der Infektion spielen ist noch völlig ungeklärt. Polybasische Proteine werden durch die Interaktion ihrer basischen Aminosäuren mit sauren Resten an der Membran rekrutiert (z.B. PstInst(4,5)- P_2 , PstInst(3,4,5)- P_3). Zu den polybasischen Proteinen gehört eine ganze Reihe interessanter Faktoren wie die Ras-, Rap-, Rac-, Rab- und Arl-Proteine, die intrazelluläre Transportprozesse steuern (Heo et al., 2006). Neben Molekülen die den Transport regulieren sind natürlich auch Signalkaskaden interessant, die von $PLC\gamma$ ausgelöst werden. DAG vermittelt z.B. die Aktivierung von PKC und führt so zu transkriptionellen Veränderungen bei Immunantwort und Zellwachstum. Welche dieser transkriptionellen Signale direkt von der Invasion ausgehen ist bisher noch nicht geklärt. Es ist auch noch unbekannt welche dieser Signale für die Chlamydien von Vorteil sind und welche Signale negativ wirken und von den Chlamydien wieder abgeschaltet werden müssen. Ein wichtiges Ziel ist es auch, die anderen von Chlamydien sekretierten Faktoren zu charakterisieren, um ein vollständiges Bild von der Invasion zu erhalten. Möglicherweise erlauben einige dieser Faktoren die Entwicklung antibiotischer Substanzen oder führen zu einem tieferen Verständnis der Wirtszell-Pathogeninteraktion.

10. Literaturverzeichnis

- Abdelrahman, Y.M. and Belland, R.J. (2005). The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol. Rev.* *29*, 949-959.
- Al Younes, H.M., Rudel, T., and Meyer, T.F. (1999). Characterization and intracellular trafficking pattern of vacuoles containing *Chlamydia pneumoniae* in human epithelial cells. *Cell Microbiol.* *1*, 237-247.
- Allan, I. and Pearce, J.H. (1987). Association of *Chlamydia trachomatis* with mammalian and cultured insect cells lacking putative chlamydial receptors. *Microb. Pathog.* *2*, 63-70.
- Backert, S., Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V., and Meyer, T.F. (2001). Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol. Microbiol.* *42*, 631-644.
- Backert, S. and Selbach, M. (2005). Tyrosine-phosphorylated bacterial effector proteins: the enemies within. *Trends Microbiol.* *13*, 476-484.
- Belland, R.J., Ouellette, S.P., Gieffers, J., and Byrne, G.I. (2004). *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Cell Microbiol.* *6*, 117-127.
- Bierne, H., Dramsi, S., Gratacap, M.P., Randriamampita, C., Carpenter, G., Payrastra, B., and Cossart, P. (2000). The invasion protein InIB from *Listeria monocytogenes* activates PLC-gamma1 downstream from PI 3-kinase. *Cell Microbiol.* *2*, 465-476.
- Birkelund, S., Johnsen, H., and Christiansen, G. (1994). *Chlamydia trachomatis* serovar L2 induces protein tyrosine phosphorylation during uptake by HeLa cells. *Infect. Immun.* *62*, 4900-4908.
- Bligh, V. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. Biochem. J. Physiol.* *37*, 911-917.
- Boman, J. and Hammerschlag, M.R. (2002). *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies. *Clin. Microbiol. Rev.* *15*, 1-20.
- Bonifacino, J.S. and Rojas, R. (2006). Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 568-579.
- Bourzac, K.M. and Guillemin, K. (2005). *Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cell Microbiol.* *7*, 911-919.
- Buchan, H., Vessey, M., Goldacre, M., and Fairweather, J. (1993). Morbidity following pelvic inflammatory disease. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* *100*, 558-562.
- Campellone, K.G. and Leong, J.M. (2003). Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Curr. Opin. Microbiol.* *6*, 82-90.
- Carabeo, R.A., Dooley, C.A., Grieshaber, S.S., and Hackstadt, T. (2007). Rac interacts with Abi-1 and WAVE2 to promote an Arp2/3-dependent actin recruitment during chlamydial invasion. *Cell Microbiol.*
- Carabeo, R.A., Grieshaber, S.S., Fischer, E., and Hackstadt, T. (2002). *Chlamydia trachomatis* induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells. *Infect. Immun.* *70*, 3793-3803.
- Carabeo, R.A., Grieshaber, S.S., Hasenkrug, A., Dooley, C., and Hackstadt, T. (2004). Requirement for the Rac GTPase in *Chlamydia trachomatis* invasion of non-phagocytic cells. *Traffic.* *5*, 418-425.

- Carabeo,R.A. and Hackstadt,T. (2001). Isolation and characterization of a mutant Chinese hamster ovary cell line that is resistant to Chlamydia trachomatis infection at a novel step in the attachment process. *Infect. Immun.* *69*, 5899-5904.
- Carlson,J.H., Porcella,S.F., McClarty,G., and Caldwell,H.D. (2005). Comparative genomic analysis of Chlamydia trachomatis oculotropic and genitotropic strains. *Infect. Immun.* *73*, 6407-6418.
- Chi,E.Y., Kuo,C.C., and Grayston,J.T. (1987). Unique ultrastructure in the elementary body of Chlamydia sp. strain TWAR. *J. Bacteriol.* *169*, 3757-3763.
- Christiansen,G., Pedersen,A.S., Hjerno,K., Vandahl,B., and Birkelund,S. (2000). Potential relevance of Chlamydia pneumoniae surface proteins to an effective vaccine. *J. Infect. Dis.* *181 Suppl 3*, S528-S537.
- Churin,Y., Al Ghouli,L., Kepp,O., Meyer,T.F., Birchmeier,W., and Naumann,M. (2003). Helicobacter pylori CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the mitogenic response. *J. Cell Biol.* *161*, 249-255.
- Clausen,J.D., Christiansen,G., Holst,H.U., and Birkelund,S. (1997). Chlamydia trachomatis utilizes the host cell microtubule network during early events of infection. *Mol. Microbiol.* *25*, 441-449.
- Clifton,D.R., Dooley,C.A., Grieshaber,S.S., Carabeo,R.A., Fields,K.A., and Hackstadt,T. (2005). Tyrosine phosphorylation of the chlamydial effector protein Tarp is species specific and not required for recruitment of actin. *Infect. Immun.* *73*, 3860-3868.
- Clifton,D.R., Fields,K.A., Grieshaber,S.S., Dooley,C.A., Fischer,E.R., Mead,D.J., Carabeo,R.A., and Hackstadt,T. (2004). A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Cockcroft,S. and De Matteis,M.A. (2001). Inositol lipids as spatial regulators of membrane traffic. *J. Membr. Biol.* *180*, 187-194.
- Cockcroft,S. and Thomas,G.M. (1992). Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *Biochem. J.* *288 (Pt 1)*, 1-14.
- Coombe,D.R. and Kett,W.C. (2005). Heparan sulfate-protein interactions: therapeutic potential through structure-function insights. *Cell Mol. Life Sci.* *62*, 410-424.
- Coombes,B.K. and Mahony,J.B. (2002). Identification of MEK- and phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling as essential events during Chlamydia pneumoniae invasion of HEp2 cells. *Cell Microbiol.* *4*, 447-460.
- Corvera,S. and Czech,M.P. (1998). Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction. *Trends Cell Biol.* *8*, 442-446.
- Covacci,A. and Rappuoli,R. (2000). Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. *J. Exp. Med.* *191*, 587-592.
- Deretic,V., Singh,S., Master,S., Harris,J., Roberts,E., Kyei,G., Davis,A., de Haro,S., Naylor,J., Lee,H.H., and Vergne,I. (2006). Mycobacterium tuberculosis inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell Microbiol.* *8*, 719-727.
- Dhar,A., Paul,A.K., and Shukla,S.D. (1990). Platelet-activating factor stimulation of tyrosine kinase and its relationship to phospholipase C in rabbit platelets: studies with genistein and monoclonal antibody to phosphotyrosine. *Mol. Pharmacol.* *37*, 519-525.
- Di Paolo,G. and De Camilli,P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* *443*, 651-657.
- Dietmaier,W., Fabry,S., and Schmitt,R. (1993). DISEC-TRISEC: di- and trinucleotide-sticky-end cloning of PCR-amplified DNA. *Nucleic Acids Res.* *21*, 3603-3604.

- DiNitto,J.P., Cronin,T.C., and Lambright,D.G. (2003). Membrane recognition and targeting by lipid-binding domains. *Sci. STKE*. 2003, re16.
- Donati,M., Graciotti,C., Di Francesco,A., Pavan,G., Bui,C., and Cevenini,R. (1995). Influence of centrifugation on the infectivity of *Chlamydia pneumoniae* IOL-207. *New Microbiol.* 18, 315-318.
- Eb,F., Orfila,J., and Lefebvre,J.F. (1976). Ultrastructural study of the development of the agent of ewe's abortion. *J. Ultrastruct. Res.* 56, 177-185.
- Escalante-Ochoa,C., Ducatelle,R., Charlier,G., De Vos,K., and Haesebrouck,F. (1999). Significance of host cell kinesin in the development of *Chlamydia psittaci*. *Infect. Immun.* 67, 5441-5446.
- Everett,K.D., Bush,R.M., and Andersen,A.A. (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, 415-440.
- Falasca,M., Logan,S.K., Lehto,V.P., Baccante,G., Lemmon,M.A., and Schlessinger,J. (1998). Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J.* 17, 414-422.
- Fawaz,F.S., van Ooij,C., Homola,E., Mutka,S.C., and Engel,J.N. (1997). Infection with *Chlamydia trachomatis* alters the tyrosine phosphorylation and/or localization of several host cell proteins including cortactin. *Infect. Immun.* 65, 5301-5308.
- Fields,K.A. and Hackstadt,T. (2000). Evidence for the secretion of *Chlamydia trachomatis* CopN by a type III secretion mechanism. *Mol. Microbiol.* 38, 1048-1060.
- Fields,K.A. and Hackstadt,T. (2002). The chlamydial inclusion: escape from the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 221-245.
- Fields,K.A., Mead,D.J., Dooley,C.A., and Hackstadt,T. (2003). *Chlamydia trachomatis* type III secretion: evidence for a functional apparatus during early-cycle development. *Mol. Microbiol.* 48, 671-683.
- Finlay,B.B. and Cossart,P. (1997). Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276, 718-725.
- Francis,M.S., Lloyd,S.A., and Wolf-Watz,H. (2001). The type III secretion chaperone LcrH co-operates with YopD to establish a negative, regulatory loop for control of Yop synthesis in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 42, 1075-1093.
- Friedman,M.G., Dvoskin,B., and Kahane,S. (2003). Infections with the chlamydia-like microorganism *Simkania negevensis*, a possible emerging pathogen. *Microbes. Infect.* 5, 1013-1021.
- Gabel,B.R., Elwell,C., van Ijzendoorn,S.C., and Engel,J.N. (2004). Lipid raft-mediated entry is not required for *Chlamydia trachomatis* infection of cultured epithelial cells. *Infect. Immun.* 72, 7367-7373.
- Gerke,V. (2001). Annexins And Membrane Organisation In The Endocytic Pathway. *Cell Mol. Biol. Lett.* 6, 204.
- Gerke,V., Creutz,C.E., and Moss,S.E. (2005). Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 449-461.
- Gerke,V. and Moss,S.E. (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol Rev.* 82, 331-371.
- Ghosh,P. (2004). Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 771-795.

- Gillooly,D.J., Simonsen,A., and Stenmark,H. (2001). Phosphoinositides and phagocytosis. *J. Cell Biol.* *155*, 15-17.
- Gold,E.S., Simmons,R.M., Petersen,T.W., Campbell,L.A., Kuo,C.C., and Aderem,A. (2004). Amphiphysin II α is required for survival of *Chlamydia pneumoniae* in macrophages. *J. Exp. Med.* *200*, 581-586.
- Goni,F.M. and Alonso,A. (1999). Structure and functional properties of diacylglycerols in membranes. *Prog. Lipid Res.* *38*, 1-48.
- Grieshaber,S.S., Grieshaber,N.A., and Hackstadt,T. (2003). *Chlamydia trachomatis* uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process. *J. Cell Sci.* *116*, 3793-3802.
- Grieshaber,S.S., Grieshaber,N.A., Miller,N., and Hackstadt,T. (2006). *Chlamydia trachomatis* causes centrosomal defects resulting in chromosomal segregation abnormalities. *Traffic.* *7*, 940-949.
- Grimwood,J., Olinger,L., and Stephens,R.S. (2001). Expression of *Chlamydia pneumoniae* polymorphic membrane protein family genes. *Infect. Immun.* *69*, 2383-2389.
- Grimwood,J. and Stephens,R.S. (1999). Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. *Microb. Comp Genomics* *4*, 187-201.
- Gruenheid,S., DeVinney,R., Blatt,F., Goosney,D., Gelkop,S., Gish,G.D., Pawson,T., and Finlay,B.B. (2001). Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat. Cell Biol.* *3*, 856-859.
- Hackstadt,T. (1999). *Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity.*, R.S.Stephens, ed. (Washington: D.C.: ASM Press.), pp. 101-138.
- Hackstadt,T., Scidmore,M.A., and Rockey,D.D. (1995). Lipid metabolism in *Chlamydia trachomatis*-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 4877-4881.
- Hanke,J.H., Gardner,J.P., Dow,R.L., Changelian,P.S., Brissette,W.H., Weringer,E.J., Pollok,B.A., and Connelly,P.A. (1996). Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J. Biol. Chem.* *271*, 695-701.
- He,S.Y., Nomura,K., and Whittam,T.S. (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta* *1694*, 181-206.
- Heinzen,R.A., Scidmore,M.A., Rockey,D.D., and Hackstadt,T. (1996). Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* *64*, 796-809.
- Heo,W.D., Inoue,T., Park,W.S., Kim,M.L., Park,B.O., Wandless,T.J., and Meyer,T. (2006). PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science* *314*, 1458-1461.
- Hernandez,L.D., Hueffer,K., Wenk,M.R., and Galan,J.E. (2004). *Salmonella* modulates vesicular traffic by altering phosphoinositide metabolism. *Science* *304*, 1805-1807.
- Heuer,D., Kneip,C., Maurer,A.P., and Meyer,T.F. (2007). Tackling the intractable - Approaching the genetics of Chlamydiales. *Int J. Med. Microbiol.*
- Higashi,H., Tsutsumi,R., Fujita,A., Yamazaki,S., Asaka,M., Azuma,T., and Hatakeyama,M. (2002a). Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 14428-14433.
- Higashi,H., Tsutsumi,R., Muto,S., Sugiyama,T., Azuma,T., Asaka,M., and Hatakeyama,M. (2002b). SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* *295*, 683-686.

- Hilbi,H. (2006). Modulation of phosphoinositide metabolism by pathogenic bacteria. *Cell Microbiol.* 8, 1697-1706.
- Hodinka,R.L., Davis,C.H., Choong,J., and Wyrick,P.B. (1988). Ultrastructural study of endocytosis of *Chlamydia trachomatis* by McCoy cells. *Infect. Immun.* 56, 1456-1463.
- Hogan,R.J., Mathews,S.A., Mukhopadhyay,S., Summersgill,J.T., and Timms,P. (2004). Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect. Immun.* 72, 1843-1855.
- Horn,M., Collingro,A., Schmitz-Esser,S., Beier,C.L., Purkhold,U., Fartmann,B., Brandt,P., Nyakatura,G.J., Droege,M., Frishman,D., Rattei,T., Mewes,H.W., and Wagner,M. (2004). Illuminating the evolutionary history of chlamydiae. *Science* 304, 728-730.
- Iozzo,R.V. (2005). Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 646-656.
- Janmey,P.A. and Lindberg,U. (2004). Cytoskeletal regulation: rich in lipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 658-666.
- Jewett TJ, Fischer ER, Mead DJ, and Hackstadt T (2006b). Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 15599-15604.
- Jewett TJ, Fischer ER, Mead DJ, and Hackstadt T (2006a). Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 15599-15604.
- Jewett,T.J., Fischer,E.R., Mead,D.J., and Hackstadt,T. (2006). Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 15599-15604.
- Kaul,R. and Wenman,W.M. (1998). Eukaryotic-like histones in *Chlamydia*. *Front Biosci.* 3, d300-d305.
- Kenny,B. (1999). Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol. Microbiol.* 31, 1229-1241.
- Kenny,B., DeVinney,R., Stein,M., Reinscheid,D.J., Frey,E.A., and Finlay,B.B. (1997). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91, 511-520.
- Krivan,H.C., Nilsson,B., Lingwood,C.A., and Ryu,H. (1991). *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* bind specifically to phosphatidylethanolamine in HeLa cells and to GalNAc beta 1-4Gal beta 1-4GLC sequences-found in asialo-GM1 and asial-GM2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 1082-1089.
- Lechner,J. and Wieland,F. (1989). Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 173-194.
- Lemmon,M.A. (2003). Phosphoinositide recognition domains. *Traffic.* 4, 201-213.
- Lindroth,M., Bell,P.B., Jr., Fredriksson,B.A., and Liu,X.D. (1992). Preservation and visualization of molecular structure in detergent-extracted whole mounts of cultured cells. *Microsc. Res. Tech.* 22, 130-150.
- Majeed,M., Ernst,J.D., Magnusson,K.E., Kihlstrom,E., and Stendahl,O. (1994a). Selective translocation of annexins during intracellular redistribution of *Chlamydia trachomatis* in HeLa and McCoy cells. *Infect. Immun.* 62, 126-134.
- Majeed,M., Ernst,J.D., Magnusson,K.E., Kihlstrom,E., and Stendahl,O. (1994b). Selective translocation of annexins III, IV, and V during intracellular redistribution of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 in HeLa and McCoy cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 730, 326-328.

- Majeed,M., Krause,K.H., Clark,R.A., Kihlstrom,E., and Stendahl,O. (1999a). Localization of intracellular Ca²⁺ stores in HeLa cells during infection with Chlamydia trachomatis. *J. Cell Sci.* *112* (Pt 1), 35-44.
- Majeed,M., Krause,K.H., Clark,R.A., Kihlstrom,E., and Stendahl,O. (1999b). Localization of intracellular Ca²⁺ stores in HeLa cells during infection with Chlamydia trachomatis. *J. Cell Sci.* *112* (Pt 1), 35-44.
- Manes,S., del Real,G., and Martinez,A. (2003). Pathogens: raft hijackers. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 557-568.
- Marcus,S.L., Wenk,M.R., Steele-Mortimer,O., and Finlay,B.B. (2001). A synaptojanin-homologous region of Salmonella typhimurium SigD is essential for inositol phosphatase activity and Akt activation. *FEBS Lett.* *494*, 201-207.
- Matsumoto,A. (1973). Fine structures of cell envelopes of Chlamydia organisms as revealed by freeze-etching and negative staining techniques. *J. Bacteriol.* *116*, 1355-1363.
- Matsumoto,A. (1982). Electron microscopic observations of surface projections on Chlamydia psittaci reticulate bodies. *J. Bacteriol.* *150*, 358-364.
- Matsumoto,A. and Manire,G.P. (1970). Electron Microscopic Observations on the Fine Structure of Cell Walls of Chlamydia psittaci. *J. Bacteriol.* *104*, 1332-1337.
- Mimuro,H., Suzuki,T., Tanaka,J., Asahi,M., Haas,R., and Sasakawa,C. (2002). Grb2 is a key mediator of helicobacter pylori CagA protein activities. *Mol. Cell* *10*, 745-755.
- Miyashita,N., Kanamoto,Y., and Matsumoto,A. (1993). The morphology of Chlamydia pneumoniae. *J. Med. Microbiol.* *38*, 418-425.
- Mladenov,I.V., Haralambieva,I.H., Iankov,I.D., and Mitov,I.G. (2002). Characterisation of 20-kDa lectin-spermagglutinin from Arum maculatum that prevents Chlamydia pneumoniae infection of L-929 fibroblast cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *32*, 249-254.
- Murray,A. and Ward,M.E. (1984). Control mechanisms governing the infectivity of Chlamydia trachomatis for HeLa cells: the role of calmodulin. *J. Gen. Microbiol.* *130*, 193-201.
- Mustelin,T., Coggeshall,K.M., Isakov,N., and Altman,A. (1990). T cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C requires tyrosine phosphorylation. *Science* *247*, 1584-1587.
- Niebuhr,K., Jouihri,N., Allaoui,A., Gounon,P., Sansonetti,P.J., and Parsot,C. (2000). IpgD, a protein secreted by the type III secretion machinery of Shigella flexneri, is chaperoned by IpgE and implicated in entry focus formation. *Mol. Microbiol.* *38*, 8-19.
- Norris,F.A., Wilson,M.P., Wallis,T.S., Galyov,E.E., and Majerus,P.W. (1998). SopB, a protein required for virulence of Salmonella dublin, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 14057-14059.
- Okkenhaug,K. and Vanhaesebroeck,B. (2001). New responsibilities for the PI3K regulatory subunit p85 alpha. *Sci. STKE.* *2001*, E1.
- Patterson,R.L., van Rossum,D.B., Nikolaidis,N., Gill,D.L., and Snyder,S.H. (2005). Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 688-697.
- Perfettini,J.L., Hospital,V., Stahl,L., Jungas,T., Verbeke,P., and Ojcius,D.M. (2003). Cell death and inflammation during infection with the obligate intracellular pathogen, Chlamydia. *Biochimie* *85*, 763-769.
- Peters,P.J., Bos,E., and Griekspoor A. (2006). In *Current Protocols in Cell Biology*, John Wiley&Sons Inc.).
- Phillips,N., Hayward,R.D., and Koronakis,V. (2004). Phosphorylation of the enteropathogenic E. coli receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation. *Nat. Cell Biol.* *6*, 618-625.

- Pieters, J. (2001). Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes. Infect.* 3, 249-255.
- Poppe, M., Feller, S.M., Romer, G., and Wessler, S. (2007). Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene* 26, 3462-3472.
- Prain, C.J. and Pearce, J.H. (1989). Ultrastructural studies on the intracellular fate of *Chlamydia psittaci* (strain guinea pig inclusion conjunctivitis) and *Chlamydia trachomatis* (strain lymphogranuloma venereum 434): modulation of intracellular events and relationship with endocytic mechanism. *J. Gen. Microbiol.* 135, 2107-2123.
- Rescher, U. and Gerke, V. (2004). Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *J. Cell Sci.* 117, 2631-2639.
- Rockey, D.D., Fischer, E.R., and Hackstadt, T. (1996). Temporal analysis of the developing *Chlamydia psittaci* inclusion by use of fluorescence and electron microscopy. *Infect. Immun.* 64, 4269-4278.
- Rockey, D.D., Heinzen, R.A., and Hackstadt, T. (1995). Cloning and characterization of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. *Mol. Microbiol.* 15, 617-626.
- Rockey, D.D., Scidmore, M.A., Bannantine, J.P., and Brown, W.J. (2002). Proteins in the chlamydial inclusion membrane. *Microbes. Infect.* 4, 333-340.
- Roque, A.C. and Lowe, C.R. (2005). Lessons from nature: On the molecular recognition elements of the phosphoprotein binding-domains. *Biotechnol. Bioeng.* 91, 546-555.
- Rzomp, K.A., Moorhead, A.R., and Scidmore, M.A. (2006). The GTPase Rab4 interacts with *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein CT229. *Infect. Immun.* 74, 5362-5373.
- Rzomp, K.A., Scholtes, L.D., Briggs, B.J., Whittaker, G.R., and Scidmore, M.A. (2003). Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner. *Infect. Immun.* 71, 5855-5870.
- Sano, A., Zhu, X., Sano, H., Munoz, N.M., Boetticher, E., and Leff, A.R. (2001). Regulation of eosinophil function by phosphatidylinositol-specific PLC and cytosolic PLA(2). *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 281, L844-L851.
- Schlessinger, J. and Lemmon, M.A. (2003). SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci. STKE.* 2003, RE12.
- Schramm, N. and Wyrick, P.B. (1995). Cytoskeletal requirements in *Chlamydia trachomatis* infection of host cells. *Infect. Immun.* 63, 324-332.
- Schuetze, S. and Kroenke, M. (1995). Measurement of Cytokine Induction of PC-specific Phospholipase C and Sphingomyelinases. In *Cytokines*, F.R. Balkwill, ed. IRL Press, pp. 93-128.
- Schulein, R., Guye, P., Rhomberg, T.A., Schmid, M.C., Schroder, G., Vergunst, A.C., Carena, I., and Dehio, C. (2005). A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 856-861.
- Schwarzenbacher, R., Stenner-Liewen, F., Liewen, H., Robinson, H., Yuan, H., Bossy-Wetzel, E., Reed, J.C., and Liddington, R.C. (2004). Structure of the *Chlamydia* protein CADD reveals a redox enzyme that modulates host cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 29320-29324.
- Scidmore, M.A., Fischer, E.R., and Hackstadt, T. (2003). Restricted fusion of *Chlamydia trachomatis* vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection. *Infect. Immun.* 71, 973-984.

- Seedorf,K., Kostka,G., Lammers,R., Bashkin,P., Daly,R., Burgess,W.H., van der Blik,A.M., Schlessinger,J., and Ullrich,A. (1994). Dynamin binds to SH3 domains of phospholipase C gamma and GRB-2. *J. Biol. Chem.* *269*, 16009-16014.
- Segal,E.D., Cha,J., Lo,J., Falkow,S., and Tompkins,L.S. (1999). Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 14559-14564.
- Selbach,M., Moese,S., Hurwitz,R., Hauck,C.R., Meyer,T.F., and Backert,S. (2003). The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J.* *22*, 515-528.
- Slepenkin,A., Motin,V., de la Maza,L.M., and Peterson,E.M. (2003). Temporal expression of type III secretion genes of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect. Immun.* *71*, 2555-2562.
- Slot,J.W., Geuze,H.J., Gigengack,S., Lienhard,G.E., and James,D.E. (1991). Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J. Cell Biol.* *113*, 123-135.
- Soderlund,G. and Kihlstrom,E. (1982). Physicochemical surface properties of elementary bodies from different serotypes of *chlamydia trachomatis* and their interaction with mouse fibroblasts. *Infect. Immun.* *36*, 893-899.
- Soloff,B.L., Rank,R.G., and Barron,A.L. (1982). Ultrastructural studies of chlamydial infection in guinea-pig urogenital tract. *J. Comp Pathol.* *92*, 547-558.
- Sonnichsen,B., De Renzis,S., Nielsen,E., Rietdorf,J., and Zerial,M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell Biol.* *149*, 901-914.
- Stauffer,T.P., Ahn,S., and Meyer,T. (1998). Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P2 concentration monitored in living cells. *Curr. Biol.* *8*, 343-346.
- Stein,M., Bagnoli,F., Halenbeck,R., Rappuoli,R., Fantl,W.J., and Covacci,A. (2002). c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol. Microbiol.* *43*, 971-980.
- Stenner-Liewen,F., Liewen,H., Zapata,J.M., Pawlowski,K., Godzik,A., and Reed,J.C. (2002). CADD, a *Chlamydia* protein that interacts with death receptors. *J. Biol. Chem.* *277*, 9633-9636.
- Stephens,R.S., Kalman,S., Lammel,C., Fan,J., Marathe,R., Aravind,L., Mitchell,W., Olinger,L., Tatusov,R.L., Zhao,Q., Koonin,E.V., and Davis,R.W. (1998). Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* *282*, 754-759.
- Stuart,E.S., Webley,W.C., and Norkin,L.C. (2003). Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by *Chlamydiae* into host cells. *Exp. Cell Res.* *287*, 67-78.
- Su,A.I., Cooke,M.P., Ching,K.A., Hakak,Y., Walker,J.R., Wiltshire,T., Orth,A.P., Vega,R.G., Sapinoso,L.M., Moqrich,A., Patapoutian,A., Hampton,G.M., Schultz,P.G., and Hogenesch,J.B. (2002). Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 4465-4470.
- Su,H., McClarty,G., Dong,F., Hatch,G.M., Pan,Z.K., and Zhong,G. (2004). Activation of Raf/MEK/ERK/cPLA2 signaling pathway is essential for chlamydial acquisition of host glycerophospholipids. *J. Biol. Chem.* *279*, 9409-9416.
- Subtil,A., Blocker,A., and Dautry-Varsat,A. (2000). Type III secretion system in *Chlamydia* species: identified members and candidates. *Microbes. Infect.* *2*, 367-369.
- Subtil,A., Delevoye,C., Balana,M.E., Tastevin,L., Perrinet,S., and Dautry-Varsat,A. (2005). A directed screen for chlamydial proteins secreted by a type III mechanism identifies a translocated protein and numerous other new candidates. *Mol. Microbiol.* *56*, 1636-1647.

- Subtil,A., Parsot,C., and Dautry-Varsat,A. (2001). Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol. Microbiol.* *39*, 792-800.
- Subtil,A., Wyplosz,B., Balana,M.E., and Dautry-Varsat,A. (2004). Analysis of *Chlamydia caviae* entry sites and involvement of Cdc42 and Rac activity. *J. Cell Sci.* *117*, 3923-3933.
- Suchland,R.J., Rockey,D.D., Bannantine,J.P., and Stamm,W.E. (2000). Isolates of *Chlamydia trachomatis* that occupy nonfusogenic inclusions lack IncA, a protein localized to the inclusion membrane. *Infect. Immun.* *68*, 360-367.
- Sukumaran,S.K., McNamara,G., and Prasadarao,N.V. (2003). *Escherichia coli* K-1 interaction with human brain micro-vascular endothelial cells triggers phospholipase C-gamma1 activation downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* *278*, 45753-45762.
- Swanson,A.F. and Kuo,C.C. (1991). Evidence that the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* is glycosylated. *Infect. Immun.* *59*, 2120-2125.
- Swimm,A., Bommarius,B., Reeves,P., Sherman,M., and Kalman,D. (2004). Complex kinase requirements for EPEC pedestal formation. *Nat. Cell Biol.* *6*, 795-796.
- Tago,K., Funakoshi,M., Mano,H., Yanagisawa,K., Hayakawa,M., Kuroiwa,K., Iwahana,H., Kasahara,T., and Tominaga,S. (2001). Presence of a genistein-responsive inhibitory mechanism on interleukin-1alpha-induced NF-kappaB activation. *Eur. J. Biochem.* *268*, 6526-6533.
- Takenawa,T. and Suetsugu,S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 37-48.
- Tam,J.E., Davis,C.H., and Wyrick,P.B. (1994). Expression of recombinant DNA introduced into *Chlamydia trachomatis* by electroporation. *Can. J. Microbiol.* *40*, 583-591.
- Tampakaki,A.P., Fadoulglou,V.E., Gazi,A.D., Panopoulos,N.J., and Kokkinidis,M. (2004). Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol.* *6*, 805-816.
- Vance,D.W., Jr. and Hatch,T.P. (1980). Surface properties of *Chlamydia psittaci*. *Infect. Immun.* *29*, 175-180.
- Virok,D.P., Nelson,D.E., Whitmire,W.M., Crane,D.D., Goheen,M.M., and Caldwell,H.D. (2005). Chlamydial infection induces pathobio-type-specific protein tyrosine phosphorylation in epithelial cells. *Infect. Immun.* *73*, 1939-1946.
- Ward,M.E. and Murray,A. (1984). Control mechanisms governing the infectivity of *Chlamydia trachomatis* for HeLa cells: mechanisms of endocytosis. *J. Gen. Microbiol.* *130*, 1765-1780.
- Ward,M.E. and Salari,H. (1982). Control mechanisms governing the infectivity of *Chlamydia trachomatis* for hela cells: modulation by cyclic nucleotides, prostaglandins and calcium. *J. Gen. Microbiol.* *128*, 639-650.
- Watson,P., Jones,A.T., and Stephens,D.J. (2005). Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *57*, 43-61.
- Wehrl,W., Brinkmann,V., Jungblut,P.R., Meyer,T.F., and Szczepek,A.J. (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*, 319-334.
- Wiesenfeld,H.C., Hillier,S.L., Krohn,M.A., Amortegui,A.J., Heine,R.P., Landers,D.V., and Sweet,R.L. (2002). Lower genital tract infection and endometritis: insight into subclinical pelvic inflammatory disease. *Obstet. Gynecol.* *100*, 456-463.
- Wilde,J.I. and Watson,S.P. (2001). Regulation of phospholipase C gamma isoforms in haematopoietic cells: why one, not the other? *Cell Signal.* *13*, 691-701.

- Wissel,H., Schulz,C., Rudiger,M., Krull,M., Stevens,P.A., and Wauer,R.R. (2003). Chlamydia pneumoniae affect surfactant trafficking and secretion due to changes of type II cell cytoskeleton. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29, 303-313.
- World Health Organisation (2001). Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Diseases. www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/000.htm.
- World Health Organisation (2005). Cardiovascular disease: prevention and control. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/cvd/en/>.
- Wyrick,P.B. (2000). Intracellular survival by Chlamydia. *Cell Microbiol.* 2, 275-282.
- Wyrick,P.B., Choong,J., Davis,C.H., Knight,S.T., Royal,M.O., Maslow,A.S., and Bagnell,C.R. (1989). Entry of genital Chlamydia trachomatis into polarized human epithelial cells. *Infect. Immun.* 57, 2378-2389.
- Yaffe,M.B. (2002). Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 177-186.
- Yen,T.Y., Pal,S., and de la Maza,L.M. (2005). Characterization of the disulfide bonds and free cysteine residues of the Chlamydia trachomatis mouse pneumonitis major outer membrane protein. *Biochemistry* 44, 6250-6256.
- Yeung,T., Ozdamar,B., Paroutis,P., and Grinstein,S. (2006). Lipid metabolism and dynamics during phagocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 429-437.
- Zaretzky,F.R., Pearce-Pratt,R., and Phillips,D.M. (1995). Sulfated polyanions block Chlamydia trachomatis infection of cervix-derived human epithelia. *Infect. Immun.* 63, 3520-3526.
- Zeichner,S.L. (1982). Isolation and characterization of phagosomes containing Chlamydia psittaci from L cells. *Infect. Immun.* 38, 325-342.
- Zhang,J.P. and Stephens,R.S. (1992). Mechanism of C. trachomatis attachment to eukaryotic host cells. *Cell* 69, 861-869.
- Zhou,D., Chen,L.M., Hernandez,L., Shears,S.B., and Galan,J.E. (2001). A Salmonella inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol. Microbiol.* 39, 248-259.

11. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas F. Meyer für die zahlreichen anregenden Diskussionen zu den Themen „Tarp und Chlamydieninvasion“ sowie für die Bereitstellung ausgezeichneter Arbeitsbedingungen in der Abteilung Molekulare Biologie am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Matthias Selbach für Diskussionen, Recherchen, Korrekturen und zahllose Vorschläge zum Thema „Tarp Phosphorylierung“ und vor allem für den sonnigen Tag im Sommer 2004 an dem das Projekt entstanden ist.

I would like to specially thank Dr. Hans Thorn for the help during the critical phase of the “PEEI project”. Without his help, there would be no exciting confocal live cell imagings or electron microscopy pictures. It is a great pleasure for me to thank him for many long and fruitful discussions in front of different microscopes.

Der gesamten Chlamydien-Arbeitsgruppe, besonders aber Dagmar, André, Anette, Elke, Hesham, Joscha, Marion, Peter, Christoph und Simone danke ich für die kooperative Atmosphäre, die Unterstützung im Labor und vor allem die anregenden Diskussionen über Wesentliches und weniger Wesentliches. Peter und Daniel möchte ich für die Korrektur dieser Arbeit danken. Ich möchte mich auch bei Wolfgang, der mich bei meinen ersten „Gehversuchen“ auf dem Gebiet „Chlamydiale Invasion“ unterstützt hat, ganz herzlich bedanken

Herrn Prof. Dr. Ulf Stahl danke ich für die Vertretung meiner Dissertation im Institut für Biotechnologie im Fachbereich Mikrobiologie und Genetik der Technischen Universität Berlin und die Begutachtung der Arbeit.

Tanja und ihrer phantastischen Familie danke ich für die vielen gemeinsam verbrachten Stunden und Tanja möchte ich noch ganz besonders für ihre Geduld danken. Meiner Familie und vor allem meinen Eltern gilt mein größter Dank für die Ermutigung meiner Pläne und die vorbehaltlose Unterstützung in jeder Hinsicht.

14. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln erstellt habe.

Berlin, den 8. Dezember 2007