TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Medizinische Mikrobiologische, Immunologie und Hygiene

Einfluss Chlamydialer Pathogenitätsfaktoren auf das Bakterielle Wachstum und Zelluläre Signalwege

Jan Gregor Christian

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	UnivProf. Dr. Chr. F. W. Becker
Prüfer:	

- 1. Univ.-Prof. Dr. M. Groll
- 2. <u>Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker</u>, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Die Dissertation wurde am <u>11.07.2011</u> bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am <u>04.08.2011</u> angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürz	ungsverzeichnis	V
Abbildu	ungsverzeichnis	Χ
Summa	ary	(
Zusamr	menfassungX	
1 Einle	eituna	.1
1.1 C	hlamydien	1
1.1.1	Taxonomie	1
1.1.2	Medizinische Relevanz von chlamydialen Infektionen	. 2
1.2 M	olekulare Grundlagen des chlamydialen	
Entwic	klungszyklus	.4
1.2.1	Invasion von Wirtszellen	. 6
1.2.2	Die chlamydiale Vakuole	. 6
1.2.3 Entwi	Chlamdiale Differnzierungsvorgänge und Komplettierung des cklungszyklus	. 7
1.2.4	Persistente Infektionen	. 8
1.2.5	Immunantwort nach Infektion mit <i>C. trachomatis</i>	. 8
1.3 W	/irt-Pathogen-Interaktionen während chlamydialer Infektio	n9
1.3.1	Zytoskelettveränderungen	11
1.3.1 1.3.1	I.1Grundlagen des ZytoskelettaufbausI.2Zytoskelettveränderungen während chlamydialen Infektionen	.11 .11
1.3.2	Anpassung des intrazellulären Transports	12
1.3.3	Unterdrückung der Apoptose	13
1.3.3 1.3.3	3.1 Grundlagen apoptotischer Signalwege3.2 Zelltod nach chlamydialer Infektionen	.13 .14
1.3.4	Modulation der Immunantwort nach Infektion	15
1.3.4 1.3.4 1.3.4 1.3.4	 4.1 Detektion von Chlamydien und Abschwächung der Immunantwort 4.2 Modulation inflammatorischer Prozesse 4.3 Grundlagen des NF-κB-Signalwegs 4.4 NF-κB-Signale während Infektionen 	.16 .17 .18 .21
1.4 D	er chlamydiale Effektor CPAF	22
1.4.1	Struktur und Homologien	22
1.4.2	Aktivierungs- und katalytischer Mechanismus	23

1.4.3	CPAF-abhängige Substratspaltung	25
1.5 Zie	lsetzung	27
2 Mater	ialien und Methoden	29
2.1 Mat	terialien	29
2.1.1	Geräte	29
2.1.2	Chemikalien	31
2.1.3	Puffer, Lösungen und Medien	33
2.1.4	Plasmide	37
2.1.5	Bakterien	39
2.1.6	Zelllinien	40
2.1.7	Antikörper	41
2.2 Met	thoden	43
2.2.1	Zellbiologische Methoden	43
2.2.1.1	Kultivierung von eukarvotischen Zelllinien	43
2.2.1.2	Test auf Mykoplasmenkontamination	43
2.2.1	.2.1 MycoAlert [®] Mycoplasma Detection Kit	43
2.2.1	.2.2 Venor [®] GeM Mycoplasma-PCR Detection Kit	44
2.2.1.3	Transfektion mit FuGENE HD	44
2.2.1.4	Herstellung von genetisch veränderten Lentiviren	44
2.2.1.5	Lentivirale Transduktion eukaryotischer Zellen	45
2.2.1.6	Zelliyse	45
2.2.1	.6.1 Lyse eukaryotischer Zellen durch Triton-X 100 bzw. NP-40	45
2.2.1	6.2 Lyse eukaryotischer Zellen durch RiPA-Puller	46
2.2.1	6.4 Horstellung von nukleären und zutosolischen Zellucaten	40
2.2.1	Kryokonservierung von Zellen	40 <i>A</i> 7
2.2.1.7	Mikrobiologische Methoden	
	Chlomudian	47
د د د	Chiamydien	47
2.2.2	1.2 Infektion mit Chlamydia proumoniae	47 ۸۰
2.2.2	1.2 Intertion fint Chamydia predmonide	40 19
2.2.2	Transformation yon chemokompetenten Eschericha coli TOP10	40 48
2.2.2.3	Isolierung von Plasmid-DNS aus Eschericha coli	49
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	49
2.2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	49
2.2.3.2	Agarose-Gelelektrophorese	50
2.2.3.3	Aufreinigung von PCR-Produkten und linearen DNS-Fragmenten	50
2.2.3.4	Restriktionsverdau	50
2.2.3.5	Ligation	50

	2.2.3.6	Zellfreier Test der Proteaseaktivität	51
	2.2.3.7	Bradford Assay	51
	2.2.3.8	SDS-PAGE	51
	2.2.3.9	EZ-Run [®] -Gel System	52
	2.2.3.10	Ponceau-Färbung	52
	2.2.3.11	Western Blot	52
	2.2.3.12	Entfernen gebundener Antikörper von Nitrozellulosemembranen	53
	2.2.3.13	Analyse der Zellvitalität	53
	2.2.3.14	Analyse der Genexpression via Luziferase-Reportergenassay	53
	2.2.3.15	Detektion von sezerniertem IL-8	54
	2.2.3.16	Durchflusszvtometrie	54
	2.2.3.17	Intrazelluläre Färbung und durchflusszytometrische Analyse	55
	2.2.4 Pro	oteinbiochemische Methoden	56
			50
	2.2.4.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	
	2.2.4.2	Aufschluss bakterieller Zellen	
	2.2.4.3	Affinitatschromatographie an NiNTA-Saulen	57
	2.2.4.4	Entsalzung von Proteinlösungen an Desalting-Säulen	57
	2.2.4.5	Ionenaustausch-Chromatographie an <i>Resouce</i> ™Q-Säulen	58
	2.2.4.6	Affinitätsreinigung von Antikörpern	58
	2.2.5 Mil	kroskopische Methoden	59
	2.2.5.1	Lichtmikroskopische Analyse der Zellmorphologie	59
	2.2.5.2	Konfokale Mikroskopie	
	22521	Introzollulära Färbung von Chlamudia tracherastia	60
	Z.Z.J.Z.I	Intrazellulare Farbung von Chlomvala trachomatis	
3	Fraebni	SSA	61
3	Ergebni	SSE	61
3 3	Ergebni .1 Erwei	sse terung des Substratspektrums von CPAF	61 61
3 3	Ergebni .1 Erwei 3.1.1 Ve	SSE terung des Substratspektrums von CPAF rifizierung publizierter CPAF-Substrate	61 61
3 3	Ergebni .1 Erwei 3.1.1 Ve 3.1.2 Ide	SSE terung des Substratspektrums von CPAF rifizierung publizierter CPAF-Substrate	61 61 61 63
3 3	Ergebni .1 Erwei 3.1.1 Ve 3.1.2 Ide 3.1.3 Üb Infektion e	SSE terung des Substratspektrums von CPAF rifizierung publizierter CPAF-Substrate entifikation neuer CPAF-Substrate erprüfung CPAF-abhängiger Substratspaltung nach chlamy ukaryotischer Zellen	61 61 61 63 /dialer 66
333	Ergebni .1 Erwei 3.1.1 Ve 3.1.2 Ide 3.1.3 Üb Infektion e	SSE terung des Substratspektrums von CPAF rifizierung publizierter CPAF-Substrate entifikation neuer CPAF-Substrate erprüfung CPAF-abhängiger Substratspaltung nach chlamy ukaryotischer Zellen	61 61 61 63 /dialer 66
3 3 3 P	Ergebni 5.1 Erwei 3.1.1 Ve 3.1.2 Ide 3.1.3 Üb Infektion e 5.2 Einfül Proteasefu	SSE terung des Substratspektrums von CPAF rifizierung publizierter CPAF-Substrate entifikation neuer CPAF-Substrate erprüfung CPAF-abhängiger Substratspaltung nach chlamy ukaryotischer Zellen hrung neuer CPAF-Inhibitoren zur Analyse der inktion während chlamydialer Infektionen	61 61 61 63 /dialer 66
3 3 3 P	Ergebni 5.1 Erwei 3.1.1 Ve 3.1.2 Ide 3.1.3 Üb Infektion e 5.2 Einfül Proteasefu 3.2.1 Infe	SSE terung des Substratspektrums von CPAF rifizierung publizierter CPAF-Substrate entifikation neuer CPAF-Substrate erprüfung CPAF-abhängiger Substratspaltung nach chlamy ukaryotischer Zellen hrung neuer CPAF-Inhibitoren zur Analyse der inktion während chlamydialer Infektionen	61 61 61 63 /dialer 66
3 3 3 P	Ergebni 5.1 Erwei 3.1.1 Ve 3.1.2 Ide 3.1.3 Üb Infektion e 5.2 Einfül Proteasefu 3.2.1 Infektion e	SSE terung des Substratspektrums von CPAF rifizierung publizierter CPAF-Substrate entifikation neuer CPAF-Substrate erprüfung CPAF-abhängiger Substratspaltung nach chlamy ukaryotischer Zellen hrung neuer CPAF-Inhibitoren zur Analyse der Inktion während chlamydialer Infektionen hibition von CPAF durch Lactacystin	61 61 61 63 /dialer 66 68 68 68
3 3 9 P	Ergebni .1 Erwei 3.1.1 Ve 3.1.2 Ide 3.1.3 Üb Infektion e .2 Einfül Proteasefu 3.2.1 Inf 3.2.2 WE	SSE terung des Substratspektrums von CPAF rifizierung publizierter CPAF-Substrate entifikation neuer CPAF-Substrate erprüfung CPAF-abhängiger Substratspaltung nach chlamy ukaryotischer Zellen hrung neuer CPAF-Inhibitoren zur Analyse der Inktion während chlamydialer Infektionen hibition von CPAF durch Lactacystin EHD-fmk beeinträchtigt die Entwicklung von <i>C. trachomatis</i> WEHD-fmk inhibitort CPAF-abhängige Spaltungsvorgänge während	61 61 61 63 /dialer 66 68 68 68
3 3 9 9	Ergebni 5.1 Erwei 3.1.1 Ve 3.1.2 Ide 3.1.3 Üb Infektion e 5.2 Einfül Proteasefu 3.2.1 Inh 3.2.2 WE 3.2.21 chlamydia	SSE terung des Substratspektrums von CPAF rifizierung publizierter CPAF-Substrate entifikation neuer CPAF-Substrate erprüfung CPAF-abhängiger Substratspaltung nach chlamy ukaryotischer Zellen hrung neuer CPAF-Inhibitoren zur Analyse der Inktion während chlamydialer Infektionen bibition von CPAF durch Lactacystin EHD-fmk beeinträchtigt die Entwicklung von <i>C. trachomatis</i> WEHD-fmk inhibiert CPAF-abhängige Spaltungsvorgänge während lan Infektionen	61 61 61 63 /dialer 66 68 68 71
3 3 9 9	Ergebni .1 Erwei 3.1.1 Ve 3.1.2 Ide 3.1.3 Üb Infektion e .2 Einfül Proteasefu 3.2.1 Inh 3.2.2 WE 3.2.2.1 chlamydia 3.2.2.2	SSE terung des Substratspektrums von CPAF rifizierung publizierter CPAF-Substrate entifikation neuer CPAF-Substrate erprüfung CPAF-abhängiger Substratspaltung nach chlamy ukaryotischer Zellen nrung neuer CPAF-Inhibitoren zur Analyse der Inktion während chlamydialer Infektionen bibition von CPAF durch Lactacystin EHD-fmk beeinträchtigt die Entwicklung von <i>C. trachomatis</i> WEHD-fmk inhibiert CPAF-abhängige Spaltungsvorgänge während len Infektionen	61 61 61 63 /dialer 66 68 68 68 61 61 61 61 61 61 61 61 61 61 61 61 61 61
3 3 9	Ergebni 3.1.1 Erwei 3.1.1 Ve 3.1.2 Ide 3.1.3 Üb Infektion e 3.2 Einfül Proteasefu 3.2.1 Inh 3.2.2 WE 3.2.2.1 chlamydia 3.2.2.2 3.2.3 WE	SSE terung des Substratspektrums von CPAF rifizierung publizierter CPAF-Substrate entifikation neuer CPAF-Substrate erprüfung CPAF-abhängiger Substratspaltung nach chlamy ukaryotischer Zellen hrung neuer CPAF-Inhibitoren zur Analyse der inktion während chlamydialer Infektionen EHD-fmk beeinträchtigt die Entwicklung von <i>C. trachomatis</i> WEHD-fmk inhibiert CPAF-abhängige Spaltungsvorgänge während len Infektionen WEHD-fmk führt zu einer Retardierung der chlamydialen Entwicklur EHD-fmk inhibiert CPAF nach ektopischer Expression	61 61 61 63 /dialer 66 68 68 68 71 71 71
3 3 9	Ergebni 3.1.1 Erwei 3.1.1 Ve 3.1.2 Ide 3.1.3 Üb Infektion e 5.2 Einfül Proteasefu 3.2.1 Inh 3.2.2 We 3.2.2.1 chlamydia 3.2.2.2 3.2.3 We 3.2.4 An	SSE terung des Substratspektrums von CPAF rifizierung publizierter CPAF-Substrate entifikation neuer CPAF-Substrate erprüfung CPAF-abhängiger Substratspaltung nach chlamy ukaryotischer Zellen nrung neuer CPAF-Inhibitoren zur Analyse der inktion während chlamydialer Infektionen hibition von CPAF durch Lactacystin EHD-fmk beeinträchtigt die Entwicklung von <i>C. trachomatis</i> WEHD-fmk inhibiert CPAF-abhängige Spaltungsvorgänge während len Infektionen WEHD-fmk führt zu einer Retardierung der chlamydialen Entwicklur EHD-fmk inhibiert CPAF nach ektopischer Expression alyse des inhibitorischen Effekts von WEHD-fmk	61 61 61 63 /dialer 66 68 68 68 61 61 61 61 61 61 61 61 61 61 61 61 63 63 66
3 3 7	Ergebni 5.1 Erwei 3.1.1 Ve 3.1.2 Ide 3.1.3 Üb Infektion e 5.2 Einfül Proteasefu 3.2.1 Inf 3.2.2 WE 3.2.2.1 chlamydia 3.2.2.2 3.2.3 WE 3.2.4 An 3.2.4 1	SSE terung des Substratspektrums von CPAF rifizierung publizierter CPAF-Substrate entifikation neuer CPAF-Substrate erprüfung CPAF-abhängiger Substratspaltung nach chlamy ukaryotischer Zellen hrung neuer CPAF-Inhibitoren zur Analyse der inktion während chlamydialer Infektionen EHD-fmk beeinträchtigt die Entwicklung von <i>C. trachomatis</i> WEHD-fmk inhibiert CPAF-abhängige Spaltungsvorgänge während len Infektionen WEHD-fmk führt zu einer Retardierung der chlamydialen Entwicklur Substratspaltung von CPAF and ektopischer Expression alyse des inhibitorischen Effekts von WEHD-fmk	61 61 61 63 /dialer 66 68 68 71 71 71 71 71 78 78 82
3 3 9	Ergebni 3.1.1 Erwei 3.1.1 Ve 3.1.2 Ide 3.1.3 Üb Infektion e 3.2 Einfül Proteasefu 3.2.1 Inh 3.2.2 WE 3.2.2 WE 3.2.2.1 chlamydia 3.2.2.2 3.2.3 WE 3.2.4 An 3.2.4.1 3.2.4.1 3.2.4.1 3.2.4.1	SSE terung des Substratspektrums von CPAF rifizierung publizierter CPAF-Substrate entifikation neuer CPAF-Substrate erprüfung CPAF-abhängiger Substratspaltung nach chlamy ukaryotischer Zellen hrung neuer CPAF-Inhibitoren zur Analyse der Inktion während chlamydialer Infektionen EHD-fmk beeinträchtigt die Entwicklung von <i>C. trachomatis</i> WEHD-fmk inhibiert CPAF-abhängige Spaltungsvorgänge während len Infektionen WEHD-fmk führt zu einer Retardierung der chlamydialen Entwicklur EHD-fmk inhibiert CPAF nach ektopischer Expression WEHD-fmk inhibiert aktiviertes CPAF WEHD-fmk inhibiert aktiviertes CPAF	61 61 61 61 63 /dialer 66 68 68 68 68 71 71 71 71 78 78

3.2.5	Test von Peptid-fmk Inhibitoren auf CPAF-blockierende Effekte 86
3.2.5 3.2.5 nach	 Analyse von Peptid-fmk Inhibitoren auf CPAF-blockierende Effekte86 WEHD-fmk und VEID-fmk hemmen CPAF-abhängige Substratspaltung Chlamydialer Infektion
3.2.5	5.3 VEID-fmk hemmt CPAF-abhängige Substratspaltung in CPAF-
expri	mierenden Zellen
3.2.5	
3.3 El	uktion
3.3.1	Spaltung von p65/ReIA nach chlamydialer Infektion
3.3.1 3.3.1	.1 p65/ReIA-Spaltung nach Infektion mit <i>C. trachomatis</i>
3.3.2	Die chlamydiale Protease spaltet p65/ReIA
3.3.3	CPAF inhibiert den NF-κB-Signalweg
3.3.3 und (3.3.3 3.3.3 3.3.3 3.3.3 3.3.3	 Überprüfung von Proteinen des NF-κB-Signalwegs nach CPAF-Expression chlamydialer Infektion CPAF inhibiert NF-κB-Aktivität nach ektopischer Expression NF-κB-Aktivität wird während chlamydialer Infektion inhibiert CPAF-generierte p65/RelA-Spaltprodukte verbleiben im Zytosol CPAF verringert die Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8 108
4 Disk	ussion110
4.1 C	PAF-abhängige Substratspaltung: Relevanz für die
Chlam	ydieninfektion110
4.2 No	eue Möglichkeiten zur Blockierung der Funktion des /dialen Effektorproteins CPAF114
4.2.1	Möglichkeiten der Funktionsweise von WEHD-fmk und VEID-fmk114
4.2.2	Konsequenzen der Identifikation neuer CPAF-Inhibitoren
13 C	PAE-abhängige Unterdrückung inflammatorischer Signal-
transd	uktion
431	Einordung der CPAE-abhängigen Spatung von n65/RelA 120
432	Konsequenzen einer Unterdrückung von NF-KB-Signalen während
chlam	ydialer Infektion
5 Liter	aturverzeichnis128
6 Danl	ksagung138

Abkürzungsverzeichnis

А	Ampère
AA	Arachidonsäure
AHT	Anhydrotetracyclin
AJ	"adherence junction"
Ala, A	Alanin
Alix	"ALG2-interacting protein X"
APAF-1	"apoptotic-protease-activating factor"
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ARF 6	"ADP ribosylation factor 6"
Arg, R	Arginin
Arp 2/3-Komplex	Komplex aus den "actin related proteins" Arp 2 und Arp 3
ATCC	"American Type Culture Collection"
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAD	"Bcl-2-antagonist of cell death"
Bak	"Bcl-2-antagonist/killer"
Bax	"Bcl-2-associated X protein"
Bcl-2	"B-cell leukimia/lymphoma-2"
BD	Becton Dickenson
BH	Bcl-2-Homologie Domäne
Bid	"BH3-interacting-domain death agonist"
Bim	"Bcl-2 interacting mediator of cell death"
BSA	Rinderserumalbumin
C. abortus	Chlamydia abortus
CD1d	"cluster of differentiation 1d"
CD4	"CD4 antigen"
CD8	"CD8 antigen"
CD40	"CD40 antigen"
CDK1	"cyclin-dependent kinase 1"
cDNS	komplementäre DNS
ChlaDub	"chlamydial deubiqutinase"
cHsp60	"chlamydial heat shock protein 60"
CK8	Zytokeratin 8
CK18	Zytokeratin 18
СМ	Coumermycin
CPAF	"chlamydial protease-like activity factor"
CPP	C-terminal prozessierende Proteasen

C. pn.	Chlamydia pneumoniae
C. pneumoniae	Chlamydia pneumoniae
C. psittaci	Chlamydia psittaci
C. trach.	Chlamydia trachomatis
C. trachomatis	Chlamydia trachomatis
СТ	Chlamydia trachomatis
Cy5	wasselösliche Cyanin-Farbstoffe
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
Z-DEVD-fmk	Benzyloxycarbonyl-Aspartat-Glutamat(OMethyl)-Valin-Aspartat
	(OMethyl)-fluoromethylketon
DISC	"death inducing signalling complex"
DMEM	"dulbecco's minimal essential medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EB	Elementarkörper
ECL	"enhanced chemoluminescence"
E. coli	Escherichia coli
eEF-2	"eukaryotic translation elongation factor 2"
Ерох	Epoxomicin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
Erk 1/2	"extracellular signal-regulated kinase"
FACS	"fluorescence-activated cell sorter"
Fas/CD95	"TNF receptor superfamily, member 6"
FCS	Fötales Kälberserum ("fetal calf serum")
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FtsZ	"filamenting temperature-sensitive mutant Z"
GAG	Glukosaminoglykan
GAPDH	"glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase"
GFP	"green fluorescent protein"
Gly, G	Glycin
GM-CSF	"granulocyte macrophage colony-stimulating factor"
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)

HCI	Salzsäure
HDAC-1	Histon-Deacetylase-1
HEK-Zellen	"human embryonic kidney"-Zellen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMGB-1	"high mobility group box 1"
IAP	"inhibitor of apoptosis protein"
ICAM	"intracellular adhesion molecule"
Ι-κΒ-α	"inhibitor of kappa light chain gene enhancer in B cells alpha"
IKK-Komplex	I-ĸB-Kinase-Komplex
IFNγ	Interferon y
IL-1α	Interleukin 1a
IL-1β	Interleukin 1β
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
kB	Kilobasenpaar
LB	Luria-Bertani
LC	"clasto-Lactacystin β -lacton"
Z-LEHD-fmk	Benzyloxycarbonyl-Leucin-Glutamat(OMethyl)-Histidin-Aspartat
	(OMethyl)-fluoromethylketon
Leu, L	Leucin
LGV	Lymphogranuloma venereum
LPS	Lipopolysaccharid
Lys, K	Lysin
μΙ	Mikroliter
μΜ	Mikrometer
Μ	Molar (Mol/I)
MAPK	"mitogen-activated protein kinase"
MEF	embryonale Fibroblasten aus Maus
MEKK-1	"MAP kinase or ERK kinase kinase"
min	Minuten
MHC	"major histocompatibility complex"
MOI	"multiplicity of infection"
mol	1 mol enthält 6.022x 10 ²³ Moleküle
MOMP	"major outer membrane protein"
Mst-4	"Mst-3 and Sok-1-related kinase"
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NF-ĸB	Nukleärer Faktor κB

Abkürzungsverzeichnis

ng	Nanogramm
NIK	"NF-kappa-B-inducing kinase"
NKT	Natürliche Killer-T-Zellen ("natural killer-T-cells")
NOD	"nucleotide-binding oligomerization domain protein"
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
OmcB	"outer membrane protein II"
OmpA	"major outer membrane protein A"
p65/ReIA	"V-Rel avian reticuloenndotheliosis viral oncogene homolog A"
PAMP	"pathogen associated molecular pattern"
PARP	"poly-(ADP-Ribose)-Polymerase"
PBS	"phosphate-buffered saline"
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain Reaction")
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
pl	Isoelektrischer Punkt
рН	Maß für den Säuregrad
ΡΚϹδ	Proteinkinase C delta
PRR	"pattern recognition receptor"
Rab	"ras-related in brain"
RB	Retikularkörper
rDNS	ribosomale DNS
RelB	"V-Rel avian reticuloenndotheliosis viral oncogene homolog B"
RFX5	"regulatory factor X subunit 5"
Rho A	"ras homolog gene family, member A"
rpm	"rounds per minute"
rRNS	ribosomale RNS
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektophorese
Ser, S	Serin
SEM	"standard error of the mean"
SOC-Medim	"super optimal broth with catabolite repression"
SNARE	"synaptosome-associated protein receptor"
T3S	Typ III Protein-Sekretionssystem
T _H -Zelle	T-Helferzellen
tBid	verkürztes Bid

Tet	Tetracyclin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TJ	"tight junction"
TNF-α	"tumor necrosis factor-α"
TNF-R	TNF-Rezeptor
Tsp	"tail-specific protease"
TLR	"toll-like receptor"
ü. N.	über Nacht
U	Unit(s)
UV	ultraviolett
USF-1	"upstream stimulatory factor 1"
UTP	Uracil-5`-triphosphat
V	Volt
VCAM	"vascular cell adhesion protein 1"
Z-VEID-fmk	Benzyloxycarbonyl-Valin-Glutamat(OMethyl)-Isoleucin-
	Aspartat(OMethyl)-fluoromethylketon
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
WAVE 2	"WASP-family protein member 2"
Z-WEHD-fmk	Benzyloxycarbonyl-Tryptophan-Glutamat(OMethyl)-Histidin-
	Aspartat(OMethyl)-fluoromethylketon
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
wt	Wildtyp
z-VAD-fmk	Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-fluoromethylketon

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der chlamydiale Entwicklungszyklus	5
Abb. 2: Wirt-Pathogen-Interaktionen während chlamydialer Infektionen	10
Abb. 3: Grundlagen des NF-кB-Signalwegs	20
Abb. 4: Aktivierungsmechanismus der chlamydialen Protease CPAF	25
Abb. 5: CPAF-abhängige Substratspaltung	62
Abb. 6: Spaltung neu ermittelter Substrate nach ektopischer CPAF-Expression	65
Abb. 7: Spaltung neu ermittelter CPAF-Substrate erfolgte nach Infektion mit C. trachomati	is. 66
Abb. 8: Lactacystin inhibiert CPAF	69
Abb. 9: WEHD-fmk inhibiert CPAF-abhängige Spaltung während chlamydialen Infektioner	า.72
Abb. 10: WEHD-fmk unterdrückt einen Chlamydien-vermittelten Schutz vor Apoptose	73
Abb. 11: WEHD beeinträchtigt den Verlauf chlamydialer Infektionen	75
Abb. 12: WEHD-fmk kann eine Retardierung chlamydialen Wachstums hervorrufen	77
Abb. 13: WEHD-fmk blockiert CPAF-Aktivität.	79
Abb. 14: WEHD-fmk blockiert CPAF-abhängige Substratspaltung	81
Abb. 15: WEHD-fmk blockiert aktives CPAF	82
Abb. 16: WEHD-fmk blockiert rekombinantes CPAF	84
Abb. 17: WEHD-fmk blockiert CPAF-Aktivität unabhängig von Caspasen	85
Abb. 18: Test von Peptid-fmk Inhibitoren auf CPAF-Blockierung	86
Abb. 19: VEID-fmk hemmt CPAF-abhängige Substratspaltung nach Infektion	87
Abb. 20: VEID-fmk blockiert CPAF-Aktivität	88
	00
Abb. 21: VEID-fmk blockiert rekombinantes CPAF.	89
Abb. 21: VEID-fmk blockiert rekombinantes CPAF Abb. 22: Infektion von T-REx-293 und MEF Zellen mit <i>C. trachomatis</i> hat p65/ReIA-Spaltu zur Folge.	89 89 91
 Abb. 21: VEID-fmk blockiert rekombinantes CPAF. Abb. 22: Infektion von T-REx-293 und MEF Zellen mit <i>C. trachomatis</i> hat p65/RelA-Spaltu zur Folge. Abb. 23: Infektion von T-REx-293 und MEF Zellen mit <i>C. pneumoniae</i> hat p65/RelA-Spalt zur Folge. 	89 91 91 ung 93
 Abb. 21: VEID-fmk blockiert rekombinantes CPAF. Abb. 22: Infektion von T-REx-293 und MEF Zellen mit <i>C. trachomatis</i> hat p65/ReIA-Spaltu zur Folge. Abb. 23: Infektion von T-REx-293 und MEF Zellen mit <i>C. pneumoniae</i> hat p65/ReIA-Spalt zur Folge. Abb. 24: Induktion der chlamydialen ,Protease CPAF hat p65/ReIA-Spaltung zur Folge. 	89 91 91 93 94
 Abb. 21: VEID-fmk blockiert rekombinantes CPAF. Abb. 22: Infektion von T-REx-293 und MEF Zellen mit <i>C. trachomatis</i> hat p65/ReIA-Spaltu zur Folge. Abb. 23: Infektion von T-REx-293 und MEF Zellen mit <i>C. pneumoniae</i> hat p65/ReIA-Spalt zur Folge. Abb. 24: Infektion der chlamydialen ,Protease CPAF hat p65/ReIA-Spaltung zur Folge. Abb. 25: p65/ReIA-Spaltung durch chlamydiale Proteasen. 	89 Ing 91 ung 93 94 95
 Abb. 21: VEID-fmk blockiert rekombinantes CPAF. Abb. 22: Infektion von T-REx-293 und MEF Zellen mit <i>C. trachomatis</i> hat p65/ReIA-Spaltu zur Folge. Abb. 23: Infektion von T-REx-293 und MEF Zellen mit <i>C. pneumoniae</i> hat p65/ReIA-Spalt zur Folge. Abb. 24: Induktion der chlamydialen ,Protease CPAF hat p65/ReIA-Spaltung zur Folge. Abb. 25: p65/ReIA-Spaltung durch chlamydiale Proteasen. Abb. 26: Inhibition von CPAF blockiert p65/ReIA-Spaltung. 	88 89 91 ung 93 93 94 95 97

Abb. 28: Chlamydiale Infektion führt nicht zur Spaltung von IKK-Proteinen und I-κB-α99
Abb. 29: Einfluss ektopischer CPAF-Expression auf den IKK-Komplex
Abb. 30: Einfluss ektopischer CPAF-Expression auf Ι-κΒ-α Degradierung und den MAPK- Signalweg
Abb. 31: CPAF inhibiert NF-kB-abhängige Gen-Expression103
Abb. 32: AHT und CM beeinträchtigen die NF-kB-Aktivität nicht
Abb. 33: C. trachomatis Infektion inhibiert NF-кB-abhängige Genexpression
Abb. 34: CPAF-generierte p65/ReIA-Spaltprodukte verbleiben im Zytosol107
Abb. 35: CPAF hemmt die Sekretion des inflammatorischen Zytokins IL-8109

Summary

Chlamydiae elicit a variety of diseases in humans with *C. trachomatis* being the most prevalent species, infecting the eye and the genital tract. The members of the order *Chlamydiales* share an obligate intracellular, parasitic life style. Inside its hosts *Chlamydia* resides and replicates within a membranous vacuole in the cytoplasm termed the inclusion. Throughout their developmental cycle the bacteria interfere with cellular functions, such as vesicle and lipid trafficking, apoptosis or signal transduction events. It is hypothesized that effector proteins secreted from *Chlamydia* are responsible for these alterations. A potential key molecule in these processes is the secreted chlamydial protease "*Chlamydial Protease-like Activity Factor*" (CPAF). Although numerous CPAF-substrates have been identified in the past, a definite function of this protease during infection has yet to be established.

The central focus of the research described here was the question whether CPAF-activity is essential for intracellular survival of the bacteria and responsible for a number of biological changes in host cells. The identification of two novel inhibitors of the chlamydial protease the modified peptides WEHD-fmk and VEID-fmk - allowed a new approach. These substances, which were originally devised as caspase-inhibitors, not only suppressed CPAFdependent substrate cleavage events but also caused severe impairment of the pathogen's developmental cycle. These data suggest that CPAF is an essential factor for Chlamydia infections. Although the exact inhibitory mechanisms of WEHD-fmk and VEID-fmk have not been fully determined, in vitro experiments using recombinant CPAF show that the activated protease is inhibited by either peptide. Further experiments utilized a eukaryotic model of CPAF expression and C. trachomatis infection to identify new CPAF substrates. These studies found several putative substrates: septin-2, which forms filaments and interacts with the cytoskeleton; Mst-4, a Ste20-like kinase; eEF-2 an essential, translational factor and alix, a protein which has been proposed to have a role in apoptosis and protein degradation. Additional experiments provided data that CPAF cleaves the NF-KB-family protein p65/ReIA and thus interferes with inflammation associated cellular pathways. Cleavage occurred after ectopic CPAF expression and after infection with either C. trachomatis or C. pneumoniae in both murine and human cells and resulted in a strong reduction of NF-KB-activity upon inflammatory stimulation. As a consequence of this modification the secretion of the proinflammatory cytokine IL-8 was also significantly reduced by human cells.

In conclusion, the results from this work extend the group of CPAF substrates by identifying new substrates of diverse structure and function. In addition it introduces novel tools such as the peptide inhibitors WEHD-fmk and VEID-fmk to study the function of CPAF during chlamydial infections. Finally the demonstration that CPAF cleaves p65/ReIA and the consequential downregulation of NF- κ B signaling provides insights into how this protease could counteract cellular defense to ensure bacterial survival.

Zusammenfassung

Infektionen mit verschiedenen Chlamydien-Spezies sind die Ursache unterschiedlicher Krankheitsbilder des Menschen. Die meisten dieser Erkrankungen sind dabei auf *C. trachomatis* zurückzuführen und umfassen sowohl Infektionen der Augen als auch Sexualerkrankungen. Allen Mitgliedern der Ordnung *Chlamydiales* ist ein obligat intrazellulärer, parasitärer Entwicklungszyklus gemein. Nach Invasion ihrer Wirte liegen die Bakterien in einer membranumschlossenen Vakuole vor, in der sie sich replizieren, dem chlamydialen Einschluss. Während ihres gesamten Entwicklungszyklus modulieren Chlamydien zelluläre Funktion wie den Lipid- und den Vesikeltransport, die Apoptose oder zelluläre Signalwege. Nach bisherigen Erkenntnissen nimmt dabei die Sekretion chlamydialer Effektorproteine eine wesentliche Rolle ein. Ein zentraler Faktor scheint die chlamydiale Protease "*Chlamydial Protease-like Activity Factor*" (CPAF) zu sein, für die bereits eine Vielzahl an Substraten identifiziert wurde.

Im Zuge dieser Arbeit sollte CPAF weiter charakterisiert werden. Dabei sollte sowohl seine Bedeutung für die Chlamydienentwicklung als auch seine Beteiligung an Modulationen von Wirtszellfunktionen analysiert werden. Neue Erkenntnisse konnten durch die Einführung zweier CPAF-Inhibitoren - die Peptide WEHD-fmk und VEID-fmk- gewonnen werden. Beide Substanzen waren in der Lage CPAF-Aktivität bei ektopischer Expression und chlamydialer Infektion zu blockieren. Ferner konnte in Infektionsexperimenten beobachtet werden, dass CPAF für das Voranschreiten des chlamydialen Entwicklungszyklus von entscheidender Bedeutung ist. So hatte die Inhibition der Protease eine starke Retardierung chlamydialer Infektionen zur Folge. Über ein induzierbares Expressionssystem in eukaryotischen Zellen sowie C. trachomatis Infektionen war es in weiteren Experimenten möglich, das bekannte Substratspektrum von CPAF zu erweitern. Dieser methodische Ansatz ermöglichte die Identifikation putativer CPAF-Substrate: Septin-2, ein Filament-bildendes Protein, welches mit dem Zytoskelett interagiert; Mst-4, eine Ste20-artige Kinase; eEF-2, ein essentieller Faktor der Translation und Alix, ein Protein, welches möglicherweise in der Apoptose und der Degradierung von Proteinen beteiligt ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CPAF verschiedener human-pathogener Chlamydien-Spezies p65/ReIA spaltet, eine Komponente des dimeren Transkriptionsfaktors NF-kB. Dieser Vorgang ermöglicht der Protease den Eingriff in inflammatorische Prozesse. Spaltung von p65/ReIA wurde sowohl nach ektopischer CPAF-Expression als auch Infektion humaner und muriner Zellen mit verschiedenen human-pathogenen Chlamydien-Spezies beobachtet. Aus der Fragmentierung von p65/RelA resultierte nach inflammatorischer Stimulation eine verringerte transkriptionelle NF-κB-Aktivität und Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit durch den Einsatz zweier neuer CPAF-Inhibitoren dargelegt werden, dass es sich bei der Protease CPAF um einen essentiellen Faktor

chlamydialer Infektionen handelt, ohne den ein normaler Ablauf des Entwicklungszyklus unmöglich scheint. Im Zuge einer Erweiterung des Substratspektrums konnten wir zudem nachweisen, dass CPAF durch die Spaltung von p65/RelA in einen zentralen Signalweg der Wirtsabwehr eingreift, wodurch möglicherweise das Überleben der Bakterien erleichtert wird.

Im vergangenen Jahrhundert ermöglichten die Einführung von Impfstoffen, die Entwicklung von Antibiotika und die Anhebung hygienischer Standards eine zunehmend effektivere Prävention und Bekämpfung von Infektionskrankheiten. Trotzdem sind Infektionskrankheiten weltweit für etwa 15 Millionen Todesfälle pro Jahr verantwortlich [1]. In dieser Statistik unberücksichtigt sind nicht letale, jedoch dauerhafte, Schädigungen von Menschen durch Pathogene. Je nach Erreger und Krankheitsverlauf können diese in Art und Schwere variieren und beispielsweise Lähmungen, Organschäden oder Unfruchtbarkeit umfassen. Daher ist ein wesentliches Ziel infektionsbiologischer Forschung die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, sowie die Anpassung und Weiterentwicklung bestehender Therapien. Dies erfordert ein weitgehendes Verständnis der Funktionsweise eines Erregers, sowie dessen Interaktionen mit dem Wirt bzw. Eingriffe in seine Funktionen. Zur Analyse der genannten Prozesse dient ein breites Spektrum an Methoden, welche unter anderem Genomsequenzierungen und genetische Veränderungen eines Erregers, die Isolation einzelner Proteine und deren Strukturaufklärung und *"Microarray"*-Studien zur Analyse der Reaktion des Wirts umfasst.

1.1 Chlamydien

Chlamydien wurden erstmals Anfang des 20. Jahrhunderts von Ludwig Halberstädter und Stanislaus von Prowazeck in Indonesien als Auslöser des sog. Trachoms, einer chronischen Entzündung der Augen, beschrieben. Die in einer Vakuole residierenden Partikel, welche als Auslöser der Infektion vermutet wurden, klassifizierte man zunächst als Viren [2], später als Viren Mit Zwischenstufe von und Bakterien [3]. der Einführung besserer Gewebeschnitttechniken und der Elektronenmikroskopie in den 1960er Jahren erfolgte die Anpassung der Klassifikation und die Zuordnung zu den Bakterien als Ordnung Chlamydiales [4]. Grundlage hierfür waren Architektur und Bestandteile der Zellwand [5], das Vorhandensein von Ribosomen, die Lokalisation und Organisation chlamydialer DNS, sowie der Replikationsmodus [4, 6]. Allen Mitgliedern der Chlamydiales gemein ist ein obligat intrazellulärer Entwicklungszyklus, in welchem die Bakterien in einem eigenen Kompartiment vorliegen und mehrere distinkte Differenzierungsstufen durchlaufen [7, 8].

1.1.1 Taxonomie

Bis vor ca. 10 Jahren bestand die Ordnung *Chlamydiales* der *"Eubacteria"* aufgrund einer, auf phänotypischen, morphologischen und genetischen Daten basierenden Einteilung, lediglich aus drei Familien - *Chlamydiaceae*, welche pathoadaptive Erreger diverser Vertebraten umfassen, *Simkaniaceae* und *Parachlamydiaceae*. Die beiden letzt genannten

Familien enthielten Amöben infizierende, Chlamydien-artige Bakterien [9-11]. Durch neue, PCR-basierte Techniken und die Sequenzierung ganzer bakterieller Genome erfolgte eine Erweiterung der Ordnung. Die gewonnen Daten ermöglichten Einteilungen bzw. Zuweisungen zu *Chlamydiales* auf der Grundlage von Sequenzidentität ribosomaler RNS (rRNS), ribosomaler DNS (rDNS) und von "Housekeeping"-Genen [9, 12, 13]. Eine Zuordnung zur Ordnung *Chlamydiales* erfolgte ab einer Sequenzidentität von mindestens 80% im Falle der rDNS bzw. 90% bei rRNS [14]. Die Ordnung wurde so auf acht Familien mit insgesamt 13 Gattungen erweitert. Da die Mehrheit der Gattungen lediglich ein bis zwei Mitglieder aufweisen, ist zu vermuten, dass die tatsächliche Diversität der Ordnung deutlich größer ist als bisher bekannt [10].

Aufgrund der medizinischen Relevanz und der unterschiedlichen, mit der Infektion durch *C. trachomatis* und *C. psittaci* verbundenen Erkrankungen wurden diese Spezies über membranständige Antigene einer zusätzlichen serologischen Klassifizierung unterzogen [15-17]. Da in der vorliegenden Arbeit Wirt-Pathogen-Interaktionen von *C. trachomatis* untersucht wurden, beziehen sich die nachfolgenden Erläuterungen im speziellen auf diesen Vertreter der *Chlamydiaceae*.

1.1.2 Medizinische Relevanz von chlamydialen Infektionen

Die Mitglieder der *Chlamydiales* sind in der Lage, ein großes Spektrum an Wirten, von Säugern über Vögel bis hin zu einzelligen Organismen wie Amöben zu infizieren. Mit Erkrankungen des Menschen sind vor allem Mitglieder der *Chlamydiaceae* assoziiert [18]. Die größte medizinische Bedeutung kommt dabei *C. trachomatis* zu.

Serotyp-abhängig führt *C. trachomatis* zur Infektion des Konjunktival-Epithels der Augen oder der Epithelien des Genitaltrakts. Okulare Infektionen haben Entzündungen zur Folge, welche bei manchen Serovaren ohne Behandlung zur Entstehung von Trachomen führen können. Diese Komplikation geht einher mit Vernarbungen der *Cornea* und kann die Erblindung nach sich ziehen [19]. Weltweit wird die Anzahl an Trachomen auf 84 Millionen geschätzt, welche in 10% aller Fälle zu Defekten der Sehfähigkeit führen [20, 21].

Infektionen des Genitaltrakts durch *Chlamydia trachomatis* sind mit ca. 90 Millionen nachgewiesenen Neuinfektionen pro Jahr die häufigste bakterielle Geschlechtserkrankung [21]. Ausgehend von einem initialen Befall der Zervikalschleimhaut ist der Übergang der Infektion auf das Endometrium, die Tuben oder den Peritonealraum möglich. Bekannte Komplikationen umfassen Vernarbungen der Tuben, ektopische Schwangerschaften und Infertilität [20, 22]. Ferner haben genitale Chlamydieninfektionen der Mutter während der Schwangerschaft häufig eine Übertragung auf das Neugeborene bei der Geburt zur Folge [20]. Die Infektion des männlichen Genitaltraktes besteht meist aus einer Urethritis. Unbehandelte Fälle können beim Mann zu einem Befall von Prostata und Nebenhoden

führen. In diesem Zusammenhang werden ebenfalls Beeinträchtigungen der Fertilität diskutiert [23]. Neben den genannten Krankheitsbildern können *C. trachomatis LGV* Stämme zu einer weiteren sexuell übertragbaren Erkrankung führen, dem sog. *Lymphogranuloma venereum*. Die entzündliche Infektion der Lymphbahnen und -knoten kann zu Symptomen systemischer Infektionen und in chronischem Stadium zu Schädigungen des Lymphsystems, sowie zu Geschwüren im Genital- und Darmbereich führen [24, 25].

Eine zweite humanpathogene Spezies, Chlamydia pneumoniae, infiziert über Tröpfcheninfektion präferenziell den Respirationstrakt. Dort hat eine Infektion des Epitheliums und anderer Zellen meist subklinisch verlaufende Erkrankungen wie Pharyngitis, Sinusitis oder Bronchitis zur Folge [25, 26]. Im Vergleich zu C. trachomatis zeigt C. pneumoniae einen deutlich schwächeren Wirtszelltropismus. Infiziert C. trachomatis vor allem Epithelzellen, vermehrt sich C. pneumoniae anscheinend auch in glatten Muskelzellen, Endothelien und Makrophagen [26]. Dadurch ist den Bakterien eine Verbreitung über die Lunge hinaus möglich. Dies ist wahrscheinlich die Grundlage für die postulierte Assoziation von C. pneumoniae-Infektionen mit chronischen Erkrankungen [25]. So berichten verschiedene Studien, dass C. pneumoniae-Infektionen möglicherweise an der Entstehung von Arteriosklerose beteiligt sind [27, 28]. In diesem Zusammenhang weisen Arbeiten eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein des Erregers in arteriosklerotischen Plagues aus [29]. Daneben, allerdings kontroverser diskutiert, wird auch die Beteiligung von C. pneumoniae in neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer und Multiple Sklerose postuliert [25, 30, 31].

Neben diesen beiden Spezies gibt es einige Vertreter der *Chlamydiaceae*, die anthrozoonotisches Potential besitzen [18]. So sind Übertragungen von *Chlamydia psittaci*, und *C. abortus* auf den Menschen beschrieben. Beide können zu Infektionen der Lunge führen. *C. abortus* kann auch beim Menschen zum Tod des ungeborenen Kindes führen [18, 32].

Eines der größten Probleme der Behandlung von chlamydialen Infektionen ist deren häufiger asymptomatischer bzw. chronischer Verlauf [33]. Nach erfolgreicher Diagnose werden Infektionen mit Chlamydien durch Gabe von Antibiotika erfolgreich behandelt. Die chemotherapeutische Behandlung umfasst üblicherweise die Verwendung von Tetrazyklinen (Doxycyclin), Makroliden (Erythromycin, Clarithromycin oder Azithromycin) und Chinolonen (Levofloxazin) [20, 34].

3

1.2 Molekulare Grundlagen des chlamydialen Entwicklungszyklus

Allen Chlamydien gemein ist ein biphasischer Entwicklungszyklus. So sind während Infektionen verschiedene Differenzierungsstufen der Bakterien zu beobachten. Im Falle von С. trachomatis waren über elektronenmikroskopische Methoden zwei Differenzierungsstadien zu identifizieren [8]. Extrazellulär liegen Chlamydien als Elementarkörperchen ("elementary bodies", EBs) vor, welche sich durch einen Durchmesser von 0,2-0,6 µm und eine hohe Elektronendichte, als Konsequenz eines stark kondensierten bakteriellen Chromosoms, auszeichnen [35]. In diesem Stadium sind die Bakterien infektiös, allerdings nicht bzw. kaum metabolisch aktiv. Einzig eine Expression Stress-induzierter Gene - möglicherweise um ein längeres extrazelluläres Überleben zu ermöglichen - wird diskutiert [7, 36]. EBs sind nicht zur Replikation befähigt. Nach Eintritt in die Wirtszelle differenzieren Elementarkörperchen innerhalb eines Lipiddoppelmembran-umschlossenen Kompartiments der chlamydialen Vakuole oder dem Einschluss - in ihre metabolisch aktive Form [7, 37]. Die entstehenden Retikularkörperchen ("reticulate bodies", RBs) sind in Größe (Durchmesser von ca. 1 µm) und Morphologie (eher pleomorphes Erscheinungsbild) eindeutig von EBs zu unterscheiden und zeigen hohe metabolische Aktivität und Replikation (Rockey 2000). Im Verlauf des Entwicklungszyklus führen die Bakterien zu weitgreifenden Modifikationen des chlamydialen Kompartiments, Anpassung zellulärer Funktionen und der Wirtszellmorphologie Gegen Ende der Infektion findet in der chlamydialen Vakuole [37-39]. eine Rückdifferenzierung der RBs zu infektiösen EBs statt. Nach Abschluss dieses Vorgangs, 48-72 h Stunden nach Invasion, verlassen Chlamydien ihre Wirte, meist nach deren Lyse [40]. Eine schematische Darstellung des chlamydialen Entwicklungszyklus ist Abb. 1 zu entnehmen.



Abb. 1: Der chlamydiale Entwicklungszyklus

Chlamydien folgen einem biphasischen Entwicklungszyklus. So sind während einer Infektion zwei unterschiedliche Differenzierungsstufen der Bakterien nachzuweisen. Extrazellulär liegen Chlamydien als infektiöse EBs vor. Nach Infektion befinden sich diese in einer membranumschlossenen Vakuole. Dort differenzieren EBs zu RBs welche sich dann teilen. In Abhängigkeit der Menge an RBs beginnen die Bakterien gegen Ende des Entwicklungszyklus zu EBs rückzudifferenzieren. Einen Abschluss findet der Entwicklungszyklus durch Lyse der Zellen oder Extrusion der gesamten chlamydialen Vakuole. Bei einer Beeinträchtigung des Entwicklungszyklus, beispielsweise durch Immunmediatoren oder bei Nährstoffmangel, können die Bakterien in ein Persistenzstadium eintreten, in dem wenige übergroße RBs in der chlamydialen Vakuole vorliegen. Nach Entfernung des Stresses erfolgt die Wiederaufnahme des Zyklus.

1.2.1 Invasion von Wirtszellen

Der Eintritt von Chlamydien in ihre Zielzellen ist bisher noch nicht zur Gänze verstanden. Das aktuelle Modell postuliert einen mehrstufigen Anheftungsprozess von EBs an die Wirtszellen, gefolgt vom eigentlichen Eintrittsprozess [41-43]. Studien weisen darauf hin, dass in einem ersten Schritt eine elektrostatische Bindung zwischen Elementarkörpern und Wirtszelle über Heparansulfat-Glukosaminoglykane (GAG) stattfindet [44, 45]. Beteiligte Zellwandbestandteile und Proteine konnten bisher nicht identifiziert werden. Dem reversiblen GAG-vermittelten Schritt scheint ein temperatursensitiver, irreversibler Schritt zu folgen; vermutlich eine Rezeptor-Ligand-Interaktion zwischen Chlamydien und Zelle [42]. Auf chlamydialer Seite wurden zwar verschiedene Zellwandbestandteile (MOMP, OmcB, chlamydiales Hsp 70) mit den Anheftungsvorgängen in Verbindung gebracht, ein endgültiger Nachweis konnte jedoch in keinem Fall geführt werden [46, 47]. Auf Seite der Wirtszellen scheint die membranständige Proteindisulfidisomerse (PDI) sowohl für EB-Anbindung, als auch Eintritt in die Wirtszelle benötigt zu werden. Als zellulärer Rezeptor agiert PDI wohl möglicherweise ist ein Aufbrechen der Cysteinbrücken in chlamydialen nicht: Zellwandproteinen wie MOMP für die Invasion nötig [41, 47, 48].

Ein wesentliches Problem bei der Analyse der Invasion ist die Beobachtung, dass verschiedene chlamydiale Spezies und Serovare unterschiedliche Abläufe bei der Invasion von Wirtszellen aufweisen [37, 46]. Diese Variabilität hat zu teils widersprüchlichen Daten über die Bedeutung verschiedener endo- oder phagozytotischer Vorgänge geführt [37, 49] 53, Chen 2010). Trotzdem wird mittlerweile angenommen, dass der Invasion durch Chlamydien ein Triggermechanismus unterliegt. So konnte nach EB-Anheftung die Translokation eines chlamydialen Effektors (Tarp) über ein chlamydiales Typ-3-Sekretionssystem (T3S) gezeigt werden [50]; 55, Hackstadt 2001). Dieses Protein kann als Aktin-Nukleator dienen und die Bildung von Aktinpodesten und Mikrovili am Infektionsort ermöglichen [46, 51]. Beide Veränderungen scheinen für die Internalisierung essentiell zu sein. Aktinpolymerisation wird vermutlich auch durch Chlamydien-abhängige Anpassung zellulärer Signaltransduktion manipuliert [37, 52]. Nach Eintritt in den Wirt liegen Elementarkörperchen in membranumschlossenen Vesikeln vor [53].

1.2.2 Die chlamydiale Vakuole

Nach Eintritt residieren Chlamydien, wie zuvor erwähnt, innerhalb eines membranumschlossenen Vesikels. Diese Vesikel werden als chlamydiale Vakuole oder Einschluss bezeichnet und stellen das natürliche sowie einzig bekannte Habitat dar, in welchem sich Chlamydien vermehren [7, 37]. Das Kompartiment zeichnet sich direkt nach Infektion der Wirtszelle durch fehlende Fusionsvorgänge mit anderen Vesikeln aus [47, 49,

54]. So scheint die Vakuole vom endo-lysosomalen Prozess abgekoppelt zu werden [55, 56]. Da die Blockierung bakterieller Proteinexpression zu einer sehr langsam ablaufenden, lysosomalen Degradierung der Erreger führt, sind vermutlich nach Infektion neu angelegte sowie in EBs bereits vorhandene chlamydiale Strukturen an dieser Abkopplung beteiligt [57]. Noch während der nicht fusogenen Phase migriert das chlamydiale Kompartiment in die Peri-Golgi-Region der Zelle [47, 49]. Bekannt ist, dass die Vakuolenmembran nach Beginn chlamydialer metabolischer Aktivität modifiziert wird. Bereits vor 25 Jahren konnte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden, dass Vakuolen von nadelartigen Strukturen bedeckt sind, welche möglicherweise auf ein Typ-3-Sekretionssystem der Bakterien zurückzuführen sind [58, 59]. Über diesen und andere vermutete Transportwege werden Proteine in die Membran integriert, welche unter anderem der Nährstoffakquisition dienen [60]. Somit hat die Vakuole als Barriere mehrere Funktionen; zum einen schützt sie die Bakterien vor einer Detektion durch das Immunsystem und zum anderen ist sie über den Transport von Nährstoffen in metabolische Prozesse eingebunden.

1.2.3 Chlamdiale Differnzierungsvorgänge und Komplettierung des Entwicklungszyklus

Wie erwähnt folgen Chlamydien einem biphasischen Lebenszyklus. Infektiöse EBs differenzieren nach Eintritt in den Wirt zu metabolisch aktiven RBs. Dieser Vorgang ist durch mehrere Veränderungen gekennzeichnet: Reduktion der Disulfidbrücken des Äußeren-Membran-Komplexes [61], Vergrößerung des Durchmessers der Bakterien auf 1 µm, Dekondensation des Genoms, welches dann in fibrillärer Form vorliegt und eine Anpassung der Zellmembranarchitektur [7]. Entscheidend für den Beginn der Differenzierung scheint die Degradierung chlamydialer histonartiger Proteine zu sein [62, 63]. Im Anschluss synthetisieren RBs zunächst Proteine, die zur Transkription, Translation und DNA-Replikation, sowie zur Prozessierung von Proteinen benötigt werden [64-66]. Im weiteren Verlauf beginnen Chlamydien, die Vakuole zu modifizieren und über die Sekretion von Effektoren in zelluläre Prozesse einzugreifen. Viele dieser Prozesse haben entweder die Akquisition von Nährstoffen oder den Schutz der ökologischen Nische zum Ziel [7, 60, 67]. Retikularkörperchen scheinen präferenziell an der Innenseite der Vakuole angeheftet zu sein [53]. Dort erfolgt die Replikation über binäre Teilung. Auf diese Weise vermehren sich Chlamydien exponentiell über bis zu zehn Generationen [68]. Bei fortschreitender Zunahme der Bakterienzahl ist neben dem Wachstum der Vakuole eine zunehmende Abkopplung der Chlamydien von der Einschlussmembran zu beobachten. Dieser, ca. 18 h nach Infektion beginnende Prozess [64], scheint mit einer asynchronen Rückdifferenzierung zu EBs einherzugehen, welche dann im Lumen der Vakuole vorliegen [68]. Gekennzeichnet ist

Vorgang durch den Rückzug des Typ-3-Sekretionssystems aus der

7

dieser

Vakuolenmembran, eine Neubildung von chlamydialen Histonen und der Bildung des Äußeren-Membran-Komplexes [64, 68]. Durch bisher unbekannte Signale wird nach der zweiten Differenzierung das Verlassen der Zelle ausgelöst. Beschrieben wurden in der Literatur sowohl der Austritt von Chlamydien nach Zelllyse [69], als auch über Exozytose [70]. Neuere Daten postulieren einen geordnet ablaufenden, durch Proteasen-vermittelten Lyseprozess, sowie einen Vorgang indem die komplette Vakuole intakt aus der Zelle gepresst wird - die Extrusion. Letztgenannter Prozess ist möglicherweise im Zusammenhang mit persistenten Infektionen zu sehen [40].

1.2.4 Persistente Infektionen

Oft werden chlamydiale Infektionen nicht oder sehr spät diagnostiziert, da eine große Anzahl subklinisch verläuft. Des Weiteren sind häufig wiederkehrende und chronische Krankheitsbilder zu beobachten [71]. Entsprechend konnte in Zellkultur-basierten Studien ein induzierbares, reversibles Dauer- oder Pesistenzstadium nachgewiesen werden [33, 72]. Als Reaktion auf Stressoren unterschiedlicher Art. beispielsweise Nährstoffengpässe (Aminosäuren, Eisenmangel), Antibiotika (Penicillin) oder Mediatoren des Immunsystems (IFN-y) kann der chlamydiale Entwicklungszyklus unterbrochen werden [33]. Anstatt zu infektiösen EBs zu differenzieren, bilden sich stark vergrößerte RBs, welche sich nicht weiter teilen. Ebenso scheint keine Expression von Genen, welche den Übertritt zu EBs markieren, sowie von Proteinen, die an der Teilung beteiligt sind (beispielsweise FtsZ), vorhanden zu sein. Auch zeigen bisherige Daten, dass die metabolische Aktivität während Persistenz der Chlamydien global verringert wird. Dem entgegen gibt es Hinweise für eine Hochregulation von Stress-induzierten Genen wie Chaperonen [72, 73]. Auch das chlamydiale Chromosom wird weiter repliziert. In diesem Zustand sind die Bakterien zwar noch lebensfähig, aber nicht kultivierbar. Sie sind so in der Lage über mehrere Wochen in Wirtszellen zu überleben. Nach Entfernen des Persistenzinduktors erfolgt die Komplettierung des Entwicklungszyklus [33].

1.2.5 Immunantwort nach Infektion mit *C. trachomatis*

Infektionen mit *C. trachomatis* sind häufig mit Langzeitschäden verbunden. Dabei scheinen die Komplikationen eng mit der Immunantwort verbunden. Als Erstreaktion nach Infektion humaner Epithelzellen erfolgt eine durch Chemokin- und Zytokinsekretion (unter anderem IL-6, IL-8, GM-CSF) getriebene Rekrutierung von Lymphozyten und Monozyten zum Infektionsherd [74-76]. Durch bakterielle Bestandteile (möglicherweise cHsp60, MOMP) und Zytokine können im Anschluss über *"pattern recognition receptors"*-PRRs (speziell *"toll-like"*-Rezeptoren TLRs) starke Entzündungsreaktion ausgelöst werden. Vor allem die Sekretion großer Mengen an TNF- α und IL-1 α/β , sowie von Matrix-Metalloproteasen durch Zellen des

angeborenen Immunsystems werden mit teils starken Schädigungen des Gewebes verbunden [75, 77, 78]. Entsprechend wurde gezeigt, dass die Inhibition dieser Prozesse zu einer Verringerung Chlamydien-assoziierter Pathologie führt. Eine erfolgreiche Bekämpfung chlamydialer Infektionen erfordert nach derzeitigen Erkenntnissen hauptsächlich CD4⁺-T-Zellen und deren Sekretion von IFN-γ. Durch das Zytokin wird die Verknappung der essentiellen Aminosäure Tryptophan über das Enzym Indol-2,3-Dioxygenase ausgelöst, die reaktive bakterizide Stickstoffverbindung Stickstoffmonoxid NO gebildet und eine entzündliche T_H-1-Immunantwort induziert [74, 75]. Weniger eindeutig sind die Daten im Fall zytotoxischer CD8⁺-T-Zellen. Wohl scheinen sie in der Lage den Organismus bei der Bekämpfung chlamydialer Infektionen zu unterstützen, Depletionsexperimente zeigen aber, dass ihnen vermutlich keine essentielle Rolle zu zuordnen ist. Ähnliches wird für B-Zellen diskutiert, da hohe Titer Chlamydien-spezifischer Antikörper nicht mit dem Abtöten der Erreger korrelieren [79]. Ob der Ineffektivität der gegen Chlamydien-gerichteten, adaptiven Immunantwort scheint kein dauerhafter Schutz vor entsprechenden Infektionen vermittelt zu werden [74, 75].

1.3 Wirt-Pathogen-Interaktionen während chlamydialer Infektion

Während der Beschreibung des chlamydialen Entwicklungszyklus (Abschnitt 1.2) wurden bereits bakterienabhängige Modulationen zellulärer Funktionen erwähnt. Für die Infektion entscheidende Anpassungen der Zellphysiologie sind im Bereich des Zytoskeletts, des Vesikeltransports, der Apoptose, sowie der Immunantwort zu beobachten (siehe Abb. 2). Viele werden mit der Funktion chlamydialer Effektoren verbunden [60, 66] und werden im Folgenden kurz beschrieben.



Abb. 2: Wirt-Pathogen-Interaktionen während chlamydialer Infektionen

Chlamydien interagieren im Laufe ihres Entwicklungszyklus mit verschiedenen zellulären Funktionen und Signalwegen und manipulieren diese. So wird der interzelluläre Transport beeinflusst. Beispielsweise werden exozytotische Vesikel und Lipidtröpfchen werden zur Vakuole umgeleitet, und Nährstoffe werden über chlamydiale Transporter in der Vakuolenmembran aufgenommen. Daneben wird das Zytoskelett durch Chlamydien verändert. Dies kann die Spaltung von Proteinen oder die Manipulation des Filamentaufbaus beinhalten. Weiterhin blockieren Chlamydien (zumindest experimentell induzierte) Apoptose. Hier wird eine Rolle der Rekrutierung von 14-3-3β und PKCδ zum chlamydialen Einschluss diskutiert. Von zentraler Bedeutung scheint die Spaltung proapoptotischer BH-3-Proteine zu sein. Chlamydien können vermutlich auch eine gegen sie gerichtete Immunantwort beeinträchtigen. So konnte die Spaltung der Transkriptionsfaktoren RFX-5, USF-1 und p65/RelA gezeigt werden. RFX-5 und USF-1 regulieren die MHC-Expression, p65/RelA kann die Expression verschiedener inflammatorischer Zytokine beeinflussen. Daneben wurde auch die Spaltung des MHC-ähnlichen, Lipidantigene-präsentierenden Proteins CD1d beobachtet.

1.3.1 Zytoskelettveränderungen

1.3.1.1 Grundlagen des Zytoskelettaufbaus

Das Zytoskelett einer Zelle besteht aus einem Netzwerk verschiedener Filamente. In Eukaryoten werden diese in drei Gruppen unterteilt: Aktin- oder Mikrofilamente, aus α/β-Tubulindimeren bestehende Mikrotubuli und Intermediärfilamente. Die Namensgebung basiert dabei auf den unterschiedlichen Durchmessern der drei Filamentarten. Während die röhrenartigen Mikrotubuli am größten (Ø ~25 nm) und die helikalen Mikrofilamente am kleinsten (Ø ~5-6 nm) sind, liegen Intermediärfilamente dazwischen (Ø ~8-12 nm). Das gesamte Netz steht im Kontakt mit der Zellmembran und den Zellorganellen und bietet Schutz vor mechanischen Stressoren. Es dient so der Erhaltung der Zellmorphologie und Gewebsorganisation und ist weiterhin an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. Über assoziierte Motor- und Adaptorproteine sind die Filamente beispielsweise als intrazelluläre Transportwege von Relevanz und Mikrotubuli sind unter anderem an der Chromosomensegregation während der Zellteilung beteiligt; auch eine Funktion während der Apoptose wird postuliert [80, 81]. Während chlamydialer Infektionen weisen Daten auf bakterienabhängige Modifikationen aller Filamentgruppen hin.

1.3.1.2 Zytoskelettveränderungen während chlamydialen Infektionen

Wie unter Abschnitt 1.1.2 eingeführt, werden Mikrofilamente schon vor Eintritt der Elementarkörperchen in der Wirtszelle modifiziert. Verschiedene Arbeitsgruppen beobachteten nach Anheften der Bakterien die Bildung von Aktinpodesten und Mikrovili im Bereich der EBs [46]. Die Veränderungen scheinen mit der Chlamydien-abhängigen Modulation zellulärer Signalwege, teils durch chlamydiale Proteinsekretion, verbunden.

So konnte die Translokation des Effektorproteins Tarp beobachtet werden, welches den Neuaufbau von Aktinfilamenten am Ort der Anheftung induziert [51]. Durch bisher unbekannte Mechanismen ist auch die Rekrutierung von ARF 6, WAVE 2 und dem Arp 2/3-Komplex an den Ort der Anheftung festzustellen. Aus einer Inhibition der Aktinpolymerisation resultiert die Blockierung der Chlamydien-Invasion [82, 83]. Dies unterstreicht die essentielle Bedeutung der Modulation des Zytoskeletts für den Eintritt von Chlamydien.

Auch nach Infektion der Wirtszelle sind weitere Interaktionen zwischen den Bakterien bzw. ihrem Kompartiment und Bestandteilen des Zytoskeletts beschrieben. So steht die Migration der chlamydialen Vakuole in die Peri-Golgi-Region möglicherweise mit einer frühen Assoziation zwischen dem chlamydialen Kompartiment und Mikrotubuli bzw. dem Motorprotein Dynein-1 in Verbindung [49, 84].

Im weiteren Verlauf der Infektion wird diskutiert, ob Chlamydien aktiv eine Ummantelung ihrer Vakuole mit Zytoskelettfilamenten auslösen. So weisen Daten auf eine Rho A- abhängige Lokalisation von Mikrofilamenten um den Einschluss hin [85]. Das Netzwerk, in welches das chlamydiale Kompartiment eingebettet sein soll, beinhaltet diesen Ergebnissen zur Folge auch Bestandteile von Intermediärfilamenten. Zu den Erkenntnissen passen würde die Feststellung, dass chlamydiale Infektionen zur Spaltung der Intermediärfilamentproteine Vimentin und Zytokeratin-8 (CK8) führen. Beide Fragmentierungen wurden auf die Aktivität der chlamydialen Protease CPAF zurückgeführt [86, 87]. Eine Hülle aus Bestandteilen des Zytoskeletts könnte sowohl für die Stabilität als auch die Expansion der Vakuole von Bedeutung sein.

Weiterhin scheint die Manipulation des Zytoskeletts beim Abschluss des chlamydialen Entwicklungszyklus notwendig. Nach Ergebnissen von Hybiske *et. al.* ist Aktinpolymerisation für den Extrusionsmechanismus notwendig [40]. Damit gibt es Hinweise, dass Chlamydien in allen Entwicklungsstadien mit dem Zytoskelett interagieren bzw. es verändern.

1.3.2 Anpassung des intrazellulären Transports

Als obligat intrazelluläre Bakterien sind Chlamydien in ihrer Entwicklung auf Nährstoffe ihres Wirtes angewiesen. Trotzdem sind je nach Spezies verschiedene Proteine des Energiestoffwechsels im Genom angelegt, beispielsweise Bestandteile des Pentosephosphat-Weges und der Aminosäurebiosynthese. Eine Abhängigkeit vom Wirt besteht im Besonderen bei Purin- und Pyrimidin-Nukleotiden [88].

Chlamydien scheinen unterschiedliche Möglichkeiten zur Akquisition von Nährstoffen zu besitzen. Diese beinhalten neben der Einflussnahme auf den zellulären Vesikeltransport, der Expression chlamydialer Transporter und Effektorproteine auch die Modifikation der Vakuolenmembran mit wirtseigenen wie bakteriellen Proteinen sowie Veränderungen zellulärer Organellen. So konnte in bisherigen Studien gezeigt werden, dass Chlamydien eine Umleitung exozytotischer Vesikel auslösen. Diese ist vermutlich mit der Aufnahme von Cholesterin, Lipiden, Sterolen und Sphingomyelin verbunden [55, 60, 89]. Weiterhin scheinen während der Migration der chlamydialen Vakuole je nach chlamydialer Spezies unterschiedliche Rab-Proteine an deren Membran gebunden zu werden. Bei dieser Gruppe von Proteinen handelt es sich um Regulatoren des zellulären Transports [60, 90-92]. Die so erreichte Umleitung von Vesikeln könnte zusätzlich durch eine Chlamydien-induzierte, gerichtete Vesikelfusion beeinflusst sein. Es konnte nachgewiesen werden, dass einige der bakteriellen, membranlokalisierten Inc-Proteine strukturelle und funktionelle Homologe von zellulären SNAREs sind. Diese führen über Protein-Protein-Interaktionen zu Vesikelfusionen [93].

Jüngere Ergebnisse zeigen einen weiteren, mit der Akquisition von Lipiden assoziierten, Eingriff von Chlamydien in die Zellphysiologie. Im Verlauf des chlamydialen Entwicklungszyklus konnte die Fragmentierung des Golgikomplexes sowie die Translokation der entstandenen Teile in die Vakuole und als Folge die Aufnahme von Lipiden beobachtet werden. Zurückzuführen war der Vorgang auf die Spaltung des integralen Golgi-Matrix-Proteins Golgin-84 [94]. Eine Blockierung der Modulation der Golgi-Architektur über einen Inhibitor zog eine Unterdrückung bakterieller Replikation nach sich. Bisher konnte allerdings noch nicht aufgeklärt werden, ob wirtseigene oder chlamydiale Proteine die Anpassung der Golgi-Morphologie bzw. Golgi-84 Spaltung auslösen [94].

Ferner wird eine veränderte Aktivität von zellulären Lipasen ebenfalls mit der Mobilisation von und der Versorgung der chlamydialen Vakuloe mit Lipiden in Verbindung gebracht [88]. Daten weisen zudem auf die Aufnahme von Nukleotiden und Aminosäuren durch ein Spektrum spezifischer Transporter in der Vakuolenmembran hin. Für die Translokation von ATP, GTP und UTP konnten beispielsweise entsprechende Proteine in verschiedenen chlamydialen Spezies identifiziert werden [88, 95]. Trotz der Vielzahl der Beobachtungen ist davon auszugehen, dass Chlamydien weitere Möglichkeiten zur Aufnahme von Nährstoffen und der parasitären Ausbeutung ihres Wirts besitzen.

1.3.3 Unterdrückung der Apoptose

In höheren Eukaryoten ist zum Schutz des Organismus vor Infektionen und entarteten Zellen, sowie zur Gewebshomöostase und Organentwicklung eine regulierte Form des Zelltods angelegt. Zellen sterben so auf identische, kontrollierte Weise ab. Diese Art des programmierten Zelltods bezeichnet man als Apoptose. Mit dem Vorgang verbunden sind charakteristische morphologische Veränderungen sowie spezifische Spaltungsvorgänge [96-98]. Von zentraler Bedeutung für die Apoptose ist eine Familie von Cystein-Proteasen - die Caspasen. Entsprechend ihrer Funktion bezeichnet man an der apoptotischen Signalkaskade beteiligte Vertreter als Initiator-Caspasen (Caspase-8, -9, -10) oder als Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7) [99].

1.3.3.1 Grundlagen apoptotischer Signalwege

In Säugetieren unterscheidet man den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg der Apoptose, deren Gewichtung je nach Zelltyp variieren kann. Die extrinsische Kaskade wird durch Ligandbindung an einen Oberflächenrezeptor (CD95, TNF-R etc.) initiiert [100]. Diese induziert ein *"clustering"* der Rezeptoren, was eine Bindung von pro-Caspase-8 über Adaptorproteine zur Folge hat. Zusammen bilden Rezeptor, Adaptoren und pro-Caspase-8 den *"DISC"* (*Death Inducing Signalling Complex*), in welchem die Caspase autokatalytisch aktiviert wird. Im Anschluss prozessiert und aktiviert Caspase-8 Effektor-Caspasen, durch die dann zelluläre Proteine gespalten werden. Dies zieht Veränderungen der Zellmorphologie (Zellschrumpfung, Chromosomenkondensation, etc.) nach sich [101, 102].

beinhalten und ohne Auslösen einer Entzündungsreaktion von phagozytierenden Zellen aufgenommen werden - die sog. apoptotischen Körperchen [96, 103].

Während der extrinsische Signalweg durch extrazelluläre Signale induziert wird, dient der intrinsische Weg der Reaktion auf Apoptosestimuli innerhalb der Zellen, beispielsweise nach DNS-Schäden oder einer Unterversorgung mit Nährstoffen. ([98, 104]. Reguliert wird der Vorgang durch die Familie der Bcl-2-Proteine. Diese teilt man in drei Gruppen ein: proapoptotische BH3-Proteine, antiapoptotische Bcl-2-ähnliche Proteine und eine Klasse von Effektorproteinen, bestehend aus Bax, Bak (und möglicherweise Bok) [104]. Proapoptotische Stimuli können über BH3-Proteine eine Aktivierung von Bax und Bak auslösen, was eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran nach sich zieht. Auf diese Weise gelangen verschiedene pro-apoptotisch agierende Proteine in das Zytosol. Dabei ist nicht abschließend geklärt, ob die BH3-Protein-abhängige Aktivierung durch deren Bindung an die Effektoren oder an anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie erfolgt [105]. Nach Mitochondrien-Permeabilisierung zytosolisch vorliegendes Cytochrom c bildet in der Folge zusammen mit Apaf-1, und pro-Caspase-9 das Apoptosom. In dieser Formation aktivieren sich, infolge der ,induzierten Nähe' (hohe lokale Konzentration), Caspase-9-Moleküle gegenseitig. Die aktive Initiator-Caspase ist dann befähigt Effektor-Caspasen zu spalten [106, 107]. Abhängig von der Zellart kann der extrinsische an den intrinsischen Weg gekoppelt sein. So kann Caspase-8 das BH3-Protein Bid in seine aktive Form tBid spalten, welches zu Bax/Bak-Aktivierung führt [108].

1.3.3.2 Zelltod nach chlamydialer Infektionen

Während viele, extrazellulär replizierende Bakterien Apoptose verschiedener Zelltypen induzieren, sind sich intrazellulär replizierende Erreger oftmals darauf angewiesen, das Überleben der Wirtszellen zu sichern. Der Entwicklungszyklus human-pathogener Chlamydien dauert (*in vitro*) je nach Spezies und Wirt zwischen 48 und 96 h. Über diesen Zeitraum hinweg geht die Infektion bzw. Replikation mit der Alterierung zellulärer Funktionen einher. Diese beinhalten starke Beeinträchtigungen des Zytoskeletts, der Zellteilung und des intrazellulären Vesikeltransports. Die zunehmende Vergrößerung der Vakuole hat zudem die Verschiebung aller Zellorganellen zu Folge [60, 109]. Trotz dieses biochemischen und mechanischen Stresses überleben Wirtszellen bis zur Beendigung des chlamydialen Entwicklungszyklus. Der dabei ausgelöste Zelltod, verbunden mit der Freisetzung der Bakterien, zeigt zwar verschiedene für Apoptose charakteristische Eigenschaften (Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran, Kondensation des Nukleus), ist jedoch nach heutigen Erkenntnissen unabhängig von Bax/Bak, Cytochrom c oder Caspase-Aktivität [110, 111]. Gleichzeitig konnten auch nekrosetypische Veränderungen, beispielsweise die Freisetzung von HMGB-1, festgestellt werden [112]. Wegen der

14

unterschiedlichen Natur der detektierten Marker erscheint der Begriff nicht-apoptotischer Zelltod die Beobachtungen am besten zu beschreiben [87, 111].

Verschiedene Wege einer Chlamydien-abhängigen Unterdrückung apoptotischer Vorgänge wurden bisher beschrieben. Einer der wesentlichen, Serovar- und Spezies-übergreifend vorhandenen Mechanismen scheint die Blockierung der Zytochrom-c-Freisetzung durch Degradierung pro-apoptotischer BH3-Proteine zu sein [113, 114]. In diesem Vorgang nimmt die chlamydiale Protease CPAF nach bisherigen Erkentnissen eine wichtige Rolle ein. Wir und andere konnten zeigen, dass der chlamydiale Effektor, nach Translokation in das Zytosol, die Spaltung verschiedener BH3-Proteine (vermutlich indirekt) auslöst [87, 115]. Chlamydien scheinen, teils speziesspezifisch, weitere Mechanismen zur Unterdrückung der Apoptose zu besitzen bzw. auszunutzen. So konnte nach Infektion von Zellen mit C. trachomatis eine Rekrutierung des 14-3-3β-Protein über Interaktion mit IncG zur festgestellt werden. Normalerweise chlamydialen Vakuole dient 14-3-3β dem phosphorylierten BH3-Protein BAD als Interaktionspartner in den Mitochondrien, wodurch Cytochrom c-Freisetzung induziert werden kann [116]. Die Bindung von BAD an die Vakuole könnte zu einer Unterdrückung der Apoptose im Bereich des intrinsischen Signalweges beitragen. Eine ähnliche Vorgehensweise wird in Bezug auf pro-apoptotisch agierende Proteinkinase Cδ (PKCδ) diskutiert. In großen Mengen auf Mitochondrien akkumuliert, kann die Kinase zur Freisetzung pro-apoptotischer mitochondrialer Proteine führen. Es wurde beschrieben, dass die chlamydiale Vakuole Diacylglyzerol (DAG) bindet, welches als Bindungspartner für PKCo dient. Entsprechend zeigen Daten eine Assoziation der Kinase mit dem Einschluss [117]. Daneben gibt es Ergebnisse, welche eine Beteiligung von "Inhibitor of Apoptosis"-Proteinen (IAPs) vorschlagen. Diese sollen nach chlamydialer Infektion in der Lage sein auch den extrinsischen Signalweg zu unterdrücken [118]. Die bisher präsentierten Daten werden allerdings kontrovers diskutiert. Trotz der Aufklärung wesentlicher Prozesse des Chlamydien-vermittelten Zelltods ist zu vermuten, dass weitere, gerade wirts- und speziesspezifische Modulationen apoptotischer Signalwege vorliegen könnten.

1.3.4 Modulation der Immunantwort nach Infektion

Zur Detektion und Entfernung von Mikroorganismen besitzen Säugetiere ein komplexes Immunsystem, welches durch seine verschieden Zelltypen in der Lage ist den Organismus effektiv zu schützen. Man unterscheidet angeborenes und adaptives Immunsystem. Nach Infektionen führt das angeborene Immunsystem erste Abwehrreaktionen aus. Dabei stellen Epithelien bzw. Schleimhäute die ersten Barrieren dar. Diese dienen oft nicht nur als physische Hürden, sondern sind über die Sekretion von Mukus und anti-mikrobiellen Proteinen und Peptiden (beispielsweise Lipasen oder Defensinen) aktiv an der Bekämpfung

von Mikroorgansimen beteiligt. Werden die Epithelien überwunden und Mikroben wandern ins Gewebe ein, dienen phagozytierende Zellen wie Makrophagen deren Entfernung. Unterstützt werden diese durch die Einwanderung anderer Zellen des angeborenen Immunsystems vor allem Neutrophilen, aber auch anderen Granulozyten und "natural killer" NK-Zellen. Die Erkennung der Mikroorganismen erfolgt in diesen Zellen über "pattern recognition receptors" (PRRs) auf der Zelloberfläche oder im Zytosol der genannten Zellen. Durch Zytokinsekretion der Zellen des Immunsystems und das Auslösen einer Entzündungsreaktion werden weitere an der Abwehr von Infektionen beteiligte Zellen rekrutiert [119, 120]. Auch kann das adaptive Immunsystem aktiviert werden. Bestandteile des adaptiven Immunsystems sind T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. Die Rezeptoren dieser Zellen sind im Gegensatz zu den PRRs über klonale Reorganisation spezifisch für Antigene [119, 121]. Nach Antigenerkennung durch T- und B-Lymphozyten kann eine Differenzierung in mehrere Untergruppen erfolgen, welche Effektor- oder "memory" bzw. Gedächtnis-Funktion haben. Gedächtniszellen überleben auch nach erfolgreicher Bekämpfung von Mikroorganismen und ermöglichen eine schnellere, gezielte Reaktion auf Sekundärinfektionen. Effektor-B-Lymphozyten bekämpfen Infektionen durch Sekretion spezifischer Antikörper. Bei T-Lymphozyten unterscheidet man verschiedene Gruppen an Effektorzellen dazu gehören zytotoxische T-Zellen, welche nach Antigenerkennung ihre Zielzellen abtöten, T_H1-Zellen, welche vor allem Makrophagen und Bildung von IgG-Antikörper induzieren und T_H2-Zellen, welche B-Zellen zur Bildung anderer Antikörpertypen anregen. Eine wichtige Rolle bei der Ausübung dieser unterschiedlichen Funktionen kommt den jeweils sezernierten Zytokinen zu [122-124]. Obwohl die verschiedenen Bereiche des menschlichen Immunsystem in den allermeisten Fällen ausreichen um Mikroorganismen zu entfernen, kann es Erregern trotzdem gelingen Abwehrmechanismen zu überwinden. Um die Chancen einer Infektion des Wirtes zu erhöhen haben sich viele Keime zumindest teilweise angepasst. Dies zeigt sich beispielsweise durch in Pathogenen angelegte Mechanismen und Strukturen, welche die Erkennung ihrer Zielzellen und Wirte erleichtern, der Umgehung einer Detektion dienen oder auch die Abschwächung der Immunantwort bewirken.

1.3.4.1 Detektion von Chlamydien und Abschwächung der Immunantwort

Als intrazelluläre Bakterien sind Chlamydien nach Invasion ihrer Wirte vor extrazelluläragierenden Faktoren des angeborenen Immunsystems wie Defensinen oder phagozytierenden Zellen geschützt. Eine der wesentlichen, das Überleben ermöglichende, Eigenheit chlamydialer Infektionen ist deren einzigartige Replikation innerhalb der membranumschlossenen Vakuole [125]. Die fehlende intrazelluläre Degradierung von Chlamydien über den endo-lysosomalen Weg sowie die räumliche Trennung der Bakterien vom Zytosol limitiert die Detektions- und Abwehrmöglichkeiten des Wirtes. Ein Ergebnis ist beispielsweise

eine Verknappung an möglichen Epitopen für die Präsentation an der Wirtszelloberfläche [67, 79]. Zudem zeigen Daten, dass die chlamydiale Vakuole durch die Anlagerung wirtseigener Proteine maskiert werden könnte. So wird neben der Anbindung von Rab-Proteinen an die Einschlussmembran, auch eine Assoziation von Zytoskelettproteinen mit der chlamydialen Vakuole diskutiert [126, 127].

Des Weiteren besitzen Chlamydien nach bisherigen Erkenntnissen die Möglichkeit über die Sekretion von Effektorproteinen in die zelluläre Immunantwort einzugreifen. So wurde nachgewiesen. dass die chlamydiale Protease CPAF für die Spaltung der Transkriptionsfaktoren RFX-5 und USF-1 verantwortlich ist. Beides sind positive Regulatoren der Expression von Proteinen des MHC-Komplexes [128, 129]. Daher erscheint eine verringerte MHC-abhängige Antigenpräsentation auf der Oberfläche infizierter Zellen möglich. Als Konsequenz wäre eine abgeschwächte Immunantwort nach Chlamydieninfektionen denkbar.

Die Aktivität von CPAF wird mittlerweile auch mit einer möglichen Abschwächung der Detektion durch NKT-Zellen in Verbindung gebracht. Diese töten nach Erkennung von Lipidantigenen auf der Zelloberfläche infizierte Zellen ab, einem gerade bei intrazellulären Erregern wichtigen Vorgang [130]. Die angesprochene Präsentation der Lipidantigene erfolgt unter anderem durch das MHC-ähnliche Glykoprotein CD1d. Publizierte Daten zeigen, dass die chlamydiale Protease CPAF (zumindest *in vitro*) in der Lage ist, CD1d zu spalten. Dadurch könnte eine NKT-Zell-abhängige Entfernung infizierter Zellen erschwert oder verhindert werden [131](124, Kawana 2007). Daneben wird die Detektion und Entfernung Chlamydien-infizierter Zellen vermutlich auch durch Unterdrückung der Apoptose (siehe Abschnitt 1.3.3) und das chlamydiale Persistenzstadium (siehe Abschnitt 1.2.4) behindert. Diskutiert wird zudem die Möglichkeit, dass die Chlamydien-abhängige Produktion des

Zytokins TNF-α Apoptose in T-Zellen induziert, was eine Abschwächung der Immunantwort nach sich ziehen könnte [132].

1.3.4.2 Modulation inflammatorischer Prozesse

Erkenntnisse der letzten beiden Dekaden sehen durch Entzündungen im Bereich der Infektionen ausgelöste Gewebsschädigungen als Ursache Chlamydien-abhängiger Langzeitschäden. Typischerweise dienen inflammatorische Prozesse der Unterstützung der Immunantwort. Allerdings kann eine zu starke oder unkontrollierte Entzündung zu ausgeprägtem Kollateralschaden in betroffenen Geweben führen [74, 75, 78].

Eine zentrale Rolle in der Ersterkennung von Mikroorganismen kommt den PRRs- auf der Zelloberfläche oder im Zytosol der Wirtszelle zu. Diese erkennen "*pattern associated molecular patterns*" (PAMPs) der Erreger und stimulieren inflammatorische Signalwege. Als Folge werden an Entzündungsvorgängen beteiligte Proteine (Zytokine, Chemokine etc.)

translatiert und sezerniert. Diese unterstützen durch Rekrutierung von Zellen des Immunsystems und Induktion der Zytokinproduktion die Entfernung der Erreger [119, 120]. Auch Chlamydien lösen im Zuge der Invasion ihrer Wirte und im Verlauf ihres Entwicklungszyklus die Sekretion inflammatorischer Mediatoren aus. So konnte die infektionsabhängige Sekretion von IL-8, IL-6, IL-1α und GM-SCF detektiert werden, welche vermutlich mit einer Einwanderung von Neutrophilen und Monozyten verbunden ist [74, 77]. In diesen Vorgängen scheinen auf der Seite des Wirts TLRs, speziell TLR-2 beteiligt zu sein [133]. Als Liganden dienen dabei wohl unter anderem die chlamydialen Proteine Hsp60 und Mip. Chlamydiales LPS, ein klassischer TLR-Ligand, scheint nur wenig inflammatorisches Potenzial zu besitzen. Weitere Daten weisen auch auf eine mögliche Beteiligung zytosolischer NOD-Rezeptoren hin, wobei bisher kein chlamydialer Ligand identifiziert werden konnte [77, 133-135].

Trotz dieser Stimulation durch Chlamydien selbst zeigen Daten, dass nicht infizierte Zellen, Besonderen rekrutierte Zellen des Immunsystems, Produzenten sondern im inflammatorischer Zytokine (vor allem von IL-1a und IL-1b) sind [74, 75, 78, 79]. Diese Feststellung würde zu Daten passen, welche eine Blockierung bzw. Anpassung inflammatorischer Signalwege und der damit verbundenen Zytokinsekretion in Chlamydieninfizierten Zellen postulieren. So scheint eine dauerhafte Aktivierung des NF-κB-Signalwegs, welcher die Transkription an Entzündungen beteiligter Proteine ermöglicht, in Chlamydien infizierten Zellen zu unterbleiben [134]. Entsprechend weisen bisherige Ergebnisse auf eine, im Vergleich mit Infektionen anderer intrazellulärer Erreger, verzögerte Zytokin-Sekretion hin. Beispielsweise wird IL-8, welches das dominierende Zytokin in der Frühphase chlamydialer Infektionen ist und zur Rekrutierung von Lymphozyten und Monozyten führt, in vitro erst 15 h nach Infektion sezerniert [76, 136]. Im Einklang mit diesen Daten scheint anstatt des NF-kB-Signalwegs erst die Aktivierung des "Mitogen-activated protein kinase"-MAPK-Signalwegs über ERK1/2 die IL-8-Sekretion zu ermöglichen. ERK-Aktivität wird auch mit der Freisetzung von Arachidonsäure (AA), welche in der Bildung von pro-inflammatorisch-agierenden Prostaglandinen benötigt wird, in Verbindung gebracht [67, 137]. Verantwortlich für die beschriebene Gewichtung der Signalwege sind nach bisherigem Wissensstand von chlamydialen Effektorproteinen vermittelte Modulationen der NF-KB-Signalkaskade [60].

1.3.4.3 Grundlagen des NF-kB-Signalwegs

Ein zentraler, Zellproliferation, Gewebshomöostase und Immunantwort regulierender, zellulärer Signalweg ist die NF-kB-Signalkaskade. Unter dieser Bezeichnung werden Transduktionsereignisse zusammengefasst, welche die Translokation in den Zellkern und die transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-kB ermöglichen. Die Anpassung der Genexpression erfolgt in Abhängigkeit von Kofaktoren und anderen Signalwegen. Bekannte

Induktoren des NF- κ B-Signalwegs umfassen unter anderem inflammatorische Signale (IL-1 β , TNF- α etc.), PAMPs von Mikroorganismen (zum Beispiel Lipopolysaccharid (LPS)) und genotoxische Stressoren [120, 138]. Schematisch beschrieben ist der NF- κ B Signalweg in Abbildung 3.

Der Transkriptionsfaktor ist ein Dimer variabler Zusammensetzung aus den fünf Proteinen der NF-κB-Familie, p65/ReIA, ReIB, c-ReI, p50 und p52. Je nach Signalzustand der Zelle liegen diese in Homo- oder Heterodimeren unterschiedlicher Zusammensetzung vor [139]. In Abwesenheit eines Induktors der Signalkaskasde befinden sich die Dimere mit einem Mitglied der I-κB-Proteinfamilie im Komplex vor. In diesem maskiert I-κB die Kernimportsequenz von einem der NF-κB-Proteine. Da I-κB selbst eine Kernexportsequenz besitzt, kann sich der Komplex sowohl im Kern als auch im Zytosol befinden. Das Gleichgewicht dieses Vorgangs liegt allerdings auf Seiten des Zytosols. Mit der Entfernung des I-κB-Proteins werden beide Kernimportsequenzen des NF-κB-Dimers frei, wodurch eine dauerhafte Translokation in den Kern möglich wird [140, 141].

Bisher sind zwei Varianten des NF- κ B-Signalwegs, der kanonische (klassische) und der nicht-kanonische (alternative), beschrieben. Im Falle des kanonischen Wegs (typischerweise nach inflammatorischer Stimulation), folgt über Adaptorproteine der beteiligten Rezeptoren, die MEKK1-abhängige Bildung und Aktivierung des I- κ B- α -Kinase-Komplexes- IKK [140]. Anschließend wird, in Abhängigkeit von der regulatorischen Untereinheit NEMO, die Effektoruntereinheit IKK- β durch Phosphorylierung aktiviert [142]. Dies ermöglicht die Phosphorylierung des I- κ B-Proteins und des Transkriptionsfaktors. Die Phosphorylierung des Inhibitors löst eine K48-Ubiquitinierung und darauffolgende proteasomale Degradierung von I- κ B aus. Das freie NF- κ B-Dimer wird anschließend in den Kern transloziert [139, 143].



Abb. 3: Grundlagen des NF-kB-Signalwegs

Je nach Zelltyp und Stimulus wurden zwei unterschiedliche NF-κB-Signalkaskaden identifiziert. Beiden gemein ist, dass nach einem extrinsischen Signal der zytosolische, dimere Transkriptionsfaktor NF-κB (zusammengesetzt aus unterschiedlichen Proteinen) in den Kern transloziert wird wo seine transkriptionelle Aktivität ermöglicht wird. Nach Ligandbindung beispielsweise an CD40, oder den Lymphotoxin-β-Rezeptor wird der nicht-kanonische oder alternative Signalweg beschritten. Dabei wird über NIK ein Dimer aus IKK-α und IKK-β aktiviert. IKK-α-Aktivierung ermöglicht im Anschluss die Bildung und Translokation eines NF-κB-Dimers aus RelB und p52 in den Zellkern. Typischerweise nach inflammatorischen Signalen wird über Rezeptoren wie TNFR, IL-1R oder TLRs ein aus NEMO, IKK-α und IKK-β bestehender Komplex aktiviert. In Abhängigkeit von IKK-β-Aktivierung wird I-κB-α phosphoryliert und im Anschluss proteasomal abgebaut. Das auf diese Weise frei-werdende NF-κB-Dimer, häufig bestehend aus p65/RelA und p50, wird dann in den Kern transloziert. Im Kern kann der Transkriptionsfaktor in Abhängigkeit der vorhandenen Kofaktoren transkriptionelle Aktivität entfalten.

von IKK über den nicht-kanonischen Signalweg zur Folge. Nach Rezeptorbindung erfolgt durch die Kinase NIK die Bildung des IKK-Komplexes, allerdings ohne NEMO, und IKK-a wird mittels Phosphorylierung aktiviert. ΙΚΚ-α wiederum phosphoryliert im Anschluss I-κB und induziert damit den proteasomalen Abbau des Proteins [144, 145]. Neben den Abweichungen in der Signalweiterleitung sind zwischen kanonischem und nichtkanonischem Signalweg auch Unterschiede in der Zusammensetzung des Transkriptionsfaktors festzustellen. Die klassische Signalkaskade führt in der Regel zur Translokation und Aktivierung eines NF-κB-Dimers aus p50- und p65/RelA. Die alternative Signalkaskade aktiviert dagegen üblicherweise Dimere, welche aus den Proteinen p52 und RelB- zusammengesetzt sind [146].

Im Zellkern erfolgt in Abhängigkeit von NF-κB-Modifikationen (Phosphorylierungen und Acetylierungen), vorhandenen Kofaktoren und dem Zusammenspiel mit anderen Signalwegen die Bindung an κB-Regionen in Promotoren [147, 148]. Dies kann eine Induktion oder Repression der entsprechenden Gene auslösen. Auf diese Weise können Immunantwort und inflammatorische Mediatoren, Zellproliferation und Apoptose moduliert werden [149, 150]. Fast alle Gene der am NF-κB-Signalweg beteiligten Proteine besitzen NF-κB-Bindungsstellen in ihren Promotoren und unterliegen so einem entsprechenden Feedback, welches an der Terminierung der Induktion beteiligt ist [139].

1.3.4.4 NF-κB-Signale während Infektionen

Bezüglich einer möglichen Aktivierung des NF-κB-Signalwegs nach chlamydialer Infektion und deren Bedeutung liegen sehr unterschiedliche Ergebnisse vor. Beispielsweise wurde nach *C. trachomatis*-Infektion von Endothel-Zellen und HeLa Zellen eine transiente Aktivierung beobachtet, welche bereits nach sechs Stunden wieder abklang [134]. Generell scheint die Bedeutung von NF-κB-Signalen nach Infektionen von der Chlamydien-Spezies und der Wirtszelle abhängig zu sein. Die bisher beschriebenen Modulationen des NF-κB-Signalwegs sind möglicherweise auf chlamydiale Effektoren zurückzuführen. In diesem Zusammenhang wird mehreren chlamydialen Proteinen eine Rolle zugeschrieben.

Die Arbeitsgruppe um John Reed identifizierte zwei chlamydiale Deubiquitinasen ChlaDub-1 und ChlaDub-2. Deubiquitinasen sind in der Lage über die Entfernung von Ubiquitin den proteasomalen Abbau ihrer Substrate zu verhindern. Vorhandene Daten weisen daraufhin, dass I-κB-α ein Substrat von ChlaDub-1 ist. Dieser Vorgang könnte nach einer Induktion der NF-κB-Signalkaskade eine Degradierung von I-κB-α verhindern und die damit verbundene Freisetzung des NF-κB-Dimers würde blockiert; der Transkriptionsfaktor bliebe anschließend im Zytosol lokalisiert. Unklar sind allerdings Sekretion und Lokalisation der identifizierten chlamydialen Deubiquitinasen [151].

21
Neben einer Inhibition von NF-κB-Signalen auf Ebene von I-κB-α wird auch eine Blockierung des Weges durch Spaltung von Proteinen der NF-κB-Familie postuliert. Nach Infektion mit verschiedenen human-pathogenen chlamydialen Spezies konnte die Fragmentierung von p65/RelA nachgewiesen werden. Der Vorgang ist möglicherweise die Konsequenz einer, zur Tsp-Protease aus *E.coli* homologen chlamydialen Protease, CT441 [152, 153]. Unsere Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung der Protease CPAF hin (siehe Abschnitt 3.3). Scheint nach Infektionen mit *C. trachomatis* die Inhibition des NF-κB-Signalwegs zu dominieren, könnten NF-κB-Signale nach Infektionen mit *C. pneumoniae* von größerer Bedeutung sein. So wurde die Expression von Adhäsinen (ICAM, VCAM) in infizierten Endothelzellen auf NF-κB-abhängige Genexpression zurückgeführt [154]. Diese wäre mit einer ausgeprägteren Rekrutierung von Lymphozyten und Makrophagen verbunden. Auch soll die Infektion von Makrophagen mit einer gesteigerten Zytokinproduktion verbunden sein. Bei beiden Beobachtungen wird eine Verbindung mit *C. pneumoniae*-abhängiger Entstehung von Arteriosklerose postuliert [155].

1.4 Der chlamydiale Effektor CPAF

Die vorangegangenen Abschnitte sollten neben der Einführung von Grundlagen der chlamydialen Physiologie einen Eindruck der Vielzahl Chlamydien-abhängiger Modulationen zellulärer Funktionen vermitteln. Bisherige Daten legen nahe, dass bei diesen Veränderungen die Translokation von Effektorproteinen in das Zytosol entscheidend ist [38]. Einer der wenigen näher beschriebenen Effektoren ist die Serinprotease *"chlamydial protease-like activity factor"* (CPAF). Seit ihrer Identifikation konnte ihre Translokation in das Zytosol, ihre Funktionsweise, sowie ein breites Substratspektrum gezeigt werden [67, 87, 156, 157]. Auch ist der Effektor in fast allen bisher sequenzierten Spezies und Serovaren der Ordnung *Chlamydiales* vorhanden [156]. Insgesamt weisen die Daten auf eine essentielle Rolle von CPAF für chlamydiale Infektionen hin.

1.4.1 Struktur und Homologien

CPAF wird nach derzeitigen Erkenntnissen als inaktives Zymogen mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa translatiert, welches in der Folge unter Prozessierung in zwei Fragmente aktiviert wird [87, 158, 159]. Diese Art der Prozessierung konnte bei mehreren chlamydialen Spezies beobachtet werden. Entsprechend ist die Struktur in zwei funktionale Domänen unterteilt, einen C- und einen N-terminalen Teil [160]. N-terminal wurde eine Signalsequenz für den in Chlamydien angelegten Sec-Sekretionsweg (Typ-2-Sekretionsweg) identifiziert [156].

Die Aufklärung der Struktur von CPAF und deren Abgleich mit Datenbanken identifizierten als nächstes Homologes D1P, eine C-terminal-prozessierende Protease (CPP) in Pflanzen. Dies korreliert mit Sequenzierungsergebnissen chlamydialer Genome, welche die Annotation vieler Homologien zwischen chlamydialen und pflanzlichen Proteinen ergaben [160, 161]. Die Feststellung wird auf die frühe Abspaltung der Ordnung *Chlamydiales* von anderen Eubakterien zurückgeführt. Modelling-Ansätze ergaben zudem Homologien im Bereich des katalytischen Zentrums mit den CPP-Vertretern Tricorn aus *Termoplasma acidophilum*, einem funktionalen Analog der humaner Tripeptidypeptidase II, und Tsp aus *E.coli* [156, 160, 162].

Trotz der Ähnlichkeiten scheint CPAF nicht den CPPs zuzuordnen zu sein. So liegen bei CPPs an der Katalyse beteiligten Aminosäurereste innerhalb einer funktionellen Domäne, bei CPAF sind sie auf zwei, CPAFc und CPAFn, aufgeteilt. Auch die Prozessierung des Primärtranskripts ist für CPPs nicht beschrieben. Zudem sprechen bisherige Daten eindeutig gegen eine Erkennung und Spaltung freier C-Termini. So sind weder die an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren bzw. Domänen von D1P, Tricorn noch Tsp konserviert [160, 163, 164]. Auch weist die Generierung mehrerer Spaltprodukte aus einem Substrat auf eine endoproteolytische Aktivität von CPAF hin, welche von C-terminalen Motiven im Substrat unbeeinflusst scheint [87, 115, 160]. Erwähnenswert ist, dass in Chlamydien ein weiteres Homologes zu Tsp vorliegt - CT441 [156].

1.4.2 Aktivierungs- und katalytischer Mechanismus

CPAF liegt, wie zuvor beschrieben, nach Translation zunächst als inaktives Zymogen innerhalb der chlamydialen Vakuole vor. Zur Aktivierung ist die Prozessierung der Pro-Form in zwei Fragmente notwendig. Diese Art der Prozessierung ist für die ermittelten strukturellen Homologe nicht bekannt [157, 160]. Allerdings durchlaufen an der Apoptose beteiligte Initiator-Caspasen eine vergleichbare strukturelle Veränderung. So spaltet sich pro-Caspase-9 als Teil des makromolekularen Apoptosom-Komplexes nach induzierter Nähe gegenseitig [165, 166]. Erste klare Hinweise, dass CPAF auf eine vergleichbare Art und Weise aktiviert wird, ergab eine induzierte Quervernetzung von CPAF, welcher die Aktivierung und Fragmentierung der Protease, sowie Substratspaltung nach sich zog [87]. Auch zeigten die Experimente, dass vermutlich ein autoprozessiver Vorgang der Aktivierung unterliegt. Die Lösung der CPAF-Kristallstruktur stützt diese Hypothese [87, 160]. So konnte gezeigt werden, dass im Zymogen der Substratzugang zum katalytischen Zentrum des Proteins internes Segment blockiert wird. In einem ersten, möglicherweise durch ein konzentrationsabhängigen Schritt bildet sich durch asymmetrische Assoziation zweier Zymogene über hydrophobe Interaktionen ein transientes Homodimer. Diese Zusammenlagerung induziert eine Konformationsänderung der beiden Untereinheiten, die

geringe proteolytische Aktivität ermöglicht. Da der Abstand der C-terminalen und Nterminalen Domäne innerhalb eines Proteins in der zymogenen Form sehr groß ist, ist von einer initialen Interstrangprozessierung auszugehen. Durch sequentielle Hydrolyse der Polypeptidkette an drei Stellen und der Bildung entsprechender Zwischenstufen erfolgt zunächst eine Stabilisierung des Homodimers und anschließend die Entfernung des inhibitorischen Segments [159, 160]. Die Hypothese, dass die Modifikation der Struktur durch autoprozessive Vorgänge angetrieben wird, ist durch die Überprüfung einer Beteiligung annotierter chlamydialer Proteasen gestützt. Keines dieser Proteine war zur Prozessierung einer inaktiven CPAF-Mutante (diese beinhaltete einen Aminosäureaustausch des katalytischen Serins) befähigt. CPAF selbst war dazu in der Lage [167]. Weiterhin hatte auch die Unterdrückung zellulärer Proteinexpression durch Cycloheximid keinen Einfluss auf die Prozessierung [156]. Eine Rolle anderer Proteine konnte somit zwar nicht endgültig ausgeschlossen werden, erscheint aber unwahrscheinlich.

Erst die Entfernung des inhibitorischen Segments ermöglicht die Ausbildung der katalytischen Triade innerhalb eines CPAF-Moleküls und damit die volle Aktivität. Gebildet wird das aktive Zentrum, in Homologie zu D1P, aus den Resten Ser 499 und His 105. Anstatt eines Aspartatrestes als dritten Teil der Triade wird in CPAF Glu 558 über eine H₂O vermittelte Wasserstoffbrückenbindung zu His 105 im aktiven Zentrum positioniert. Erst die Koordination des Wassermoleküls führt zu einer korrekten Ausrichtung aller beteiligten Aminosäuren. Beide beschriebenen Vorgänge (Dimerisierung und Prozessierung) sind für die Aktivität von essentieller Bedeutung. Entsprechende Mutationen führten zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität [159, 160, 168].

Nach wie vor ungeklärt ist die Substratbindung und Erkennung. Wie in Abschnitt 1.4.2, erwähnt sind die Substraterkennungsbereiche homologer CPPs nicht in CPAF konserviert. Auch erbrachte die Analyse der bisher identifizierten Substrate und Spaltprodukte keine neuen Erkenntnisse [67, 157, 160]. Zentrale Schritte der CPAF-Aktivierung sind schematisch in Abbildung 4 beschrieben.

24



Abb. 4: Aktivierungsmechanismus der chlamydialen Protease CPAF

Die chlamydiale Protease CPAF wird als Zymogen gebildet. Für eine Aktivierung scheint eine Dimerisierung notwendig. In einem ersten Schritt bilden sich transiente Dimere, welche eine proteolytische Aktivität aufweisen. Diese ermöglicht den Beginn einer sequentiellen Prozessierung der Protease. Durch Entfernung eines Segments von CPAF, welches das aktive Zentrum blockiert, sowie sich anschließende Umlagerungen, entsteht die aus zwei miteinander assoziierten Fragmenten CPAFc und CPAFn bestehende funktionsfähige Protease. Entsteht die Aktivität des transienten Dimers durch die räumliche Nähe zweier CPAF-Zymogene, scheinen die Fragmente der aktiven Protease jeweils aus einem CPAF-Zymogen-Molekül zu stammen.

1.4.3 CPAF-abhängige Substratspaltung

Die Expression von CPAF konnte in Abhängigkeit der infektiösen Dosis und verwendeten Zelllinie nach 12-16 h in der Vakuole detektiert werden. In der Folge, nach 18-24 h, konnte eine Translokation der Protease in das Zytosol beobachtet werden [157]. Welcher Mechanismus dem Transport unterliegt, ist nicht abschließend aufgeklärt. Derzeitige Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung des chlamydialen Typ-2-Sekretionssystems hin. Sichergestellt scheint, dass keine Typ-3-abhängige Translokation im Falle von CPAF stattfindet [126, 156, 169]. Über die genaue Regulation der CPAF-Expression und Aktivierung sind allerdings kaum Daten vorhanden.Einher mit CPAF-Translokation ging eine beginnende Spaltung zellulärer Proteine. Dabei war zu beobachten, dass aktives CPAF dann über lange Zeiträume stabil im Wirtszytosol vorliegt.

Durch ektopische CPAF-Expression und Aktivierung sowie den Einsatz des CPAF-Inhibitors Lactacystin konnten in den vergangenen Jahren verschiedene in Struktur und Funktion sehr unterschiedliche CPAF-Substrate identifiziert werden. Die bisherigen Substrate lassen sich grob in unterschiedliche funktionelle Klassen einteilen.

Zunächst ist an dieser Stelle ein möglicher Eingriff in die Immunantwort durch die CPAFabhängige Spaltung der Transkriptionsfaktoren RFX-5 und USF-1, sowie des MHCähnlichen Glykoproteins CD1d zu nennen [128, 129, 131]. Alle drei unterliegen einer spezifischen Fragmentierung, welche in in vitro Experimenten durch den Einsatz des CPAF-Inhibitors Lactacystin blockiert werden kann [131, 157]. Eine zweite Gruppe an Substraten sind Bestandteile des Zytoskeletts bzw. mit diesem assoziierte Proteine. Zu diesen zählen die Intermediärfilamentproteine Vimentin und Zytokeratin-8 (siehe Abschnitt 1.3.1). Auch die Spaltung von Zytokeratin-18, welches zusammen mit CK8 im Komplex vorliegt, wird diskutiert. Prozessierung dieser Substrate wird von vielen mit einer Schwächung der Zytoskelettintegrität und dem Wachstum der chlamydialen Vakuole verbunden. Daneben wird aber auch im Falle von Vimentin eine mechanische Stabilisierung des Einschluss in Erwägung gezogen (siehe Abschnitt 1.3.1) [86, 87, 127]. Bei allen wurde, durch massenspektrometrische Analyse der Spaltprodukte, eine Spaltung innerhalb der Kopfdomäne bestimmt. Eine solche Fragmentierung könnte auch Defekte im Filamentaufbau zur Folge haben [127, 159]. Neben integralen Bestandteilen des Zytoskeletts weisen Daten die CPAF-abhängige Prozessierung des mit Mikrofilamenten verbundenen Transmembranproteins Nectin-1 aus [170]. Dieses ist ein Adhäsionsprotein, welches sowohl in "tight junctions" (TJ) als auch "adherence junctions" (AJ) vorliegt. Beide, AJ und TJ vermitteln Zellkontakte innerhalb von Epithelien und ermöglichen die Ausbildung der apikalbasal-Polarität von Zellen [171]. Die Spaltung von Nectin-1 durch CPAF könnte zu einer Schwächung der Zell-Zell-Kontaktbereiche führen und durch Auslösen intakter, infizierter Zellen aus dem Gewebsverband eine Ausbreitung chlamydialer Infektionen erleichtern. Weiter erscheint auch eine Rho A-abhängige Deregulation des Aktinzytoskeletts als Konsequenz eines Nectin-1-Verlusts möglich [170].

Eine dritte Klasse an Substraten umfasst die pro-apoptotischen BH-3-Proteine (siehe Abschnitt 1.3). In mehreren Studien wurde die Degradierung verschiedener Mitglieder der

26

Gruppierung nachgewiesen, unter anderem Bim, Puma und tBid. Mit der Spaltung assoziiert scheint die Resistenz Chlamydien-infizierter Zellen gegenüber mitochondrial-vermittelter apoptotischer Prozesse [87, 115]. Im Gegensatz zu den bisher eingeführten CPAF-Substraten, bei denen von einer direkten Spaltung durch die aktive Protease ausgegangen wird, ist der Modus der Prozessierung der BH-3-Proteine weniger klar. So sprechen Daten für eine Beteiligung zellulärer Faktoren, vermutlich dem Ubiquitin/Proteasom-abhängigen Proteindegradierungssystem [87].

Als weiteres, während Infektion CPAF-abhängig gespaltenes, Substrat wurde Cyclin B1 identifiziert. Cyclin B1 ist im Komplex mit CDK1 am Zellzyklus beteiligt und ermöglicht den Übertritt von G2 zu M-Phase. Entsprechend wird auf die Spaltung von Cyclin B1 eine verzögerte bzw. fehlende Proliferation infizierter Zellen zurückgeführt. Ob dies zutrifft ist nicht endgültig geklärt. Der Vorteil einer Unterdrückung der Zellproliferation könnte durch die Beobachtung erklärt werden, dass bei Zellteilung die Vakuolen infizierter Zellen teilweise nicht auf die Tochtergeneration übertragen werden [87, 172].

1.5 Zielsetzung

Die Analyse und Charakterisierung chlamydialer Proteine stellt aufgrund fehlender Möglichkeiten der genetischen Manipulation und dem obligat intrazellulären, biphasischen Entwicklungszyklus nach wie vor eine anspruchsvolle Aufgabe dar. Zwar ist es durch isolierte Betrachtung bakterieller Proteine in Modellsystemen möglich, Hinweise auf deren Funktion zu erhalten; ihre Aufgabe während einer Infektion kann auf diese Weise jedoch nicht endgültig bestimmt werden. Ein wichtiger Schritt zur möglichst umfassenden Charakterisierung des chlamydialen Effektors CPAF war die Generierung eines induzierbaren und aktivierbaren CPAF-Fusionsproteins und einer entsprechenden stabilen humanen Zelllinie. Unter deren Verwendung sollte in Zellkultur ebenso wie in *in vitro* Experimenten das Substratspektrum der Protease weiter beleuchtet werden.

Viele bisher beschriebene CPAF-Substrate weisen auf eine Bedeutung des chlamydialen Effektors bei der Unterdrückung bzw. der Abschwächung einer Immunantwort hin. Im Bereich inflammatorischer Signalwege weist die Literatur gleichfalls eine aktive, Effektorprotein-vermittelte Modulation aus. Mit diesen Vorgängen verbunden ist eine Blockierung des NF-kB-Signalwegs durch das CPAF-Homolog CT441. Im Zuge dieser Arbeit soll überprüft werden, ob auch CPAF befähigt ist, Einfluss auf den NF-kB-Signalweg zu nehmen. Dazu sollen neben CPAF-abhängigen Spaltvorgängen beteiligter Proteine auch Translokation und Aktivität des Transkriptionsfaktors überprüft werden. Mögliche Konsequenzen für zelluläre Funktionen sollen durch verschiedene zellbiologische und immunologische Methoden, unter anderem Luziferasereportergen- und ELISA-Experimente, untersucht werden.

27

Trotz der vorhandenen Möglichkeiten der Analyse von CPAF ist bisher kein System zur direkten Untersuchung von dessen Funktion während einer Infektion bekannt. Ein Ansatz ist die Verwendung spezifischer Inhibitoren. Abgeleitet aus der vorhandenen Literatur soll die Eignung verschiedener Peptid-Inhibitoren als neue Klasse an CPAF-Inhibitoren getestet werden. Bei erfolgreicher Einführung stünde so ein neues Werkzeug zur *in vivo* Analyse der Bedeutung dieser Protease bereit, welches überdies, ob der vermuteten Bedeutung der Protease für chlamydiale Infektionen, als neuer Ansatz für Therapien dienen könnte.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometer FACS	
FACS Calibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Elektrophoresekammern:	
Max Submarine Unit (Agarose)	Hoefer, San Francisco, CA, USA
HE99X (Agarose)	Hoefer, San Francisco, CA, USA
Mighty Small SE260 (SDS-PAGE)	Hoefer, San Francisco, CA, USA
Mini-vertical Unit (SDS-PAGE)	Hoefer, San Francisco, CA, USA
Elektroporation:	
Gene Pulser	Bio-Rad, München, Deutschland
Fluorimeter:	
Twinkle LB 970	Berthold Detection Systems, Pforzheim, Deutschland
Konfokales Mikroskop:	
Axiovert 100 M Laser Scanning Microscope	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Lichtmikroskop:	
Axiovert 40 C	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Luminometer:	
Orion Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim, Deutschland
PCR-Cycler:	
T 3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Mycycler Thermocycler	Bio-Rad, München, Deutschland
Photometer:	
Sunrise Microplate Photometer	Tecan, Crailsheim, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller		
SDS-Gelelektrophorese: EPS 1001	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala,		
	Schweden		
Sterilbank:			
HERAsafe HSP 18 (Zellkultur)	Heraeus, Hanau, Deutschland		
Inkubatoren und Brutschränke:			
Hera cell 240 (Zellkultur)	Heraeus, Hanau, Deutschland		
WB 330 (Bakterien) Mytron, Heiligenstadt, Deutschlar			
Thermomixer comfort (Heizblock) Eppendorf, Wesseling-Berzdorf,			
Deutschland			
UV-Transilluminator	Chemidoc XRIS Bio-Rad, München,		
	Deutschland		
Western-Blot:			
Mini Trans-Blot [®] Cell (Blotkammer)	Bio-Rad, München, Deutschland		
Criterion Blotter (Blotkammer)	Bio-Rad, München, Deutschland		
Curix 60 (Entwickler) AGFA, Köln, Deutschland			
Zentrifugen:			
Biofuge primo R	Heraeus, Hanau, Deutschland		
Centrifuge 5415C	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf,		
	Deutschland		
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland		
Megafuge 2.0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland		
Multifuge 3 SR	Heraeus, Hanau, Deutschland		
Sorvall RC 26	Plus DuPont, Newton, CT, USA		
Ultrazentrifuge:			
Optima L-100 XP	Beckham & Coulter, Krefeld,		
	Deutschland		
Proteinaufreinigung:			
Äkta FPLC-P 900	GE Healthcare, Waukesha, WI, USA		
HisTrap FF crude (5ml)	GE Healthcare, Waukesha, WI, USA		
Resource Q (6ml)	GE Healthcare, Waukesha, WI, USA		
HiTrap Desalting	GE Healthcare, Waukesha, WI, USA		

2.1.2 Chemikalien

Bezei	ich	nung
-------	-----	------

Aceton

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung Agarose Albumin, Bovine (BSA) Anhydrotetracyclin (AHT) Ammoniumperoxodisulfat (APS) Ampicillin Blasticidin Coumermycin Cycloheximid Natrium-Deoxycholat Deoxynukleosid-Mix Dimethylsulfoxid (DMSO) Dinatriumhydrogenphosphat Dithiothreitol (DTT) Essigsäure (100 %) Ethanol (99.8 %, 70 %)

Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) Fötales Kälberserum, FCS (Tetracyclin negativ) Formaldehyd (37 %) Gentamicin Glasperlen (0.75-1 mm) Glycerin Glycin HEPES Isopropanol

Hersteller

Apotheke Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland Bio-Rad, München, Deutschland Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA Sigma, Deisenhofen, Deutschland IBA, Göttingen, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Roth, Karlsruhe, Deutschland Roche, Mannheim, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland Roth, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Roth, Karlsruhe, Deutschland Apotheke Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland Roth, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland PAA, Pasching, Österreich Roth, Karlsruhe, Deutschland PAA, Pasching, Österreich Roth, Karlsruhe, Deutschland Roth, Karlsruhe, Deutschland Roth, Karlsruhe, Deutschland Roth, Karlsruhe, Deutschland Apotheke Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kanamycinmonosulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol (99 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge 10 N	Apotheke Klinikum rechts der Isar,
	München, Deutschland
Phosphate Buffered Saline, PBS	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
Ponceau S	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure 5 N	Apotheke Klinikum rechts der Isar,
	München, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Bio-Rad, München, Deutschland
Trypsin/EDTA (0.05 %/0.02 % w/v)	PAA, Colbe, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Vancomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Zeocin	InvivoGen, San Diego, CA, USA

2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Zellkulturmedium		Kryokonservierungs	medium
DMEM	90 %	FCS	90 %
FCS	10 %	DMSO	10 %
PBS			
NaCl	137 mM		
KCI	2,7 mM		
Gesamt-Phosphat	12 mM		
pH 7,4			

LB-Medium	L	.B _{Kan}	
Trypton	1 % (w/v)	Trypton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	1 % (w/v)	NaCl	1 % (w/v)
pH 7		Kanamycin	30 µg/µl
		рН 7	

P		LB-A	gar		
Trypton	1 %	(w/v)	Trypton	1 %	(w/v)
Hefeextrakt	0,5 %	(w/v)	Hefeextrakt	0,5 %	(w/v)
NaCl	1 %	(w/v)	NaCl	1 %	(w/v)
Ampicilin	100	µg/µl	Agar	1,5 %	(w/v)
рН 7			рН 7		

g

g

g

ml

SOC-Medium:

Bacto-Trypton	20
Hefeextrakt	5
NaCl	0,5
KCI 1 M	2,5
auf 1 I mit H ₂ O	

Chlamydien-Transportmedium:

10x PBS	50	ml
Phenolrot 0.5 %	2	ml
FCS	10	ml
Gentamicin (10mg/ml)	2	ml
Saccharose 25 %	137	ml
auf 500 ml H ₂ O		

Trito	onlysepuffer:			NP-40-Lysepuffer		
	Triton X-100	1 %	(v/v)	NP-40	1 %	(v/v)
	NaCl	150	mМ	NaCl	150	mМ
	EDTA	1	mМ	EDTA	1	mМ
	MOPS (pH 7,4)	20	mМ	MOPS (pH 7,4)	20	mМ
RIP	A-Puffer:					
	Tris-HCI (pH 8)	50	mМ			
	NaCl	150	mМ			
	Triton-X 100	1 %				
	Natriumdeocycholate	0,5 %	1			
	SDS	0,1 %	1			

Puffer A		Puffer B			
Hepes (pH 7,9)	10	mΜ	Hepes (pH 7.9)	20	mМ
KCI	0,1	mМ	NaCl	400	mМ
EDTA	0,1	mМ	EDTA	1	mМ
EGTA	0,1	mМ	EGTA	1	mМ
DTT	1	mΜ	DTT	1	mМ

6x Laemmli-Puffer:		5x SDS-Laufpuffer:			
Tris-HCI (pH 6,8)	62,5	mМ	Tris-HCI (pH 8,5)	500	mМ
SDS	2 %		Glycin	192	mМ
Glycerol	50 %		SDS	17	mМ
EDTA	2	mМ			
Bromphenolblau	0,004	1 %			
DTT	1	mМ			

TBS-Puffer:			TBS-T-Puffer:		
Tris-HCI (pH 7,6)	20	mМ	Tris-HCI (pH 7,6)	20	mМ
NaCl	137	mМ	NaCl	137	mΜ
			Tween-20	0,05 9	%

Blockierungspuffer:			10x Tris/Glycin:			
Magermilchpulver 5 % in TBS-T		Tris	250	mМ		
			Glycin	1,92	М	
			-			
Transferpuffer:			Ponceau S:			
Methanol	20 %	5 (v/v)	Ponceau S	0,1 %)	
10x Tris/Glycin	10 %	5 (v/v)	Essigsäure	5 %		
50x TAE:						
Tris	242	g				
Eisessig	57,1	ml				
EDTA	37,2	g				
auf 1 I mit H ₂ O (pH 8,5)						
NIN I A-Bindeputter			NINIA-Elutionputter			
Na ₃ PO ₄ (pH 7,4)	20	mΜ	Na ₃ PO ₄ (pH 7,4)	20	mΜ	
NaCl	500	тM	NaCl	500	mΜ	
Imidazol	20	mΜ	Imidazol	500	mМ	
ResourceQ-Bindeputter			ResourceQ-Elutionsputter			
Tris-HCI (pH 8)	20	mМ	Tris-HCI (pH 8)	20	mΜ	
Mg(Ch ₃ -COO ⁻) ₂	2,5	mМ	Mg(Ch ₃ -COO ⁻) ₂	2,5	mМ	
NaCl	20	mМ	NaCl	1	Μ	
Glycerin	2 %		Glycerin	2 %		
Protease-Inhibitor			Protease-Inhibitor			
Sulfolink-Flutionspuffer						
Glycin (nH 2 5)	100	тM				
NaCl	150	mM				

FACS-Färbepuffer		Luziferase-Assay Puffer		
PBS		D-Luziferin	470	μM
BSA	0,5 %	CoenzymA	270	μM
Saponin	0,5 %	DTT	33,3	mМ
		ATP	530	μM
		Magnesiumcarbonat	1,07	mМ
		Magnesiumsulfat	2,67	mΜ
		Trizin	20	mМ
		EDTA	0,1	mМ

2.1.4 Plasmide

pGH422

pcDNA4/TO/myc-His A (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) eukaryotischer Expressionsvektor für Proteine mit myc/His-Tag

pGH477

pcDNA4/TO/FLAG-3xGyraseB eukaryotischer Expressionsvektor für ein Fusionsprotein mit 3x GyraseB-FLAG-Tag (Aminosäuren 2-221 aus *E. coli*)

pGH479

pcDNA4/TO/FLAG-3xGyraseB-CPAF (*Chlamydia trachomatis*) eukaryotischer Expressionsvektor für ein CPAF-Fusionsprotein mit N-terminalem 3x GyraseB-FLAG-Tag (Aminosäuren 2-221 aus *E. coli*)

pcDNA4/TO/FLAG-1xGyraseB-CPAF (Chlamydia trachomatis)

eukaryotischer Expressionsvektor für ein CPAF-Fusionsprotein mit N-terminalem 1x GyraseB-myc-Tag (Aminosäuren 2-221 aus *E. coli*)

pcDNA4/TO/FLAG-1xGyraseB-CPAF (Chlamydophila pneumoniae)

eukaryotischer Expressionsvektor für ein CPAF-Fusionsprotein mit N-terminalem 1x GyraseB-myc-Tag (Aminosäuren 2-221 aus *E. coli*)

pET30b-CPAF(Chlamydia trachomatis)

prokaryotischer Expressionsvektor für ein CPAF-Fusionsprotein mit C-terminalem 3x His-Tag

pcDNA3.1-CT441-myc-HisA

eukaryotischer Expressionsvektor für ein CT441-Fusionsprotein mit N-terminalem myc- und His-Tag

pEGFP-C2

eukaryotischer Expressionsvektor für GFP-Fusionsproteine

pEGFP-C2-Vimentin

eukaryotischer Expressionsvektor für ein GFP-Fusionsprotein mit humanem Vimentin (Aminosäuren 1-465)

pcDNA V5/DEST 6.2 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

eukaryotischer Expressionsvektor des *Gateway*-Systems, mit Topoisomerase-Erkennungssequenzen und *Rekombinase-Attachment*-Sequenzenen

pcDNA V5/DEST 6.2-hKeratin 8-myc

eukaryotischer Expressionsvektor des *Gateway*-Systems für ein myc-getaggtes Fusionsprotein mit humanem Keratin 8 (Aminosäuren 1-430)

pRSV-Rev

lentivirales Verpackungsplasmid der dritten Generation. Durch das Plasmid wird HIV-1-rev cDNA exprimiert. Das Protein ist unter der Kontrolle eines RSV U3 Promoters (Addgene, Cambridge, MA, USA)

pMDLg/pRRE

lentivirales Verpackungsplasmid der dritten Generation. Es kodiert für die viralen Strukturproteine pol, welches retrovirale Enzyme kontrolliert und RRE, welches eine Bindungsstelle für das lentivirale REV ist, wodurch der RNA-Export aus dem Nukleus ermöglicht wird (Addgene, Cambridge, MA, USA)

pMD2.G

lentivirales Verpackungsplasmid der dritten Generation. Es kodiert für das Verpackungsprotein VSV-G des vesikulären Stomatitis Virus (Addgene, Cambridge, MA, USA)

pLVUB-lgк

lentiviraler Expressionsvektor für eukaryotische Zellen. Er kodiert für ein 3x Igκ-Luziferase (*Photinus pyralis*) Reporterelement

2.1.5 Bakterien

E. coli TOP 10 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

E. coli Stamm für Klonierungen

Spezifikationen: F-*mcrA* Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) Φ 80 *lacZ* Δ *M*15 Δ *lacX*74 *recA*1 *deoR araD*139 Δ (*ara-leu*)7697*galU galK rpsL* (strR) *endA*1 *nupG*

E. coli BL21 DE3 (Merck, Darmstadt, Deutschland)

E. coli-Expressionsstamm

Spezifikationen: F- ompT hsdSB (r-Bm-B) gal dcm (DE3)

Chlamydia trachomatis Serovar L2 (ATCC, Manassaas, VA, USA)

Human-pathogene Bakterien der *Chlamydiaceae,* welche nach Infektion das *Lymphogranuloma venereum* auslösen können.

Chlamydophila pneumoniae CM-1 (ATCC, Manassaas, VA, USA)

Human-pathogene Bakterien der *Chlamydiaceae*, welche Infektionen der Atemwege auslösen können.

2.1.6 Zelllinien

T-REx-293

Humane, embryonale Nierenepithelzellen, welche stabil den Tet-Repressor exprimieren (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

HEK-293-FT

Humane, embryonale Nierenepithelzellen, welche das "SV-40 large T-Antigen" tragen.

T-REx-293-LV-Luziferase (T-REx-293-Luziferase)

Humane, embryonale Nierenepithelzellen, welche stabil den Tet-Repressor exprimieren. Zusätzlich tragen die Zellen durch lentivirale Transduktion ein Igk-Luziferase-Reporterkonstrukt (*Photinus pyralis*).

T-REx-293-gyrB-CPAF

Humane, embryonale Nierenepithelzellen, welche stabil den Tet-Repressor exprimieren. Die Zellen sind stabil mit einem Tetracyclin regulierbaren Vektor, welcher ein FLAG-Tag-3xGyraseB-CPAF-Konstrukt kodiert, transfiziert. CPAF stammt aus *Chlamydia trachomatis*.

T-REx-293-gyrB-CPAF-LV-Luziferase (T-REx-293-gyrB-CPAF-Luziferase)

Humane, embryonale Nierenepithelzellen, welche stabil den Tet-Repressor exprimieren. Die Zellen sind stabil mit einem Tetracyclin regulierbaren Vektor, welcher ein FLAG-Tag-3xGyraseB-CPAF-Konstrukt kodiert, transfiziert. CPAF stammt aus *Chlamydia trachomatis*. Zusätzlich tragen die Zellen, durch lentivirale Transduktion, ein Igk-Luziferase-Reporterkonstrukt (*Photinus pyralis*).

HEp-2

Epidermoide Karzinom-Zelllinie, welche aus dem humanen Larynx stammt.

MEF

Embryonale Fibroblasten-Zelllinie der Maus, hier durch Transformation mit "SV-40 *large* T-Antigen" immortalisiert.

2.1.7 Antikörper

Primärantikörper

α-Aktin	monoklonaler Antikörper aus Maus gegen β-Aktin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
α-Alix	monoklonaler Antikörper aus Maus gegen Alix (AbD Serotech, Martinsried, Deutschland)
α-Bim	monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Bim (Cell Signalling, Danvers, Ma, USA)
α-aktive Caspase-3	monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen aktive Caspase-3 (abcam, Cambridge, UK)
α-Caspase-8	monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Caspase-8 (Cell Signalling, Danvers, Ma, USA)
α-CPAF	polyklonales Antiserum welches durch Immunisierung von Kaninchen mit einem Peptid der CPAF-Sequenz generiert wurde (Pineda Antikörper-Service, Berlin, Deutschland)
α-Cyclin B1	monoklonaler Antikörper aus Maus gegen Cyclin B1 (Cell Signalling, Danvers, Ma, USA)
α-eEF-2	monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen eEF-2 (Cell Signalling, Danvers, Ma, USA)
α-ERK-1/2	monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen ERK-1/2 (p42/p44; Cell Signalling, Danvers, Ma, USA)
α-GAPDH	monoklonaler Antikörper aus Maus gegen GAPDH (Millipore, Billerica, MA, USA)
α-HDAC-1	monoklonaler Antikörper aus Maus gegen HDAC-1 (Millipore, Billerica, MA, USA)
α-Ι-κΒ-α	monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen I-κB-α (Cell Signalling, Danvers, Ma, USA)
α-ΙΚΚ-α	monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen IKK-α (Cell Signalling, Danvers, Ma, USA)
α-ΙΚΚ-β	monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen IKK-β (Millipore, Billerica, MA, USA)

Materialien und Methoden

α-Keratin 8	monoklonaler Antikörper aus Maus gegen humanes Keratin 8 (Acris, Hiddenhausen, Deutschland)
α-тус	monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen einen myc-Tag (Cell Signalling, Danvers, Ma, USA)
α-Mst-4	monoklonaler Antikörper aus Maus gegen Mst-4 (Cell Signalling, Danvers, Ma, USA)
α-p65/RelA	monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen p65/RelA (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland)
α-phospho-I-κB-α	monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen phosphoryliertes I- κB-α Protein (Cell Signalling, Danvers, Ma, USA)
α-phospho-ERK-1/2	monoklonaler Antikörper aus Maus gegen phosphoryliertes ERK- 1/2 (Cell Signalling, Danvers, Ma, USA)
α-Septin-2	monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Septin-2 (Proteintech Group, Chicago, IL, USA)
α-RFX-5	monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Vimentin (Acris, Hiddenhausen, Deutschland)
α-Vimentin	monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Vimentin (Acris, Hiddenhausen, Deutschland)
α-chlamydial-LPS-FITC	monoklonaler, an das Fluorophor Fluoreszein-gekoppelter Antikörper aus Maus gegen chlamydiales LPS (Progen, Heidel- berg, Deutschland)
Sekundärantikörper	

- **POX-Ziege-α-Maus**Meerrettich-Peroxidase gekoppelter, polyklonaler, gegen murineProteine gerichteter, Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland)
- **POX-Ziege-α-Kaninchen** Meerrettich-Peroxidase gekoppelter, polyklonaler, gegen Proteine aus Kaninchen gerichteter, Antikörper (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- **Esel-α-Kaninchen-Cy5** Cyanine-Farbstoff-gekoppelter, polyklonaler, gegen Kaninchen Proteine gerichteter Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien

Alle Zelllinien wurden entsprechend der Anforderungen der Experimente in Kulturschalen bzw. -Platten in DMEM bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert. T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen wurde während Kultivierung zusätzlich Blasticidin (5 µg/µl) und Zeocin (175 µg/ml) zugesetzt. Diese Selektion wurde gewählt, da der CPAF-FLAG-Tag-3xGyraseB-Vektor für eine Zeocin-Resistenz kodiert. Bei einer Konfluenz der adhärenten Zellen von 60-80 % wurden diese durch Trypsin abgelöst, geerntet, verdünnt und neu ausgesät bzw. in Experimenten verwendet.

Zum Ernten der Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend Trypsin-EDTA 0,05 %/0,02 % zugesetzt, um die Zellen abzulösen. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Trypsinierung durch Zugabe von serumhaltigen DMEM abgestoppt und die Zellen wurden neu ausgesät. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauerzählkammer eingesetzt (Merck, Darmstadt, Deutschland).

2.2.1.2 Test auf Mykoplasmenkontamination

2.2.1.2.1 MycoAlert[®]Mycoplasma Detection Kit

Kontaminationen von Zelllinien mit Mykoplasmen können durch Schädigungen der Zellen bzw. Veränderungen der Zellphysiologie zu einer Verfälschung experimenteller Daten führen. Typisches Indiz einer Kontamination ist ein Absinken der Zellproliferation aufgrund einer Unterversorgung mit Nährstoffen. Eine Möglichkeit kultivierte Zellen auf Mykoplasmen zu testen besteht im Nachweis Mykoplasmen-abhängiger ATP-Bildung. Es werden Mykoplasmen lysiert und deren ATP-Bildung über die Reaktion von ATP mit Luziferin und Sauerstoff beobachtet. Die emittierte Biolumineszenz der Nachweisreaktion dient als quantifizierbare Größe. Dazu wurde ein *MycoAlert[®]Mycoplasma Detection* Kit (Cambrex Bio Science Inc., Nottingham, UK) verwendet.

Zunächst wird der zu testenden Kultur Medium entnommen und zentrifugiert (1,500 rpm, RT, 5 min). Anschließend werden 50 µl des Überstands mit 50 µl *MycoAlert*[®]-Reagenz gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Messung der Lumineszenz wird den Ansätzen 100 µl *MycoAlert*[®]-Substrat zugesetzt. Dieses beinhaltet das Substrat der Luminolreaktion. Alle Ansätze werden für 10 min bei RT inkubiert, und die Lumineszenz wird erneut bestimmt. Der Quotient aus zweiter Messung und erster Messung gibt Aufschluss über eine mögliche Kontamination. Werte größer als 1,5 sind ein Hinweis auf eine Mykoplasmenkontamination.

2.2.1.2.2 Venor[®] GeM Mycoplasma-PCR Detection Kit

Eine sehr sensitive Möglichkeit des Nachweises von Mykoplasmen stellt eine entsprechend adaptierte PCR dar. Man verwendet hierbei Primer, welche spezifisch für 16S ribosomale RNA von Mykoplasmen sind.

Medium wird von konfluenten Zellen abgenommen und für 5 min auf 95°C erhitzt. Dadurch werden vorhandene Mykoplasmen lysiert. Nach Zentrifugation des Probenmaterials für 5 s bei 13,000 rpm wird dieses entsprechend der Angaben des Herstellers weiterverwendet. Um die Generation möglichst zuverlässiger Ergebnisse zu garantieren, beinhaltet das verwendete *Venor[®] GeM Mycoplasma-PCR Detection Kit* (Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland) zum einen eine interne Kontrolle, welche das Funktionieren der PCR kontrolliert, zum anderen eine Positivkontrolle für Mykoplasmen. PCR-Amplifikate werden über Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.1.3 Transfektion mit FuGENE HD

Bei FuGENE HD[®] (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) handelt es sich um ein lipidbasiertes, nicht-liposomales Transfektionsreagenz ohne tierische Komponenten, welches in der Lage ist, Komplexe mit DNS einzugehen und so den Import von Fremd-DNS in Zellen zu optimieren. Im Gegensatz zur Elektroporation sterben dadurch weniger Zellen. Über dieses System wurden im Verlauf dieser Arbeit HEK-293-FT-, T-REx-293-, T-REx-293-gyrB-CPAF-, HeLa-, sowie MEF Zellen mit Plasmid-DNS transfiziert.

Entsprechend den Angaben des Herstellers werden Zellen in antibiotikafreiem Zellkulturmedium definiert ausgesät. Am folgenden Tag werden 2 µg Plasmid-DNS zu 100 µl DMEM (ohne FCS) gegeben. Anschließend wird dem Ansatz 8 µl FuGENE HD[®] Reagenz beigefügt und für 1-2 s gevortext. Nach 15 min Inkubation bei RT werden die Ansätze vorsichtig in vorbereitete Kulturschalen bzw. Platten pipettiert. In der Folge können die Zellen entsprechend der experimentellen Vorgaben weiterverwendet werden.

2.2.1.4 Herstellung von genetisch veränderten Lentiviren

Zur dauerhaften genetischen Veränderung von teilungsaktiven wie inaktiven, eukaryotischen Zellen, werden auf dem *"human immunodeficiency virus type 1"-* HI-Virus basierende, Transduktionssysteme verwendet. Von HIV-1 abstammende Vektoren sind in der Lage, sich stabil in das Genom der Zielzellen zu integrieren. So können Transgene dauerhaft in Zellen eingeführt werden. Hierzu werden in einem ersten Schritt genetisch manipulierte Lentiviren hergestellt. Zur möglichst sicheren Handhabung wird bei diesen Systemen das ursprüngliche Virus aller, für die Transduktion nicht notwendigen Funktionen bzw. Gene beraubt. Weiterhin werden alle cis-agierenden und trans-agierenden Elemente auf verschiedenen, voneinander

getrennten Plasmiden kodiert. Das verwendete System beinhaltet insgesamt vier Vektoren. Ein Plasmid trägt alle cis-agierenden Elemente, die zur Produktion genomischer RNS benötigt werden, sowie das Transgen. Die drei anderen Plasmide kodieren für Gene zur Verpackung und Assemblierung der Viruspartikel und für trans-agierende Faktoren, die eine Integration des Transgens in das Erbgut der Zielzelle ermöglichen. Durch gleichzeitige Transfektion aller Vektoren in eine Donorzelllinie wird die Produktion Transgen-tragender Viruspartikel ermöglicht.

Die hier verwendeten Verpackungsplasmide sind pRSV-Rev, welches zur Verbesserung des Exports ungespliceter, viraler, genomischer RNS und somit einer Erhöhung des Virustiters dient, pMDLg/pRRE, welches unter anderem für die virale Integrase kodiert und pMD2.G, welches für das Verpackungsprotein VSV-G des vesikulären Stomatitis Virus kodiert und so die Transduktion in sich teilende und sich nicht teilende Zellen ermöglicht. Über Deletionen in viralen *"long terminal repeat"-* LTR Regionen wurde sichergestellt, dass sich die produzierten Viruspartikel nicht replizieren.

Zur Produktion von genetisch veränderten Lentiviren werden HEK-293-FT Zellen mit den beschriebenen Plasmiden transfiziert. Dazu wird FuGENE HD[®] eingesetzt. Im Falle einer Ø10cm Kulturschale werden 4,5 μ g Expressionsplasmid, 1,1 μ g pRSV-Rev, 2,8 μ g pMDLg/pRRE und 1,6 μ g pMD2.G eingesetzt und mit 500 μ l serum- und antibiotikafreiem Medium gemischt. Nach Zugabe von 40 μ l FuGENE HD[®] wird der Ansatz 15 min bei RT inkubiert und anschließend zu HEK-293-FT Zellen pipettiert. Nach 6-8 h wechselt man das Medium der Zellen und inkubiert sie für 72 h. Zur Ernte der Viruspartikel wird das Medium abgenommen und 5 min bei 3,000 rpm und RT zentrifugiert. Der Virusüberstand wird abschließend mit einem Filter, Porengröße 0,45 μ M, steril filtriert und kann dann zur Transduktion eukaryotischer Zellen verwendet werden.

2.2.1.5 Lentivirale Transduktion eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen werden am Tag vor der Transduktion ausgesät. Je nach Zelltyp werden am folgenden Tag 2-5x10⁵ Zellen in 1 ml Lentivirus-Überstand aufgenommen. Das Gemisch wird dann in eine 6-Loch-Platte überführt, und das Medium wird nach 6-8 h gewechselt. Je nach Transgen-tragendem Vektor können die Zellen in der Folge selektioniert oder über einen Fluoreszenzmarker sortiert werden.

2.2.1.6 Zelllyse

2.2.1.6.1 Lyse eukaryotischer Zellen durch Triton-X 100 bzw. NP-40

Um die Proteinzusammensetzung von Zellen, per Western Blot Analyse zu untersuchen, werden Zellen durch den Einsatz von Detergenzien lysiert. Über Triton-X 100 oder NP-40

können Zellmembranen solubilisiert und zytosolische Proteingemische gewonnen werden. Der Zellkern bleibt bei Verwendung dieser Detergenzien überwiegend intakt.

Zur Lyse von adhärenten Zellen werden diese geerntet und anschließend durch Zentrifugation bei 1,500 rpm, 4°C sedimentiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS und erneuter Pelletierung (1,500 rpm, 4°C, 5 min) werden die Zellen durch Einsatz des Detergenz-enthaltenden Lysepuffers für 30 min bei 4°C lysiert. Dabei werden 100 µl Lysepuffer pro 10⁶ Zellen eingesetzt. Um während dieses Vorgangs Proteindegradierung durch Proteasen zu vermeiden, verwendet man auf 4°C vorgekühlten Lysepuffer und setzt einen Mix verschiedener Protease-Inhibitoren (Roche, Mannheim, Deutschland) zu. Zellreste sowie unlösliche Proteinbestandteile werden durch Zentrifugation bei 13,000 rpm, 4°C, für 15 min abgetrennt. Der Überstand enthält den löslichen Proteinanteil, welcher entweder direkt weiterverwendet oder bei -80°C gelagert werden kann.

2.2.1.6.2 Lyse eukaryotischer Zellen durch RIPA-Puffer

Zum Nachweis von zytosolischen- und Kernproteinen wird zur Zelllyse RIPA-Puffer eingesetzt. Dieser enthält als Detergenzien sowohl NP-40 als auch das ionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS), welches in der Lage ist, die Kernmembran zu zerstören.

Ernte und Lyse der Zellen werden analog zu 2.2.1.6.1 durchgeführt. Gleichfalls wird dem Lysepuffer ein Protease-Inhibitoren-Mix (Roche, Mannheim, Deutschland) zugesetzt. Zur Entfernung von DNS werden alle Ansätze im Anschluss an die Lyse für 10 s kontinuierlich Ultraschall-behandelt. Zellreste werden abschließend durch Zentrifugation für 15 min bei 13,000 rpm 4°C abgetrennt und die Überstände weiterverwendet oder bei -80°C eingefroren.

2.2.1.6.3 Lyse eukaryotischer Zellen durch Laemmli-Puffer

Zur Vermeidung von Lyseartefakten können Zellen auch direkt in Laemmli-Puffer [173] durch das enthaltene SDS aufgeschlossen werden. Dazu werden die Zellen geerntet, in PBS gewaschen und durch Zentrifugation (1,500 rpm, 4°C, 5 min) sedimentiert. Anschließend resuspendiert man die Pellets in 50 µl Laemmli-Puffer. Zur Proteindenaturierung werden alle Ansätze 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend weiterverwendet.

2.2.1.6.4 Herstellung von nukleären und zytosolischen Zelllysaten

Zur getrennten Analyse von kern- und zytosollokalisierten Proteinen via Western Blot ist es möglich, nukleäre und zytosolische Zelllysate herzustellen. In einem mehrstufigen Prozess lässt man Zellen zunächst mittels eines hypotonen Puffers schwellen, um sie dann mechanisch durch Passage über eine dünne Kanüle aufzubrechen. Bei diesem Vorgang wird lediglich die Zellmembran zerstört, der Kern bleibt überwiegend intakt. Durch anschließendes Pelletieren der Kerne trennt man endgültig nukleäre von zytosolischen Proteinen.

Zellen werden geerntet, mit PBS gewaschen und über Zentrifugation bei 1,500 rpm, 7 min, 4°C sedimentiert. Anschließend inkubiert man die Zellen in kaltem, hypotonem Puffer A für 15 min auf Eis bei 4°C. Um vorhandene Proteaseaktivität zu blocken setzt man dem Puffer einen Protease-Inhibitor-Mix zu (Roche, Mannheim, Deutschland). Die Zellen werden dann mehrfach über eine 26G Kanüle passagiert und so aufgebrochen. Mittels Zentrifugation bei 6,800 rpm, 5min, 4°C pelletiert man die Kerne. Die zytosolische Fraktion wird ein weiteres Mal bei 13,000 rpm, 15 min, 4°C zentrifugiert um mögliche Zellreste zu entfernen. Die nukleäre Fraktion wird mehrfach mit kaltem, hypotonem Puffer A gewaschen. So vorbehandelte Kerne können dann durch Zugabe von kaltem hypertonen Puffer B mit (Protease-Inhibitor Zusatz) lysiert werden. Dazu werden die resuspendierten Kerne für 45 min bei 4°C und 300 rpm, 15 min, 4°C. Beide Lysate werden direkt weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.1.7 Kryokonservierung von Zellen

Zur Langzeitlagerung von Zellen werden diese kryokonserviert. Hierzu werden 5x 10⁶ Zellen nach Sedimentierung in 90 % FCS, 10 % DMSO resuspendiert. Anschließend werden sie in Einfriergefäße aliquotiert und in einem speziellen, mit Isopropanol gefüllten Behälter bei - 80°C eingefroren. Eine noch längere Lagerung ermöglicht eine anschließende Überführung der Zellen in flüssigen Stickstoff. Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, werden sie bei 37°C aufgetaut und Kulturmedium zugegeben. Die Zellen werden dann für 5 min bei 1,500 rpm sedimentiert, in Medium aufgenommen und ausplattiert.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Chlamydien

2.2.2.1.1 Infektion mit Chlamydia trachomatis

Zur Infektion von MEF-, HeLa- und T-REx-293 Zellen werden diese zunächst mit PBS gewaschen und Serum-freies Kulturmedium wird zugefügt. Anschließend werden die Zellen mit Chlamydien (*Chlamydia trachomatis* Serovar L2, ATCC, Manassaas, VA, USA) mit einer *"Multiplicity of Infection"* (MOI; infektiöse Einheiten pro Zelle) von 1-3 infiziert. Nach 120 min wird der Kultur 10 % FCS zugesetzt. Ernte und Weiterverwendung erfolgen nach versuchsabhängigen Inkubationszeiten.

2.2.2.1.2 Infektion mit Chlamydia pneumoniae

Zur Infektion eukaryotischer Zellen mit *C. pneumoniae* wurde der Stamm CM-1 (ATCC, Manassaas, VA, USA) verwendet. Je nach experimentellem Aufbau werden Zellen in unterschiedlichen Dichten definiert ausgesät. Bei ausreichender Zelldichte wird das Kulturmedium entfernt und durch Infektionsmedium ersetzt. Dieses enthält neben den Bakterien auch Cycloheximid (1 µg/µl) allerdings kein FCS. Um eine effektivere Infektion zu ermöglichen werden frisch infizierte Zellen für 35 min bei 3,500 rpm und 35°C zentrifugiert. Nach versuchsabhängigen Inkubationszeiten bei 37°C werden die Zellen geerntet und weiterverwendet.

2.2.2.1.3 Isolation von Chlamydia trachomatis

Zur Isolation und anschließender Lagerung von Chlamydia trachomatis werden mykoplasmenfreie, infizierte HEp-2 Zellen verwendet. Typischerweise werden 1,5x 10⁶ HEp-2 Zellen mit MOI = 1 infiziert. Nach 72 h werden diese mit einem sterilen Zellschaber von der Oberfläche ihrer Kulturschale abgelöst und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Anschließend werden zu den Zellen sterile Glasperlen (0,75-1 mm) gegeben. Zum Zellaufschluss erfolgt 3-5 minütiges Vortexen bei RT. Der Überstand wird abgenommen und für 5 min bei 1,500 rpm 4°C zentrifugiert. Zur Reinfektion werden 500-1000 µl Chlamydiensuspension zu 1,5x 10⁶ HEp-2 Zellen gegeben. Nach erneutem Test auf Mykoplasmen werden die Zellen am dritten Tag der Reinfektion, wie oben beschrieben, aufgeschlossen und 3 ml des Überstands werden zur Infektion von 5x10⁶ HEp2-Zellen in Ø15 cm Kulturschalen verwendet. Nach 72 h werden diese erneut geerntet, mit Glasperlen aufgeschlossen und das Lysat nach Zentrifugation (1,500 rpm, 4°C, 5 min) in sterile Plastikröhrchen überführt. Durch Zentrifugation für 1 h bei 37,000 rpm und 4°C werden die Chlamydien sedimentiert. Das Pellet wird dann mit 30 ml Transportmedium gewaschen und erneut bei 13,000 rpm und 4°C für 1 h zentrifugiert. Anschließend muss der Überstand verworfen und das bakterienenthaltende Pellet in 3 ml Transportmedium resuspendiert werden. Zur Lagerung und zum Gebrauch wurden die Chlamydien abschließend à 200 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Infektiösität der Bakterien wurde über Färbung und Titration bestimmt.

2.2.2.2 Transformation von chemokompetenten Eschericha coli TOP10

Zur Transformation von chemokompetenten *E. coli* (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wird zu 50 µl Bakterien 1 µl gereinigtes Plasmid oder 2 µl eines Ligationsansatzes gegeben. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis werden die Bakterien einem Hitzeschritt bei 42°C für 45 s unterzogen. Danach folgt eine kurze Inkubation auf Eis bevor 250 µl SOC-Medium zugegeben werden. Anschließend werden die Ansätze 1 h bei 37°C inkubiert und je nach Plasmid auf entsprechenden Selektionsplatten ausgebracht.

2.2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNS aus Eschericha coli

Zur Isolation kleinerer Mengen an Plasmid-DNS werden 3 ml einer Übernachtkultur transformierter *E. coli* TOP 10 Bakterien verwendet. Deren Ernte erfolgt durch Zentrifugation bei 13,000 rpm, RT für 5 min. Zur eigentlichen Isolation wird ein Promega Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Nach Waschen der DNS eluiert man diese entweder mit 30 µl eines Elutionspuffers niedriger Ionenstärke oder mit H₂O.

Für die Transfektion eukaryotischer Zellen sind größere Mengen an Plasmid-DNS erforderlich. Dazu wird ein *Promega PureYield Plasmid Maxiprep Kit* (Promega Corporation, Madison, WI, USA) entsprechend dem Herstellerprotokoll eingesetzt. Hierzu werden zunächst 250 ml einer Übernachtkultur transformierter *E. coli* Bakterien geerntet. Durch alkalische Lyse erfolgt der Zellaufschluss, und die DNS wird an eine Silica-Membran gebunden. Zur Beschleunigung diese Bindung wird wegen der größeren Lysatmenge Vakuum an die Säulchen angelegt. Da die so gewonnene DNS für Transfektionen eukaryotischer Zellen bestimmt ist, wird neben dem normalen Waschen auch ein Endotoxin-entfernender Puffer eingesetzt. Die Elution erfolgt mit 1-1,5 ml vorgewärmten (auf 50°C), Nuklease-freiem Wasser. Zur Bestimmung der Reinheit und der DNS-Konzentration wird die Absorption bei 260 und 280 nm überprüft.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation bestimmter linearer DNS-Abschnitte werden in 50 µl Ansätzen 100 ng Matrizen-DNS (Plasmid-DNS oder cDNS) mit je 1 µM spezifischer Primer und dNTP-Mix vermischt. Je nach eingesetzter Polymerase wird der entsprechende MgSO₄-haltige Puffer verwendet. Die Ansätze werden anschließend auf 95°C erhitzt und für 2 min inkubiert. Währenddessen werden pro Ansatz 5 U DNS-Polymerase (Pfu-, Pwo- oder Taq-Polymerase) zugegeben. Das Zielfragment wird dann in 30 Zyklen amplifiziert. Diese bestehen aus Denaturierung (30 s, 95°C), Hybridisierung (Temperatur je nach Primersequenz, 1 min) und Elongation (Pfu/Pwo-Polymerase: 68°C, Taq-Polymerase: 72°C; 1 min/1000 bp). Um auszuschließen, dass nicht fertig synthetisierte Fragmente zurückbleiben, wird abschließend ein einmaliger, 10 minütiger Elongationsschritt durchgeführt.

2.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Größe von DNS-Fragmenten werden 1-2 % Agarosegele verwendet. Durch Erhitzen wird Agarose in 1x TAE-Puffer aufgelöst. Um DNS-Fragmente zu detektieren wird der Lösung Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt. Die DNS-Fragmente werden dann durch Anlegen einer Spannung von 100-120 V entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. In Abhängigkeit des experimentalen Aufbaus werden *"GeneRuler[®] 1 kB DNA Ladder"* bzw. *"GeneRuler[®] 100 bp DNA Ladder"* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) als Marker eingesetzt.

2.2.3.3 Aufreinigung von PCR-Produkten und linearen DNS-Fragmenten

Um DNS nach Restriktionsverdau oder PCR möglichst von Verunreinigungen, speziell von anderen DNS-Fragmenten, zu reinigen trennt man sie zunächst per Agarose-Gelelektrophorese auf. Anschließend können die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNS mit einem *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangabe isoliert und aufgereinigt werden. Zu diesem Zweck solubilisiert man die Agarose-Banden in Puffer bei 55°C. Danach wird die DNS bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silicamembran gebunden, gewaschen und in 30 µl eines Puffers niedriger Ionenstärke eluiert. Nach Restriktionsverdau werden die Produkte direkt über ein *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) von Enzymresten gereinigt.

2.2.3.4 Restriktionsverdau

Für einen Restriktionsverdau werden 2 µg Plasmid-DNS bzw. 100 ng aufgereinigtes PCR-Produkt verwendet. Die DNS wird in einem Gesamtvolumen von 50 µl zu den mitgelieferten 10x Puffern, sowie 10 U pro Restriktionsendonuklease (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) gegeben. Für den Verdau inkubiert man die Reaktionsansätze je nach Enzym 1 h, 4 h oder ü. N. bei 37°C und denaturiert die Enzyme anschließend durch Erhitzen auf 65°C für 20 min.

2.2.3.5 Ligation

Um zwei DNS-Fragmente mit identischen Überhängen bzw. ohne Überhänge zu ligieren wird ein Ligations-Kit verwendet (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Vorverdautes Insert und Vektor werden üblicherweise in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt und mit 1 µl Ligase und Puffer gemischt. Die Ansätze werden dann auf 8 µl mit H₂O aufgefüllt und 1 h bei 22°C inkubiert.

2.2.3.6 Zellfreier Test der Proteaseaktivität

Zum Test auf Proteaseaktivität werden Zelllysate von CPAF exprimierenden Zellen bzw. gereinigtes CPAF mit Zelllysaten, teilweise nach transienter Expression getaggter CPAF-Substrate, gemischt und inkubiert. Auf diese Weise ist es möglich, Beeinträchtigungen CPAF-abhängiger Substratspaltung durch zelluläre Vorgänge zu unterbinden.

Entsprechend der Fragestellung werden CPAF-beinhaltende NP-40-Lysate bzw. gereinigtes CPAF zunächst mit Inhibitoren inkubiert. 7,5 µl CPAF-Lösung wird den entsprechenden Substanzen zugesetzt und die Ansätze mit Lysepuffer oder Elutionspuffer auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend erfolgt eine Inkubation für 30 min, bei 37°C und 300 rpm. Zum Test auf Proteaseaktivität gibt man danach 10 µl Substratlysat zu. Nach einstündiger Inkubation der Ansätze bei 37°C und 300 rpm wird Lämmli-Puffer zugesetzt.

2.2.3.7 Bradford Assay

Zur Berechnung der Proteinmenge von Lysaten wird die Methode nach Bradford angewandt [174]. Dabei erfolgt die Bestimmung der Proteinmengen durch Abgleich einer Farbreaktion mit einem Standard (BSA). Zur Erstellung der Eichgerade wird BSA in verschiedenen Konzentrationen zu Bradford-Reagenz (Bio-Rad, München, Deutschland) pipettiert (0 µg, 0,2 µg, 0,4 µg, 0,6 µg, 0,8 µg, 1 µg, 2 µg, 4 µg, 8 µg). Zur Bestimmung der Protein-Konzentrationen wird dem Reagenz je 1 µl Probe zugesetzt. Anschließend erfolgt eine 15-minütige Inkubation der Ansätze in Dunkelheit, um im Anschluss die Absorption bei 595 nm über ein UV-Vis Spektrometer zu bestimmen. Durch die so gemessenen Absorptionswerte können dann die jeweiligen Konzentrationen errechnet werden. Dazu verwendet man die Magellan-2 Software. Um einen möglichen Fehler der Messungen zu verringern werden Doppelbestimmungen der Proteinkonzentrationen durchgeführt.

2.2.3.8 SDS-PAGE

Zur Proteinauftrennung werden Polyacrylamid-Gele verwendet. Je nach Fragestellung wird der prozentuale Anteil an Bis-Acrylamid und damit die Porengröße des Gels variiert. Typischerweise verwendet man zwischen 10 und 15 % Bis-Acrylamid. Um einen möglichst optimalen Polymerisationsgrad zu gewährleisten, werden frisch gegossene Gele für mindestens 2 h bei RT inkubiert. In der Laufkammer werden sie durch 1x Laufpuffer leitend mit Kathode und Anode verbunden.

Alle zu untersuchenden Proben werden zur Proteindenaturierung nach Zugabe von Laemmli-Puffer 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend setzt man pro Probe 10-25 µg Protein zur Auftrennung per SDS-PAGE ein. Um die Auftrennung weiter zu verbessern, legt man zur Wanderung durch das Sammelgel eine Spannung von 80 V, bei der durch das Trenngel eine von 130 V, an. Zur Beobachtung der Proteinseparation und Abschätzung von Proteingrößen werden unterschiedliche Marker verwendet. Standardmäßig kam der *PageRuler*[®] Proteinmarker (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) zum Einsatz.

2.2.3.9 EZ-Run[®]-Gel System

Die Qualität selbst angefertigter Gele unterliegt gewissen Schwankungen. Dadurch ist deren Vergleichbarkeit, wenn auch nur in geringem Maße, beeinträchtigt. Um Arbeitsabläufe zu beschleunigen und die Vergleichbarkeit der Gele zu verbessern wird das EZ-Run[®]-Gel System (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) verwendet. Hierbei handelt es sich um fertige Polyacrylamid-Gel-Konzentrate welche durch Zugabe von APS und TEMED polymerisiert werden können. Zudem wird ein 50x Laufpufferkonzentrat definierter Zusammensetzung mitgeliefert. Je nach Fragestellung werden 10, 12,5 oder 15 % Polyacrylamid-Gele verwendet. Deren Präparation führt man entsprechend der Herstellerangaben durch. Das Gel-System ist im weiteren Verlauf mit allen Standardmethoden der Molekularbiologie kompatibel.

2.2.3.10 Ponceau-Färbung

Bei einer Ponceau-Färbung wird der Farbstoff Ponceau S - ein Natriumsalz einer Diazoverbindung - eingesetzt. Da der Farbstoff reversibel an positiv geladene Aminogruppen von Proteinen bindet, dient er der Überprüfung der Proteinübertragung auf Nitrozellulosemembranen. Die Membranen werden 1 min in Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend mehrfach mit H₂O gewaschen. Nachdem eine ausreichende Entfärbung erreicht ist, werden die Membranen für Western Blots weiterverwendet.

2.2.3.11 Western Blot

Als Standardmethode zum spezifischen Nachweis von Proteinen wird der *Western Blot* eingesetzt. Dabei werden Proteine via SDS-PAGE aufgetrennt und im elektrischen Feld auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend werden Proteine durch spezifische Antikörper nachgewiesen.

Zum Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman, Dassel, Deutschland) wird das angelegte elektrische Feld an die Größe des Gels angepasst. Verwendete Stromstärken variieren so von 50 bis 120 mA. Der Transfer wird über Nacht durchgeführt. Zum Blocken möglicher unspezifischer, für Antikörper zugänglicher, Bindestellen werden die Nitrozellulosemembranen für 1 h bei RT bzw. ü. N. bei 4°C in Blockierungspuffer inkubiert. Durch mindestens einstündige Inkubation erfolgt anschließend die Bindung der Primärantikörper (die genaue Inkubationszeit ist je nach Antikörper anzupassen). Danach wird die Membran 3x für je 5 min mit TBS-T gewaschen, worauf die Inkubation (für mindestens 1 h) im Sekundärantikörper folgt. Zur Vorbereitung auf die Peroxidase-Nachweisreaktion werden die Membranen dann 2x 5 min mit TBS-T und 1x 5 min mit TBS gewaschen. Danach werden *ECL Western Blotting Detection* Reagenzien (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) auf die Membranen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 90 s werden *Fujifilm MedicalXRay*-Filme (Fuji Photo Film, Düsseldorf, Deutschland) zur Detektion der Chemolumineszenz aufgelegt.

2.2.3.12 Entfernen gebundener Antikörper von Nitrozellulosemembranen

Um Membranen nach Detektion eines spezifischen Proteins erneut mit einem anderen Antikörper inkubieren zu können, werden zuvor verwendete Antikörper entfernt. Im Anschluss an eine ECL-Reaktion werden Membranen in TBS-Puffer gewaschen. Reste an Peroxidase werden durch Zugabe von 500 μ l 1M Natriumazid-Lösung und Inkubation für 1 h inaktiviert. Antikörper werden im Anschluss durch den Einsatz von 0,2 M NaOH für 20 min entfernt. Um einen neuerlichen Proteinnachweis zu ermöglichen, müssen die Membranen nach einem 5-10 minütigen Waschschritt in H₂O erneut für 1 h geblockt werden.

2.2.3.13 Analyse der Zellvitalität

Zur Überprüfung der Zellvitalität wurde die zelluläre metabolische Aktivität durch den Einsatz von MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) kontrolliert. Lebensfähige, metabolisch aktive Zellen bilden aus MTT wasserunlösliche Formazan-Kristalle. Nach deren Lösung dient die Farbintensität als Maß für die in der Zelle ablaufende Glykolyse und ermöglicht so den Rückschluss auf die Anzahl an metabolisch aktiven, lebendigen Zellen.

Um eine möglichst genaue und zuverlässige Aussage über die Zellvitalität treffen zu können, wird der MTT-Test als Triplikat-Messung durchgeführt. Zum gleichzeitigen Test vieler Bedingungen werden die Experimente in 96-Loch-Platten durchgeführt. MTT (0,5 mg/ml) wird den Zellen für 60 min zugegeben. Für diese Zeitspanne werden die Zellen weiter bei 37°C inkubiert. Danach werden die entstandenen violetten Formazankristalle nach Entfernen des Mediums durch Zugabe von 50 µL DMSO gelöst. Dann bestimmt man die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 570 nm mittels eines UV-Vis Spektrometers.

2.2.3.14 Analyse der Genexpression via Luziferase-Reportergenassay

Zur Überprüfung der Genexpression bzw. deren Veränderung können Reportergenassays verwendet werden. Auch an die Genexpression gekoppelte zelluläre Mechanismen,

beispielsweise die Aktivität rezeptorvermittelter Signaltransduktion, können so indirekt untersucht werden.

Zur Analyse der NF-kB-vermittelten Anpassung der Genexpression werden T-REx-293 bzw. T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen mit einem Igk-Luziferase-Reportergen-Konstrukt lentiviral transduziert (Abschnitt 2.2.1.5). Diese Zellen werden in 96-Loch Platten definiert ausgesät. Zur Aktivierung des NF-κB-Signalweges erfolgt die Stimulation mit IL-1β (10 ng/ml). Je nach experimentellem Aufbau wird die Dauer der Stimulation variiert, gleichzeitig CPAF induziert oder die Zellen mit C. trachomatis infiziert. Anschließend werden die Zellen gewaschen und mittels Lyse-Puffer (Promega, Mannheim, Deutschland) für 15 min bei 37°C aufgebrochen. Die Lysate werden in "white OptiPlate™-96" Platten (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) überführt, welche wegen ihrer Lichtreflexionseigenschaften besonders für Biolumineszenzassays geeignet sind. Über die Injektoreinheit eines Luminometers (Orion Microplate Luminometer Berthold Detection Systems, Pforzheim, Deutschland) wird der Luziferaseassay-Puffer zugeführt, welcher sowohl Luziferin als auch ATP enthält und so eine enzymatische Reaktion ermöglicht. Die emittierte Biolumineszenz wird gemessen und dient als Maß für die Aktivierung des NF-kB-Signalwegs, bzw. der NF-kB-abhängigen Genexpression. Zur Minimierung Messungenauigkeiten von werden alle Stimulationsbedingungen einer Messung als Triplikate durchgeführt.

2.2.3.15 Detektion von sezerniertem IL-8

Inflammatorische Signale haben oft eine Aktivierung zellulärer Signalwege und eine weitere Sekretion von Interleukinen und Chemokinen zur Folge. Zur Kontrolle der Menge an sezerniertem IL-8 werden zunächst T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen ausgesät und über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag stimuliert man die Zellen entweder für 8 h mit IL-1β (10 ng/ml) alleine oder nach zusätzlicher Induktion der chlamydialen Protease CPAF. In beiden Fällen werden nach 8 h die Zellüberstände abgenommen, bei 1500 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert und mittels BD OptEI[™]Human IL-8 ELISA Set, entsprechend der Herstellerangaben auf IL-8-Sekretion untersucht (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Zur Analyse der Rohdaten verwendet man die Sigma Plot Software (Systat Software Inc, Erkrath, Deutschland.)

2.2.3.16 Durchflusszytometrie

Zur Untersuchung und dem Nachweis der Aktivität und Expression von Proteinen in Säugerzellen wird die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse) verwendet. Diese ermöglicht die quantitative Bestimmung von Oberflächen- und intrazellulären Markerproteinen. Durch einen Hüllstrom wird ein Probenstrahl auseinandergezogen, wodurch sich dessen Durchmesser stark verkleinert. Dadurch wird es möglich verschiedene Parameter, beispielsweise Lichtstreuung oder Fluoreszenzsignale für einzelne Zellen zu beobachten und zu beurteilen. Durch einen monochromatischen Laser erfolgt die Anregung der Elektronen eines Fluoreszenzfarbstoffes auf ein höheres Energieniveau. Verlassen die Elektronen dieses Energieniveau nach dem Laserpuls und kehren auf ihr Ursprungsniveau zurück. wird Energie in Form von Photonen freigesetzt. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern je Zelle. Die Lichtbeugung und -streuung lässt Rückschlüsse auf die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns) zu. Auch eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern, welche unterschiedliche Oberflächenantigene der Zelle markieren, ist möglich. In dieser Arbeit wurde ein FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet, und die Daten wurden mit dem Softwareprogramm Cell Quest Pro (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bzw. Flow Jo 8.2 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) analysiert.

2.2.3.17 Intrazelluläre Färbung und durchflusszytometrische Analyse

Zur Untersuchung intrazellulärer Proteine bzw. deren Zustand können diese, in stimulierten oder mit *Chlamydia trachomatis* infizierten Zellen, mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert werden.

Entsprechend behandelte Zellen werden geerntet, gewaschen und in PBS aufgenommen. Nach Überführen der Zellen in eine Spitzboden-96-Loch-Platte werden diese durch Zugabe von 100 µl 3,7 %-iger Formaldehydlösung und Inkubation bei 4°C für 30 min fixiert. Zur Entfernung des Formaldehyds wird anschließend je einmal mit PBS, PBS/1 % FCS und PBS/1 % FCS/0,5 % Saponin gewaschen. Zwischen diesen Schritten wird jeweils für 5 min bei 1,500 rpm 4°C zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in 25-40 µl der entsprechenden Verdünnungen der Primärantikörper resuspendiert und 30 min bei RT inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Primärantikörper wird vor Zugabe der Sekundärantikörper dreimal mit PBS/1 % FCS/0,5 % Saponin gewaschen. 30-50 µl Sekundärantikörper werden dann in einer 1:300 Verdünnung eingesetzt und die darin resuspendierten Zellen für 30 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Abschließend werden die Zellen je einmal in PBS/1 % FCS/0,5 % Saponin und PBS/1 % FCS gewaschen bevor sie in 200 µl PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert werden. Zur Aufnahme der Daten wird das Computerprogramm *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bzw. *FlowJo 8.2* (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) verwendet.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Expression rekombinanter Proteine in E. coli

Wesentliche Eigenschaften, sowohl struktureller als auch funktionaler Natur, sind nur zu bestimmen, wenn das Zielprotein in ausreichender Konzentration und isoliert von anderen Proteinen vorliegt. Daher nutzt man *E. coli*-Bakterien als System zur Überexpression von Proteinen. Kompetente Bakterien werden mit, für das Zielprotein kodierender, Plasmid-DNS transformiert. Man verwendet hierzu üblicherweise Vektoren, welche zum einen dem Ziel einen Affinitäts-Tag anfügen und zum anderen erst durch Induktion zur Expression des Zielproteins führen. Zu beachten ist, dass durch Expression von eukaryotischen Proteinen in Prokaryoten viele posttranslationale Modifikationen, beispielsweise Glykosylierungen, verloren gehen.

Hier wird ein pET30b Vektor verwendet, welcher für ein Fusionsprotein aus CPAF (*C. trachomatis*) und einem C-terminalen-His-Tag kodiert. Als Expressionsstamm werden *E. coli* BL21 DE3 benutzt, welche eine genetische Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens des Bakteriophagen λ tragen. Durch Zugabe von IPTG wird T7-Polymerase induziert und die Expression des Zielproteins wird ermöglicht.

Die Bakterien werden mit dem Expressionsvektor transformiert und als Vorkultur über Nacht bei 37°C in LB-Selektionsmedium (Kanamycin) kultiviert. Am folgenden Tag verdünnt man die Vorkultur im Verhältnis 1:50 mit Selektionsmedium und kultiviert die Bakterien bis zu einer optischen Dichte $OD_{600} = 0,4$ bei 37°C. Anschließend wird die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 0,4 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Danach werden die Bakterien für 3 h bei 22°C inkubiert und durch Zentrifugation für 15 min bei 4,500 rpm und 4°C pelletiert.

2.2.4.2 Aufschluss bakterieller Zellen

Zur Lyse der Bakterien werden die Pellets in Lysozym-enthaltendem Bakterienlyse-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Um möglichst alle Bakterien aufzuschließen und gleichzeitig störende bakterielle DNS zu denaturieren, werden die Ansätze zwei Mal für 30 s mit Ultraschall behandelt. Zur Verhinderung hitzebedingter Proteindenaturierung kühlt man die Proben zwischenzeitlich für mehrere Minuten auf Eis. Abschließend werden Zellreste durch Zentrifugation für 10 min bei 10,000 rpm und 4°C entfernt. Bevor so gewonnene bakterielle Zelllysate zur Proteinaufreinigung verwendet werden können, müssen sie mit einem Filter (0,45 µM Porengröße) filtriert werden.

2.2.4.3 Affinitätschromatographie an NiNTA-Säulen

Auf der Grundlage der Interaktion eines Proteins mit einem, an einer chromatographischen Matrix immobilisierten, Liganden, kann durch Affinitätschromatographie ein Proteingemisch aufgetrennt werden. Zur Auftrennung His-getaggter rekombinanter Proteine werden hier HisTrap[™] FF crude Säulen (Bettvolumen 5 ml; GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) Nickel²⁺-Ionen eingesetzt. Bei diesen Säulen sind über den Komplexbildner Nitrilotriessigsäure (NTA) an Sepharose immobilisiert (Ni-Sepharose™ 6 Fast Flow; GE Healthcare, Waukesha, WI, USA). Durch NTA werden vier der sechs Koordinationsstellen der Nickel-Ionen belegt. Die übrigen sind für koordinative Bindungen von Imidazolringen, wie sie in Histidin-Seitenketten zu finden sind, zugänglich. Daher hat diese Aminosäure eine starke Affinität zu den Ni²⁺-Ionen und His-getaggte Proteine können ob ihrer gesteigerten Affinität gezielt angereichert werden. Zur Proteinbindung an das Säulenmaterial werden Puffer mit niedriger Imidazolkonzentration verwendet. So werden sowohl unspezifische Proteinbindung verhindert als auch eine Bindung von rekombinantem, mit einem His-Tag versehenem Protein ermöglicht. Gebundenes Protein kann dann durch einen Puffer mit hoher Imidazolkonzentration eluiert werden, da Imidazol koordinativ gebundenes Protein kompetitiv verdrängt.

Nachdem die NiNTA-Säule mit NiNTA-Bindungspuffer äquilibriert worden ist, wird filtriertes Proteinlysat mit Hilfe des *Äkta FPLC-P 900* Systems (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) auf die NiNTA-Säule aufgetragen. Der Puffer, in welchem das Protein aufgetragen wird, enthält dabei kein EDTA, da dieser Chelatbildner mit den Ni²⁺-Ionen komplexieren und diese von der Säule entfernen würde. Eine Kontrolle der Auftragung und der Reinigung erfolgt über die Absorptionsmessung (280 nm) mit Hilfe einer angeschlossenen UV-Zelle. Nach der Auftragung des Proteinlysates wird die Säule zunächst mit NiNTA-Bindungspuffer gespült, bis die Absorption wieder das Eigenabsorptionsniveau des NiNTA-Bindungspuffers erreicht hat. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine erfolgt die Elution in einem auf 20 min angelegten linearen Gradienten von 0-100 % 500 mM Imidazol enthaltendem NiNTA-Elutionspuffer. Sowohl Auftragung als auch Elution werden bei einer Flussrate von 2 ml/min durchgeführt. Die Eluate werden in Fraktionen mit einem Volumen von 1 ml gesammelt. Anhand des Chromatogramms der Elution lässt sich ermitteln, in welchen Fraktionen das gewünschte Protein vorliegt. Diese können dann zum Proteinnachweis mittels Coomassie-Färbung oder Western Blot, bzw. weiteren Aufreinigung verwendet werden.

2.2.4.4 Entsalzung von Proteinlösungen an Desalting-Säulen

Zum Entsalzen von Proteinlösungen werden $HiTrap^{TM}$ Desalting-Säulen (5 ml; GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) eingesetzt. Das darin enthaltene SephadexTM G-25
Material hat einen Trennbereich von 1,000 bis 5,000 Da. Dadurch können niedermolekulare Substanzen, beispielsweise Salze, zurückgehalten werden, während Proteine mit dem Ausschlussvolumen eluieren.

Nach Äquilibrierung der Säule mit einem Zielpuffer wird 1 ml einer Proteinprobe auf die Säule aufgetragen und das entsalzte Protein in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Die Flussrate für Auftragung und Elution wird auf 1 ml/min eingestellt.

2.2.4.5 Ionenaustausch-Chromatographie an Resouce™Q-Säulen

Die Proteintrennung mittels Ionenaustausch-Chromatographie basiert auf reversibler Interaktion zwischen geladenen Proteinen und einer gegensätzlich geladenen chromatographischen Matrix. Eine Elution erfolgt durch eine Steigerung der Salzkonzentration des verwendeten Puffers. Unterschiedlich geladene Proteine werden zu verschiedenen Zeitpunkten eluiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Anionenaustauscher *Resource*[™] Q (6 ml; GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) verwendet. Die Oberflächenladung eines sich in Lösung befindenden Proteins variiert entsprechend dem pH-Wert des Lösungsmittels. Damit eine Bindung des Zielproteins an die Matrix eines Ionenaustauschers erfolgen kann, sollte der pH-Wert der Lösung ca. 1-2 Einheiten über dem isoelektrischen Punkt des Proteins liegen. Letzterer konnte für CPAF mit Hilfe der ExPASy ProtParam-Software *(http://www.expasy.ch/tools/protparam.html)* bestimmt werden.

Nach Äquilibrierung der Resource™ Q-Säule mit entsprechendem Resource-Q-Bindepuffer (mit Protease-Inhibitor-Zusatz), wird die Proteinlösung über ein Äkta FPLC-P 900 System (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) aufgetragen. Durch Waschen der Säule mit fünf Säulenvolumen (SV) Resource-Q-Bindepuffer werden ungebundene Proteine entfernt. Über einen 10-20 SV-umfassenden linear ansteigenden Gradienten wird die NaCl-Konzentration von 20 mM auf 500 mM gesteigert. Dadurch werden an das Säulenmaterial gebundene Proteine eluiert. Bei Bedarf können im Anschluss stark gebundene Proteine in einem Elutionsschritt mit 1 M NaCl von der Säule gewaschen werden. CPAF eluiert bei einer Salzkonzentration von ca. 100-150 mM NaCI. Alle Schritte erfolgen bei einer Flussrate von 6 ml/min. Die Eluate werden in 1 ml-Fraktionen gesammelt und in Proteaseaktivitätsexperimenten verwendet (siehe Abschnitt 2.2.3.6).

2.2.4.6 Affinitätsreinigung von Antikörpern

In Säugetieren hergestellte, spezifische Antikörper können mittels unterschiedlicher Affinitätssäulen aufgereinigt und angereichert werden. Eines dieser Systeme ist *SulfoLink*[™]- *Link Resin* (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland). Diese Matrix kann in eine Säule

gepackt werden. Das Material ist in der Lage über Iodoacetyl-Gruppen mit Sulfhydryl-Gruppen zu interagieren. Entsprechende Antikörper-spezifische Peptide gehen so Thioether-Bindungen mit der Matrix ein. Über die immobilisierten Peptide können Antikörper gebunden und gezielt eluiert werden.

Zur Aufreinigung von CPAF-Antikörpern aus Kaninchenserum (Tag 210 nach Immunisierung; Pineda, Berlin, Deutschland), wird zunächst das zur Immunisierung verwendete CPAF-Peptid an *SulfoLink™-Link Resin* entsprechend der Herstellerangaben gebunden. Anschließend verdünnt man das Serum 1:10 in PBS. Die Antikörperlösung wird über eine Auftragungspumpe und das *Äkta FPLC-P 900* System auf die Affinitäts-Säule aufgetragen. Um eine möglichste komplette Bindung des Antikörpers an das Säulenmaterial zu erreichen, wird die PBS-Antikörper-Lösung dreimal aufgetragen. Die Elution erfolgt in azidem SulfoLink-Elutionspuffer in 1 ml großen Fraktionen. Zur Neutralisierung wird in jede 200 µl 2 M Tris-Lösung (pH 8,5) vorgelegt. Abschließend erfolgt über eine *HiTrap™ Desalting*-Säule die Umpufferung (siehe Abschnitt 2.2.4.4) zu PBS/0,05 % Na-Azid.

2.2.5 Mikroskopische Methoden

2.2.5.1 Lichtmikroskopische Analyse der Zellmorphologie

Zellmorphologie und deren Veränderungen im Laufe eines Experiments können mittels Lichtmikroskopie beobachtet bzw. festgehalten werden. Bei einem konventionellen Lichtmikroskop wird das Lampenlicht durch die Kondensorlinse auf das Objekt fokussiert und das vom Objekt ausgehende Licht durch die Objektivlinse in die Zwischenbildebene fokussiert. Das entstehende Bild wird durch die Okularlinse betrachtet. Auf diese Weise kann der Einfluss der chlamydialen Protease CPAF auf die Zellform und -integrität in T-REx-293-gyrB-CPAF, sowie nach transienter Transfektion von T-REx-293 Zellen, beobachtet werden. Die Zellen werden dazu definiert ausgesät und je nach Experiment mit AHT/CM alleine oder einer Kombination aus AHT/CM und verschiedenen Inhibitoren behandelt. Zu bestimmten Zeitpunkten werden Aufnahmen über ein inverses Mikroskop mit Kamera (*Axiovert S100*, 10 x/0.25 Linse, *AxioCam Hsm* Kamera) und der *AxioVision* Software (Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland) aufgenommen.

2.2.5.2 Konfokale Mikroskopie

Im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie wird bei einem Konfokalmikroskop nicht das gesamte Präparat beleuchtet, sondern zu jedem Zeitpunkt nur ein Bruchteil davon - in den meisten Fällen nur ein beugungsbegrenzter Lichtfleck. Zur Erstellung eines kompletten Bildes wird das Präparat mit diesem kleinen Lichtfleck Punkt für Punkt abgerastert. In dieser Arbeit wird ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSCM, Leica, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Das *Scannen* eines Präparats wird mit einem monochromatischen Laser durchgeführt. Diese sind zur Anregung von Fluorophoren geeignet. Durch ein Spiegelsystem wird nach Anregung emittiertes Licht zu einem Detektor weitergeleitet. Über eine Software kann so ein Bild, welches einzelne Schichten des Objekts abbildet, erstellt werden. Je nach Gerät kann das Objekt auch in Richtung des Strahlenganges bewegt werden (Z-Richtung), wodurch nach Aufnahme verschiedener Schichten des Objekts eine dreidimensionale Projektion erstellt werden kann.

2.2.5.2.1 Intrazelluläre Färbung von Chlamydia trachomatis

Zur Bestimmung der Anzahl infektiöser, chlamydialer Partikel einer Bakteriensuspension können eukaryotische Zellen infiziert werden und die Anzahl chlamydialer Einschlüsse durch immunzytochemische Färbung bestimmt werden. Dazu wird ein monoklonaler, mit dem Xanthen-Farbstoff Fluoreszein (FITC) gekoppelter Antikörper, der gegen chlamydiales LPS gerichtet ist, verwendet. Als Gegenfärbung der Zellen beinhaltet die Antikörperlösung den Azo-Farbstoff Evan's Blau.

Zellen werden definiert auf sterilen Glasplättchen ausgesetzt. Am folgenden Tag werden die Zellen mit unterschiedlichen Mengen Chlamydien infiziert. Nach 24 h wäscht man die Zellen zweimal mit PBS, und fixiert sie mit 100 % Methanol für 10 min bei RT. Danach werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zum Blocken unspezifischer Bindestellen wird PBS/5 %BSA verwendet. Pro Plättchen erfolgt die Färbung durch Zugabe von 25 µl antichlamydiales-LPS-FITC-Evan`s Blau Antikörper. Glasplättchen mit Antikörper werden 45 min in einer feuchten Kammer bei RT in Dunkelheit inkubiert. Bevor die Analyse mittels konfokaler Mikroskopie durchgeführt werden kann, bettet man die Plättchen in Mowiol auf Objektträgern ein und dichtet sie ab. Zur Bestimmung der infektiösen Einheiten (IFU) pro ml wird folgende Formel verwendet:

 IFU
 Anzahl der Einschlüsse pro Gesichtsfeld x Verdünnung x Gesichtsfelder pro Plättchen

 wolumen des Inokulums

Die chlamydiale Protease CPAF wurde in den letzten Jahren wiederholt bei Chlamydienabhängigen Spaltungsvorgängen zellulärer Proteine als beteiligtes bzw. auslösendes Effektorprotein identifiziert. So wurde unter anderem die Degradierung der Transkriptionsfaktoren RFX-5 und USF-1, die Spaltung der Intermediärfilamentproteine CK8 und Vimentin, sowie der Abbau der pro-apoptotischen BH3-Proteine auf die Aktivität von CPAF zurückgeführt [86, 87, 115, 128, 129]. Allerdings verblieben viele Aspekte der Funktionsweise der chlamydialen Protease ungeklärt.

Durch die Generierung der CPAF-exprimierenden Zelllinie T-REx-293-gyrB-CPAF, der entsprechenden CPAF-Expressionsplasmide, der Aufreinigung von rekombinantem CPAF und *in vitro* Experimenten, wurden in der Vergangenheit Fortschritte in der Charakterisierung des Funktions- bzw. katalytischen Mechanismus der Protease erzielt. Diese Materialien und Methoden ermöglichten die Aufklärung der Aktivierung der Protease und die Identifizierung ihres aktiven Zentrums [87, 159, 160]. So konnte nachgewiesen werden, dass sich CPAF, ähnlich Caspasen, über induzierte Nähe selbst aktiviert (siehe Abschnitt 1.4). Trotz dieser Fortschritte sind wichtige Parameter wie die Substraterkennung und -bindung, das Substratspektrum oder die Relevanz der chlamydialen Protease CPAF für eine chlamydiale Infektion immer noch unbestimmt.

Im Zuge dieser Arbeit sollte das Spektrum an CPAF-Substraten überprüft und gegebenenfalls erweitert werden, neue Möglichkeiten der Charakterisierung von CPAF, in Form nicht zytotoxischer Inhibitoren, erarbeitet, sowie die CPAF-abhängige Beeinträchtigung zellulärer Signaltransduktionswege überprüft werden.

3.1 Erweiterung des Substratspektrums von CPAF

Durch die Verwendung der CPAF-exprimierenden Zelllinie T-REx-293-gyrB-CPAF sollte in Abwesenheit anderer chlamydialer Proteine sowohl die Spaltung bekannter Substrate, als auch das Vorhandensein möglicher neuer Substrate überprüft werden. Zur Bestimmung von Substrat-Kandidaten wurden Lysate von T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen nach CPAF-Expression in Kooperation mit Professor Dr. Dirk Haller einer 2D-Gel/massenspektrometrischen Analyse unterzogen.

3.1.1 Verifizierung publizierter CPAF-Substrate

T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen wurden stabil mit einem CPAF-Fusionsprotein, bestehend aus der Protease, drei GyraseB-Untereinheiten (aus *E. coli*) und einem FLAG-Tag, transfiziert. Nach Induktion der Expression des Proteins mit AHT konnte durch Zugabe von Coumermycin CPAF dimerisiert oder multimerisiert werden, was zur Aktivierung der

Protease führt. Die Funktionalität des von T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen exprimierten CPAF-Fusionsproteins wurde anhand der Spaltung bekannter, bereits publizierter Substrate nachgewiesen. Dazu wurde die Fragmentierung nach ektopischer Expression und induzierter Aktivierung von CPAF mit der Situation nach Infektion von T-REx-293 Zellen mit *C. trachomatis* verglichen (adaptiert von [87]).



Abb. 5: CPAF-abhängige Substratspaltung.

(A) CPAF wurde durch Zugabe von AHT/CM (5 ng, 1 μ M) in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen für 12-14 h induziert und aktiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, lysiert und analysiert.

(B) T-REx-293 Zellen wurden mit *C. trachomatis* (MOI = 3) infiziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, lysiert und analysiert.

Der Nachweis zellulärer Proteine erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte, Proteinfragmente (Abbildung ist adaptiert von [87]).

Die Infektion von T-REx-293 Zellen führte zu einer Spaltung der getesteten Substrate. Die aus unterschiedlichen Proteinfamilien stammenden, funktional verschiedenen Substrate wurden alle mit einem vergleichbaren zeitlichen Ablauf fragmentiert bzw. degradiert. Aufgrund der infektiösen Dosis war ein Beginn der Substratspaltung bereits nach 12 h zu beobachten (siehe Abb. 5 B). Diese resultiert bei Zytokeratin-8, RFX-5, Vimentin und Cyclin

B1 in der Generierung definierter Spaltprodukte. Im Zuge der Degradierung von Bim war kein Spaltprodukt nachzuweisen. Dies könnte durch eine vermutete Beteiligung des Proteasoms an der Prozessierung der BH3-Proteine erklärt werden (siehe Abb. 5) [175]. Die Induktion der Expression der Protease CPAF durch AHT und deren herbeigeführte Aktivierung durch Coumermycin waren in der Lage eine gleichartige Spaltung der überprüften Substrate zu erzeugen (siehe Abb. 5 A). In allen Fällen schienen die Prozessierungsvorgänge im Vergleich mit chlamydialen Infektionen etwas schwächer ausgeprägt zu sein. Möglicherweise liegt dies in einer stärken Expression von CPAF während Infektionen begründet. Auch könnte die "natürliche" Art der Aktivierung der Protease von Bedeutung sein. Trotzdem ist offensichtlich, dass die CPAF-exprimierende Zelllinie T-REx-293-gyrB-CPAF in der Lage ist, CPAF-Aktivierung und sich anschließende Substratspaltungsvorgänge abzubilden.

3.1.2 Identifikation neuer CPAF-Substrate

Neben der Verifizierung beschriebener Substrate, wurde über die Expression und Aktivierung der chlamydialen Protease CPAF in einer eukaryotischen Zelllinie der Versuch ermöglicht, das gesamte Substratspektrum von CPAF zu erfassen. Dazu wurden T-REx-293gyrB-CPAF Zellen vor und nach CPAF-Induktion mittels 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie auf prozessierte Proteine hin untersucht. Zur Analyse der ermittelten 2D-Spots wurde die "Proteoweaver™"-Software (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet, zur Auswertung der Proteinspektren wurde auf die Swiss-Prot-Datenbank (http://expasy.org/sprot/) zurückgegriffen. Diese Arbeiten wurden im Zuge einer Kooperation mit Prof. Dr. Haller (Experimentelle Ernährungsmedizin, Wissenschaftszentrum Weihenstephan der TU München, Freising, Deutschland) durchgeführt. Eine Liste der ermittelten Kandidaten und deren bisher beschriebene Funktionen ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Protein	Funktion	Lokalisation
eEF-2	 GTPase-Aktivität Translokation einer naszierenden Aminosäurekette im Ribosom Koordination der Bewegung von tRNAs und mRNA 	Zytoplasma

Protein	Funktion	Lokalisation
seryl-tRNA- Synthetase	 Homodimer Katalysiert Einbau von Serin an tRNA Möglicherweise am Einbau von Seleno-cystein in naszierende Aminosäureketten beteiligt 	Zytoplasma
Septin-2	 GTPase Aktivität Filamentbildung Kolokalisierung mit Mikrotubuli und Mikrofilamenten Einfluss auf Zellpolarität und Zellteilung 	Zytoplasma
Alix	 Möglicher Einfluss auf Apoptose Einfluss auf Membrantransport und Zelladhäsion Bei Reifungsprozessen behüllter Viren beteiligt 	Zytoplasma
Mst-4	 Bildet Homodimere Aktiviert durch Interaktion mit Golgi-Matrixprotein GM130 Phosphorylierung oder Spaltung im C-Terminus zur Aktivierung nötig Evtl. an Apoptose und Zellteilung beteiligt 	Zytoplasma/Golgi-Apparat
hnRNP L	 Teil des "heterogenous nuclear riboprotein complexes" Modifikation und Reifung der mRNA Assoziiert mit naszierenden mRNA 	Nukleoplasma/zytoplasmatische mRNP Granula
hnRNP H	 Teil des "heterogenous nuclear riboprotein complexes" Modifikation und Reifung der mRNA reguliert pre-mRNA- splicing 	Nukleoplasma

Tabelle 1: Putative CPAF-Substrate

Unter Verwendung induzierter T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen wurde nach weiteren CPAF-Substraten gesucht. Die Zellen wurden dazu über Nacht mit AHT/CM (5 ng, 1 µM) behandelt. Lysate der Zellen wurden in der Folge über 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie analysiert. Über den Abgleich der so gewonnen Daten mit vorhandenen Datenbanken wurden die Kandidaten ermittelt.

Bei den ermittelten Kandidaten war, entsprechend der bisher identifizierten Substrate, keine einheitliche phylogenetische oder funktionale Übereinstimmung zu beobachten. Ebenso waren keinerlei Homologien auf Sequenz- oder Struktur-Ebene nachzuweisen. Auch konnte

keine einheitliche Lokalisation festgestellt werden. So waren die meisten identifizierten Proteine zytosolisch, allerdings wurden mit hnRNP L und hnRNP H Proteine identifiziert, die exklusiv beziehungsweise überwiegend im Kern vorliegen.

Zur Bestätigung der obigen Daten ist eine Überprüfung der Substratspaltungsvorgänge erforderlich. Dazu wurden die ermittelten Proteine nach CPAF-Induktion in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen und nach Infektion von Zellen mit *C. trachomatis* mittels Western Blot untersucht. Bei der Betrachtung der Kandidaten fiel auf, dass einige der Proteine von "Haushaltsgenen" kodiert werden und ubiquitär in Zellen vorliegen (siehe Tabelle 1, hnRNP L, hnRNP H, Serin-tRNA-Synthetase, eEF-2). Dies warf die Frage auf, ob es sich in diesen Fällen tatsächlich um CPAF-Substrate handelt. Daher sollten zunächst Mst-4, Alix und Septin-2 verifiziert werden. Weiterhin wurde aus der Gruppe der Haushaltsgene eEF-2 zur Überprüfung ausgewählt.



T-REx-293 CPAF K6

Abb. 6: Spaltung neu ermittelter Substrate nach ektopischer CPAF-Expression.

CPAF wurde in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen durch Zugabe von AHT/CM (5 ng, 1 µM) für die angegebenen Zeitpunkte induziert. Der Nachweis zellulärer Proteine erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte Proteinfragmente.

Die Induktion und Aktivierung von CPAF in T-Rex-293-gyrB-CPAF Zellen führte zu einer eindeutigen Spaltung von Septin-2 und Alix (siehe Abb. 6). Im Falle von eEF-2 und Mst-4 konnten nur geringe Änderungen der Proteinmenge beobachten werden (siehe Abb. 6). Bei beiden konnte wie auch bei Septin-2 ein definiertes Spaltprodukt detektiert werden. Diese hatten eine molekulare Masse von ca. 70 kDa für eEF-2, ca. 55 kDa für Mst-4 und ca. 40

kDa für Septin-2 (siehe Abb. 6). Einzig bei der Degradierung von Alix konnte keine definierte Spaltbande identifiziert werden. Hier nahm lediglich die Menge an detektiertem Protein ab. Dies konnte nicht durch Abweichungen der geladenen Proteinmenge erklärt werden (siehe Abb. 6).

3.1.3 Überprüfung CPAF-abhängiger Substratspaltung nach chlamydialer Infektion eukaryotischer Zellen

Zur Bestätigung der identifizierten, putativen CPAF-Substrate wurden diese auch nach Infektion mit *C. trachomatis* überprüft. Entsprechend wurden sowohl humane T-REx-293 als auch murine MEF Zellen infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und die Proteine einer Western Blot Analyse unterzogen.



Abb. 7: Spaltung neu ermittelter CPAF-Substrate erfolgte nach Infektion mit C. trachomatis.

T-REx-293 Zellen (links) und MEF Zellen (rechts) wurden für die angegebenen Zeiten mit *C. trachomatis* (MOI = 3) infiziert. Der Nachweis zellulärer Proteine erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte Proteinfragmente. "*" bezeichnet unspezifische Banden eines Western Blots. "CPAFc" bezeichnet das C-terminale Fragment von CPAF, welches nur nach Aktivierung der Protease nachweisbar ist.

Zum Nachweis eines normalen Fortschreitens der Infektion in T-REx-293 und MEF Zellen wurden als Kontrollen die chlamydiale Protease CPAF und das bereits bekannte CPAF-Substrat Vimentin überprüft. Analog zu bereits gezeigten Daten (siehe Abb. 5) war in humanen Zellen bereits 16 h nach Infektion eine beginnende Spaltung von CPAF-Substraten nachweisbar, beispielsweise Septin-2 (siehe Abb. 7). Diese korrelierte mit der beginnenden Aktivierung der Protease, welche anhand der Bildung des C-terminalen Fragments CPAFc nachzuvollziehen war. In MEF-Zellen schien die Infektion im Vergleich zu T-REx-293-Zellen langsamer abzulaufen. Dementsprechend wurde aktives, prozessiertes CPAF erst 24 h nach Infektion detektiert. Einher mit CPAF-Expression und Aktivierung ging auch hier die Spaltung von Vimentin, wenn auch weniger effizient (siehe Abb. 7).

Die Überprüfung der neu ermittelten CPAF-Substrate nach Infektion von T-REx-293 Zellen ergab, dass alle degradiert werden. Entsprechend der Situation nach CPAF-Induktion in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen konnten definierte Spaltprodukte von eEF-2, Mst-4 und Septin-2 nachgewiesen werden, die Degradierung von Alix resultierte nicht in der Bildung definierter Fragmente. Diese wiesen eine identische molekulare Masse wie die Fragmente nach ektopischer CPAF-Expression auf (siehe Abb. 6). Bei genauer Betrachtung der Spaltung von eEF-2 war festzustellen, dass trotz starker Zunahme des Spaltprodukts die Gesamtmenge des Volllängenproteins nahezu unverändert blieb. Dies ist möglicherweise durch eine hohe zelluläre Synthese des Proteins zu erklären (siehe Abb. 7).

Mst-4 Prozessierung nach Infektion von T-REx-293 Zellen zog im Vergleich zur ektopischen CPAF-Expression die Generation eines zweiten Spaltprodukts bei ca. 35 kDa nach sich. Auch waren bei der Spaltung von Septin-2 Abweichungen zu den Ergebnissen in Abb. 6 zu beobachten. Zwar war die initiale Fragmentierung identisch, im weiteren Verlauf der Infektion war aber nur noch das kleinere der beiden Spaltprodukte nachzuweisen (siehe Abb. 7). In allen Fällen war festzuhalten, dass die Spaltung der Proteine nach Infektion deutlich umfassender war als nach CPAF-Expression und Aktivierung in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen. In MEF-Zellen konnte lediglich eine eindeutige Spaltung bzw. Degradierung von Septin-2 und Alix nachgewiesen werden. Beide waren deutlich schwächer ausgeprägt als in infizierten menschlichen Zellen. Auch wurde im Fall von Septin-2 nur eines anstatt zweier Spaltprodukte detektiert. Weder bei Mst-4 noch bei eEF-2 konnte in MEF-Zellen ein Chlamydien-abhängiger Abbau nachgewiesen werden. Ob diese Diskrepanz in der Spaltung von CPAF-Substraten zwischen humanen und murinen Zellen auf mögliche Interspezies-Unterschiede in der Sequenz oder Struktur der Proteine, oder auf weniger hohe CPAF-Aktivität während der Infektion zurückzuführen ist, bleibt nachzuweisen. Möglicherweise könnte eine vergleichende Analyse dieser Parameter neue Erkenntnisse in Bezug auf die Substratspezifität von CPAF erbringen.

67

3.2 Einführung neuer CPAF-Inhibitoren zur Analyse der Proteasefunktion während chlamydialer Infektionen

In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass CPAF eine Vielzahl an Substraten spaltet und damit möglicherweise zelluläre Funktionen beeinträchtigt (siehe Abschnitt 1.4). Unter anderem könnte die Protease dadurch an einer verringerten Antigenpräsentation, der Unterdrückung von Apoptose und an Modifikationen des Zytoskeletts während Infektionen beteiligt sein. In Ermangelung genetischer Methoden zur Veränderungen chlamydialer Organismen wurden bisherige CPAF-betreffende Erkenntnisse vor allem durch Korrelation von in vitro Daten mit Beobachtungen chlamydialer Infektionen gewonnen. Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung der Aufgaben eines Zielproteins sind Inhibitorstudien, in denen die spezifische Hemmung eines Proteins Rückschlüsse auf dessen Funktion und Bedeutung zulässt. Im Falle von CPAF ist der einzig bekannte Inhibitor Lactacystin, welcher kovalent das aktive Zentrum der Protease bindet [157, 160]. Dieser wurde allerdings zur des Proteasoms entwickelt und weist dadurch mit fortschreitender Hemmung Inkubationsdauer Zytotoxizität auf. Daher ist eine Verwendung von Lactacystin in Langzeitexperimenten über mehrere Tage - wie im Falle der Analyse chlamydialer Infektionen angezeigt - unmöglich.

Zusätzlich stand uns die Zelllinie T-REx-293-gyrB-CPAF für die Analyse der chlamydialen Protease CPAF zur Verfügung. Diese Zellen können induzierbar ein *C. trachomatis* CPAF-Fusionsprotein exprimieren (siehe Abschnitt 2.1.6). Auf diese Weise war es zwar möglich die Funktion der chlamydialen Protease ohne andere chlamydiale Elemente zu beobachten, eine direkte, definitive Aussage über die Relevanz von CPAF während einer chlamydialen Infektion konnte aber nicht getroffen werden. Durch die Einführung neuer, möglichst nichtzytotoxischer CPAF-Inhibitoren könnte es möglich sein, die Bedeutung der Protease für den chlamydialen Entwicklungszyklus genauer zu bestimmen.

3.2.1 Inhibition von CPAF durch Lactacystin

Zunächst sollte die Inhibition von CPAF durch Lactacystin gezeigt werden. Exemplarisch ist dies in CPAF-exprimierenden T-REx-293-gyrB-CAPF Zellen gezeigt. Die Zellen wurden 30 min vor CPAF-Induktion mit Lactacystin bzw. Epoxomicin behandelt. Epoxomicin ist ebenfalls ein Proteasominhibitor, welcher jedoch CPAF nicht inhibieren kann. Beobachtet wurden zum einen die nach CPAF-Aktivierung charakteristischen, morphologischen Veränderungen der Zellen und zum anderen die Spaltung des Substrates Vimentin.

A



T-REx-293-gyrB-CPAF

Abb. 8: Lactacystin inhibiert CPAF.

(A) CPAF wurde in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen durch Zugabe von AHT/CM (5 ng, 1 μ M) für 8 h induziert. Zuvor wurde den Kulturen wie angegeben Lactacystin (LC, 40 μ M) bzw. Epoxomicin (Epox, 2,5 μ M) zugegeben. Die morphologischen Veränderungen wurden mit einem Lichtmikroskop verfolgt (*Axiovert S100*, 10x/0.25 Linse, *AxioCam Hsm* Kamera). Weißer Balken = 50 μ M.



(B) CPAF wurde in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen durch Zugabe von AHT/CM (5 ng, 1 μM) für 8 h induziert. Zuvor wurde den Kulturen wie angegeben Lactacystin (LC, 40 μM) bzw. Epoxomicin (Epox, 2,5 μM) zugegeben. Der Nachweis von Vimentin erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte Proteinfragmente.

Die Induktion von CPAF durch die Zugabe von AHT/CM hatte bereits nach 8 h eine deutliche Veränderung der Zellmorphologie zur Folge. Charakteristisch war eine Abrundung der Zellen, welche sich dann unter - zumindest teilweisem Verlust von Zell-Zellkontakten - aus dem Zellverband lösten. Diese Zellen schwammen anschließend einzeln oder in traubenförmigen Formationen im Medium (siehe Abb. 8 A) Die beschriebenen Vorgänge sind vermutlich nicht direkt auf Zelltod zurückzuführen, da trotz offensichtlicher Modulation der Morphologie zum gezeigten Zeitpunkt die Zellvitalität kaum beeinflusst ist [87].

Die Zugabe des CPAF/Proteasom-Inhibitors Lactacystin bewirkte, dass auch 8 h nach Induktion und Aktivierung der Protease kaum abnorme Zellmorphologie zu beobachten war. Es fiel bei genauer Analyse auf, dass die Verwendung von Lactacystin alleine, auch ohne CPAF-Expression, zu einer leichten Erhöhung der Anzahl schwimmender Zellen führte. Diese lagen aber im Gegensatz zur zuvor beschriebenen Situation nach CPAF-Expression ausschließlich einzeln vor (siehe Abb. 8 A). Diese Beobachtung kann vermutlich auf einsetzende Zytotoxizität von Lactacystin zurückgeführt werden. Gestützt wird diese Vermutung durch die Ergebnisse der Behandlung der Zellen mit Epoxomicin. Zwar führte die Zugabe dieses Proteasominhibitors nicht zu einer Hemmung CPAF-induzierter Morphologieänderungen, allerdings war in Abwesenheit von CPAF gleichfalls eine erhöhte Anzahl freischwimmender, mutmaßlich abgestorbener Zellen sichtbar.

Unter Verwendung eines identischen Versuchaufbaus wurde die Lactacystin-abhängige Inhibition von CPAF durch die Analyse der Spaltung des Substratproteins Vimentin nachgewiesen (siehe Abb. 8 B). In T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen war nach achtstündiger CPAF-Induktion eine Prozessierung des Intermediärfilamentproteins nachweisbar. Der Zusatz von Lactacystin verhinderte diese Spaltung. Entsprechend war ein Verlust des Spaltprodukts und die Zunahme der Menge an Volllängen-Protein zu beobachten. Epoxomicin zeigte keinen Einfluss auf die CPAF-abhängige Spaltung von Vimentin (siehe Abb. 8 B).

3.2.2 WEHD-fmk beeinträchtigt die Entwicklung von C. trachomatis

Aufgrund der bestehenden Literatur schien WEHD-fmk als CPAF-Inhibitor-Kandidat in Frage zu kommen. So konnte gezeigt werden, dass während chlamydialen Infektionen der Golgi-Komplex der Wirtszelle fragmentiert wird und ein Transport der Überreste in die chlamydiale Vakuole erfolgt. Dieser Vorgang konnte zum einen durch die Verwendung des als Caspase-1-Inhibitor entwickelten Peptids WEHD-fmk unterdrückt werden und hatte zum anderen zur Folge, dass Chlamydien nicht mehr in der Lage waren, ihren Entwicklungszyklus normal abzuschließen [94]. Die Golgi-Fragmentierung war auf die Spaltung des integralen Golgi-Matrixproteins Golgin-84 zurückzuführen. Die Zugabe von WEHD-fmk hatte in diesem Zusammenhang eine Inhibition der Golgin-84-Spaltung zur Folge. Ein möglicher Hinweis auf eine Beteiligung von CPAF in diesen Vorgängen entstammte der Kinetik der Golgin-84-Fragmentierung, welche in zeitlicher Hinsicht vergleichbar zu Fragmentierungen von CPAF-Substraten verläuft [87, 94, 175]. Somit könnte es sich bei Golgin-84 um ein weiteres CPAF-Substrat handeln. Dies lässt die Hypothese zu, dass WEHD-fmk ein CPAF-Inhibitor sein könnte. Die nachfolgenden Arbeiten wurden in Kooperation mit Dr. Dagmar Heuer (MPI für Infektionsbiologie, Berlin, Deutschland) durchgeführt, die sich auf die Verifizierung von Golgin-84 als CPAF-Substrat und die möglichen Konsequenzen der CPAF-Expression auf den Golgi-Komplex konzentrierte. Daher liegt das Augenmerk hier auf der Analyse der Effekte von WEHD-fmk auf den chlamydialen Pathogenitätsfaktor CPAF.

3.2.2.1 WEHD-fmk inhibiert CPAF-abhängige Spaltungsvorgänge während chlamydialen Infektionen

Zunächst sollte die Hypothese einer inhibitorischen Wirkung von WEHD-fmk auf CPAF in Infektionsexperimenten getestet werden. Dazu wurden T-REx-293 Zellen verwendet. Den Zellen wurde nach Infektion WEHD-fmk zugesetzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden sie dann geerntet und auf CPAF-abhängige Spaltungsvorgänge untersucht.



Abb. 9: WEHD-fmk inhibiert CPAF-abhängige Spaltung während chlamydialen Infektionen.

T-REx-293 Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit *C. trachomatis* (MOI = 2) infiziert. WEHD-fmk (75 μ M) wurde 9 h nach Infektion der Zellen zugegeben. Der Nachweis zellulärer Proteine erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte Proteinfragmente. "*" bezeichnet unspezifische Banden eines Western Blots. "CPAFc" bezeichnet das C-terminale Fragment von CPAF, welches nach Aktivierung der Protease nachweisbar ist.

Zur Analyse der Spaltung von CPAF-Substraten wurden T-REx-293 Zellen für 18, 24 bzw. 30 h mit *C. trachomatis* infiziert. WEHD-fmk-Zugabe erfolgte nach neunstündiger Infektion. Ohne WEHD-fmk konnte beobachtet werden, dass alle getesteten CPAF-Substrate mit fortschreitender Infektionsdauer fragmentiert wurden (Abb. 9, Spuren 1-4). Der beobachtete Verlauf der Substratspaltung nach Infektion korrelierte dabei mit der CPAF-Aktivierung. Dies ist durch die ansteigende Menge an CPAFc, dem C-terminalen, nach Aktivierung der Protease auftretenden Fragment, angezeigt (siehe Abb. 9). Die Zugabe von WEHD-fmk führte zu einer deutlichen Hemmung der beschriebenen Spaltungsvorgänge (siehe Abb. 9, Spuren 7-9). Bei allen analysierten Substratproteinen war eine deutliche oder komplette Inhibition der Spaltung zu beobachten. Ferner fiel die Menge an aktivem CPAF in den Zellen stark ab, so dass es kaum möglich war CPAFc, zu detektieren. Ob diese Beobachtungen auf einen direkten Eingriff von WEHD-fmk in CPAF-abhängige Spaltungsvorgänge oder eine Beeinträchtigung der chlamydialen Entwicklung zurückzuführen sind, konnte an dieser Stelle nicht bestimmt werden.

Wie bereits beschrieben, ist CPAF, vermutlich indirekt, in die Degradierung pro-apoptotischer BH3-only-Proteine involviert (siehe Abschnitte 1.3.3; 1.4). Bisherige Daten begründen mit diesen Vorgängen einen ausgeprägten Schutz Chlamydien-infizierter Zellen gegenüber verschiedenen Apoptosestimuli [113, 114].

Da der Zusatz des Peptid-Inhibitors WEHD-fmk eine Hemmung aller CPAF-abhängigen Spaltungsvorgänge, auch der BH3-only Proteine, nach sich zog, sollte überprüft werden, ob dies den Verlust charakteristischer Merkmale chlamydialer Infektion wie den Schutz vor Apoptose zur Folge hatte. Dazu wurden Zellen der Linie HeLa für 30 h infiziert (MOI = 4). Die eingesetzte Konzentration von WEHD-fmk sowie der Zeitpunkt der Zugabe wurden analog zu den zuvor gezeigten Experimenten gewählt (siehe Abb. 9). Nach 30 h wurde Apoptose durch Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht hoher Intensität (1600 J/m²) induziert [113]. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf den Apoptosemarker aktive Caspase-3 analysiert. Auf diese Weise konnte man überprüfen, ob WEHD-fmk-Zugabe eine Verringerung des Chlamydien-induzierten Apoptoseschutzes auslösen kann.



Abb. 10: WEHD-fmk unterdrückt einen Chlamydien-vermittelten Schutz vor Apoptose.

Zellen wurden mit *C. trachomatis* (MOI = 4) für 30 h infiziert. WEHD-fmk-Zugabe (75 μ M) erfolgte 9 h nach Infektion der Zellen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1600 J/m² UV-Licht bestrahlt und für 4 h kultiviert. Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und aktive Caspase-3 wurde mit spezifischen Antikörpern intrazellulär gefärbt (α -aktive-Caspase-3, G α R-Cy5). Die Anzahl aktiver Caspase-3 positiver Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die abgebildeten Daten repräsentieren die Mittelwerte/SEM drei unabhängiger Experimente. "K" bezeichnet Kontrollansätze. "*" p-Wert < 0,05 (Student's t Test).

Die Behandlung von HeLa Zellen mit der beschriebenen Dosis an UV-Licht führte unter normalen Kulturbedingungen zur Induktion von Apoptose. Innerhalb von 4 h wurde in ca. 40-50 % der Zellen Caspase-3 aktiviert (siehe Abb. 10). Die Zugabe von WEHD-fmk alleine hatte keinen Einfluss; so war die Anzahl an Caspase-3 positiven Zellen nach Zusatz des Peptid-Inhibitors vergleichbar mit dem Anteil apoptotischer Zellen im Kontrollansatz (siehe Abb. 10). Dies unterstreicht die Annahme, dass WEHD-fmk nach einer Inkubation für 25 h

nicht oder kaum zytotoxisch wirkt. Eine Infektion der Zellen für 30 h hatte einen Schutz vor Apoptose zur Folge. Bestrahlung infizierter Hela Zellen resultierte in einer geringen Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen auf ca. 15 % (siehe Abb. 10). Dieses Ergebnis ist im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten, wonach Chlamydien den programmierten Zelltod blockieren und nicht-apoptotischen Zelltod auslösen [87, 110]. Nach Zugabe von WEHD-fmk konnte kein Chlamydien-vermittelter Apoptoseschutz beobachtet werden. In der Präsenz von WEHD-fmk war entsprechend ein signifikanter Anstieg an apoptotischen, aktive Caspase-3 positiven Zellen, auf ca. 50 %, festzuhalten (siehe Abb. 10). Somit hat die Behandlung Chlamydien-infizierter Zellen mit dem Peptid-Inhibitor WEHD-fmk neben einem Verlust CPAF-abhängiger Spaltungsvorgänge auch eine Blockierung des CPAF-vermittelten Apoptoseschutzes nach chlamydialen Infektionen als Konsequenz.

Da die bisherigen Studien sowie unsere eigenen Ergebnisse die Möglichkeit eines hemmenden Effekts von WEHD-fmk auf das Fortschreiten chlamydialer Infektionen anzeigten, wurde der Infektionsverlaufs *C. trachomatis*-infizierter T-REx-293 Zellen nach Zugabe von WEHD-fmk lichtmikroskopisch beobachtet.

T-REx-293-gyrB-CPAF



- C. trach.



WEHD-fmk



C. trach. MOI = 2



C. trach. MOI = 2 WEHD-fmk

Abb. 11: WEHD beeinträchtigt den Verlauf chlamydialer Infektionen.

T-REx-293 Zellen wurden mit *C. trachomatis* (MOI = 2) für 24 h infiziert. WEHD-fmk-Zugabe (75 μ M) erfolgte 9 h nach Infektion der Zellen. Die morphologischen Veränderungen wurden mit einem Lichtmikroskop verfolgt (*Axiovert S100*, 10x/0.25 Linse, *AxioCam Hsm* Kamera). Weißer Balken = 50 μ M.

Der Zusatz von WEHD-fmk führte zu einer Beeinträchtigung des chlamydialen Entwicklungszyklus. Nach 24 h andauernder Infektion waren im Vergleich mit uninfizierten Zellen große Vakuolen in den Zellen sichtbar. Diese nahmen einen Großteil des Zellvolumens ein (siehe Abb. 11, unten links). Bei den Vakuolen handelte es sich um die mit Bakterien angefüllten, chlamydialen Einschlüsse. Deren Größe ist ein eindeutiges Indiz, dass sich die Bakterien zum beobachteten Zeitpunkt replizierten. Die Zugabe von WEHD-fmk alleine hatte keinen Einfluss auf das morphologische Erscheinungsbild von T-REx-293 Zellen (siehe Abb. 11, oben rechts). So scheint WEHD-fmk selbst kaum eine Beeinträchtigung der Zellen nach sich zu ziehen. Wurde dem Medium nach neunstündiger Infektion der Zellen mit *C. trachomatis* WEHD-fmk beigefügt, so ließ sich feststellen, dass sowohl Größe als auch Anzahl der Vakuolen stark reduziert war (siehe Abb. 11, unten rechts). Möglicherweise ist dies auf eine Retardierung oder Blockierung des chlamydialen Entwicklungszyklus zurückzuführen.

3.2.2.2 WEHD-fmk führt zu einer Retardierung der chlamydialen Entwicklung

Wie unter Abschnitt 3.2.2.1 dargelegt, hatte WEHD-fmk eine Unterdrückung CPAFabhängiger Prozesse zur Folge. Zudem wurde auch eine Beeinträchtigung des Infektionsverlaufs beobachtet (siehe Abb. 11). Um näher zu bestimmen, worauf der beobachtete Effekt in Abb. 11 zurückzuführen ist, ob WEHD-fmk-abhängig eine Verlangsamung oder ein Abbruch der Infektion stattfindet, wurden Infektionen mit *C. trachomatis* über einen Zeitraum von 75 h beobachtet. Die Zellen wurden dabei für 30 h in WEHD-fmk-enthaltendem Medium kultiviert. Danach wurde das Medium durch WEHD-fmkfreies DMEM-Medium ersetzt. Die Infektion der Zellen wurde qualitativ über lichtmikroskopische Aufnahmen überprüft





Abb. 12: WEHD-fmk kann eine Retardierung chlamydialen Wachstums hervorrufen

T-REx-293 Zellen wurden mit *C. trachomatis* (MOI = 2) infiziert. WEHD-fmk-Zugabe (75 μ M) erfolgte 9 h nach Infektion der Zellen. 30 h nach Infektion wurde WEHD-fmk-haltiges Medium durch Inhibitor-freies Medium ersetzt. Die morphologischen Veränderungen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit einem Lichtmikroskop verfolgt (*Axiovert S100*, 10x/0.25 Linse, *AxioCam Hsm* Kamera). Weißer Balken = 50 μ M.

Betrachtete man die Situation 30 h nach Infektion, so war eine WEHD-fmk-abhängige Abnahme chlamydialer Einschlüsse festzustellen. Zu diesem Zeitpunkt war ein Großteil der T-REx-293 Zellen infiziert. Ohne Zusatz von WEHD-fmk waren überwiegend große Vakuolen sichtbar. Die Zugabe des Peptid-Inhibitors hatte wie zuvor eine Reduktion sowohl der Anzahl, als auch der Größe der chlamydialen Einschlüsse zur Folge. Kleinere Vakuolen waren auch nach WEHD-fmk-Zugabe zu beobachten (siehe Abb. 12, rechte Spalte, oben). Dies deutet an, dass eine Retardierung der Infektion wahrscheinlicher ist als ein Abbruch.

Bei längerer Kultivierung infizierter Zellen ist eine stetige Zunahme an sterbenden Zellen zu beobachten. Dies ist wahrscheinlich auf den Abschluss des chlamydialen Entwicklungszyklus zurückzuführen. Ein Mechanismus der Freisetzung infektiöser Elementarkörperchen beinhaltet die Lyse der Wirtszellen (siehe Abschnitt 1.2). Dazu passend wurden 50 h nach Infektion vermehrt kleinere chlamydiale Einschlüsse detektiert, die vermutlich auf neue, sekundäre Infektionsereignisse zurückzuführen sind (siehe Abb. 12, mittlere Spalte). Nach Entzug von WEHD-fmk und insgesamt 50-stündiger Kultivierung der infizierten Zellen war ein deutliches Fortschreiten der Infektion zu verzeichnen. Waren zuvor nur wenige, meist kleine Vakuolen sichtbar, konnte zu diesem Zeitpunkt ein deutlicher Anstieg an großen chlamydialen Einschlüssen festgestellt werden, welche nahezu komplett ihre Wirtszellen ausfüllten (siehe Abb. 12, rechte Spalte, Mitte).

Die logische Fortführung der beschriebenen Beobachtungen ergab die Analyse der Zellmorphologie nach 75 h. Wurde Medium ohne WEHD-fmk eingesetzt, konnten zu diesem Zeitpunkt fast keine intakten Zellen mehr beobachtet werden. Die Vielzahl an im Medium schwimmenden Zelltrümmern legt den Schluss nahe, dass Chlamydien-induzierter, nichtapoptotischer Zelltod - wie in der Literatur beschrieben - dafür verantwortlich war (siehe Abb. 12, mittlere Spalte, unten). Auch die WEHD-fmk-beinhaltende Infektionssituation entwickelte sich wie erwartet weiter. Ähnlich der WEHD-freien Infektion begannen - zwar verzögert vermehrt Zellen abzusterben. Teilweise konnten wie zuvor kleine, vermutlich auf Sekundärinfektionen zurückzuführende, chlamydiale Einschlüsse detektiert werden (siehe Abb. 12, rechte Spalte, unten). Somit scheint WEHD-fmk nicht zu einem kompletten Abbruch einer chlamydialen Infektion zu führen. Die Entfernung des Peptids führte dazu, dass die Infektion im Anschluss einem typischen zeitlichen Verlauf folgte. Anhand der Analyse der zellmorphologischen Veränderungen, der Detektion einer Zunahme toter, teils zerstörter Zellen, ist von einem teilweisen Abschluss des chlamydialen Entwicklungszyklus auszugehen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Verwendung von WEHD-fmk in der Frühphase chlamydialer Infektionen zu einer Verlangsamung des Infektionsablaufs führt. Möglich ist auch der Eintritt der Chlamydien in ein persistentes Stadium, wie es etwa in der Gegenwart von Interferon-y oder Antibiotika beschrieben ist.

3.2.3 WEHD-fmk inhibiert CPAF nach ektopischer Expression

Experimentelle Untersuchungen chlamydialer Infektionen nach Zusatz des Peptid-Inhibitors WEHD-fmk ergaben eine Unterdrückung CPAF-abhängiger Spaltungsvorgänge, sowie ein Ausbleiben der Chlamydien-vermittelten Apoptose-Inhibition. Zur Analyse einer möglichen direkten Inhibition von CPAF durch den Peptid-Inhibitor, wurde die Zelllinie T-REx-293-gyrB-

CPAF verwendet. Auf diese Weise war es möglich, die CPAF-Aktivität unabhängig von chlamydialen Infektionen zu untersuchen. Dazu wurde CPAF in den Zellen für 18 h Stunden mit AHT/CM induziert. WEHD-fmk wurde 30 min zuvor, in verschiedenen Konzentrationen, hinzu titriert. Im Anschluss wurden die Zellen zum einen auf charakteristische, morphologische Veränderungen, zum anderen auf die Spaltung des CPAF-Substrats Vimentin, untersucht.

A

T-REx-293-gyrB-CPAF





AHT/CM 18 h + WEHD-fmk 10 µM

AHT/CM 18 h + WEHD-fmk 30 µM

AHT/CM 18 h + WEHD-fmk 75 µM

Abb. 13: WEHD-fmk blockiert CPAF-Aktivität.

(A) WEHD-fmk blockiert CPAF-abhängige Veränderungen der Zellmorphologie. CPAF wurde in T-REx-293gyrB-CPAF Zellen für 18 h mit AHT/CM (5 ng, 1 μ M) induziert und aktiviert. Vor Induktion wurde den Zellen in angegebener Konzentration WEHD-fmk zugesetzt. Die morphologischen Veränderungen wurden nach 18 h mit einem Lichtmikroskop verfolgt (*Axiovert S100*, 10x/0.25 Linse, *AxioCam Hsm* Kamera). Weißer Balken = 50 μ M.



Abb. 13: WEHD-fmk blockiert CPAF-Aktivität.

(B) WEHD-fmk blockiert CPAF-abhängige Substratspaltung. CPAF wurde in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen für 18 h induziert. Vor Induktion wurde den Zellen in angegebener Konzentration WEHD-fmk zugesetzt. Der Nachweis von Vimentin erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte Proteinfragmente.

Die Zugabe von WEHD-fmk zu T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen hatte keinen Einfluss auf deren Morphologie. Identisch zu unbehandelten Zellen war ein dichtes Netzwerk länglicher, ca. 10 µM großer Zellen zu beobachten (siehe Abb. 13 A, obere Reihe, Mitte). Nach CPAF-Induktion für 18 h konnten kaum noch adhärente Zellen detektiert werden. Die Mehrheit der Zellen schwamm - wie bereits beschrieben (siehe Abb. 8) - einzeln oder in traubenförmigen Formationen im Medium. Teilweise waren auch zerstörte bzw. Fragmente zerstörter Zellen zu sehen (siehe Abb. 13 A, obere Reihe, rechts). Dies korreliert mit unseren früheren Daten, welche zu diesem Zeitpunkt der CPAF-Induktion ein Absterben der Zellen durch nicht-apoptotischen Zelltod aufzeigten [87].

Die Zugabe ansteigender Mengen an WEHD-fmk hatte eine graduelle Inhibition der beschriebenen, für CPAF-Induktion typischen Veränderungen der Zellmorphologie zur Folge. Die Zugabe von 10 µM WEHD-fmk vor Induktion der Zellen zeigte lediglich geringe bis keine Effekte. Eine WEHD-fmk-Konzentration von 30 µM führte zu einer starken Abschwächung CPAF-induzierter Anpassungen der Zellmorphologie. Der Einsatz von 75 µM WEHD-fmk, analog zu den zuvor gezeigten Infektionsexperimenten (siehe Abb. 11, 12), inhibierte die Veränderungen der Zellmorphologie fast vollständig (siehe Abb. 13 A, untere Reihe). Da in diesem experimentellen Aufbau CPAF ektopisch exprimiert wurde, konnten Effekte auf andere chlamydiale Proteine oder Strukturen ausgeschlossen werden. Das Ergebnis des Experiments stützt somit die Hypothese einer Inhibition von CPAF durch WEHD-fmk.

Weiter wurde getestet, ob WEHD-fmk CPAF-abhängige Substratspaltung beeinträchtigt. Daher wurden Zelllysate der zuvor beschriebenen Titrationsexperimente auf die Spaltung des CPAF-Substrats Vimentin untersucht.

Nach 18-stündiger CPAF-Induktion konnte Vimentin-Spaltung im Western Blot detektiert werden (siehe Abb.13 B). Entsprechend der vorangegangenen Experimente wurde den Zellen 10, 30 bzw. 75 µM WEHD-fmk zugesetzt. In Übereinstimmung mit der Inhibition

CPAF-abhängiger Veränderungen der Zellmorphologie wurde auch die Spaltung des CPAF-Substrats durch WEHD-fmk blockiert. Während eine Konzentration von 10 µM WEHD-fmk für eine Hemmung der CPAF-Aktivität erneut nicht ausreichend war, führten 30 wie 75 µM WEHD-fmk zu einer partiellen bzw. vollständigen Inhibition der Spaltung von Vimentin. Dies resultiert aus einer abgeschwächten bzw. fehlenden Detektion des Vimentinspaltprodukts. Die Korrelation von ausbleibenden CPAF-Effekten nach ektopischer CPAF-Expression in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen und der Applikation des Peptid-Inhibitors WEHD-fmk stützt erneut die Hypothese, dass WEHD-fmk ein CPAF-Inhibitor ist.

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob WEHD-fmk auch die Spaltung anderer CPAF-Substrate blockiert. Auf diese Weise könnte ausgeschlossen werden, dass Interaktionen zwischen einzelnen Substraten und dem Inhibitor für unsere Beobachtungen verantwortlich sind. Dazu wurde in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen CPAF induziert und aktiviert. WEHD-fmk wurde 30 min zuvor, in einer Konzentration von 75 µM, zugegeben. CPAF-Substrate wurden mittels Western Blot analysiert.



T-REx-293-gyrB-CPAF

Abb. 14: WEHD-fmk blockiert CPAF-abhängige Substratspaltung.

CPAF wurde in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen für 18 h mit AHT/CM (5 ng, 1 µM) induziert und aktiviert. WEHD-fmk (75 µM) wurde den Zellen 30 min vor Induktion zugesetzt. Der Nachweis von zellulären Proteinen erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte Proteinfragmente.

Exemplarisch wurde zur Überprüfung der Substrat-Spaltung Cyclin B1 und das proapoptotische Protein Bim überprüft. Die Induktion der CPAF-exprimierenden Zellen hatte die Prozessierung beider Proteine zur Folge (siehe Abb. 14). Im Fall von Cyclin B1 wurde eine

charakteristische Verkürzung des Proteins detektiert. Ferner konnte ein Spaltprodukt einer Masse von ca. 40 kDa detektiert werden. Die Degradierung von Bim resultierte nicht in einem definierten Spaltprodukt. Die Zugabe des Peptid-Inhibitors verhinderte die überprüften Spaltungsvorgänge. Eine mögliche Erklärung der beobachteten Vorgänge wäre eine direkte Inhibition der chlamydialen Protease CPAF. Die Möglichkeit, dass unsere Beobachtungen durch eine Interaktion zwischen WEHD-fmk und einem Substratprotein begründet sein könnten erscheint unwahrscheinlich.

3.2.4 Analyse des inhibitorischen Effekts von WEHD-fmk

Die gezeigten Daten deuten auf eine Inhibition der chlamydialen Protease CPAF durch WEHD-fmk hin. Allerdings war keines der bisher gezeigten Experimente dazu geeignet, einen solchen Vorgang näher zu charakterisieren. Durch *in vitro,* sowie Zellkultur-basierte Experimente sollte der zu Grunde liegende Mechanismus analysiert und charakterisiert werden.

3.2.4.1 WEDH-fmk inhibiert aktiviertes CPAF

Die Möglichkeit einer direkten Inhibition von CPAF durch WEHD-fmk sollte in *in vitro* Experimenten überprüft werden. Dazu wurden Lysate von Zellen nach CPAF-Expression und Aktivierung mit Lysaten CK8-myc transfizierter T-REx-293 Zellen vermischt. Durch Analyse der Spaltung des markierten CPAF-Substrates kann die Aktivität der Protease beobachtet werden. Da CPAF im eingesetzten T-REx-293-gyrB-CPAF Lysat bereits aktiviert worden war, kann möglicherweise durch Verwendung von WEHD-fmk vor Zugabe des Substrat-Lysats, eine Blockierung auf Ebene der Expression oder Aktivierung bzw. auf Ebene der Substratspaltung ausgeschlossen werden.



Abb. 15: WEHD-fmk blockiert aktives CPAF.

T-Rex-293-gyrB-CPAF Zellen wurden nach CPAF-Induktion und Aktivierung geerntet und lysiert. Diese Lysate wurden mit Lysaten aus CK8-myc transfizierter T-REx-293 Zellen gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Wie angegeben wurde dem CPAF-enthaltenden Zellextrakt zuvor WEHD-fmk (75 μM) oder Lactacystin (LC; 40 μM) zugesetzt. Der Nachweis von myc-markiertem Zytokeratin-8 erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse.

Bei Kontrolle von myc-markiertem Zytokeratin-8 konnte, wie erwartet, festgestellt werden, dass kein Signal im CPAF-enthaltenden Lysat zu detektieren war. CK8 wurde lediglich im Lysat zuvor transient transfizierter T-REx-293 Zellen nachgewiesen. Entgegen der Experimente unter Abschnitt 3.2.2.1 konnte eine dritte Bande bei ca. 40 kDa beobachtet werden. Da die Lysate ohne die Verwendung von Protease-Inhibitoren gewonnen wurden, könnte die Aktivität zellulärer Proteasen die Ergebnisse erklären.

Nach gemeinsamer Inkubation der Lysate war zu beobachten, dass das CPAF-Substrat kaum noch detektierbar war (siehe Abb. 15). Ein möglicher Grund ist die bekannte CPAFabhängige Substratspaltung. Die Daten der Experimente nach Zugabe des CPAF-Inhibitors Lactacystin stützen eine entsprechende Annahme. So wurde der Abbau von Zytokeratin-8 durch Lactacystin nahezu völlig unterdrückt (siehe Abb. 15). Der Zusatz von WEHD-fmk hatte vergleichbare Folgen. Wie im Falle der Verwendung von Lactacystin war eine starke Blockierung der CPAF-abhängigen Zytokeratin-8-Spaltung zu beobachten. Im Vergleich mit der Lactacystin-vermittelten Inhibition, erschien die Hemmung durch WEHD-fmk schwächer ausgeprägt zu sein. Zwar konnte auch Volllängen-Zytokeratin detektiert werden, allerdings weniger als im Kontrolllysat oder nach Lactacystin-Zusatz. Des Weiteren war durch WEHDfmk eine Zunahme des 40 kDa Fragments festzustellen. Möglicherweise ist an der Generierung des Zytokeratin-8-Fragments eine weitere WEHD-fmk-insensitive, wirtseigene Protease beteiligt. Aus diesem experimentellen Aufbau ist zu schließen, dass WEHD-fmk in der Lage ist, die katalytische Aktivität von aktivem CPAF zu hemmen. Das hier erbrachte Ergebnis ist als Argument für eine direkte Inhibition von CPAF durch WEHD-fmk zu interpretieren.

Um die Beteiligung von ungewollten bzw. unerwarteten, durch WEHD-fmk-vermittelten, Effekten auf andere Proteine möglichst auszuschließen, wurde in *in vitro* Versuchen rekombinantes, aufgereinigtes und aktiviertes CPAF verwendet. Bevor rekombinantes CPAF mit T-REx-293 Zelllysaten vermischt wurde, titrierte man unterschiedliche Konzentrationen an WEHD-fmk zu. Nach Inkubation bei 37°C wurde zum Nachweis CPAF-abhängiger Substrat-Spaltung Vimentin mittels Western Blot überprüft.



Abb. 16: WEHD-fmk blockiert rekombinantes CPAF.

Aufgereinigtes, rekombinantes CPAF wurde wie angegeben WEHD-fmk zugesetzt. T-REx-293 Lysat wurde den Ansätzen nach 30-minütiger Inkubation zugegeben. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert. Der Nachweis von Vimentin erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte Proteinfragmente. "*" bezeichnet unspezifische Banden eines Western Blots.

Rekombinantes CPAF hatte, nach Zugabe eines Substrat-Lysats, die Spaltung von Vimentin zur Folge (siehe Abb. 16, Spur 2). Verglichen mit vorherigen *in vitro* oder Zellkultur-basierten Versuchen war eine identische Fragmentierung des CPAF-Substrates zu beobachten. Die Zugabe von WEHD-fmk in steigenden Konzentrationen hatte eine graduelle Zunahme der Inhibition der Vimentin-Spaltung zur Folge (siehe Abb. 16, Spuren 3-8). Eine Konzentration von 50 µM WEHD-fmk war nicht in der Lage Substratspaltung zu inhibieren, eine Steigerung auf 75 µM zog allerdings eine weitgehende Blockierung der CPAF-Aktivität nach sich. Ab einer Zugabe von 100 µM WEHD-fmk war kaum noch eine Prozessierung von Vimentin zu detektieren. Trotzdem konnte die Fragmentierung von Vimentin selbst durch eine starke Steigerung der WEHD-fmk-Konzentration nicht komplett unterdrückt werden.

Da als Substrat keine rekombinanten Proteine sondern Zelllysate eingesetzt wurden, konnten diese Experimente die Möglichkeit von Nebenwirkungen durch WEHD-fmk zwar nicht endgültig ausschließen, die Blockierung der CPAF-Aktivität des gereinigten Proteins durch die Verwendung von WEHD-fmk ist trotzdem als deutlicher Hinweis auf die CPAF-Spezifität des unterliegenden, inhibitorischen Mechanismus zu werten.

3.2.4.2 WEHD-fmk inhibiert CPAF unabhängig von Caspasen

Zur weiteren Charakterisierung der WEHD-fmk-vermittelten Hemmung der CPAF-Aktivität durch WEHD-fmk erfolgte eine vergleichende Analyse mit verschiedenen Inhibitoren. So wurden CPAF-exprimierende Zellen mit WEHD-fmk und Lactacystin inkubiert. Da WEHD-fmk ursprünglich als Caspase-1-Inhibitor entwickelt wurde, wäre auch eine Beteiligung von Caspasen denkbar. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden induzierte T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen auch nach Zugabe des pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk auf Spaltung verschiedener CPAF-Substrate analysiert. Als Negativ-Kontrolle wurde der Proteasominhibitor Epoxomicin verwendet. Dieser hat keine Inhibition der CPAF-Aktivität zur Folge (siehe Abschnitt 3.1).



Abb. 17: WEHD-fmk blockiert CPAF-Aktivität unabhängig von Caspasen.

CPAF wurde in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen für 18 h mit AHT/CM (5 ng, 1 µM) induziert. Vor Induktion der Zellen wurde wie angezeigt WEHD-fmk (75 µM), Lactacystin (LC, 40 µM), Epoxomicin (Epox, 2,5 µM) bzw. z-VAD-fmk (75 µM) zugegeben. Der Nachweis zellulärer Proteine erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische durch CPAF generierte, Proteinfragmente.

Zur Überprüfung CPAF-abhängiger Spaltungsereignisse wurden nach Zugabe von AHT/CM zu T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen Vimentin und Zytokeratin-8 mittels Western Blot kontrolliert. Analog zu bisherigen Experimenten führte sowohl die Zugabe von WEHD-fmk, als auch von Lactacystin zu einer zumindest partiellen Blockierung der Spaltung der Proteine (siehe Abb. 8, 14, 15). In diesem Experiment zeigte WEHD-fmk eine deutlich ausgeprägtere Unterdrückung der CPAF-abhängigen Substratspaltung als Lactacystin. Dies könnte in einer unterschiedlichen Zellgängigkeit der beiden Inhibitoren begründet sein. In einem *in vitro* Assay wäre ein solcher Faktor nicht von Bedeutung. Weiterhin ist die Stabilität von Lactacystin sehr gering. Daher könnte eine längere Lagerung des Inhibitors oder Inkubationsdauer zu einer verringerten inhibitorischen Kapazität führen. Der Proteasom-Inhibitor Epoxomicin hatte keine inhibitorische Wirkung auf CPAF (siehe Abb. 17, Spuren 3-5).

Weiterhin sollte analysiert werden, ob Caspasen bei den beobachteten WEHD-fmkvermittelten Effekten bzw. CPAF-abhängigen Substratspaltungsvorgängen von Bedeutung sind. Die Zugabe des pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk war dabei nicht ausreichend, um die Spaltung der CPAF-Substrate zu blockieren. Dies zeigt, dass Caspasen nicht an CPAFabhängigen Spaltvorgängen beteiligt waren. Auch schloss man dadurch aus, dass die WEHD-vermittelte Inhibition von CPAF mit einer Blockierung von Caspasen im Zusammenhang steht. Insgesamt konnte durch diese Versuche neben Caspasen zumindest eine Beteiligung des Proteasoms im inhibitorischen Mechanismus von WEHD-fmk ausgeschlossen werden. Ein Einbezug anderer zellulärer Proteine wäre trotzdem denkbar.

3.2.5 Test von Peptid-fmk Inhibitoren auf CPAF-blockierende Effekte

Nachdem bisherige Daten eine spezifische Inhibition von CPAF durch WEHD-fmk anzeigten, sollte in weiterführenden Experimenten näher untersucht werden, inwiefern der Peptidanteil der Inhibitoren entscheidend für die Blockierung der Protease ist. In einem mit dem Experiment in Abb. 15 vergleichbaren, experimentellen Aufbau, wurden weitere Peptid-Inhibitoren auf eine Hemmung CPAF-abhängiger Spaltvorgänge überprüft.

3.2.5.1 Analyse von Peptid-fmk Inhibitoren auf CPAF-blockierende Effekte

Zur Untersuchung bekannter Peptid-Inhibitoren auf eine Blockierung der Protease CPAF, wurde auf eine entsprechende Bibliothek an Inhibitoren zurückgegriffen (PromoKine, Heidelberg, Deutschland). Diese Gruppe fmk-gekoppelter Peptide wurde identisch zu Abb. 15 analysiert. Neben den Inhibitoren der verwendeten Bibliothek wurden Lactacystin und WEHD-fmk entsprechend der bisherigen Experimente verwendet. Zur Überprüfung einer möglichen Blockierung CPAF-abhängiger Substratspaltung wurde myc-markiertes Zytokeratin-8 mittels Western Blot analysiert.



Abb. 18: Test von Peptid-fmk Inhibitoren auf CPAF-Blockierung .

T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen wurden nach CPAF-Induktion und Aktivierung geerntet und lysiert. Diese Lysate wurden mit Lysaten aus CK8-myc transfizierter T-REx-293 Zellen gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Wie angezeigt wurden CPAF-beinhaltenden Zelllysaten zuvor Peptid-Inhibitoren (75 μ M) oder Lactacystin (LC; 40 μ M) zugesetzt. Der Nachweis von myc-markiertem Zytokeratin-8 erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse.

Über den Test verschiedener Peptid-Inhibitoren ließ sich feststellen, dass weitere Substanzen ein Potential zur Blockierung CPAF-abhängiger Spaltungen besitzen. So hatte eine Inkubation CPAF-haltiger Lysate mit LEVD-fmk oder VEID-fmk eine partielle Blockierung der CK8-Spaltung zur Folge (siehe Abb. 18, Spuren 9, 11). In beiden Fällen war

nicht vollständig gespaltenes Zytokeratin-8 zu detektieren. Ungespaltenes Protein war trotzdem kaum nachweisbar. Die übrigen getesteten Substanzen hatten keinerlei Einfluss auf die Degradierung des CPAF-Substrats. Dabei ist anzumerken, dass die Gruppe getesteter Inhibitoren YVAD-fmk umfasste, welches, wie WEHD-fmk, ein Caspase-1-Inhibitor ist (siehe Abb. 18, Spur 6). Da auch dieser Caspase-1-Inhibitor keinen Einfluss auf die CPAF-Aktivität hatte, kann eine Rolle der Cystein-Protease bei CPAF-abhängigen Substratspaltungen ausgeschlossen werden.

Verglich man die WEHD-fmk Inhibitoren verschiedener Hersteller (siehe Abb. 18, Spur 5: R&D, Wiesbaden, Deutschland; Spur 10: PromoKine, Heidelberg, Deutschland) so war eine unterschiedlich stark ausgeprägte Hemmung der CK8-Spaltung zu verzeichnen. Die Gründe hierfür konnten bisher nicht geklärt werden.

3.2.5.2 WEHD-fmk und VEID-fmk hemmen CPAF-abhängige Substratspaltung nach chlamydialer Infektion

Auf der Grundlage der Analyse einer Gruppe an Peptid-Inhibitoren sollte ein weiterer putativer CPAF-Inhibitor - VEID-fmk - genauer auf sein inhibitorisches Potenzial überprüft werden. Neben VEID-fmk und WEHD-fmk wurden in Zellkultur-basierten Experimenten auch LEHD-fmk und DEVD-fmk untersucht. Da die beiden letztgenannten Peptid-Inhibitoren zuvor keine messbare Hemmung von CPAF zeigten, dienten sie als Negativ-Kontrollen. In einem ersten experimentellen Aufbau wurden dazu T-REx-293 Zellen mit *C. trachomatis* infiziert und nach Zugabe der Inhibitoren auf Vimentinspaltung untersucht.





T-REx-293 Zellen wurden mit *C. trachomatis* (MOI = 2) für 24 h infiziert. Zugabe von VEID-fmk (75 μ M) erfolgte 9 h nach Infektion der Zellen. Der Nachweis von Vimentin erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte, Proteinfragmente.

Die durchgeführten Infektionsexperimente bestätigen die Daten der *in vitro* Experimente. WEHD-fmk und VEID-fmk führten zu einer partiellen Inhibition der CPAF-abhängigen Spaltung von Vimentin (siehe Abb. 19, Spur 3, 4). Wie zuvor zeigte weder DEVD-fmk noch LEHD-fmk einen Einfluss auf die Vimentindegradierung. Dieses Ergebnis unterstreicht die Möglichkeit einer VEID-fmk-vermittelten Blockierung von CPAF.

3.2.5.3 VEID-fmk hemmt CPAF-abhängige Substratspaltung in CPAFexprimierenden Zellen

Entsprechend der Überprüfung der CPAF-Inhibition durch WEHD-fmk, wurde untersucht, ob VEID-fmk CPAF-abhängige Substratspaltung nach ektopischer Expression der Protease unterdrücken kann. Dies würde zeigen, dass die VEID-fmk-abhängige Blockierung der Spaltung von CPAF-Substraten, wie im Falle von WEHD-fmk, unabhängig von anderen chlamydialen Proteinen ist. T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen wurden deshalb mit VEID-fmk behandelt und wie angegeben induziert. CPAF-Aktivität wurde anhand der Spaltung von Vimentin überprüft.



Abb. 20: VEID-fmk blockiert CPAF-Aktivität.

CPAF wurde in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen für die angegebenen Zeitpunkte mit AHT/CM (5 ng, 1 μ M) induziert. Vor Induktion wurde den Zellen VEID-fmk (75 μ M) zugesetzt. Der Nachweis von zellulären Proteinen erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte Proteinfragmente.

CPAF-Expression führte zu eine zeitabhängigen Spaltung von Vimentin. Die Zugabe von VEID-fmk führte zu einer Verlangsamung der Vimentinspaltung. So konnte das charakteristische Spaltfragment von Vimentin fünf, spätestens sechs Stunden nach Induktion detektiert werden (siehe Abb. 20, Spuren 2, 3). Im Beisein von VEID-fmk war eine Spaltung erst 7 h nach Zugabe von AHT/CM zu beobachten. Auch das Ausmaß der Spaltung war nach VEID-fmk Zusatz geringer als zuvor (siehe Abb. 20, Spuren 6-9).

3.2.5.4 VEID-fmk inhibiert aktives CPAF

Nachdem festgestellt werden konnte, dass VEID-fmk sowohl nach Infektion, als auch nach ektopischer Expression die Spaltung von CPAF-Substraten inhibiert, sollte getestet werden ob auch bereits aktives CPAF auf diese Weise blockiert werden kann. Dazu wurden *in vitro* Experimente durchgeführt. Gereinigtem, rekombinantem Protein wurde analog zu Abb. 16 VEID-fmk in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Im Anschluss wurden diese Ansätze mit T-REx-293 Zelllysat vermischt. Nach einstündiger Inkubation der Ansätze bei 37°C, wurde exemplarisch Vimentinspaltung nachgewiesen.



Abb. 21: VEID-fmk blockiert rekombinantes CPAF.

Aufgereinigtes, rekombinantes CPAF wurde wie angegeben VEID-fmk zugesetzt. T-REx-293 Zelllysat wurde den Ansätzen nach 30-minütiger Inkubation zugegeben. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert. Der Nachweis von Vimentin erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte Proteinfragmente. "*" bezeichnet unspezifische Banden eines Western Blots.

Die Titration von VEID-fmk zu rekombinantem CPAF führte zu einer schrittweisen Blockierung der Vimentinspaltung. Ohne Inhibitor-Zugabe konnte eine vollständige Fragmentierung des Substratproteins beobachtet werden (siehe Abb. 21, Spur 2). Nach Zusatz von 50 µM VEID-fmk konnte bereits eine partielle Inhibition der Fragmentierung detektiert werden. Diese nahm schrittweise zu und bei einer Konzentration von 200 µM war keine Spaltung mehr nachzuweisen (siehe Abb. 21, Spuren 3-8). Das Ergebnis des Experiments zeigt, dass wie im Falle von WEHD-fmk, auch VEID-fmk in der Lage ist, aktives CPAF zu inhibieren. Durch die Ergebnisse der Abschnitt 3.2.5 wird gezeigt, dass auch VEID-fmk ein potentieller Inhibitor der chlamydialen Protease CPAF ist.

3.3 Einfluss chlamydialer Infektionen auf zelluläre Signaltransduktion

Durch verschiedene Studien konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass Chlamydien in der Lage sind, Effektorproteine über die Barriere der Vakuolenmembran zu sezernieren. Ein Mechanismus, über den dies geschieht, ist beispielsweise ein Typ-3-Sekretionssystem. Daneben existieren wohl auch noch andere Mechanismen zu Proteintranslokation; so wird die chlamydiale Protease CPAF Typ-3-unabhängig sezerniert - möglicherweise über ein Sec-System [60, 67, 176]. Die chlamydialen Effektoren können in den Wirtszellen mit verschiedenen zellulären Mechanismen und Funktionen interferieren, beispielsweise der Apoptose oder dem Vesikeltransport.

Des Weiteren scheinen Chlamydien Signaltransduktionswege zu manipulieren, die Einfluss auf die Immunantwort nehmen. Neben einer Aktivierung der MEK/ERK-Kaskade [137], beschreiben mehrere Arbeiten eine Chlamydien-abhängige Blockierung des NF-kB-Signalwegs. Bisher werden zwei chlamydiale Effektoren mit diesen Vorgängen in Verbindung gebracht. Hier zu nennen ist eine chlamydiale Deubiguitinase, ChlaDub-1, welche zumindest in vitro die Ubiquitinierung von I- κ B- α aufhebt und dadurch eine Translokation des heterodimeren Transkriptionsfaktors in den Nukleus verhindern könnte [151]. Eine Sekretion von ChlaDub-1 während chlamydialen Infektionen konnte bisher aber nicht gezeigt werden. Weiterhin wird die Aktivität einer chlamydialen Tsp-Protease CT441 mit der Unterdrückung von Signalen des NF-kB-Signaltransduktionsweges assoziiert [152, 153]. Tsp-Proteasen sind aus verschiedenen Mikroorganismen bekannt und beschrieben. Sie erkennen ihre Substrate über eine PDZ-Erkennungsdomäne und spalten freie C-Termini. Tsp-Proteasen sind oft Teil von Proteindegradierungs- bzw. Verwertungswegen. So dient die Tsp-Protease aus E. coli -Prc - der Entfernung missgefalteter Proteine aus dem bakteriellen Periplasma [177]. In vitro wurde gezeigt, dass die chlamydiale Tsp-Protease CT441 p65/RelA - ein Protein der NF-KB-Proteinfamilie - spaltet [79, 152, 153]. Allerdings ist die Lokalisation der Protease während Infektion noch ungeklärt. Eine Sekretion des Proteins in das Zytosol konnte bisher nicht gezeigt werden [156]. Des Weiteren wurde eine mögliche Beteiligung anderer chlamydialer Proteasen, speziell CPAF, nicht ausgeschlossen. Somit ist nicht abschließend geklärt, wodurch der NF-kB-Signalweg in Abhängigkeit chlamydialer Infektionen blockiert wird.

3.3.1 Spaltung von p65/RelA nach chlamydialer Infektion

Zunächst sollte nach chlamydialen Infektionen der zeitliche Ablauf der Spaltung von p65/RelA überprüft werden. Hierzu wurden verschiedene eukaryotische Zelllinien mit *C. trachomatis* infiziert. Als humane Zelllinie wurden T-REx-293 Zellen und als murine MEF Zellen verwendet. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da vorhandene Daten

speziesspezifische Unterschiede in der Proteinspaltung zeigten. p65/RelA wurde sowohl nach Infektion mit *C. trachomatis*, als auch *C. pneumoniae* überprüft. Sollten in beiden humanpathogenen Spezies Mechanismen zur Spaltung angelegt sein, würde dies eine mögliche Relevanz für den Verlauf von Infektionen nahe legen.

3.3.1.1 p65/ReIA-Spaltung nach Infektion mit C. trachomatis

Die beiden eukaryotischen Zelllinien wurden mit einer Chlamydienmenge, welche einer MOI = 3 entsprach, infiziert. Nach den in Abb. 22 angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und mittels Western Blot analysiert. Da die Dauer des chlamydialen Entwicklungszyklus durch die Wahl der Wirtszellen beeinflusst wird, wurden T-REx-293 Zellen über eine Infektionsdauer von 24 h, MEF Zellen von 48 h, untersucht.



Abb. 22: Infektion von T-REx-293 und MEF Zellen mit *C. trachomatis* hat p65/RelA-Spaltung zur Folge.
(A) T-REx-293 Zellen wurden mit einer MOI = 3 infiziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, lysiert und analysiert.
(B) MEF Zellen wurden mit einer MOI = 3 infiziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen

geerntet, lysiert und analysiert.

Der Nachweis zellulärer Proteine bzw. von chlamydialem CPAF erfolgte durch spezifische Antikörper per Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte Proteinfragmente. "*" bezeichnet unspezifische Banden eines Western Blots. "CPAFc" bezeichnet das C-terminale Fragment von CPAF, welches nur nach Aktivierung der Protease nachweisbar ist (Abbildung ist adaptiert von [175]).

Nach Infektion sowohl der humanen Zelllinie T-REx-293 als auch der murinen Zelllinie konnte die Spaltung von p65/RelA nachgewiesen werden. Unter Einbezug der unterschiedlichen Dauer des chlamydialen Entwicklungszyklus in beiden Zelllinien konnte ein vergleichbarer zeitlicher Ablauf des Spaltungsvorgangs festgestellt werden. In T-REx-293 Zellen wurde 16 h nach Infektion eine beginnende Fragmentierung beobachtet. Gleiches

konnte in MEF Zellen nach 22 h detektiert werden (siehe Abb. 22). Diese Feststellung widersprach bisherigen Berichten, wonach murines p65/RelA nicht während Infektionen mit *C. trachomatis* gespalten wird [152, 153]. Spaltung von p65/RelA führte in beiden Fällen zu einer definierten Fragmentierung des Proteins, wodurch ein Spaltprodukt einer Größe von ca. 25 kDa nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 22). Bei näherer Analyse des Fragmentierungsmusters waren auch Unterschiede zwischen den Zelllinien festzustellen. So wurden nach Infektionen von MEF Zellen zwei Banden im Bereich von 25 kDa detektiert (siehe Abb. 22 B). Weiterhin schien die Spaltung von humanem p65/RelA effektiver zu sein als von murinem. Diese Diskrepanzen in der Fragmentierung könnten möglicherweise auf speziesspezifische Unterschiede in der Proteinsequenz zurückzuführen sein. In diesen Unterschieden könnte auch eine unterschiedliche Sensitivität des verwendeten Antikörpers für humanes und murines p65/RelA begründet sein. Auch wäre es denkbar, dass die Zugänglichkeit von p65/RelA in MEF-Zellen und T-REx-293 Zellen verschieden ist.

Die detektierte p65/RelA-Spaltung setzte in beiden Zelllinien mit der Detektion der aktiven Form der chlamydialen Protease CPAF ein (siehe Abb. 22). Neben dem Nachweis von CPAF, korrelierte auch die Aktivität der Protease mit dem Verlauf der p65/RelA-Spaltung. Dies wurde anhand der Fragmentierung des CPAF-Substrates Vimentin gezeigt (siehe Abb. 22). So war zu beobachten, dass beide Spaltungsereignisse vergleichbar voranschritten beginnend 16 h nach Infektion von T-REx-293 und 18 h nach Infektion von MEF Zellen (siehe Abb. 22). Diese Experimente stellten erstmals einen Bezug zwischen der Aktivität der chlamydialen Protease CPAF und dem Abbau von p65/RelA her.

3.3.1.2 p65/ReIA-Spaltung nach Infektion mit C. pneumoniae

Neben *C. trachomatis*, die je nach Serovar Epithelien im Bereich des Auges bzw. Genitaltrakts infiziert, ist *C. pneumoniae* die zweite wichtige humanpathogene Spezies aus der Familie der *Chlamydiaceae*. Entsprechende Infektionen des Lungenepithels haben manchmal Pneumonien zur Folge (siehe Abschnitt 1.1). Nachdem in Abschnitt 3.3.1.1 eine Korrelation zwischen p65/ReIA-Spaltung und der Detektion sowie der Aktivität der chlamydialen Protease CPAF hergestellt werden konnte, sollte in weiterführenden Experimenten analysiert werden, ob dies auch nach Infektionen mit *C.pneumoniae* zu beobachten ist. Zu diesem Zweck wurden wie unter 3.3.1.1 sowohl T-REx-293, als auch MEF Zellen infiziert. Da der Entwicklungszyklus von *Chlamydia pneumoniae* je nach infizierter Zelllinie 72-96 h andauert, wurden die Experimente dahingehend angepasst. Zudem ist die Infektion von Zellen mit *C. pneumoniae* ineffektiver als der entsprechende Vorgang mit *C. trachomatis*. Daher wurde eine höhere infektiöse Dosis verwendet (siehe Abb. 23).



Abb. 23: Infektion von T-REx-293 und MEF Zellen mit *C. pneumoniae* hat p65/ReIA-Spaltung zur Folge.
 (A) T-REx-293 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI = 5) infiziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, lysiert und analysiert.

(B) MEF Zellen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI = 10) infiziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, lysiert und analysiert.

Der Nachweis zellulärer Proteine bzw. von chlamydialem CPAF erfolgte durch spezifische Antikörper per Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte Proteinfragmente. "*" bezeichnet unspezifische Banden eines Western Blots. "CPAFc" bezeichnet das C-terminale Fragment von CPAF, welches nur nach Aktivierung der Protease nachweisbar ist (Abbildung ist adaptiert von [175]).

Bei Betrachtung der Experimente war festzustellen, dass p65/RelA auch nach Infektion mit *C. pneumoniae* gespalten wird. So war beginnend nach 36-stündiger Infektion in T-REx-293 bzw. 48-stündiger Infektion in MEF Zellen p65/RelA-Fragmentierung zu beobachten (siehe Abb. 23). Das Spaltmuster des Proteins entsprach dabei den Ergebnissen nach *C. trachomatis* Infektion (siehe Abb. 22). Aus unbekannten Gründen wurde das p65/RelA Spaltprodukt nach *C. pneumoniae*-Infektion - verglichen mit Abschnitt 3.3.1.1 - nur in geringerem Maße detektiert.

Neben Spaltung von p65/RelA wurde auch die Expression sowie Aktivität von CPAF überprüft. Vergleichbar mit *C. trachomatis*-Infektion konnte auch im Falle von Infektionen mit *C. pneumoniae* festgehalten werden, dass der Spaltungsvorgang mit der Detektion der aktiven Protease korreliert (siehe Abb. 23). In beiden untersuchten Zelllinien folgten die angesprochenen Prozesse einem vergleichbaren zeitlichen Ablauf. CPAF-abhängige Substratspaltung wurde erneut durch Überprüfung von Vimentin nachgewiesen (siehe Abb. 23). Die Spaltung von p65/RelA scheint damit in beiden humanpathogenen Vertretern der
Chlamydiaceae konserviert zu sein. Als Konsequenz wäre ein inhibtorischer Effekt auf den NF-κB-Signalweg und eine Modulation NF-κB-abhängiger Genexpression denkbar.

3.3.2 Die chlamydiale Protease spaltet p65/ReIA

Die Korrelation der Spaltungsereignisse von p65/RelA und Vimentin sowie von p65/RelA-Spaltung und der Detektion der aktiven Form des Effektorproteins CPAF, waren ein erster Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang der beobachteten Vorgänge.

Über den Einsatz der T-REx-293-gyrB-CPAF Zelllinie sollte untersucht werden, ob isolierte Expression von CPAF eine Spaltung von p65/RelA nach sich zieht oder ob andere chlamydiale Proteine benötigt werden. Durch die Zugabe von AHT zu diesen Zellen wurde CPAF-Expression induziert und über Coumermycin wurde die Protease aktiviert.



Abb. 24: Induktion der chlamydialen Protease CPAF hat p65/ReIA-Spaltung zur Folge.

CPAF wurde in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen durch Zugabe von AHT/CM (5 ng/ml; 1µM) für die angegebenen Zeitpunkte induziert. Der Nachweis zellulärer Proteine bzw. von chlamydialem CPAF erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte Proteinfragmente. "*" bezeichnet unspezifische Banden eines Western Blots. "CPAFc" bezeichnet das C-terminale Fragment von CPAF, welches nur nach Aktivierung der Protease nachweisbar ist (Abbildung ist adaptiert von 170, Christian 2010 [175]).

Nach Induktion von CPAF konnte nach 6-8 h aktives CPAF über den Nachweis des Cterminalen Fragments CPAFc, detektiert werden (siehe Abb. 24). Analog zu den durchgeführten Infektionsexperimenten (siehe Abb. 22, 23) wurde im gleichen Zeitraum Spaltung sowohl von p65/ReIA als auch von Vimentin beobachtet (siehe Abb. 24). Weiterhin war das festgehaltene Spaltungsmuster von p65/ReIA identisch zu den gezeigten Infektionsexperimenten (siehe Abb. 22). Da in diesem System als einziges chlamydiales Protein CPAF vorhanden war und erst dessen Aktivierung die Fragmentierung des NF-κB-Proteins auslöste, spricht dieses Experiment dafür, dass CPAF p65/ReIA spaltet.

Zur Analyse der Spaltung von p65/RelA durch verschiedene chlamydiale Proteasen, bzw. durch CPAF unterschiedlicher chlamydialer Spezies wurde auf ektopische Expression der entsprechenden Proteine in eukaryotischen Zellen zurückgegriffen. Transient transfeziert wurden so neben T-REx-293 Zellen auch MEF Zellen (siehe Abb. 25).



Abb. 25: p65/RelA-Spaltung durch chlamydiale Proteasen.

(A) T-REx-293 Zellen wurden mit CT441 oder *C. trachomatis*-CPAF kodierenden Plasmiden transient transfiziert. Die Zellen wurden nach 48 h geerntet und lysiert. CPAF-Expression wurde durch Zugabe von AHT/CM (5 ng/ml; 1μM) direkt nach Transfektion induziert.

(B) MEF Zellen wurden mit *C. trachomatis*-CPAF oder *C. pneumoniae*-CPAF kodierenden Plasmide transient transfiziert. Zellen wurden nach 48 h geerntet und lysiert. Transfizierte T-REx-293 Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Der Nachweis zellulärer Proteine erfolgte in beiden Fällen durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte Proteinfragmente. "*" bezeichnet unspezifische Banden eines Western Blots (Abbildung ist adaptiert von [175]).

T-REx-293 Zellen wurden sowohl mit Plasmiden, welche für die chlamydiale Tsp-Protease CT441 oder für CPAF kodieren, transfiziert (siehe Abb. 25 A). In beiden Fällen hatte die Expression der chlamydialen Proteasen die Spaltung von p65/RelA zur Folge (siehe Abb. 25 A). Der Vergleich des Spaltungsmusters von CPAF-transfizierten T-REx-293 mit infizierten Zellen bzw. induzierten T-REX-293-gyrB-CPAF Zellen zeigte, dass die p65/RelA-Fragmentierung unter den verschiedenen Bedingungen vergleichbar war (siehe Abb. 22-25). Zu detektieren war ein Spaltprodukt mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa. Durch Analyse der Spaltung von p65/RelA nach Expression von CT441 ließ sich im Vergleich zu Infektionsexperimenten ein abweichendes Fragmentierungsmuster feststellen. Das Tsp-Protease-generierte Fragment schien ein größeres Molekulargewicht aufzuweisen. Daher ist vermutlich CPAF nach Infektion entscheidend für die Spaltung von p65/RelA.

Neben T-REx-293 Zellen wurden MEF Zellen mit CPAF-Expressionskonstrukten transfiziert (siehe Abb. 25 B). Vergleichbar mit der Situation in T-REx-293 Zellen war CPAF aus *C*.

trachomatis in der Lage p65/RelA vergleichbar zu chlamydialen Infektionen zu spalten. Daneben hatte die Expression von CPAF aus *C. pneumoniae* in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.3.1.2 einen Abbau von p65/RelA zur Folge. Weiterhin hatten die Spaltprodukte ein vergleichbares Molekulargewicht (siehe Abb. 25 B). Allerdings war die Effizienz bzw. das Ausmaß der beobachteten p65/RelA-Fragmentierung in MEF Zellen reduziert. Ein Faktor ist vermutlich die bereits nach Infektionen muriner Zellen nachgewiesene, schwächere Ausprägung der Spaltung des Proteins. Eine weitere Erklärung könnte in einer geringeren Transfektionseffizienz bei MEF Zellen begründet sein. Wurden bei T-REx-293 Zellen üblicherweise 70-95 % der Zellen transfiziert, war die Transfektionsrate bei MEF Zellen lediglich etwa 20-50 %.

Bei bisherigen Studien wurden sowohl CPAF-Substrate identifiziert, welche direkt durch CPAF gespalten werden (beispielsweise Vimentin) als auch Substrate, deren Spaltung bzw. Abbau vermutlich durch CPAF ausgelöst aber nicht durchgeführt wird (BH3-Proteine). Bei letzterer Gruppe scheint das Proteasom in den Abbau der Substrate involviert zu sein [87]. Daher sollte in der Folge überprüft werden, ob p65/ReIA-Spaltung direkt durch CPAF vermittelt wird. Dazu wurden zwei Inhibitoren eingesetzt.

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass der Proteasominhibitor Lactacystin in der Lage ist das katalytische Serin im aktiven Zentrum der Protease CPAF kovalent zu binden und so neben dem Proteasom auch CPAF-Aktivität zu blockieren [157, 160]. Andere bekannte Proteasominhibitoren, beispielsweise MG-132 oder Epoxomicin, sind nicht in der Lage die chlamydiale Protease zu blockieren [87, 157]. Zur weiteren Charakterisierung der CPAF-vermittelten p65/ReIA-Spaltung wurden T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen vor der Induktion der Protease mit den Proteasominhibitoren Lactacystin und Epoxomicin behandelt.



Abb. 26: Inhibition von CPAF blockiert p65/ReIA-Spaltung.

T-REx-293-gyrB-CPAF wurden entweder mit Lactacystin (25 μ M) oder Epoxomicin (2,5 μ M) vorinkubiert. CPAF wurde anschließend durch Zugabe von AHT/CM (5 ng/ml; 1 μ M) für 8 h induziert und aktiviert. Der Nachweis zellulärer Proteine erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse (Abbildung ist adaptiert von [175]).

Durch Zugabe der beiden Proteasominhibitoren Lactacystin und Epoxomicin konnte gezeigt werden, dass CPAF ohne Beteiligung des Proteasoms in der Lage ist p65/RelA zu spalten. Durch Induktion von CPAF-Expression und Aktivierung mittels AHT/CM-Zugabe wurde analog zu vorherigen Experimenten p65/RelA-Spaltung ausgelöst (siehe Abb. 24, Abb. 26). In Gegenwart von Lactacystin wurde die Prozessierung dagegen blockiert und die ungespaltene Form von p65/RelA detektiert (siehe Abb. 26, Spur 5). Im Gegensatz dazu war Epoxomicin nicht in der Lage eine CPAF-vermittelte Spaltung zu inhibieren (siehe Abb. 26, Spur 6)

Auch wenn die Ergebnisse der bisherigen Experimente auf eine CPAF-abhängige, vermutlich direkte Spaltung von p65/RelA hinweisen, konnte weder im Infektionsmodell, noch durch ektopische Expression der chlamydialen Protease eine Beteiligung von wirtseigenen Proteinen ausgeschlossen werden. Um in einem isolierteren System die Spaltung von p65/RelA zu analysieren, wurde rekombinantes, aufgereinigtes CPAF in *in vitro* Experimenten verwendet. Die aktive Protease wurde dazu mit den CPAF-Inhibitoren Lactacystin und WEHD-fmk bzw. dem Proteasominhibitor Epoxomicin vorinkubiert und zu Lysaten aus T-REx-293 Zellen gegeben. Nach Inkubation der Ansätze für 1 h bei 37°C wurde p65/RelA im Western Blot überprüft (siehe Abb. 27).



Abb. 27: CPAF-Inhibitoren blockieren p65-Spaltung in zell-freien *in vitro* Experimenten.

Aufgereinigtes, rekombinantes CPAF wurde wie angegeben WEHD-fmk (100 μM), Lactacystin (LC, 40 μM) oder Epoxomicin (Epox, 2,5 μM) zugesetzt. T-REx-293-Zelllysat wurde den Ansätzen nach 30-minütiger Inkubation zugegeben. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert. Der Nachweis von Vimentin erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte Proteinfragmente. "*" bezeichnet unspezifische Banden eines Western Blots.

Entsprechend der zuvor gezeigten Daten aus Zellkultur -basierten Experimenten (siehe Abb. 26), führte die Verwendung verschiedener CPAF-Inhibitoren zum Verlust CPAF-abhängiger p65/RelA-Spaltung. Sowohl die Zugabe von WEHD-fmk als auch von Lactacystin führte zur Detektion von p65/RelA in unveränderter Intensität (siehe Abb. 27, Spuren 3, 5). Epoxomicin hingegen war nicht in der Lage CPAF zu inhibieren. Dementsprechend war p65/RelA-Spaltung zu beobachten (siehe Abb. 27, Spur 4). Dies zeigt, dass auch in einem isolierten System p65/RelA CPAF-abhängig gespalten wird.

3.3.3 CPAF inhibiert den NF-kB-Signalweg

Die Experimente der Abschnitte 3.3.1 und 3.3.2 zeigten, dass die chlamydiale Protease CPAF mit p65/ReIA ein Mitglied der NF-κB-Proteinfamilie spaltet. In diesen Versuchen wurde bisher noch nicht erfasst, ob diese Fragmentierung Konsequenzen für den NF-κB-Signalweg bzw. die Weiterleitung entsprechender Signale hat.

3.3.3.1 Überprüfung von Proteinen des NF-kB-Signalwegs nach CPAF-Expression und chlamydialer Infektion

Der NF-κB-Signalweg wird durch verschiedene, typischerweise pro-inflammatorische, Signale rezeptor-vermittelt aktiviert. Auf zytosolischer Seite erfolgen dann Phosphorylierungsereignisse, wodurch p65/ReIA selbst phosphoryliert und in den Nukleus transloziert wird. Wichtige Schritte in dieser Kaskade in Epithelzellen sind die Phosphorylierung des IKK-Komplexes und die IKK-vermittelte Phosphorylierung von I-κB-Proteinen. Letztgenannter Vorgang führt zur Ubiquitinierung und dem proteasomalen Abbau dieser Proteine, wodurch der Transkriptionsfaktor freigesetzt wird und in den Nukleus transloziert werden kann. In den nachfolgenden Experimenten wurden diese wesentlichen Mitglieder des Signalweges nach Infektion überprüft (siehe Abb. 28).



Abb. 28: Chlamydiale Infektion führt nicht zur Spaltung von IKK-Proteinen und I-κB-α.

T-REx-293 sowie MEF Zellen wurden für die angezeigten Zeitpunkte mit *C. trachomatis* (MOI = 3) infiziert. Der Nachweis zellulärer Proteine bzw. von chlamydialem CPAF erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte Proteinfragmente. "*" bezeichnet unspezifische Banden eines Western Blots. "CPAFc" bezeichnet das C-terminale Fragment von CPAF (Abbildung ist adaptiert von [175]).

In beiden eukaryotischen Zelllinien wurde nach Infektion mit *C. trachomatis* keine Spaltung von Proteinen des IKK-Komplexes nachgewiesen (siehe Abb. 28). Da p65 im Zytosol mit Mitgliedern der I-κB-Proteinfamilie im Komplex vorliegt, wurde exemplarisch I-κB-α überprüft. *C. trachomatis*-Infektion hatte in unseren Experimenten keine Fragmentierung von I-κB-α zur Folge (siehe Abb. 28). Die Funktionalität von CPAF wurde durch die Überprüfung des Substrates Vimentin sowie der Aktivierung der chlamydialen Protease nachgewiesen. So ist in der zweiten Hälfte des Infektionszyklus CPAF-Expression und Aktivierung zu beobachten, welche durch die Detektion des CPAFc-Fragments gezeigt ist (siehe Abb. 28). Diese korreliert mit Vimentin-Spaltung und mit dem Nachweis eines definierten Spaltprodukts (siehe Abb. 28).

Ein bekannter Induktor von NF- κ B-Signalen ist das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 β . Zur Analyse der Funktionalität des Signalwegs nach CPAF-Expression wurden deshalb T-RExgyrB-CPAF Zellen nach CPAF-Induktion mit IL-1 β (10 ng/ml) stimuliert. Die IL-1 β -Stimulationszeiten richteten sich nach der Kinetik des proteasomalen Abbaus von I- κ B- α . Zunächst wurde überprüft, ob die chlamydiale Protease CPAF auch Proteine des IKK- Komplexes fragmentiert. Dazu wurden sowohl IKK- α als auch IKK- β mittels Western Blot analysiert.



Abb. 29: Einfluss ektopischer CPAF-Expression auf den IKK-Komplex.

CPAF wurde in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen durch Zugabe von AHT/CM für 8 h induziert und aktiviert. Der NF-κB-Signalweg wurde für die angegebenen Zeiten durch den sich anschließenden Zusatz von IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. Der Nachweis zellulärer Proteine erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse (Abbildung ist adaptiert von [175]).

Entsprechend den Ergebnissen der vorangegangenen Infektionsexperimente (siehe Abb. 28) konnte nach CPAF-Aktivierung in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen keine Beeinträchtigung von Proteinen des IKK-Komplexes festgestellt werden. So war weder eine Veränderung von IKK- α noch IKK- β (siehe Abb. 29) zu beobachten. Wie unter Abschnitt 1.3.5 beschrieben, hat die Phosphorylierung des IKK-Komplexes die Phosphorylierung von I-kB-Proteinen, deren anschließende Ubiquitinierung und proteasomale Degradierung zur Folge. Dies ermöglicht im Anschluss die Translokation von NF-kB in den Nukleus. Daher wurde nach Stimulation des NF-kB-Signalweges in T-REx-293-gyrB-CPAF-Luc Zellen, bzw. nach Stimulation und CPAF-Induktion exemplarisch die Phosphorylierung und der Abbau von I- κ B- α analysiert. Daneben sollte getestet werden, ob CPAF andere, an Entzündungsreaktionen beteiligte Signalwege beeinträchtigt. Deshalb wurden ERK1/2, als Mitalieder der MAPK-Signaltansduktionskaskade überprüft.



Abb. 30: Einfluss ektopischer CPAF-Expression auf I-κB-α Degradierung und den MAPK-Signalweg. CPAF wurde in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen durch Zugabe von AHT/CM für 8 h induziert und aktiviert. Der NF-κB-Signalweg wurde für die angegebenen Zeiten durch den sich anschließenden Zusatz von IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. Der Nachweis zellulärer Proteine erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte Proteinfragmente. "*" bezeichnet unspezifische Banden eines Western Blots (Abbildung ist adaptiert von [175]).

Die Analyse der Experimente zeigte, dass sowohl nach Stimulation von T-REx-293-gyrB-CPAF-Luc Zellen mit IL-1 β als auch nach Stimulation und CPAF-Induktion eine Reduktion der I- κ B- α Menge zu beobachten war (siehe Abb. 30). Allerdings erschien der proteasomale Abbau in der Anwesenheit von aktivem CPAF leicht verzögert zu sein. So war in Kontrollansätzen bereits 15 min nach Stimulation eine starke Verringerung der Proteinmenge zu verzeichnen. Eine Vorangehende CPAF-Induktion hatte zur Folge, dass erst 30 min nach Stimulation mit IL-1 β ein eindeutiger Abbau von I- κ B- α nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 30). Diese Diskrepanz korrelierte mit einer verringerten Phosphorylierung von I- κ B- α unter letztgenannten Bedingungen (siehe Abb. 30). Möglicherweise ist dies auf die Spaltung von im Komplex mit I- κ B- α befindlichen p65/ReIA zurückzuführen (siehe Abb. 30), wodurch zu phosphorylierende Seitenketten innerhalb von I- κ B- α schlechter zugänglich sein könnten oder die Erkennung durch den IKK-Komplex möglicherweise beeinflusst ist. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Funktionalität des NF-κB-Signalwegs oberhalb von p65/ReIA nach CPAF-Induktion, trotz einer Beeinträchtigung des I-κB-α Abbaus, erhalten bleibt.

Um nachzuweisen, dass CPAF spezifisch in den NF- κ B-Signalweg eingreift, wurde exemplarisch die Funktionalität von ERK-1/2 nach Stimulation von T-REx-293-gyrB-CPAF-Luc Zellen mit IL-1 β analysiert. Auch hier konnte festgestellt werden, dass CPAF nicht zur Spaltung dieser Proteine führte (siehe Abb. 30). Des Weiteren war die Phosphorylierung von ERK-1/2 von der Expression und Aktivität von CPAF unbeeinflusst (siehe Abb. 30). Dies unterstreicht die Hypothese, dass CPAF, vermutlich spezifisch, durch Spaltung von p65/ReIA mit der NF- κ B-Signalkaskade interferiert, ohne in verwandte Signaltransduktionsereignisse einzugreifen.

3.3.3.2 CPAF inhibiert NF-kB-Aktivität nach ektopischer Expression

Die vorangegangenen Experimente konnten darstellen, dass CPAF in der Lage ist p65/RelA zu spalten. Diese Spaltung war sowohl nach ektopischer Expression als auch während der Infektion mit *C. trachomatis* nachzuweisen. Nicht erfasst wurde, ob Fragmentierung von p65/RelA Konsequenzen für die NF-κB-vermittelte Regulationen der Transkription hat.

Zur Überprüfung der NF-κB-Aktivität wurden zwei Reportergen-Zelllinien generiert. Durch lentivirale Transduktion wurden Konstrukte aus einem κB-Erkennungssegmente-tragenden Promoter und dem Luziferase-Gen (*Photinus pyralis*) in T-REx-293 bzw. T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen eingebracht. In den anschließenden Experimenten wurden NF-κB-Signale durch die Zugabe von IL-1β induziert. NF-κB-abhängige Gen-Expression wurde nach Induktion und Aktivierung von CPAF, sowie ohne CPAF-Induktion mittels Luziferase-Assays untersucht. Um auszuschließen, dass CPAF-vermittelte Zytotoxizität die Ergebnisse verfälscht, wurde gleichzeitig die metabolische Aktivität der Zellen als Maß für deren Lebensfähigkeit überprüft.



Abb. 31: CPAF inhibiert NF-kB-abhängige Gen-Expression.

(A) Mit einem Igk-Luziferase-Reporterkonstrukt transduzierte T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen wurden mit IL-1 β (10 ng/ml) stimuliert. Stimulation wurde sowohl in Anwesenheit von aktivem CPAF (weiße Balken) als auch in Abwesenheit der Protease (schwarze Balken) durchgeführt. Die Dauer der CPAF-Induktion betrug 8 h, während die IL-1 β -Stimulation entweder davor (2 h bzw. 12 h vor CPAF-Induktion entspricht den Zeitpunkten 10 h bzw. 20 h), gleichzeitig (8 h) oder nach CPAF-Induktion gestartet wurde (2 h bzw. 4 h später, entspricht den Zeitpunkten 6 bzw. 4 h). Die Zellen wurden Iysiert, und die Luziferase-Aktivität wurde bestimmt. Gezeigt ist die relative NF- κ B-Induktion (unstimulierte Zellen haben eine Induktion von 1).

(B) Zur Kontrolle der Zellvitalität wurden analog zu (A) MTT-Experimente durchgeführt.

Die abgebildeten Daten repräsentieren die Mittelwerte/SEM fünf unabhängiger Experimente. "K" bezeichnet Kontrollansätze. "*" p-Wert < 0,05 (Student's t Test; Abbildung ist adaptiert von [175]).

Stimulation von T-REx-293-gyrB-CPAF-Luc Zellen mit IL-1β hatte wie erwartet eine Aktivierung des NF-κB-Signalwegs zur Folge. Nach Zugabe war eine klare Induktion der NFκB-abhängigen Expression und Aktivität des Luziferase-Reportergens der Zellen zu beobachten (siehe Abb. 31 A). Die Stärke der detektierten Luziferase-Aktivität wurde als relative Größe der Induktion bzw. Aktivität NF-κB-abhängiger Genexpression angesehen. Diese war von der Stimulationsdauer abhängig. So war nach vierstündiger Stimulation ein Anstieg der Luziferase-Aktivität um das ca. 40-fache, nach 20-stündiger Stimulation um das ca. 120-fache, festzustellen (siehe Abb. 31 A, schwarze Balken).

Entsprechende IL-1β-Stimulation wurde im Beisein von CPAF durchgeführt. Die Protease wurde dazu für 8 h vor IL-1β-Zugabe durch Zusatz von AHT/CM exprimiert und aktiviert. Dies hatte, unabhängig des Zeitraums der IL-1β-Stimulation, eine starke Reduktion der Luziferase-Aktivität bzw. der Induktion NF-κB-abhängiger Genexpression zur Folge (siehe Abb. 31 A). In allen Fällen konnte eine Verringerung dieser Induktion um mehr als 50 % nachgewiesen werden. Je früher die Zugabe von IL-1β erfolgte, desto ausgeprägter war die beobachtete CPAF-abhängige Reduktion der NF-κB-Induktion (siehe Abb. 31 A, schwarze Balken). Trotzdem war in allen Fällen ein Rest an Reportergenaktivität und damit NF-κB-abhängiger Genexpression festzustellen (siehe Abb. 31 A, weiße Balken). Da ohne IL-1β-Stimulation der Zellen keine Luziferase-Expression bzw. Aktivität vorhanden war, muss diese wahrscheinlich auf eine noch vorhandene Funktionalität des NF-κB-Signalwegs zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse der Luziferase-Assays schienen nicht durch CPAF-abhängigen Zelltod beeinflusst zu werden. Die Überprüfung der Zellvitalität durch Aufnahme ihrer metabolischen Aktivität zeigte keine vergleichbaren Beeinträchtigungen (siehe Abb. 31 B). Stimulation mit IL-1β führte zu keiner Veränderung der metabolischen Aktivität (siehe Abb. 31 B, schwarze Balken) und CPAF-Induktion für 8 h zog, entsprechend unserer früheren Daten, lediglich ein Absterben von maximal 10 % der Zellen nach sich (siehe Abb. 31 B, weiße Balken) [87].

Über die vorherigen Experimente konnte dargelegt werden, dass die Induktion von CPAF durch AHT/CM-Zugabe nach Stimulation von T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen mit IL-1β, eine Reduktion der NF-κB-abhängigen Genexpression als Konsequenz hatte. Diese Verringerung ist nach unserer Hypothese auf die CPAF-bedingte Spaltung von p65/RelA zurückzuführen. Um auszuschließen, dass die Reportergenassays durch die Verwendung von AHT oder CM verfälscht wurden, führten wir identische Experimente zu Abb. 31 in T-REx-293-Luc Zellen durch. Die Analyse der NF-κB-abhängiger Genexpression bzw. Aktivität, nach Zugabe von AHT, CM oder einer Kombination von beiden, ist in Abb. 32 gezeigt.



Abb. 32: AHT und CM beeinträchtigen die NF-KB-Aktivität nicht.

Mit einem Igk-Luciferase Reporterkonstrukt transduzierte T-REx-293 Zellen wurden für 8 h mit IL-1 β (10ng/ml) stimuliert. AHT (5 ng/ml), CM (1 μ M) oder AHT/CM wurden gleichfalls für 8 h zugesetzt. Die Zellen wurden Iysiert, und Luziferase-Aktivität wurde bestimmt. Gezeigt ist die relative NF- κ B-Induktion (unstimulierte Zellen haben eine Induktion von 1).

Die abgebildeten Daten repräsentieren die Mittelwerte/SEM dreier unabhängiger Experimente. "K" bezeichnet Kontrollansätze (Abbildung ist adaptiert von [175]).

Stimulation von T-REx-293-Luc Zellen mit IL-1β löste eine ähnlich starke Induktion der NFκB-Aktivität wie in T-REx-293-gyrB-CPAF-Luc Zellen aus (siehe Abb. 31, oben, Abb. 32, weiße Balken). Diese Aktivierung wurde weder durch die Zugabe von AHT noch CM beeinflusst. In beiden Fällen konnte eine ca. 100-fache Induktion NF-κB-abhängiger Genexpression beobachtet werden (siehe Abb. 32). Entsprechendes war nach der gleichzeitigen Zugabe von AHT und CM nachzuweisen (siehe Abb. 32). Die festgestellte Reduktion der NF-κB-Aktivität in Abb. 32 ist damit nur durch die Induktion und Aktivierung der chlamydialen Protease CPAF (vermutlich durch CPAF-abhängige Spaltung von p65/ReIA) zu erklären.

3.3.3.3 NF-kB-Aktivität wird während chlamydialer Infektion inhibiert

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die ektopische Expression von CPAF zu einer weitgehenden Inhibition der NF-κB-Aktivität in T-REx-293-gyrB-CPAF-Luc Zellen führte, sollte in der Folge analysiert werden, ob auch eine Chlamydieninfektion diesen Effekt hat. Entsprechend könnte die CPAF-bedingte Hemmung der NF-κB-Signaltransduktion *in vivo* von Relevanz sein. Dazu wurden T-REx-293-gyrB-CPAF-Luc Zellen mit *C. trachomatis* infiziert und bestimmten zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion die NF-κB-Aktivität nach Stimulation mit IL-1β mittels Luziferase-Assays. Infektionsbedingte Veränderungen der Zellvitalität wurden gleichzeitig durch Analyse der metabolischen Aktivität überprüft.



Abb. 33: C. trachomatis Infektion inhibiert NF-κB-abhängige Genexpression.
(A) Mit einem Igκ-Luziferase Reporterkonstrukt transduzierte T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit C. trachomatis (MOI = 3) infiziert. Gleichzeitig zur Infektion erfolgte Stimulation der Zellen mit IL-1β (10 ng/ml). Die Zellen wurden lysiert und die Luziferase-Aktivität wurde bestimmt. Gezeigt ist die relative NF-κB-Induktion (unstimulierte Zellen haben eine Induktion von 1).
(B) Zur Kontrolle der Zellvitalität wurden MTT-Experimente mit identischem Aufbau wie in (A) durchgeführt.

(B) Zur Kontrolle der Zellvitalität wurden MTT-Experimente mit identischem Aufbau wie in (A) durchgefuhrt. Die abgebildeten Daten repräsentieren die Mittelwerte/SEM dreier unabhängiger Experimente. "K" bezeichnet Kontrollansätze (Abbildung ist adaptiert von [175]).

Nach Infektion mit *C. trachomatis* wurde NF-kB-abhängige Genexpression an zwei Zeitpunkten - 6 h und 24 h nach Infektion - untersucht. Dies ermöglichte unter Einbezug der Kinetik der CPAF-Expression und Aktivierung während Infektion Rückschlüsse auf eine mögliche Beteiligung der Protease.

In der Frühphase einer chlamydialen Infektion konnte keine Beeinträchtigung NF-κBkontrollierter Genexpression beobachtet werden. Nach sechsstündiger Stimulation der Zellen mit IL-1β war die NF-κB-Aktivität sowohl in Gegenwart der Bakterien als auch im uninfizierten Zustand um ca. das 50-fache erhöht (siehe Abb. 33 A). Dieses Verhältnis änderte sich im Verlauf der Infektion. Nach 24 h war eine ca. 50 % Chlamydien-abhängige Reduktion der NF-κB-Aktivität zu verzeichnen (siehe Abb. 33 A). Die Inhibition von NF-κB-Signalen wäre somit auch in diesem experimentellen Aufbau durch CPAF-Aktivität erklärbar, da die Protease erst im mittleren Abschnitt des chlamydialen Entwicklungszyklus (ca. nach 16 h) exprimiert wird. Nur im Falle der 24-stündigen Infektion konnte daher aktives CPAF vorhanden sein. Die Überprüfung der Zellvitalität ergab, dass die Infektion zu einer Reduktion der Zellvitalität bzw. einem Absterben von Zellen führte. So konnte eine Abnahme der metabolischen Aktivität um ca. 20 – 30 % nach 24 h beobachtet werden (siehe Abb. 33 B). Dies ist aber keine ausreichende Erklärung der deutlich stärkeren Inhibition NF-κB-kontrollierter Genexpression (siehe Abb. 33 A).

3.3.3.4 CPAF-generierte p65/ReIA-Spaltprodukte verbleiben im Zytosol

Eine Voraussetzung für NF-kB-Aktivität ist die Translokation des NF-kB-Heterodimers in den Zellkern. Durch Bindung an Erkennungssequenzen in Promotoren über seine Transaktivierungsdomäne nimmt der Transkriptionsfaktor dann, in Abhängigkeit von Kofaktoren, Einfluss auf die Genexpression. In bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass CPAF-Aktivität zur Spaltung von p65/RelA und Inhibition von NF-kB-Aktivität führt. Vergleichbare Beobachtungen wurden dabei sowohl nach ektopischer Expression der Serinprotease, als auch nach chlamydialer Infektion gemacht. Ob der Grund für die CPAF-NF-kB-abhängiger Genexpression bedingte Hemmung möglicherweise auf eine Beeinträchtigung der Translokation von p65/RelA zurückzuführen ist, wurde diese nach Stimulation mit IL-1ß und CPAF-Induktion in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen überprüft. Dazu wurden nukleäre und zytosolische Lysate generiert und die Verteilung von p65/RelA überprüft.



Abb. 34: CPAF-generierte p65/ReIA-Spaltprodukte verbleiben im Zytosol.

CPAF wurde in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen durch Zugabe von AHT/CM für 8 h induziert und aktiviert. Der NF-κB-Signalweg wurde für die angegebenen Zeiten durch den Zusatz von IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. Der Nachweis zellulärer Proteine erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western Blot Analyse. "Z" bezeichnet zytosolische Lysate. "N" bezeichnet Kernlysate. "F" bezeichnet spezifische, durch CPAF generierte Proteinfragmente. "*" bezeichnet unspezifische Banden eines Western Blots (Abbildung ist adaptiert von [175]).

Stimulation von T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen mit IL-1β zog eine Translokation des NF-κB-Heterodimers in den Nukleus nach sich. Dies ist der Bandenintensität in Abb. 34 zu entnehmen. Zwar war festzustellen, dass trotz Stimulation der Zellen und Induktion von CPAF ungespaltenes p65/RelA sowohl im Zytosol als auch im Nukleus nachzuweisen war, ab einer Stimulationsdauer von 20 min war aber eine Erhöhung der p65/RelA-Menge im Nukleus zu beobachten (siehe Abb. 34, N-markierte Spuren). Dies korrelierte mit den Daten der NF-kB-Aktivitätsbestimmungen. Trotz CPAF-Induktion und p65/RelA-Spaltung konnte in allen genannten Experimenten eine noch vorhandene schwach ausgeprägte Induktion NFκB-kontrollierter Genexpression beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.3.3.2). Analysierte man die Detektion des CPAF-generierten p65/RelA-Spaltprodukts, so war festzustellen, dass diese Fragmente keiner Translokation in den Nukleus unterlagen. Entsprechend wurden Banden der Spaltprodukte nur im Zytosol nachgewiesen (siehe Abb. 34, Z-markierte Spuren). Da der verwendete Antikörper (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) im Bereich des C-Terminus von p65/RelA bindet, in welchem die Transaktivierungsdomäne des Proteins lokalisiert ist, würde dies eine CPAF-bedingte Inhibition des NF-kB-Signalwegs erklären. Die Trennung zytosolischer und nukleärer Komponenten wurde durch den Nachweis von Markerproteinen überprüft. HDAC-1 diente dabei als Marker für Kernproteine, GAPDH und Caspase-8 als zytosolische Marker.

3.3.3.5 CPAF verringert die Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8

NF-κB-Aktivität führt in Abhängigkeit der im Zellkern vorliegenden Kofaktoren und im Zusammenspiel mit anderen Signalwegen, zur Expression verschiedener Gene. Auf diese Weise kann der NF-κB-Signalweg Zellproliferation, Apoptose oder Immunantwort beeinflussen. Infektionen von Epithelzellen durch Pathogene haben häufig eine NF-κB-abhängige Regulation der Expression inflammatorischer Zytokine zur Folge. Eines dieser Zytokine ist IL-8, dessen Aktivität mit der chemotaktischen Rekrutierung von Leukozyten verbunden wird (168, Baggiolini 1992).

Über die Analyse der Sekretion von IL-8 nach inflammatorischer Stimulation bzw. Stimulation von T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen und gleichzeitiger CPAF-Induktion, sollte getestet werden, ob CPAF-abhängige p65/ReIA-Spaltung in Wirtszellen das Potential zur Unterdrückung einer NF-κB-vermittelten Reaktion auf Entzündungsmediatoren besitzt.



Abb. 35: CPAF hemmt die Sekretion des inflammatorischen Zytokins IL-8.

CPAF wurde in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen durch Zugabe von AHT/CM für 8 h induziert und aktiviert. Der NF-κB-Signalweg wurde durch den Zusatz von IL-1β (10 ng/ml) ebenfalls für 8 h stimuliert. Sezerniertes IL-8 wurde mittels BD OptEI[™] Human IL-8 ELISA Set detektiert. Gezeigt ist die Menge an sezerniertem IL-8 in pg/ml. Die abgebildeten Daten repräsentieren die Mittelwerte/SEM dreier unabhängiger Experimente. "nd" nicht detektierbar (Abbildung ist adaptiert von [175]).

Ohne Stimulation mit IL-1β konnte in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen keine Sekretion von IL-8 detektiert werden (siehe Abb. 35). Auch die Induktion von CPAF hatte keine Freisetzung von IL-8 zur Folge. Die Zugabe von IL-1β und die ausgelöste Signaltransduktion hatte eine Produktion und Sekretion des Zytokins zur Folge (siehe Abb. 35). Die zusätzliche Induktion und Aktivierung von CPAF resultierte in einer Reduktion der sezernierten IL-8-Menge von zuvor ca. 110 pg/ml auf ca. 60 pg/ml (siehe Abb. 35). Da die Sekretion von IL-8 eine ausgeprägte Abhängigkeit von NF-κB-Signalen bzw. NF-κB-abhängiger Signaltransduktion zeigt, stellt eine CPAF-bedingte Spaltung von p65/RelA und die damit verbundene verringerte NF-κB-Aktivität eine wahrscheinliche Erklärung dar. Dies würde die Befähigung von CPAF mit NF-κB-Signalen zu interferieren, unterstreichen.

4.1 CPAF-abhängige Substratspaltung: Relevanz für die Chlamydieninfektion

Durch mehrere Studien konnte in der Vergangenheit die Spaltung verschiedener, strukturell und funktional unterschiedlicher Proteine während chlamydialer Infektionen mit der Aktivität des chlamydialen Effektors CPAF korreliert werden. Aufgrund der fehlenden Möglichkeiten zur genetischen Veränderung von Mitgliedern der Ordnung Chlamydiales, können oft nur durch ektopische Expressionen chlamydialer Proteine in Modellsystemen und den Abgleich dieser Ergebnisse mit Infektionsexperimenten neue Erkenntnisse gewonnen werden. Bisher wurde so unter anderem die Unterdrückung apoptotischer Prozesse, sowie Veränderungen des Zytoskeletts auf CPAF zurückgeführt. Trotz der Menge an Information in Bezug auf die Substratspaltung, die Aufklärung der Struktur der Protease und den Aktivierungsmechanismus von CPAF konnte der Mechanismus der Substraterkennung noch nicht definiert werden. Auch sind weder bei der Erkennung noch der Spaltung von Substraten beteiligte Sequenz- oder Strukturmotive bekannt. Die Generierung der CPAF-exprimierenden Zelllinie T-REx-293-gyrB-CPAF ermöglichte uns neben der Analyse der CPAF-Aktivierung und der Spaltung bekannter Substrate auch die Identifikation weiterer, bisher unbekannter CPAF-abhängiger Fragmentierungsprozesse. Daher wurden diese Zellen nach Expression und Aktivierung von CPAF einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen (in Kooperation mit Prof. Dr. Haller, WZW Weihenstephan, Freising, München), wodurch mehrere putative Substrate ermittelt wurden.

Zur Verifizierung der Kandidaten wurde deren Fragmentierung zusätzlich sowohl nach CPAF-Expression in T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen, als auch nach Infektion muriner wie humaner Zellen mit *C. trachomatis,* überprüft. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass in humanen Zellen Mst-4, eEF-2, Septin-2 und Alix gespalten werden. Aus der Spaltung dieser Proteine könnten neue Funktionen von CPAF für chlamydiale Infektionen abzuleiten sein.

Bei Mst-4 handelt es sich um eine bisher nur wenig beschriebene Kinase aus der Familie der Ste-20-artigen Kinasen. Diverse Studien weisen auf mögliche Funktionen von Mst-4 in Apoptose und Zellteilung hin, wobei diese über die Aktivierung des MEK/ERK-Signalwegs vermittelt werden könnte [178, 179].

Bezüglich der Aktivierung der Kinase bestehen widersprüchliche Ansichten. Gesichert scheint, dass eine Phosphorylierung des Proteins (evtl. auch Autophosphorylierung, vermutlich im Bereich des C-Terminus) die Voraussetzung für die Aktivierung ist. Unklar ist, ob anschließend die regulatorische Domäne zur Erhaltung der Aktivität noch benötigt wird.

So konnte die Mst-4-Aktivität durch nachträgliche Spaltung im regulatorischen C-Terminus gesteigert werden [178, 180].

Dies lässt die Spekulation zu, dass CPAF-abhängige Spaltung nicht zwingend einen Verlust der Mst-4-Funktion, sondern auch eine gesteigerte Aktivität der Kinase auslösen könnte. Letzteres wäre eine mögliche Erklärung für beobachtete Modulationen zellulärer Signalwege. Nach chlamydialen Infektionen wurde in verschiedenen Phasen der Infektion eine Aktivierung der MEK/ERK-Signalkaskade beobachtet. Direkt nach Invasion scheint der Signalweg unabhängig von der chlamydialen Proteinbiosynthese transient aktiviert zu werden. Zu späteren Zeitpunkten, 12-15 h nach Infektion, kann in Zellkultur-basierten Experimenten eine erneute ERK-Aktivierung detektiert werden. Diese bleibt bis zum Abschluss des chlamydialen Entwicklungszyklus erhalten. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aufrechterhaltung im Gegensatz zur transienten ERK-Aktivierung von der chlamydialen Proteinbiosynthese und damit wahrscheinlich von einem chlamydialen Faktor, abhängig ist [137, 181]. Eine CPAF-vermittelte Spaltung von Mst-4, welche eine gesteigerte oder dauerhafte Aktivierung der Kinase auslöst, könnte die konstitutive ERK-Aktivierung während chlamydialen Infektionen (*in vitro*) erklären.

Eine mögliche Mst-4-Inaktivierung nach CPAF-abhängiger Spaltung könnte mit einer Schwächung der Zell-Zell-Verbindungen einhergehen. In einer neuen Studie wurde sowohl in endothelialen, als auch epithelialen Zellen eine Beteiligung von Mst-4 in den entsprechenden Regulationsvorgängen diskutiert [182]. Als Konsequenz der Mst-4-Aktivität präsentierten Zheng *et. al.* eine negative Rho A-Regulation. Rho A-Aktivität scheint für verschiedene postulierte Zytoskelettveränderungen während einer chlamydialen Infektion von Bedeutung zu sein [38, 127, 170]. Über Inaktivierung von Mst-4 könnte so die Funktionalität Rho A-abhängiger Prozesse sichergestellt werden. Dies könnte, ähnlich wie für die CPAF-abhängige Spaltung von Nectin-1 diskutiert, die Ausbreitung einer chlamydialen Infektion erleichtern [170].

Weiterhin sollte erwähnt werden, dass Daten eine präferierte Aktivierung von Mst-4 durch Anbindung an den Golgi-Apparat über GM-130 anzeigen [183]. Möglicherweise wird diese zusätzlich durch die Fragmentierung des Golgi-Apparats nach Infektion gestört. So ist es möglich, dass CPAF-abhängige Spaltung von Mst-4 über eine nachfolgende Anpassung zellulärer Signalwege für chlamydiale Infektionen von Bedeutung ist. Die Überprüfung des Mst-4-Aktivitätszustands nach Spaltung durch CPAF könnte zu einer Klärung der aufgeführten Theorien beitragen.

Als weiteres Substrat konnte eEF-2 identifiziert werden, welches für die Translokation einer naszierenden Aminosäurekette innerhalb des Ribosoms benötigt wird. Eine Spaltung des Proteins könnte damit zu einer verringerten, translationalen Aktivität der Wirtszelle führen. Allerdings erscheint bei der Dauer des chlamydialen Entwicklungszyklus eine weitgehende

Unterdrückung der Translation unwahrscheinlich. Dies würde zu einem erhöhten Risiko eines vorzeitigen Zelltods führen. Auch spricht die - nach unseren Daten - relativ geringe Effektivität der Spaltung und die Menge an ungespaltenem eEF-2 nach chlamydialer Infektion gegen eine weitgehende Blockierung der Translation. Es wäre allerdings denkbar, dass selbst geringe Effekte bzw. eine schwach-ausgeprägte Verlangsamung der Translation für die Akquisition von Nährstoffen durch Chlamydien von Vorteil sein könnten. Radioaktive Markierung von Aminosäuren könnte zur Überprüfung der Translation eingesetzt werden. Auf diese Weise könnte bestimmt werden, ob diese durch CPAF-Expression bzw. chlamydiale Infektion beeinträchtigt wird.

Die Spaltung von Alix nach CPAF-Expression könnte verschiedene Konsequenzen haben. So ist das Protein Teil des *"endosomal sorting complex required for transport"* (ESCRT)-Komplexes [184], welcher für den Transport bestimmter ubiquitinierter Proteine zu multivesikulären Körperchen (MVB) benötigt wird. Spaltung von Alix könnte eine Änderung oder ein Ausbleiben dieser Transportprozesse nach sich ziehen. Letzteres könnte mit der Beobachtung proliferativer Phänotypen nach Infektion von *C. pneumoniae* [185, 186] in Beziehung stehen, da unter anderem Rezeptoren wie EGFR, unter Einbezug des beschriebenen Transportwegs, entsorgt werden. Allerdings wurde bisher kein Nachweis des Spaltungsvorgangs nach *C. pneumoniae* Infektion geführt.

Weiterhin legen Überexpressionsexperimente von Alix eine mögliche Beteiligung des Proteins in der Kontrolle des Zellzyklus nahe. So beschreiben Wu *et. al.* einen Alix-vermittelten Verbleib von Zellen in der G1-Phase [187].

Zudem wäre ein Einfluss auf TNF-α-vermittelte Apoptose möglich, da bestehende Daten darlegen, dass Alix für die Signalweiterleitung an JNK nach Stimulation mit TNF-α notwendig ist [188]. Nachdem eine andere Studie bereits nach chlamydialen Infektionen eine Verringerung der TNF-Rezeptorpräsentation an der Zelloberfläche anzeigte [132], wäre die Spaltung von Alix möglicherweise ein zweiter Mechanismus zum Schutz der Wirtszellen vor TNF-α induzierter Apoptose.

Auch Septin-2 bzw. dessen Spaltung wurde in bisherigen Arbeiten nicht mit chlamydialen Infektionen in Verbindung gebracht. In einer Zelle scheint das Protein mit anderen Septinen zusammen Filamente auszubilden, welche möglicherweise Teil des Zytoskeletts sind. Zumindest wurde eine Assoziation sowohl mit Mikrotubuli und Mikrofilamenten beschrieben [189]. Die Arbeitsgruppe von Raphael Valdivia beobachtete während des chlamydialen Entwicklungszyklus eine Rekrutierung von Aktinfilamenten zur chlamydialen Vakuole, welche zusammen mit Intermediärfilamentproteinen eine Art Hülle bildeten. Möglicherweise könnte die Spaltung von Septin-2 eine unerwünschte Assoziation mit anderen Mikro- oder Intermediärfilamenten aufheben und eine bessere Zugänglichkeit dieser Filamentgruppen ermöglichen. Zumindest konnte gezeigt werden, dass CPAF in diesem Zusammenhang die

Intermediärfilamentproteine Vimentin und Zytokeratin-8 spaltet und auf diese Weise deren Rekrutierung zum chlamydialen Einschluss ermöglichen könnte [86, 127].

Allerdings sind auch andere Konsequenzen einer Septin-2-Spaltung denkbar. Manche Daten weisen zum Beispiel daraufhin, dass der Verlust von Septin-2 zu einer Aufhebung der Zellpolarität führen kann [190].

Andere zeigen, dass eine Kolokalisation von Septin-2 mit Tubulin für Vesikeltransportvorgänge von Bedeutung ist [191]. So könnte Septinspaltung zu einer Veränderung des Vesikeltransports führen, welcher während chlamydialen Infektionen über verschiedene Mechanismen moduliert wird [88].

Ferner weisen Daten eine mögliche Beteiligung von Septin-2 am Fortschreiten der Zytokinese und eine Bedeutung für die Integrität des Genoms aus. Defekte in beiden Bereichen wurden während chlamydialer Infektion bereits nachgewiesen [192].

Alle angesprochenen, möglichen Konsequenzen der CPAF-abhängigen Spaltung dieser neuen Substratproteine sind bisher spekulativ. Auch ist bisher ungeklärt ob CPAF alleine die Fragmentierung bzw. den Abbau der Proteine vermittelt. So ist eine Beteiligung anderer Proteasen bzw. des Proteasoms in den präsentierten Substratspaltungsvorgängen denkbar. Daher sollte in zukünftigen Studien dieser Aspekt sowie die Folgen der Substratspaltungen für chlamydiale Infektionen überprüft werden.

Um weitere Hinweise im Hinblick auf die Relevanz der neuermittelten CPAF-abhängigen Spaltungsvorgänge während chlamydialen Infektionen zu erlangen, könnten in zukünftigen Experimenten verschiedene chlamydiale Spezies eingesetzt werden. Sollte die Spaltung speziesübergreifend nachweisbar sein, würde dies eine Bedeutung der Fragmentierungen für den chlamydialen Entwicklungszyklus nahe legen. Auch der Effekt eines *"knock-downs"* der neuen CPAF-Substrate könnte Aufschluss geben, ob und möglicherweise in welchem Ausmaß die Spaltungsvorgänge für das Fortschreiten von chlamydialen Infektionen erforderlich sind.

Die Ermittlung zusätzlicher Substrate kann auch zum weiteren Verständnis der Funktionsweise der Protease CPAF beitragen. Im Besonderen erscheint die Generierung neuer Daten zur Bestimmung von Substraterkennungs- und Spaltungsmotiven möglich. Eine Identifizierung der Spaltstellen durch massenspektroskopische Analyse könnte dabei weitere Hinweise geben. Für diese Zielsetzung von Interesse könnte auch die Feststellung sein, dass nach Infektion mit *C. trachomatis* lediglich Septin-2 und Alix in murinen Zellen mit vergleichbarer Effizienz wie in humanen Zellen gespalten werden. Fragmentierung oder Abbau von Mst-4 und eEF-2 waren quasi nicht zu beobachten. Falls dies mit Speziesspezifischen Unterschieden in Sequenz oder Struktur der Proteine korrelieren würde, könnten sich so eventuell neue Ansatzpunkte zur genaueren Charakterisierung des Substratbindungs- und Spaltungsvorgangs ergeben.

4.2 Neue Möglichkeiten zur Blockierung der Funktion des chlamydialen Effektorproteins CPAF

4.2.1 Möglichkeiten der Funktionsweise von WEHD-fmk und VEID-fmk

Wie bereits ausgeführt, sind wesentliche Probleme in der Erforschung chlamydialer Infektionen bzw. chlamydialer Proteine der Mangel an Methoden zur genetischen Veränderung der Bakterien, sowie der biphasische Entwicklungszyklus der Bakterien. Entsprechend ist auch die Charakterisierung der chlamydialen Protease CPAF schwierig. Da weiterhin keine geeigneten spezifischen Inhibitoren von CPAF vorhanden sind, war es bisher unmöglich die Funktionen der Protease während Infektionen genau zu definieren. Der einzig bekannte CPAF-Inhibitor ist Lactacystin [157]. Dieses bildet im aktiven Zentrum unter Bildung eines Omuralid eine kovalente Bindung zum katalytischen Serin aus [160].

Lactacystin wurde ursprünglich als Inhibitor des Proteasoms entwickelt. Darin begründet ist bei Verwendung der Substanz über längere Zeiträume eine ausgeprägte Zytotoxizität. Aus diesem Grund ist ein Einsatz während Infektionen nicht sinnvoll bzw. kann keine verlässlichen Daten liefern. Im Zuge unserer Arbeiten waren wir in der Lage, unter Einbezug aktueller Literatur und den uns zu Verfügung stehenden Techniken, zwei neue potentielle CPAF-Inhibitoren zu identifizieren. Bei diesen handelte es sich um Fluoromethylketon-(fmk)gekoppelte, ursprünglich als Caspase-Inhibitoren entwickelte Tetra-Peptide. Einsatz beider, WEHD-fmk und VEID-fmk, war ausreichend, um CPAF-Aktivität *in vitro* und in Zellkulturbasierten Experimenten zu unterdrücken.

Unsere Analyse ergab, dass die Zugabe der Peptid-Inhibitoren in verschiedenen Modellen, sowie bei Infektionen zur Unterdrückung bekannter, CPAF-abhängiger Substratspaltungen führte. An dieser Stelle anzumerken ist, dass zwischen WEHD-fmk und VEID-fmk Unterschiede in der Effektivität der Inhibition CPAF-abhängiger Substratspaltung bestehen. Diese war in unseren Zellkultur-basierten Experimenten bei VEID-fmk schwächer ausgeprägt. In *in vitro* Experimenten war aber kein Unterschied messbar. Die Ursache dieser Beobachtungen liegt möglicherweise in einer unterschiedlichen Zellgängigkeit der beiden Peptid-Inhibitoren begründet. Durch den Einsatz Fluoreszenz-markierter Inhibitoren oder die Variation des Zeitpunkts der Inhibitor-Zugabe könnte dies überprüft werden.

Bei Betrachtung der Blockierung CPAF-abhängiger Substratspaltungsereignisse war festzustellen, dass WEHD-fmk auch die Spaltung des pro-apoptotischen Proteins Bim unterdrückt. Im Falle der Spaltung der BH3-Proteine ist nicht abschließend geklärt, ob eine direkte oder indirekte Abhängigkeit von CPAF-Aktivität besteht. Da gezeigt wurde, dass auch Proteasominhibitoren, ohne inhibitorische Wirkung auf CPAF eine Hemmung dieser Vorgänge bewirken, scheint das Proteasom selbst beteiligt zu sein [87]. Die Blockierung der Spaltung von Bim durch WEHD-fmk zeigt wiederum, dass das Proteasom nicht alleine zur Spaltung ausreicht.

Daneben konnte auch eine deutliche Blockierung bzw. Retardierung des chlamydialen Entwicklungszyklus durch beide Inhibitoren beobachtet werden. Allerdings erscheint es wahrscheinlicher, dass die Beobachtungen aus Abb. 11 und Abb. 12 auf eine Verlangsamung des Infektionszyklus, vermutlich aufgrund fehlender CPAF-Aktivität, zurückzuführen sind. Für diese Interpretation spricht eine geringe Anzahl an sichtbaren chlamydialen Vakuolen. Bei dieser Retardierung handelte es sich um einen Prozess, der durch Entfernen der Inhibitoren (beispielsweise über den Austausch des Mediums) umzukehren war. Diese Feststellung beinhaltet auch die Möglichkeit, dass durch WEHD-fmk bzw. VEID-fmk ein Persistenz- bzw. Persistenz-ähnliches Stadium ausgelöst werden könnte. Um dies zu testen, müssten weitere Langzeitexperimente durchgeführt werden. In bisherigen Versuchen wurden infizierte Zellen lediglich für 30 h in WEHD-fmk-beinhaltendem Medium kultiviert, um anschließend die Reversibilität des WEHD-fmk-Effekts zu überprüfen. Sollten sich dadurch weitere Hinweise, welche für eine Persistenz-Induktion sprechen, ergeben, könnten elektronenmikroskopische Aufnahmen einer genaueren Analyse dienen. Dadurch wäre man beispielsweise in der Lage festzustellen, ob WEHD-fmk-Zugabe zur Bildung ungewöhnlicher Retikularkörper ("aberrant bodies") führt.

Der Mechanismus, über den VEID- und WEHD-fmk CPAF inhibiert ist bisher nicht bekannt. Zunächst wäre denkbar, obwohl frühere Ergebnisse es unwahrscheinlich erscheinen lassen, dass Caspasen an der Aktivierung von oder der Substratspaltung durch CPAF beteiligt sind. Da die Verwendung eines pan-Caspase-Inhibitors allerdings keinerlei Inhibition der zuvor genannten Vorgänge nach sich zog, kann dies nahezu ausgeschlossen werden. Auch der Aufbau der *in vitro* Experimente, in welchen gereinigtes, rekombinantes CPAF mit WEHDfmk vorinkubiert wurde, spricht gegen eine Beteiligung zellulärer Proteine an Substratspaltungsvorgängen bzw. CPAF-Inhibition. Endgültige Gewissheit könnte *in puncto* Caspasen die Verwendung entsprechender "*knock out"-*Zelllinien erbringen.

Ferner ist es unwahrscheinlich, dass der Fluoromethylketon(fmk)-Teil der verwendeten Inhibitoren alleine für die Inhibition von CPAF verantwortlich ist. So waren nur wenige Substanzen einer verwendeten Bibliothek von fmk-gekoppelten Caspase-Inhibitoren -WEHD-fmk, VEID-fmk und LEVD-fmk - in der Lage CPAF zu inhibieren. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass der Fluoromethylketon-Teil zwar möglicherweise von Bedeutung für die inhibitorische Funktion der Peptid-Inhibitoren ist, allerdings nicht zu einer unspezifischen Bindung und Inhibition an CPAF führt. Unsere Daten weisen zudem auf eine Abhängigkeit der inhibitorischen Effizienz vom Peptidteil hin. Trotz der Anzahl der getesteten Peptid-Inhibitoren konnten bisher keine Voraussetzung für ein CPAF-inhibitorisch wirkendes

Peptid ermittelt werden. Ein genaueres Screening unter Verwendung weiterer, maßgeschneiderter Peptid-Inhibitoren könnte hier neue Einblicke verschaffen.

Naheliegen würde eine Bindung der Peptid-Inhibitoren im aktiven Zentrum oder an Bereiche, welche an der Dimerisierung bzw. der Aktivierung der Protease beteiligten sind. Erste Experimente zeigen aber weder den Verlust einer Dimerisierung noch einer Prozessierung von CPAF an. So waren WEHD-fmk und VEID-fmk in der Lage, CPAF-vermittelte Substratspaltung nach Beigabe zu bereits aktivem CPAF zu unterdrücken. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Peptid-Inhibitoren die Aktivität der chlamydialen Protease, vergleichbar zu Lactacystin, durch Bindung im aktiven Zentrum unterdrücken. Auch die Blockierung der Substratbindung oder Erkennung könnte unsere Ergebnisse erklären. Der Ort der Bindung der neuen Inhibitoren könnte durch Co-Kristallisation mit CPAF genau bestimmt werden. Sollte sich daraus eine Bindung außerhalb des aktiven Zentrums ergeben, könnte dies neue Erkenntnisse über die Interaktion mit bzw. der Erkennung von Substraten erbringen.

Zellkultur-basierte Experimente zeigen allerdings an, dass die Zugabe von WEHD-fmk während der Infektion auch zu einer verringerten Menge an CPAF-Protein selbst führt. Bisherige Daten sprechen allerdings gegen eine Blockierung von Transkription oder Translation. So sind keine Unterschiede in den Proteinmengen von CPAF-Substraten und zur Kontrolle der überprüften Proteine nachweisbar. Zudem würde man bei so tiefgreifenden Eingriffen in die Funktion der Zellen eine ausgeprägte Zytotoxizität der Substanzen erwarten. Dies konnte selbst bei Inkubationen mit WEHD-fmk von mehr als 24 h nicht beobachtet werden. Ob die Inhibitoren tatsächlich in einen der beiden Vorgänge eingreifen, könnte beispielsweise durch den Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren oder die Überprüfung von mRNA-Mengen über *"real-time"*(RT) PCR geklärt werden.

Es ist auch denkbar, dass WEHD-fmk lediglich eine Bindung des zum Nachweis verwendeten Antikörpers verhindert. Des Weiteren müsste überprüft werden, ob der Einsatz der Peptid-Inhibitoren einen Einfluss auf den proteasomalen Abbau des Proteins hat. Alle Faktoren könnten als Erklärung für unsere Beobachtungen dienen.

4.2.2 Konsequenzen der Identifikation neuer CPAF-Inhibitoren

Mit der Identifizierung zweier neuer, nicht- oder schwach-zytotoxischer Inhibitoren der chlamydialen Protease CPAF steht nach unserer Auffassung ein neues Werkzeug zur Analyse der Funktion und Bedeutung von CPAF während des chlamydialen Entwicklungszyklus, zur Verfügung. Wie bereits erwähnt, konnte bisher kein System zur genetischen Manipulation von Chlamydien eingeführt werden. Daher wird zur Charakterisierung chlamydialer Proteine oft auf ektopische Expression zurückgegriffen. Deshalb kann die genaue Funktion eines Proteins bzw. dessen Bedeutung während

chlamydialen Infektionen meist nicht erfasst werden. Durch die Verwendung von WEHD-fmk bzw. VEID-fmk kann nun CPAF auch nach einer chlamydialen Infektion inhibiert werden, ohne das die Wirtszelle geschädigt wird. Auf diese Weise konnten wir zeigen, dass die Expression von CPAF essentiell für das Fortschreiten chlamydialer Infektionen ist. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Dagmar Heuer waren wir auch in der Lage, Hinweise auf die möglicherweise primäre Funktion CPAFs zu erlangen. So konnten Heuer et. al. in einer früheren Studie zeigen, dass während chlamydialer Infektionen der Golgi-Apparat der Wirtszellen in kleine Fragmente zerfällt, welche auch innerhalb der Vakuole nachzuweisen waren. Einher ging dieser Vorgang mit einem verstärkten Transport von bzw. Lipidbestandteilen, beispielsweise Ceramid, zum Einschluss Lipiden. [94]. Zurückzuführen war der Fragmentierungsvorgang auf die Spaltung des Golgimatrixproteins Golgin-84, welche durch die Zugabe von WEHD-fmk blockiert werden konnte. Die Bedeutung der Golgin-84-Spaltung konnte dabei auch anhand von Golgin-84-"knock-down"-Experimenten gezeigt werden. Ein Fehlen des Proteins führte entsprechend der Spaltung zu einer Anpassung der Morphologie des Golgi-Apparats und zu einer gesteigerten Replikation der Bakterien. Ein Einsatz von WEHD-fmk konnte in diesen Zellen die bakterielle Vermehrung nicht mehr im selben Ausmaß beeinflussen [94]. In Zusammenarbeit mit Dr. Heuer konnte erarbeitet werden, dass CPAF die Spaltung von Golgin-84 vermittelt und CPAF-Expression ausreichend ist, eine Fragmentierung des Golgi-Apparates zu bewirken.

Dies könnte eine erleichterte Aufnahme von Nährstoffen und Lipiden ermöglichen. Daher erscheint es möglich, dass CPAF-Inhibition zu einer Unterversorgung der Bakterien mit Nährstoffen führt, wodurch der chlamydiale Entwicklungszyklus negativ beeinflusst bzw. verlangsamt wird. Gerade eine Unterversorgung an Lipiden während der bakteriellen Replikation könnte den beobachteten Einfluss der CPAF-Inhibition erklären. Wie unter Abschnitt 1.1 beschrieben, infizieren Mitglieder der Ordnung Chlamydiales eine Vielzahl unterschiedlicher eukaryotischer Wirte. Diese reichen von Wirbeltieren bis hin zu Amöben. Alle Chlamydien folgen dabei einem biphasischen, parasitären Entwicklungszyklus. Aufgrund der negativen Effekte einer CPAF-Inhibition auf den chlamydialen Entwicklungszyklus kann spekuliert werden, dass die Protease CPAF ein wesentlicher Faktor chlamydialer Infektionen ist. Auch wurde CPAF bisher in fast allen sequenzierten Mitgliedern der *Chlamydiales amoebophila* mit humanpathogenen Spezies *C. trachomatis* oder *C. pneumoniae* zeigte eine Sequenzähnlichkeit der Proteine von 63 % bei einer Sequenzidentität von mehr als 30 %.

In bisherigen Studien wurde die Substratspezifität von CPAF nur für die aus *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* stammenden Varianten beschrieben. Die korrespondierenden Proteasen Amöben-spezifischer Chlamydien wurden noch nicht näher charakterisiert. Dementsprechend sind keine Ziele dieser CPAF Varianten bekannt.

Bei Betrachtung der Substrate der humanpathogenen Chlamydienspezies erscheint die Fragmentierung des Golgi-Apperats als wahrscheinlichster Kandidat für eine in allen Chlamydien konservierte Funktion von CPAF. Diese ist, wie bereits erwähnt, mit einer Akquisition von Lipiden, welche für die chlamydiale Replikation und die Vergrößerung der Vakuole notwendig sind, verbunden. Neben dem Eingriff in die Morphologie des Golgi-Apparats wurden CPAF Beteiligungen bei der Umgehung von Abwehrmechanismen der Wirte und des Immunsystems, sowie bei der Inhibition der Apoptose ihrer Wirtszellen, zugeschrieben. Diese Modulationen könnten nach Infektion von Säugern von wesentlicher Bedeutung sein und dem Abschluss des chlamydialen Entwicklungszyklus dienen. Nach Infektion von Amöben, beispielsweise durch Parachlamydia amoebophila, kann dies ausgeschlossen werden. Weder besitzen Amöben ein adaptives Immunsystem, welches durch die Spaltung von Transkriptionsfaktoren und eine verringerte Expression von MHC-Proteinen beeinflusst werden könnte, noch besitzen sie einen mitochondrialen, intrinsischen Signalweg der Apoptose bzw. BH3-Proteine. Daher kann CPAF in diesen Zellen nur durch andere Aufgaben von Nutzen sein. Vermutlich entstanden letztgenannte Funktionen der chlamydialen Protease CPAF erst im Zuge einer chlamydialen Evolution bzw. einer Anpassung der Bakterien an neue Wirte.

Im Gegensatz zur CPAF-vermittelten Modulation der Immunantwort und der Apoptose könnte die Versorgung mit Nährstoffen und der Eingriff in den Vesikeltransport über die Fragmentierung des Golgi-Apparats in allen bekannten Wirten von Bedeutung sein. Dabei sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass auch die CPAF-vermittelte Adaption des Zytoskeletts eine zentrale, konservierte Funktion von CPAF sein könnte. Zwar ist noch nicht geklärt inwiefern die Spaltung der Intermediärfilamentproteine Vimentin und Zytokeratin-8 einen Beitrag zum Fortschreiten des chlamydialen Entwicklungszyklus liefert. Denkbar ist aber, dass die Vorgänge für die Stabilität bzw. den Schutz vor mechanischem Stress und die Vergrößerung der Vakuole von Bedeutung sein könnten [86, 87, 92].

Als Indiz für die mögliche Relevanz der Spaltung von Zytoskelettbestandteilen kann auch die Anzahl der damit verbundenen Substrate der Protease CPAF gewertet werden. So wird neben den erwähnten Intermediärfilamentproteinen auch das mit Mikrofilamenten verbundene Transmembranprotein Nectin-1 gespalten [170]. Daraus könnte eine Deregulation des Aktinzytoskeletts resultieren. Dies wiederum hängt möglicherweise mit der Bildung Hülle aus Mikrofilamenten und Bestandteilen postulierten einer der Intermediärfilamente welche zusammen, als weiterer Schutzmechanismus vor mechanischem Stress agieren könnte [127]. Auch die Spaltung des putativen CPAF-Substarts Septin-2 könnte die Chlamydien-abhängige Manipulation des Zytoskeletts beeinträchtigen. Einschränkend ist allerdings zu erwähnen, dass zwischen den Vakuolen der verschiedenen chlamydialen Spezies große Unterschiede zu beobachten sind. Während

beispielsweise *C. trachomatis* infizierte Zellen lediglich eine einzelne Vakuole aufweisen ist bei einigen Amöben-infizierenden Bakterien jedes einzelne Bakterium von einem kleinen Einschluss umgeben. Daher könnte es sein, dass auch die Anpassung des Zytoskeletts erst im Zuge einer Evolution der Bakterien bzw. einer Anpassung an neue Wirte entstanden ist [7, 193].

Ein erster Schritt zur Überprüfung der hier getroffenen Hypothese - bei der Spaltung von Golgin-84 und der daraus resultierenden Fragmentierung des Golgi-Apperats handele es sich um die zentrale, konservierte Funktion der chlamydialen Protease CPAF - könnte die Kontrolle der bekannten CPAF-Substrate nach Infektion von Amöben mit Chlamydien-artigen Bakterien sein. Ebenso könnte die Etablierung eines ektopischen Expressionssystems von CPAF-Varianten aus Amöben-infizierenden chlamydialen Spezies zur Analyse dieser Proteine beitragen.

Sollte gezeigt werden, dass es Überschneidungen zwischen den CPAF-Substraten humanpathogener und Amöben-infizierender Chlamydien gibt, könnten in weiteren Experimenten bekannte CPAF-Inhibitoren zum Einsatz kommen. Sollten diese in der Lage sein auch CPAF-Varianten von sog. "Umwelt-Chlamydien" zu blockieren, könnte in der Folge getestet werden, ob die Hemmung von CPAF auch das Wachstum von Amöben-infizierenden Chlamydien beeinträchtigt.

Weiterhin könnte die Überprüfung der Morphologie des Golgi-Apperates in Infektionsmodellen von Amöben zeigen, ob ein zur Infektion mit human-pathogenen Chlamydien vergleichbarer Vorgang zu beobachten ist.

Aufgrund der Inhibition der chlamydialen Replikation und der geringen Zytotoxizität könnte WEHD-fmk möglicherweise auch als Ausgangspunkt neuer Therapieansätze zu gebrauchen sein. Da CPAF-spezifische Antikörper auch nach chronischen chlamydialen Infektionen nachgewiesen werden konnten, ist es nicht ausgeschlossen, dass spezifische CPAF-Inhibition zu einer erfolgreichen Behandlung der Bakterien beitragenden könnte [194]. Im Gegensatz zum Einsatz von Antibiotika, welcher zwar eine effektive Bekämpfung chlamydialer Infektionen ermöglicht, würde ein WEHD-fmk-basiertes Therapeutikum eine spezifischere Bekämpfung von Chlamydien ermöglichen, ohne dass andere, auch der kommensalen Flora angehörige, Mikroorganismen beeinträchtigt würden. Dies ließe auch auf geringe Nebenwirkungen hoffen. Aufgrund der Spezifität eines solchen Präparats wäre es zudem unmöglich, dass eine Entwicklung einer Resistenz durch Chlamydien einen Einfluss auf die Behandlung anderer Erreger nehmen könnte.

4.3 CPAF-abhängige Unterdrückung inflammatorischer Signaltransduktion

4.3.1 Einordung der CPAF-abhängigen Spatung von p65/ReIA

Chlamydiale Infektionen führen zur Anpassung einer Vielzahl zellulärer Funktionen und Signalwege. Neben der Apoptose, dem Vesikeltransport und dem Zytoskelett scheinen auch inflammatorische Signalkaskaden gezielt beeinträchtigt zu werden. Wodurch Chlamydien dazu in der Lage sind, wurde bisher nicht abschließend geklärt. Entscheidend dürften chlamydiale Effektorproteine sein. Zur Translokation dieser Proteine in das Zytosol wurden in Chlamydien bisher zwei Mechanismen identifiziert: zum einen ein Typ-2-, zum anderen ein Typ-3-Sekretionssystem. Eine entscheidende Rolle in der Modulation inflammatorischer Signaltransduktion wurde in der Vergangenheit vor allem einer chlamydialen Protease, CT 441, zugeschrieben [152, 153]. Im Zuge dieser Arbeit zeigen wir, dass entgegen bisheriger Ergebnisse CPAF ebenfalls von Bedeutung zu sein scheint. Durch den Einsatz einer CPAF-exprimierenden Zelllinie bzw. der ektopischen Expression eines aktivierbaren CPAF-gyrB-Fusionsproteins, konnte über eine Korrelation mit Infektionsexperimenten die CPAF-abhängige Spaltung von p65/ReIA gezeigt werden. Dieses Protein ist ein Bestandteil des NF-κB-Transkriptionsfaktors.

Wie erwähnt konnte schon in früheren Arbeiten beobachtet werden, dass Infektionen von Zellen epithelialer Abstammung (beispielsweise HeLa Zellen) mit *C. trachomatis* keine oder nur eine frühe transiente Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs bewirken [134, 152, 153]. Die bisher mit dieser Beobachtung verbundenen Erklärungen und Hypothesen postulierten eine Abhängigkeit von zwei chlamydialen Effektoren: zum einen der chlamydialen Deubiquitinase ChlaDUB-1, welche I- κ B- α als Substrat besitzen soll, zum anderen CT441, einem Homolog zur Tsp aus *E.coli* [151-153]. Arbeiten zu beiden genannten Effektorproteinen zeigten eine verringerte genregulatorische Aktivität des Transkriptionsfaktors in Abhängigkeit der chlamydialen Proteine an. Jedoch konnten alle bisherigen Studien die Beteiligung anderer chlamydialer oder zellulärer Proteine nicht ausschließen. Weiterhin konnte für beide Effektoren eine Sekretion ins Zytosol nicht nachgewiesen werden. Gerade im Hinblick auf CT441 gibt es Daten, welche für einen Verbleib des Proteins in der chlamydialen Vakuole sprechen [156]. Dieser Widerspruch innerhalb bisheriger Ergebnisse könnte mit der Identifikation von CPAF als möglichen, die Spaltung von p65/RelA vermittelnden, chlamydialen Effektor überbrückt werden.

Zwar wurde in diesem Zusammenhang schon früher die ektopische Expression von CPAF-Konstrukten getestet [152, 153]. Aufgrund unserer bisherigen Arbeiten vermuteten wir, dass die verwendeten Konstrukte zwar in einer Expression aber nicht der Aktivierung der

chlamydialen Protease CPAF resultierten. Daher konnten unserer Auffassung nach die publizierten Studien eine Beteiligung von CPAF bei der p65-Spaltung nicht ausschließen.

Die Überprüfung chlamydialer Infektionen ergab eine klare Korrelation zwischen CPAF-Expression und Aktivierung, CPAF-abhängiger Substratspaltung und p65/RelA-Fragmentierung. Für eine CPAF-abhängige Fragmentierung spricht auch die Translokation der Protease während des Entwicklungszyklus in das Zytosol der Wirtszelle [157]. Unter Verwendung der T-REx-293-gyrB-CPAF Zelllinie waren wir in der Lage CPAF induzierbar zu exprimieren und durch den Einsatz von Coumermycin zu aktivieren [87]. Wie schon in den Infektionsexperimenten ergab die durchgeführte Analyse der Zelllysate auf CPAF-Expression, CPAF-abhängige Substratspaltung und p65/RelA-Fragmentierung mittels Western Blot, eine sehr gute Korrelation. Da damit ektopische Expression von CPAF zur Spaltung des Mitglieds der NF-κB-Proteinfamilie führte ist die Korrelation der CPAF-Expression und p65-Fragmentierung während Infektionen als Indiz für eine generelle CPAF-Abhängigkeit des Prozesses anzusehen.

Als weitere Diskrepanz zu publizierten Daten ergab sich, dass wir in allen durchgeführten Experimenten p65/RelA-Spaltung in murinen, *C. trachomatis*-infizierten Zellen (MEF Zellen wurden verwendet) beobachten konnten. Identische Versuche nach Infektion mit *C. pneumoniae* oder ektopischer Expression von CPAF in Transfektionsexperimenten, ergaben vergleichbare Ergebnisse. Unabhängig vom experimentellen Aufbau konnte zum einen eine Übereinstimmung in der Art der Fragmentierung (gemessen an entstehenden Fragmenten), zum anderen eine Korrelation mit der CPAF-Expression und der CPAF-abhängigen Substratspaltung nachgewiesen werden.

Eine Erklärung für die Abweichung unserer Daten von publizierten Arbeiten könnte in den verwendeten Zelllinien begründet sein. So wurden in früheren Arbeiten durch "NIH3T3"-Transformation immortalisierte Zellen verwendet, während wir "SV40-*large T-antigen"* transformierte Zellen einsetzten [152, 153]. Obwohl rein spekulativ könnte hier eine Ursache für die verschiedenen Ergebnisse zu finden sein. An dieser Stelle ist allerdings anzumerken, dass die Spaltung von p65/RelA in murinen Zellen, im Vergleich zu humanen Zellen, schwächer ausgeprägt schien. Daher ist auch ein Einfluss von Sequenz- und Strukturunterschieden auf die Spaltungseffizienz von p65/RelA, wie in früheren Arbeiten beschrieben, denkbar. Die Verwendung weiterer muriner Zelllinien, welche idealerweise durch beide erwähnten Methoden immortalisiert wurden, könnten hier Aufschluss erbringen. Weiterhin wäre von Interesse, ob in früheren Studien beschriebene p65-Mutationen ebenfalls zu einer Inhibition der p65/RelA-Spaltung durch CPAF führen [152, 153].

Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass auch in unseren Experimenten CT441 nach ektopischer Expression grundsätzlich zur Spaltung von p65/ReIA befähigt war. Allerdings besteht nach unseren Daten wahrscheinlich ein Unterschied zwischen CPAF-abhängiger

und CT441-abhängiger Spaltung bzw. den generierten Spaltprodukten. Beide Fragmente, obwohl ähnlich, scheinen ein unterschiedliches Molekulargewicht aufzuweisen. Der Abgleich der Fragmente nach ektopischer Expression von CPAF bzw. CT441 mit p65/ReIA-Fragmenten nach Infektion mit *C. trachomatis* ergab zudem, dass CPAF-generierte Spaltprodukte von denen nach Infektion nicht zu unterscheiden waren. Eine endgültige Klärung, ob sich die Prozessierung von p65/ReIA durch die beiden chlamydialen Proteasen unterscheidet, könnte durch eine massenspektrometrische Analyse der Fragmente erbracht werden. Auch hier wäre ein Abgleich mit p65/ReIA-Fragmenten nach chlamydialer Infektion erforderlich. Weitere Hinweise könnten auch durch die bereits erwähnten p65/ReIA-Deletionsmutanten und deren Einfluss auf die CPAF-abhängige Spaltung des Proteins, gewonnen werden [152, 153].

Trotz der präsentierten Daten, welche eine Abhängigkeit der p65/RelA-Spaltung durch CPAF zu präferieren scheinen, konnte die verantwortliche Protease nicht abschließend ermittelt werden. Zwar konnte durch den Einsatz des CPAF-Inhibitors Lactacystin nach ektopischer CPAF-Expression die Blockierung der p65/RelA-Fragmentierung erreicht werden, allerdings zeigen frühere Daten ebenfalls einen inhibitorischen Effekt von Lactacystin auf CT441 [152, 153]. Zu erklären sind die beiden Ergebnisse durch die Struktur-Homologien der beiden Proteasen. So ist das aktive Zentrum, welches Lactacystin durch kovalente Bindung an das katalytisch aktive Serin blockiert, in CT441 und CPAF konserviert. Allerdings konnte in *in vitro* Experimenten, unter Verwendung von gereinigtem, rekombinanten CPAF nachgewiesen werden, dass die Spaltung von p65/RelA auch durch den Einsatz des Peptid-Inhibitors WEHD-fmk zu blockieren ist. Sollte WEHD-fmk nicht in der Lage sein CT441-abhängige Spaltung von p65/RelA nach ektopischer Expression zu blockieren, könnte über entsprechende Infektionsexperimente die verantwortliche Protease ermittelt werden.

Auch könnten vergleichbare Experimente nach Expression bzw. Koexpression eines, auf dem inhibitorischen Segment von CPAF basierenden, Peptids durchgeführt werden. Dieses passt sich spezifisch in die CPAF-Bindetasche ein. Möglicherweise würden auch diese Versuche zur eindeutigen Identifikation der p65/ReIA-vermittelnden Protease beitragen. Sollten zusätzliche Experimente bestätigen, dass alleine CPAF für die Spaltung von p65/ReIA verantwortlich ist, bliebe die Frage nach der Funktion von CT441.

Aufgrund der Homologie zur *E.coli* Tsp, könnte spekuliert werden, dass auch eine funktionale Ähnlichkeit der beiden Proteasen bestehen könnte. CT441 könnte so am Abbau von Proteinen im bakteriellen Periplasma beteiligt sein, möglicherweise zur Entfernung fehlgefalteter Proteine [156, 163, 164]. Zu einer entsprechenden Annahme würden auch bisherige Daten, welche eine rein vakuolische Lokalisation der Protease anzeigen, passen [156]. Sollte sich herausstellen, dass beide Proteasen zur p65/ReIA-Spaltung während Infektion beitragen, würde dies eine Redundanz darstellen. Eine solche könnte als Indiz für

eine essentielle Rolle des Vorgangs für den chlamydialen Entwicklungszyklus verstanden werden. Eine Notwendigkeit für die mehrfache Anlegung der Spaltung von p65/RelA könnte sich aus der großen Anzahl an CPAF-Substraten oder deren Bindungsaffinität zu CPAF ableiten. Von CT441 sind bisher zumindest keine weiteren Substrate bekannt.

Die Kontrolle von entscheidenden Komponenten des NF-kB-Signalwegs wies in der Folge auf einen spezifischen Eingriff von CPAF auf Ebene von p65/RelA hin. So wurden während Infektion bzw. CPAF-Expression weder Bestandteile des IKK-Komplexes noch I-кB-a gespalten. Ferner konnte über die Stimulation mit IL-1^β, Phosphorylierung und proteasomale Degradierung von I-kB-a induziert werden. Dies ist ein notwendiger Schritt für die Translokation des NF-kB-Transkriptionsfaktors in den Zellkern. Obwohl keine Spaltung von I- $\kappa B - \alpha$ zu beobachten war, konnte in Anwesenheit von CPAF eine sowohl abgeschwächte als auch verzögerte Phosphorylierung des Proteins nachgewiesen werden. Um die Ursache dieser Veränderung zu ergründen, könnten in zukünftigen Experimenten zunächst Phosphorylierungsvorgänge oberhalb von I- κ B- α , nach CPAF-Expression überprüft werden. Allerdings erscheint es unwahrscheinlich, dass CPAF weitreichenden Einfluss auf zelluläre Phosphorylierung nimmt, da in unseren Experimenten die MAP-Kinase ERK-1/2 unabhängig CPAF phosphoryliert wird. Möglicherweise ist von die Modulation des Phosphorylierungszustands von I- κ B- α auch auf eine Veränderung der Stabilität oder der Konformation des I-κB-α-NF-κB-Komplexes nach p65/RelA-Spaltung zurückzuführen.

Mit dem Spaltungsvorgang von p65/RelA einher ging, sowohl nach Infektion von Zellen als auch nach ektopischer Expression von CPAF, eine umfassende Verringerung NF-KBabhängiger Transkription nach Stimulation der Zellen mit dem inflammatorischen Zytokin IL-1β. Bestimmt wurde die NF-kB-Aktivität in Luziferase-Reportergenexperimenten. Durch die Kontrolle der metabolischen Aktivität der Zellen, sowie die Verwendung einer nicht CPAFexprimierenden Luziferase-Reporterzelllinie konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Hemmung von NF-kB-Signalen nach unseren Daten nur durch die Aktivität von CPAF schlüssig zu erklären ist. Allerdings konnte sowohl in entsprechenden Experimenten in CPAF-exprimierenden T-REx-293-gyrB-CPAF Zellen als auch in infizierten T-REx-293 Zellen eine residuale, NF-κB-vermittelte, transkriptionelle Aktivität beobachtet werden. Da der Transkriptionsfaktor als Dimer, bestehend aus unterschiedlichen Kombinationen der fünf NFκB-Proteine, vorliegt, erscheint es möglich, dass residuale Aktivität des Signalwegs von p65/RelA-freien NF-kB-Dimeren ausgeht. Eine Überprüfung der Hypothese könnte beispielsweise durch gegen die übrigen Mitglieder der NF-KB-Proteinfamilie gerichtete "knock-down"-Experimente geführt werden. Weiterhin könnte die schnelle Neubildung von p65/ReIA dazu führen, dass trotz CPAF-abhängiger Spaltung teilweise noch intakte p65/RelA-beinhaltende Dimere vorhanden sind. Zu dieser Vermutung würde die Beobachtung passen, dass im Gegensatz zur Spaltung anderer CPAF-Substrate,

beispielsweise Vimentin, nach Infektion wie ektopischer Expression von CPAF grundsätzlich auch unprozessiertes p65/ReIA-Protein nachgewiesen werden konnte.

An dieser Stelle ist allerdings zu erwähnen, dass unsere Ergebnisse eine Beteiligung der zuvor angesprochenen chlamydialen Effektoren ChlaDUB-1 und CT441 an der Inhibition des NF-κB-Signalwegs nicht ausschließen.

Mit der Beobachtung verringerter NF-κB-abhängiger Transkription nach Zusatz von IL-1β ging einher, dass gespaltenes p65/ReIA nicht mehr in den Zellkern transloziert wurde. Ein direkter Zusammenhang zum Verlust der nachfolgenden Genregulation erscheint nach genauer Betrachtung des Spaltprodukts möglich. Unter Abgleich mit der Bindungsspezifität des verwendeten Antikörpers (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) ist davon auszugehen, dass mit Fragmentierung von p65/ReIA eine Abtrennung seiner Transaktivierungsdomäne erfolgt. Dies würde dazu führen, dass selbst in den Kern translozierte, CPAF-prozessierte NF-κB-Dimere keine oder nur eingeschränkte Möglichkeiten zur Modulation der Transkription hätten. Eine Spaltungs-abhängige Retention des Transkriptionsfaktors erscheint unwahrscheinlich, da alle Mitglieder der NF-κB-Proteinfamilie eine Kernimportsequenz aufweisen.

Die Konsequenz der beobachteten Spaltung und der Hemmung NF-κB-abhängiger Transkription wird durch eine Verringerung der Sekretion des pro-inflammatorisch agierenden Zytokins IL-8 nach IL-1β Stimulation und CPAF-Aktivierung gezeigt. Dies könnte *in vivo* eine verringerte Sensitivität infizierter Zellen gegenüber Entzündungsreaktionen zur Folge haben. Auch ist dieses Ergebnis im Einklang mit früheren Daten zu sehen, welche zwar IL-8-Sekretion nach Infektion anzeigen, allerdings in Abhängigkeit des MAPK-Signalwegs.

4.3.2 Konsequenzen einer Unterdrückung von NF-κB-Signalen während chlamydialer Infektion

Wie zuvor ausgeführt, ist die chlamydiale Protease CPAF nach unseren Daten in der Lage, über die Spaltung von p65/ReIA, in die NF-κB-Signalkaskade einzugreifen. CPAF kann auf diese Weise NF-κB-vermittelte Transkriptionsereignisse zumindest teilweise verhindern. Damit würden unsere Ergebnisse zu bisherigen Arbeiten passen, wonach lediglich im ersten Abschnitt einer Infektion eine transiente Aktivierung des Signalwegs festzustellen ist.

Über die Bedeutung dieses Vorgangs für chlamydiale Infektionen kann trotzdem nur spekuliert werden. Allerdings scheint die grundsätzliche Befähigung dreier chlamydialer Effektoren zum Eingriff in diesen Signalweg auf eine größere Rolle für den Verlauf chlamydialer Infektionen hinzuweisen. Nach unserem Verständnis könnte, wie anhand der verringerten Sekretion von IL-8 nach inflammatorischer Stimulation der Zellen gezeigt, die Blockierung von Entzündungssignalen von großer Bedeutung sein. Ohne eine Hemmung

des NF-kB-Signalwegs wäre eine deutlich gesteigerte Sekretion der Zytokine IL-6, IL-8 und IL-1α möglich. Dadurch wären mehrere, für die Replikation von Chlamydien potentiell negative Folgeerscheinungen denkbar. Zusätzliche Sekretion inflammatorischer Zytokine könnte beispielsweise in vivo eine stärkere Einwanderung von Lymphozyten und Makrophagen nach sich ziehen, einhergehend mit einer effizienteren Erkennung und Bekämpfung der Bakterien. Auch könnte eine stark gesteigerte Menge der genannten Zellen und deren Sekretion von Entzündungsmediatoren zu so gravierenden Gewebsschädigungen führen, dass sich Nachteile für die chlamydiale Replikation ergäben. So wäre es möglich, dass in diesem Umfeld häufiger infizierte Zellen absterben, ohne dass der chlamydiale Replikationszyklus beendet ist. Zumindest weisen bisherige Studien in vivo und in vitro die Sekretion inflammatorischer Zytokine, speziell IL-1a und IL-1B, durch Zellen des wesentliche Faktoren Chlamydien-abhängiger, Immunsystems als pathologischer Gewebsveränderungen aus [75, 78].

So könnte die Blockierung des NF-κB-Signalwegs die Limitierung einer gegen Chlamydien gerichteten Immunreaktion zur Folge haben und damit die Ausbreitung und Vermehrung der Bakterien erleichtern.

Die vermutete Redundanz in der Befähigung von Chlamydien zur Inhibition des NF-κB-Signalwegs könnte möglicherweise während des Persistenzstadiums von Bedeutung sein. Hier zeigen Daten bei einer persistenten Infektion mit *C. pneumoniae* eine fehlende Sekretion von CPAF in das Zytosol des Wirtes an [126]. Denkbar wäre, dass in dieser Situation beispielsweise chlamydiale Deubiquitinasen wesentlich für die Unterdrückung von NF-κB-Signaltransduktionsereignissen sind. Dies ist allerdings reine Spekulation.

Der geführte Nachweis der Inhibition von NF-κB-Signalen unterstützt weiterhin Daten, dass der Signalweg keinerlei Einfluss auf den Chlamydien-vermittelten Schutz vor Apoptose durch Hochregulation antiapoptotischer Proteine wie cIAP-2 oder Bcl-X_L hat [195]. Entsprechend führen Studien, welche eine Beteiligung von IAPs in der Inhibition von Apoptose nach chlamydialen Infektionen annehmen, eine Regulation dieser Proteine über den MAPK-Signalweg als entscheidend an [118]. Nach unseren früheren Ergebnissen sowie Studien anderer Arbeitsgruppen ist der Apoptoseschutz aber vor allem auf die Spaltung von pro-apoptotischen BH3-Proteinen zurückzuführen [113, 114].

Nach unserer Meinung weisen die präsentierten Ergebnisse auf eine Rolle von CPAF in der Umgehung der Wirtsabwehr hin. So sind mit unseren Daten mittlerweile drei mögliche CPAFabhängige Mechanismen beschrieben die diesem Ziel dienen könnten: eine negative Regulation der MHC-Expression durch Spaltung von RFX-5 und USF-1, eine Beeinträchtigung der Präsentation von Lipidantigenen durch Spaltung von CD1d und die Hemmung des NF-kB-Signalwegs durch p65/ReIA-Spaltung [128, 129, 131, 152, 153, 175]. Auch die Inhibition der Apoptose kann einen Beitrag zur Umgehung einer Detektion durch das Immunsystem leisten. Insgesamt unterstreicht die Identifikation von p65/ReIA als CPAF-Substrat und der mit der Spaltung verbundene Verlust NF-κB-abhängiger Genexpression die Bedeutung der chlamydialen Protease in der Umgehung einer Immunantwort und somit dem Überleben der Bakterien in ihrem Wirt.

Die Identifikation eines weiteren CPAF-Substrats, welches nach C. trachomatis Infektion möglicherweise die Immunantwort seines Wirts modulieren kann, ist als weiterer Ausdruck für die Anpassung der Chlamydiaceae an ihre Wirte im Zuge ihrer Evolution anzusehen. Wie bereits unter Abschnitt 1.4 eingeführt wurde, besitzt die chlamydiale Serinprotease CPAF sowohl in Sequenz als auch Funktion sehr unterschiedliche Substrate. Dies könnte wie unter Abschnitt 4.2.2 bereits kurz erwähnt in der Evolution chlamydialer Organismen begründet sein. Chlamydien wurden lange als eine Gruppierung eng miteinander verwandten Bakterien angesehen, welche sich vor ca. 2 Mrd. Jahren von den übrigen Eubacteria abspalteten [193]. Die Entdeckung Amöben-spezifischer Chlamydien wies eine komplexere Struktur der Ordnung Chlamydiales nach. Bisherige Studien gehen von einer Abtrennung der sog. "Umwelt-Chlamydien" vor ca. 700 Mio. Jahren aus [196-198]. Trotz einer stark ausgeprägten Reorganisation und Verkleinerung der Genome im Zuge chlamydialer Evolution konnte CPAF in fast allen bisher sequenzierten Genomen identifiziert werden auch in Chlamydien-artigen Bakterien. Daher erscheint es möglich, dass einige der für C. trachomatis- und C. pneuminiae-CPAF ermittelten Funktionen bereits in einem gemeinsamen Vorläuferorganismus bestanden und bereits dort von essentieller Bedeutung waren.

Eine der ursprünglichen Aufgaben der chlamydialen Protease könnte, wie bereits ausgeführt (siehe Abschnitt 4.2.2), eine Modulation des Lipidtransports umfasst haben. Zwar scheinen in Chlamydien-artigen Bakterien mehr, am Energiestoffwechsel beteiligte Gene angelegt zu sein, trotzdem ist nicht davon auszugehen, dass ein letzter gemeinsamer Vorfahre von Chlamydien und Chlamydien-artigen Bakterien komplett unabhängig vom Wirt überleben konnte [10, 199]. Auch scheinen einige in den *Chlamydiaceae* angelegte Mechanismen zur Akquisition von Nährstoffen, beispielsweise die Aufnahme von Lipidtröpfchen, in Chlamydien-artigen Bakterien zu fehlen [200, 201]. Dies könnte bedeuten dass diese Funktionen auch in einem gemeinsamen Vorläufer fehlten. Daher könnten in einem solchen Mikroorganismus andere Mechanismen zur Aufnahme von Lipiden von noch größerer Bedeutung gewesen sein – beispielsweise die Aufnahme von Lipiden durch die CPAF-abhängige Fragmentierung des Golgi-Apparats.

Die "Erschließung" neuer vertebrater Wirte durch chlamydiale Spezies stellte den Übertritt in ein zwar durchaus feindliches, aber in gewisser Weise stabileres Milieu dar. Dadurch wurde wahrscheinlich eine deutliche Verkleinerung der chlamydialen Genome ermöglicht, was einem Vergleich der Genome der *Chlamydiaceae* und der "Umwelt-Chlamydien" zu

entnehmen ist [193]. Allerdings musste gleichzeitig eine starke Anpassung an den Wirt erfolgen um eine Infektion weiterhin zu ermöglichen. Speziell auf deutlich komplexere Schutzmechanismen vertebrater Zellen (adaptives Immunsystem, Apoptose, etc.) mussten sich die Bakterien für eine effektive Infektion einstellen. Vermutlich ist auch die Akquisition zusätzlicher Funktionen bzw. Substrate durch die chlamydiale Protease CPAF auf diesen Umstand zurückzuführen. Vor diesem Hintergrund erscheint die Vielzahl an "zusätzlichen" CPAF-Substraten (RFX-5, USF-1, CD1d, p65/ReIA), welche potentiell eine Abschwächung einer Immunantwort auslösen bzw. eine Detektion der Chlamydien erschweren, erklärbar [60, 67, 175]. Vermutlich waren diese neuen Funktionen der Protease für ein Überleben in ihren neuen Wirten und einen Abschluss des chlamydialen Entwicklungszyklus unerlässlich.

5 Literaturverzeichnis

- 1. Organization, W.H., *The global burden of disease: 2004 update*, 2008: Geneva.
- 2. Halberstädter, L., Prowazek SV, Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim *Trachom.*, 1907, Aus dem kaiserlichen Gesundheitsamte: Berlin. p. 44-47.
- 3. Moulder, J., ed. *The Psittacosis Group as Bacteria*. 1964, Halberstädter 1907Wiley: New York.
- 4. Moulder, J.W., *The relation of the psittacosis group (Chlamydiae) to bacteria and viruses.* Annual review of microbiology, 1966. **20**: p. 107-30.
- 5. Anderson, D.R., et al., *Comparison of the ultrastructure of several rickettsiae, ornithosis virus, and Mycoplasma in tissue culture.* Journal of Bacteriology, 1965. **90**(5): p. 1387-404.
- 6. Bedson, S.P. and J.V. Gostling, *A study of the mode of multiplication of psittacosis virus.* British journal of experimental pathology, 1954. **35**(3): p. 299-308.
- 7. Abdelrahman, Y.M. and R.J. Belland, *The chlamydial developmental cycle*. FEMS microbiology reviews, 2005. **29**: p. 949-59.
- 8. Moulder, J.W., *Interaction of chlamydiae and host cells in vitro*. Microbiological reviews, 1991. **55**(1): p. 143-90.
- 9. Everett, K.D., R.M. Bush, and a.a. Andersen, *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.* International journal of systematic bacteriology, 1999. **49 Pt 2**: p. 415-40.
- 10. Horn, M., *Chlamydiae as symbionts in eukaryotes.* Annual review of microbiology, 2008. **62**: p. 113-31.
- 11. Horn, M. and M. Wagner, *Evidence for additional genus-level diversity of Chlamydiales in the environment.* FEMS microbiology letters, 2001. **204**(1): p. 71-4.
- 12. Greub, G., International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of the Chlamydiae: minutes of the inaugural closed meeting, 21 March 2009, Little Rock, AR, USA. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2010. **60**: p. 2691-3.
- 13. Stephens, R.S., et al., *Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of Chlamydia resolved.* FEMS immunology and medical microbiology, 2009. **55**: p. 115-9.
- 14. Greub, G., International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of the Chlamydiae: minutes of the closed meeting, 21 June 2010, Hof bei Salzburg, Austria. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2010. **60**: p. 2694.
- 15. Wang, S.P. and J.T. Grayston, *Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test.* American journal of ophthalmology, 1970. **70**(3): p. 367-74.
- 16. Andersen, A.A., Serotyping of Chlamydia psittaci isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test. Journal of clinical microbiology, 1991. **29**(4): p. 707-11.
- 17. Everett, K.D. and A.A. Andersen, *The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for Chlamydia spp.* International journal of systematic bacteriology, 1997. **47**(2): p. 461-73.
- 18. Longbottom, D., *Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications.* Journal of Comparative Pathology, 2003. **128**: p. 217-244.
- 19. Banks, J. and J. Schachter, Serotyping of Chlamydia: antibodies to lymphogranuloma venereum strains compared by microimmunofluorescence and neutralization tests. Infection and immunity, 1978. **20**(3): p. 864-6.
- 20. Belland, R., D.M. Ojcius, and G.I. Byrne, *Chlamydia.* Nature reviews. Microbiology, 2004. **2**: p. 530-1.

- 21. Organization, W.H., *Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections*, 2001, World Health Organization: Geneva.
- 22. Haggerty, C.L., et al., *Risk of sequelae after Chlamydia trachomatis genital infection in women.* The Journal of infectious diseases, 2010. **201 Suppl** p. S134-55.
- 23. Miyairi, I., K.H. Ramsey, and D.L. Patton, *Duration of untreated chlamydial genital infection and factors associated with clearance: review of animal studies.* The Journal of infectious diseases, 2010. **201 Suppl** p. S96-103.
- 24. Rampf, J., et al., *Lymphogranuloma venereum a rare cause of genital ulcers in central Europe.* Dermatology, 2004. **209**(3): p. 230-2.
- 25. Kalayoglu, M.V., Byrne, G.I., ed. *The genus Chlamydia medical. The Prokaryotes*, ed. M. Dorkin, FAlkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E.2006, Springer: New York.
- 26. Belland, R.J., et al., *Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis*. Cellular Microbiology, 2004. **6**: p. 117-127.
- 27. Grayston, J.T., et al., *Chlamydia pneumoniae and cardiovascular disease.* Cardiologia, 1997. **42**(11): p. 1145-51.
- 28. Kuo, C.C., et al., *Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of coronary arteries.* The Journal of Infectious Diseases, 1993. **167**(4): p. 841-9.
- 29. Jackson, L.A., et al., *Isolation of Chlamydia pneumoniae from a carotid endarterectomy specimen.* The Journal of Infectious Diseases, 1997. **176**(1): p. 292-5.
- Hahn, D.L., R.W. Dodge, and R. Golubjatnikov, Association of Chlamydia pneumoniae (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adultonset asthma. JAMA : the journal of the American Medical Association, 1991. 266(2): p. 225-30.
- 31. Budak, F., et al., *The investigation of Chlamydophila pneumoniae in patients with multiple sclerosis.* The International journal of neuroscience, 2007. **117**(3): p. 409-15.
- 32. Feist, A., et al., *No association of Chlamydia with abortion.* Journal of the Royal Society of Medicine, 1999. **92**(5): p. 237-8.
- 33. Hogan, R.J., et al., *MINIREVIEW Chlamydial Persistence : beyond the Biphasic Paradigm.* Infection and immunity, 2004. **72**: p. 1843-1855.
- 34. Prevention, C.f.D.C.a., *Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidlines, 2010*, 2010: Atlanta.
- 35. Eb, F., J. Orfila, and J.F. Lefebvre, *Ultrastructural study of the development of the agent of ewe's abortion.* Journal of ultrastructure research, 1976. **56**(2): p. 177-85.
- 36. Haider, S., et al., *Raman microspectroscopy reveals long-term extracellular activity of Chlamydiae.* Molecular microbiology, 2010. **77**(3): p. 687-700.
- 37. Dautry-Varsat, A., A. Subtil, and T. Hackstadt, *Recent insights into the mechanisms of Chlamydia entry.* Cellular microbiology, 2005. **7**: p. 1714-22.
- 38. Valdivia, R.H., *Chlamydia effector proteins and new insights into chlamydial cellular microbiology.* Current opinion in microbiology, 2008. **11**: p. 53-9.
- 39. Betts, H.J., K. Wolf, and K.a. Fields, *Effector protein modulation of host cells: examples in the Chlamydia spp. arsenal.* Current opinion in microbiology, 2009. **12**: p. 81-7.
- 40. Hybiske, K. and R.S. Stephens, *Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**: p. 11430-5.
- 41. Abromaitis, S. and R.S. Stephens, *Attachment and entry of Chlamydia have distinct requirements for host protein disulfide isomerase.* PLoS pathogens, 2009. **5**: p. e1000357.
- 42. Carabeo, R.A. and T. Hackstadt, *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.* Infection and immunity, 2001. **69**(9): p. 5899-904.
- 43. Fudyk, T., L. Olinger, and R.S. Stephens, *Selection of mutant cell lines resistant to infection by Chlamydia spp [corrected].* Infection and immunity, 2002. **70**(11): p. 6444-7.
- 44. Stephens, R.S., *Molecular mimicry and Chlamydia trachomatis infection of eukaryotic cells.* Trends in microbiology, 1994. **2**(3): p. 99-101.
- 45. Menozzi, F.D., et al., *Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans*. Molecular microbiology, 2002. **43**(6): p. 1379-86.
- 46. Carabeo, R.A., et al., *Chlamydia trachomatis induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells.* Infection and immunity, 2002. **70**: p. 3793.
- 47. Conant, C.G. and R.S. Stephens, *Chlamydia attachment to mammalian cells requires protein disulfide isomerase.* Cellular microbiology, 2007. **9**: p. 222-32.
- 48. Davis, C., J. Raulston, and P. Wyrick, *Protein disulfide isomerase, a component of the estrogen receptor complex, is associated with Chlamydia trachomatis serovar E attached to human endometrial epithelial cells.* Infection and immunity, 2002. **70**: p. 3413.
- 49. Hybiske, K. and R.S. Stephens, *Mechanisms of Chlamydia trachomatis entry into nonphagocytic cells.* Infection and immunity, 2007. **75**: p. 3925-34.
- 50. Clifton, D.R., et al., A chlamydial type III translocated protein is tyrosinephosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**: p. 10166-71.
- 51. Jewett, T.J., et al., *Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**: p. 15599-604.
- 52. Balañá, M.E., et al., *ARF6 GTPase controls bacterial invasion by actin remodelling.* Journal of cell science, 2005. **118**: p. 2201-10.
- 53. Matsumoto, A., Isolation and electron microscopic observations of intracytoplasmic inclusions containing Chlamydia psittaci. Journal of Bacteriology, 1981. **145**(1): p. 605-12.
- 54. Hackstadt, T., et al., *Chlamydia trachomatis interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane.* The EMBO journal, 1996. **15**(5): p. 964-77.
- 55. Scidmore, M.A., E.R. Fischer, and T. Hackstadt, *Restricted fusion of Chlamydia trachomatis vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection.* Infection and immunity, 2003. **71**(2): p. 973-84.
- 56. Heinzen, R.A. and T. Hackstadt, *The Chlamydia trachomatis parasitophorous vacuolar membrane is not passively permeable to low-molecular-weight compounds.* Infection and immunity, 1997. **65**(3): p. 1088-94.
- 57. Scidmore, M.A., et al., Vesicular interactions of the Chlamydia trachomatis inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry. Infection and immunity, 1996. **64**(12): p. 5366-72.
- 58. Peters, J., et al., *Type III secretion a la Chlamydia.* Trends in microbiology, 2007. **15**(6): p. 241-51.
- 59. Bavoil, P.M. and R.C. Hsia, *Type III secretion in Chlamydia: a case of deja vu?* Molecular microbiology, 1998. **28**(4): p. 860-2.
- 60. Cocchiaro, J.L. and R.H. Valdivia, *New insights into Chlamydia intracellular survival mechanisms.* Cellular microbiology, 2009. **11**: p. 1571-8.
- 61. Jones, R.B., S.C. Bruins, and W.J.t. Newhall, *Comparison of reticulate and elementary body antigens in detection of antibodies against Chlamydia trachomatis by an enzyme-linked immunosorbent assay.* Journal of clinical microbiology, 1983. **17**(3): p. 466-71.
- 62. Hackstadt, T., W. Baehr, and Y. Ying, *Chlamydia trachomatis developmentally regulated protein is homologous to eukaryotic histone H1.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(9): p. 3937-41.
- 63. Grieshaber, N.A., et al., *Regulation of the Chlamydia trachomatis histone H1-like protein Hc2 is lspE dependent and lhtA independent.* Journal of bacteriology, 2006. **188**(14): p. 5289-92.

- 64. Shaw, E.I., et al., *Three temporal classes of gene expression during the Chlamydia trachomatis developmental cycle*. Molecular microbiology, 2000. **37**(4): p. 913-25.
- 65. Wolf, K., et al., *Treatment of Chlamydia trachomatis with a small molecule inhibitor of the Yersinia type III secretion system disrupts progression of the chlamydial developmental cycle*. Molecular microbiology, 2006. **61**(6): p. 1543-55.
- 66. Belland, R.J., et al., *Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of Chlamydia trachomatis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**: p. 8478-83.
- 67. Zhong, G., *Killing me softly: chlamydial use of proteolysis for evading host defenses.* Trends in microbiology, 2009. **17**: p. 467-474.
- 68. Wilson, D.P., et al., Ocular pathologic response elicited by Chlamydia organisms and the predictive value of quantitative modeling. The Journal of Infectious Diseases, 2009. **199**(12): p. 1780-9.
- 69. Rockey, D.D., E.R. Fischer, and T. Hackstadt, *Temporal analysis of the developing Chlamydia psittaci inclusion by use of fluorescence and electron microscopy.* Infection and immunity, 1996. **64**(10): p. 4269-78.
- 70. Todd, W.J. and H.D. Caldwell, *The interaction of Chlamydia trachomatis with host cells: ultrastructural studies of the mechanism of release of a biovar II strain from HeLa 229 cells.* The Journal of infectious diseases, 1985. **151**: p. 1037-44.
- 71. Gottlieb, S.L., S.M. Berman, and N. Low, *Screening and treatment to prevent sequelae in women with Chlamydia trachomatis genital infection: how much do we know?* The Journal of infectious diseases, 2010. **201 Suppl** p. S156-67.
- 72. Beatty, W.L., R.P. Morrison, and G.I. Byrne, *Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis.* Microbiological reviews, 1994. **58**: p. 686-99.
- 73. Belland, R.J., et al., *Transcriptome analysis of chlamydial growth during IFN-gammamediated persistence and reactivation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**: p. 15971-6.
- 74. Marks, E., M.a. Tam, and N.Y. Lycke, *The Female Lower Genital Tract Is a Privileged Compartment with IL-10 Producing Dendritic Cells and Poor Th1 Immunity following Chlamydia trachomatis Infection.* PLoS pathogens, 2010. **6**: p. e1001179.
- 75. Darville, T. and Thomas J. Hiltke, *Pathogenesis of Genital Tract Disease Due to Chlamydia trachomatis.* The Journal of Infectious Diseases, 2010. **201**: p. 114-125.
- 76. Rasmussen, S.J., et al., Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. The Journal of clinical investigation, 1997. **99**: p. 77-87.
- 77. Roan, N.R. and M.N. Starnbach, *Immune-mediated control of Chlamydia infection*. Cellular microbiology, 2008. **10**: p. 9-19.
- 78. Hvid, M., et al., *Interleukin-1 is the initiator of Fallopian tube destruction during Chlamydia trachomatis infection.* Cellular microbiology, 2007. **9**: p. 2795-803.
- 79. Brunham, R.C. and J. Rey-Ladino, *Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine.* Nature reviews. Immunology, 2005. **5**: p. 149-61.
- 80. Herrmann, H., et al., *Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics.* Nature reviews. Molecular cell biology, 2007. **8**(7): p. 562-73.
- 81. Marceau, N., et al., *Keratin-mediated resistance to stress and apoptosis in simple epithelial cells in relation to health and disease.* Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire, 2001. **79**(5): p. 543-55.
- 82. Carabeo, R.a., et al., Rac interacts with Abi-1 and WAVE2 to promote an Arp2/3dependent actin recruitment during chlamydial invasion. Cellular microbiology, 2007.
 9: p. 2278-88.
- 83. Engel, J., *Tarp and Arp: How Chlamydia induces its own entry.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**: p. 9947-8.
- 84. Grieshaber, S.S., N.A. Grieshaber, and T. Hackstadt, *Chlamydia trachomatis uses* host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitinindependent process. Journal of cell science, 2003. **116**(Pt 18): p. 3793-802.

- 85. Kumar, Y. and R.H. Valdivia, *Reorganization of the host cytoskeleton by the intracellular pathogen Chlamydia trachomatis.* Communicative & integrative biology, 2008. **1**(2): p. 175-7.
- 86. Dong, F., et al., *Cleavage of host keratin 8 by a Chlamydia-secreted protease.* Infection and immunity, 2004. **72**(7): p. 3863-8.
- 87. Paschen, S.A., et al., *Cytopathicity of Chlamydia is largely reproduced by expression of a single chlamydial protease.* The Journal of cell biology, 2008. **182**(1): p. 117-27.
- 88. Saka, H.A. and R.H. Valdivia, *Acquisition of nutrients by Chlamydiae: unique challenges of living in an intracellular compartment.* Current opinion in microbiology, 2010. **13**: p. 4-10.
- 89. Fields, K.A., E. Fischer, and T. Hackstadt, *Inhibition of fusion of Chlamydia trachomatis inclusions at 32 degrees C correlates with restricted export of IncA.* Infection and immunity, 2002. **70**(7): p. 3816-23.
- 90. Cocchiaro, J.L., et al., *Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the Chlamydia trachomatis parasitophorous vacuole.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(27): p. 9379-84.
- 91. Rejman Lipinski, A., et al., *Rab6 and Rab11 regulate Chlamydia trachomatis development and golgin-84-dependent Golgi fragmentation.* PLoS pathogens, 2009. **5**: p. e1000615.
- 92. Kumar, Y. and R.H. Valdivia, *Reorganization of the host cytoskeleton by the intracellular pathogen Chlamydia trachomatis.* Communicative & Integrative Biology, 2008. **1**: p. 175.
- 93. Delevoye, C., et al., *SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium.* PLoS pathogens, 2008. **4**: p. e1000022.
- 94. Heuer, D., et al., *Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction.* Nature, 2009. **457**(7230): p. 731-5.
- 95. Trentmann, O., et al., *Enlightening energy parasitism by analysis of an ATP/ADP transporter from chlamydiae*. PLoS biology, 2007. **5**(9): p. e231.
- 96. Savill, J., et al., *A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses.* Nature reviews. Immunology, 2002. **2**(12): p. 965-75.
- 97. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.* British journal of cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
- 98. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points.* Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.
- 99. Denault, J.B. and G.S. Salvesen, *Caspases: keys in the ignition of cell death.* Chemical reviews, 2002. **102**(12): p. 4489-500.
- 100. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation.* Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
- 101. Kischkel, F.C., et al., *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor.* The EMBO journal, 1995. **14**(22): p. 5579-88.
- 102. Thorburn, A., *Death receptor-induced cell killing.* Cellular signalling, 2004. **16**(2): p. 139-44.
- 103. Hacker, G., *The morphology of apoptosis.* Cell and tissue research, 2000. **301**(1): p. 5-17.
- 104. Strasser, A., *The role of BH3-only proteins in the immune system*. Nature reviews. Immunology, 2005. **5**(3): p. 189-200.
- 105. Ekert, P.G. and D.L. Vaux, *The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders?* Current opinion in cell biology, 2005. **17**(6): p. 626-30.
- 106. Liu, X., et al., Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(20): p. 13836-40.
- 107. Thornberry, N.A., et al., A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key

mediators of apoptosis. The Journal of biological chemistry, 1997. **272**(29): p. 17907-11.

- 108. Li, H., et al., Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. Cell, 1998. **94**(4): p. 491-501.
- 109. Byrne, G.I. and D.M. Ojcius, *Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen.* Nature reviews. Microbiology, 2004. **2**(10): p. 802-8.
- 110. Ying, S., et al., *Characterization of host cell death induced by Chlamydia trachomatis.* Infection and immunity, 2006. **74**(11): p. 6057-66.
- 111. Ying, S., et al., *Host-Cell Survival and Death During Chlamydia Infection.* Current immunology reviews, 2007. **3**(1): p. 31-40.
- 112. Yu, H., et al., Role of high-mobility group box 1 protein and poly(ADP-ribose) polymerase 1 degradation in Chlamydia trachomatis-induced cytopathicity. Infection and immunity, 2010. **78**(7): p. 3288-97.
- 113. Fischer, S.F., et al., *Chlamydia inhibit host cell apoptosis by degradation of proapoptotic BH3-only proteins.* The Journal of experimental medicine, 2004. **200**(7): p. 905-16.
- Fischer, S.F. and G. Hacker, *Characterization of antiapoptotic activities of Chlamydia pneumoniae in infected cells.* Annals of the New York Academy of Sciences, 2003.
 1010: p. 565-7.
- 115. Pirbhai, M., et al., *The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in Chlamydia trachomatis-infected cells.* The Journal of biological chemistry, 2006. **281**: p. 31495-501.
- 116. Verbeke, P., et al., *Recruitment of BAD by the Chlamydia trachomatis vacuole correlates with host-cell survival.* PLoS pathogens, 2006. **2**(5): p. e45.
- 117. Tse, S.M., et al., *Accumulation of diacylglycerol in the Chlamydia inclusion vacuole: possible role in the inhibition of host cell apoptosis.* The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(26): p. 25210-5.
- 118. Rajalingam, K., et al., *IAP-IAP complexes required for apoptosis resistance of C. trachomatis-infected cells.* PLoS pathogens, 2006. **2**(10): p. e114.
- 119. Mogensen, T.H., *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses.* Clinical microbiology reviews, 2009. **22**: p. 240-73, Table of Contents.
- 120. Zhang, G. and S. Ghosh, *Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity.* Journal of Clinical Investigation, 2001. **107**: p. 13-20.
- 121. Mombaerts, P., et al., *Peripheral lymphoid development and function in TCR mutant mice.* International immunology, 1994. **6**(7): p. 1061-70.
- 122. Harty, J.T., A.R. Tvinnereim, and D.W. White, *CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection.* Annual review of immunology, 2000. **18**: p. 275-308.
- 123. Mosmann, T.R. and S. Sad, *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.* Immunology today, 1996. **17**(3): p. 138-46.
- 124. Koyasu, S. and K. Moro, *Type 2 innate immune responses and the natural helper cell.* Immunology, 2011. **132**(4): p. 475-81.
- 125. Fields, K.A. and T. Hackstadt, *The chlamydial inclusion: escape from the endocytic pathway.* Annual review of cell and developmental biology, 2002. **18**: p. 221-45.
- 126. Heuer, D., et al., *Expression and translocation of chlamydial protease during acute and persistent infection of the epithelial HEp-2 cells with Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae.* Cellular microbiology, 2003. **5**(5): p. 315-22.
- 127. Kumar, Y. and R.H. Valdivia, *Actin and intermediate filaments stabilize the Chlamydia trachomatis vacuole by forming dynamic structural scaffolds.* Cell host & microbe, 2008. **4**: p. 159-69.
- 128. Zhong, G., T. Fan, and L. Liu, *Chlamydia inhibits interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1.* The Journal of experimental medicine, 1999. **189**(12): p. 1931-8.
- 129. Zhong, G., et al., Degradation of transcription factor RFX5 during the inhibition of both constitutive and interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class I

expression in chlamydia-infected cells. The Journal of experimental medicine, 2000. **191**(9): p. 1525-34.

- 130. Bendelac, A., *CD1: presenting unusual antigens to unusual T lymphocytes.* Science, 1995. **269**(5221): p. 185-6.
- 131. Kawana, K., et al., *CD1d degradation in Chlamydia trachomatis-infected epithelial cells is the result of both cellular and chlamydial proteasomal activity.* The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(10): p. 7368-75.
- 132. Paland, N., et al., *Reduced display of tumor necrosis factor receptor I at the host cell surface supports infection with Chlamydia trachomatis.* The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(10): p. 6438-48.
- 133. O'Connell, C.M., et al., *Localization of TLR2 and MyD88 to Chlamydia trachomatis inclusions. Evidence for signaling by intracellular TLR2 during infection with an obligate intracellular pathogen.* The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(3): p. 1652-9.
- 134. Welter-Stahl, L., et al., *Stimulation of the cytosolic receptor for peptidoglycan, Nod1, by infection with Chlamydia trachomatis or Chlamydia muridarum.* Cellular microbiology, 2006. **8**: p. 1047-57.
- 135. Buchholz, K.R. and R.S. Stephens, *The cytosolic pattern recognition receptor NOD1 induces inflammatory interleukin-8 during Chlamydia trachomatis infection.* Infection and immunity, 2008. **76**: p. 3150-5.
- 136. Buchholz, K.R. and R.S. Stephens, *Activation of the host cell proinflammatory interleukin-8 response by Chlamydia trachomatis.* Cellular microbiology, 2006. **8**: p. 1768-79.
- Buchholz, K.R. and R.S. Stephens, The extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway induces the inflammatory factor interleukin-8 following Chlamydia trachomatis infection. Infection and immunity, 2007.
 75: p. 5924-9.
- 138. Tak, P.P. and G.S. Firestein, *NF-κB* : a key role in inflammatory diseases, in *Helicobacter*2001. p. 7-11.
- 139. Perkins, N.D., *Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2007. **8**: p. 49-62.
- 140. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB.* Genes & development, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
- 141. Huang, T.T., et al., A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of *IkappaBalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/lkappaBalpha complexes.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(3): p. 1014-9.
- 142. Krappmann, D. and C. Scheidereit, A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways. EMBO reports, 2005. **6**(4): p. 321-6.
- 143. Sun, S.C. and S.C. Ley, *New insights into NF-kappaB regulation and function.* Trends in immunology, 2008. **29**(10): p. 469-78.
- 144. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity.* Trends in immunology, 2004. **25**(6): p. 280-8.
- 145. Perkins, N.D., *NF-kappaB: tumor promoter or suppressor*? Trends in cell biology, 2004. **14**(2): p. 64-9.
- 146. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-*[kappa]B activity. Annual review of immunology, 2000. **18**: p. 621-63.
- 147. Natoli, G., et al., Interactions of NF-kappaB with chromatin: the art of being at the right place at the right time. Nature immunology, 2005. **6**: p. 439-45.
- 148. Grilli, M., J.J. Chiu, and M.J. Lenardo, *NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system.* International review of cytology, 1993. **143**: p. 1-62.
- 149. Baldwin, A.S., Jr., *The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights.* Annual review of immunology, 1996. **14**: p. 649-83.

- 150. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors.* Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6853-66.
- 151. Le Negrate, G., et al., *ChlaDub1 of Chlamydia trachomatis suppresses NF-kappaB activation and inhibits lkappaBalpha ubiquitination and degradation.* Cellular microbiology, 2008. **10**: p. 1879-92.
- 152. Lad, S.P., et al., Chlamydial CT441 is a PDZ domain-containing tail-specific protease that interferes with the NF-kappaB pathway of immune response. Journal of bacteriology, 2007. **189**: p. 6619-25.
- 153. Lad, S.P., et al., Cleavage of p65 / RelA of the NF- B pathway by Chlamydia. Sciences-New York, 2006. **2006**.
- 154. Krull, M., et al., *Differences in cell activation by Chlamydophila pneumoniae and Chlamydia trachomatis infection in human endothelial cells.* Infection and immunity, 2004. **72**: p. 6615.
- 155. Dechend, R., et al., *Chlamydia pneumoniae infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF-kappaB and induces tissue factor and PAI-1 expression: a potential link to accelerated arteriosclerosis.* Circulation, 1999. **100**(13): p. 1369-73.
- 156. Shaw, A.C., et al., *Characterization of a secreted Chlamydia protease.* Cellular microbiology, 2002. **4**: p. 411-24.
- 157. Zhong, G., et al., *Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors.* The Journal of experimental medicine, 2001. **193**(8): p. 935-42.
- 158. Dong, F., et al., *Cleavage-dependent activation of a chlamydia-secreted protease.* Molecular microbiology, 2004. **52**: p. 1487-94.
- 159. Dong, F., et al., Intramolecular dimerization is required for the chlamydia-secreted protease CPAF to degrade host transcriptional factors. Infection and immunity, 2004. **72**: p. 3869.
- 160. Huang, Z., et al., *Structural basis for activation and inhibition of the secreted chlamydia protease CPAF.* Cell host & microbe, 2008. **4**: p. 529-42.
- 161. Stephens, R.S., et al., *Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia trachomatis.* Science, 1998. **282**(5389): p. 754-9.
- 162. Chuang, C.K., et al., *Hybrid molecular structure of the giant protease tripeptidyl peptidase II.* Nature structural & molecular biology, 2010. **17**(8): p. 990-6.
- 163. Rawlings, N.D., et al., *MEROPS: the peptidase database.* Nucleic acids research, 2008. **36**(Database issue): p. D320-5.
- 164. Brandstetter, H., et al., *Structural basis for the processive protein degradation by tricorn protease.* Biological chemistry, 2002. **383**(7-8): p. 1157-65.
- 165. Bao, Q. and Y. Shi, *Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases.* Cell death and differentiation, 2007. **14**(1): p. 56-65.
- 166. Riedl, S.J. and G.S. Salvesen, *The apoptosome: signalling platform of cell death.* Nature reviews. Molecular cell biology, 2007. **8**(5): p. 405-13.
- 167. Chen, D., et al., *Autoprocessing and self-activation of the secreted protease CPAF in Chlamydia-infected cells.* Microbial pathogenesis, 2010. **49**(4): p. 164-73.
- 168. Chen, D., et al., *Identifying catalytic residues in CPAF, a Chlamydia-secreted protease.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 2009. **485**: p. 16-23.
- 169. Chen, D., et al., Secretion of the chlamydial virulence factor CPAF requires the Secdependent pathway. Microbiology, 2010. **156**(Pt 10): p. 3031-40.
- 170. Sun, J. and R.V. Schoborg, *The host adherens junction molecule nectin-1 is degraded by chlamydial protease-like activity factor (CPAF) in Chlamydia trachomatis-infected genital epithelial cells.* Microbes and infection / Institut Pasteur, 2009. **11**: p. 12-9.
- 171. Braga, V.M., *Cell-cell adhesion and signalling.* Current opinion in cell biology, 2002. **14**(5): p. 546-56.
- 172. Balsara, Z.R., et al., *Chlamydia trachomatis infection induces cleavage of the mitotic cyclin B1.* Infection and immunity, 2006. **74**(10): p. 5602-8.

- 173. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
- 174. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 1976. **72**: p. 248-54.
- 175. Christian, J., et al., Cleavage of the NF-{kappa}B family protein p65/RelA by the chlamydial protease-like activity factor (CPAF) impairs proinflammatory signaling in cells infected with Chlamydiae. The Journal of biological chemistry, 2010. **285**(53): p. 41320-7.
- 176. Subtil, A., A. Blocker, and A. Dautry-Varsat, *Type III secretion system in Chlamydia species: identified members and candidates.* Microbes and infection / Institut Pasteur, 2000. **2**(4): p. 367-9.
- 177. Pallen, M.J. and B.W. Wren, *The HtrA family of serine proteases.* Molecular microbiology, 1997. **26**(2): p. 209-21.
- 178. Dan, I., et al., *Cloning of MASK, a novel member of the mammalian germinal center kinase III subfamily, with apoptosis-inducing properties.* The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(8): p. 5929-39.
- 179. Ma, X., et al., *PDCD10 interacts with Ste20-related kinase MST4 to promote cell growth and transformation via modulation of the ERK pathway.* Molecular biology of the cell, 2007. **18**(6): p. 1965-78.
- 180. Qian, Z., et al., *Cloning and characterization of MST4, a novel Ste20-like kinase.* The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(25): p. 22439-45.
- 181. Su, H., et al., Activation of Raf/MEK/ERK/cPLA2 signaling pathway is essential for chlamydial acquisition of host glycerophospholipids. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(10): p. 9409-16.
- 182. Zheng, X., et al., *CCM3 signaling through sterile 20-like kinases plays an essential role during zebrafish cardiovascular development and cerebral cavernous malformations.* The Journal of clinical investigation, 2010. **120**(8): p. 2795-804.
- 183. Preisinger, C., et al., YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14-3-3zeta. The Journal of cell biology, 2004. **164**(7): p. 1009-20.
- 184. Matsuo, H., et al., *Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization.* Science, 2004. **303**(5657): p. 531-4.
- 185. Rupp, J., et al., *Chlamydia pneumoniae infection promotes a proliferative phenotype in the vasculature through Egr-1 activation in vitro and in vivo.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(9): p. 3447-52.
- Gencay, M.M.C., et al., Chlamydia pneumoniae activates epithelial cell proliferation via NF-kappa-B and the glucocorticoid receptor. Infection and immunity, 2003. 71: p. 5814.
- 187. Wu, Y., et al., *Overexpression of Hp95 induces G1 phase arrest in confluent HeLa cells.* Differentiation; research in biological diversity, 2001. **67**(4-5): p. 139-53.
- 188. Zhang, H., et al., *RIP1-mediated AIP1 phosphorylation at a 14-3-3-binding site is critical for tumor necrosis factor-induced ASK1-JNK/p38 activation.* The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(20): p. 14788-96.
- 189. Kinoshita, M., *Diversity of septin scaffolds.* Current opinion in cell biology, 2006. **18**(1): p. 54-60.
- 190. Hu, Q., et al., A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. Science, 2010. **329**(5990): p. 436-9.
- 191. Spiliotis, E.T., et al., *Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules.* The Journal of cell biology, 2008. **180**(2): p. 295-303.
- Grieshaber, S.S., et al., Chlamydia trachomatis causes centrosomal defects resulting in chromosomal segregation abnormalities. Traffic (Copenhagen, Denmark), 2006. 7: p. 940-9.
- 193. Horn, M., et al., *Illuminating the evolutionary history of chlamydiae*. Science, 2004. **304**(5671): p. 728-30.

- 194. Bunk, S., et al., *Immunoproteomic identification and serological responses to novel Chlamydia pneumoniae antigens that are associated with persistent C. pneumoniae infections.* Journal of immunology, 2008. **180**(8): p. 5490-8.
- 195. Xiao, Y., et al., *NF-kappa B activation is not required for Chlamydia trachomatis inhibition of host epithelial cell apoptosis.* Journal of immunology, 2005. **174**(3): p. 1701-8.
- 196. Fritsche, T.R., et al., *Phylogenetic diversity among geographically dispersed Chlamydiales endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of Acanthamoeba spp.* Applied and environmental microbiology, 2000. **66**(6): p. 2613-9.
- 197. Horn, M., et al., *Neochlamydia hartmannellae gen. nov., sp. nov.* (*Parachlamydiaceae*), an endoparasite of the amoeba Hartmannella vermiformis. Microbiology, 2000. **146 (Pt 5)**: p. 1231-9.
- 198. Amann, R., et al., *Obligate intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to Chlamydia spp.* Applied and environmental microbiology, 1997. **63**(1): p. 115-21.
- 199. Sixt, B.S., et al., *Proteomic analysis reveals a virtually complete set of proteins for translation and energy generation in elementary bodies of the amoeba symbiont Protochlamydia amoebophila.* Proteomics, 2011. **11**(10): p. 1868-92.
- 200. Kumar, Y., J. Cocchiaro, and R.H. Valdivia, *The obligate intracellular pathogen Chlamydia trachomatis targets host lipid droplets.* Current biology : CB, 2006. **16**(16): p. 1646-51.
- 201. Collingro, A., et al., *Unity in Variety the Pan-Genome of the Chlamydiae.* Molecular biology and evolution, 2011.

6 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Georg Häcker möchte ich für die Vergabe eines interessanten Themas danken. Sein stetes Interesse an meiner Arbeit, seine Anregungen und die konstruktiven Diskussionen dienten mir als Motivation und förderten mein Vorankommen.

Herrn Prof. Dr. Michael Groll danke ich für die freundliche Bereitschaft meine Arbeit von Seiten der Fakultät Chemie zu betreuen. Seine ständige Hilfsbereitschaft war mir ein großer Rückhalt.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Hermann Wagner und Herrn Prof. Dr. Dirk Busch möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken diese Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Dirk Haller danke ich für die Zusammenarbeit mit seiner Gruppe und die Durchführung einer massenspektrometrischen Analyse der Substratspezifität von CPAF.

Frau Dr. Dagmar Heuer danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die in diesem Zusammenhang entstandene Kooperation in einem Teilbereich des Projekts.

Danken möchte ich allen jetzigen wie ehemaligen Arbeitskollegen im Labor von Prof. Dr. Georg Häcker. Durch die freundschaftliche, konstruktive Atmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe bestand ein sehr angenehmes Arbeitsklima und die Arbeit mit allen hat mir große Freude bereitet. An dieser Stelle möchte ich insbesondere **Dr. Stefan Paschen** und **Juliane Vier** danken, mit denen ich gemeinsam an der Erforschung von *C. trachomatis* arbeiten durfte.

Auch möchte ich die stets freundschaftliche Zusammenarbeit mit den übrigen Arbeitskollegen des Institus für Medizinische Mikrobioogie, Immunologie und Hygiene erwähnen.

An dieser Stelle dürfen meine Familie und meine Lebensgefährtin Anne-Marie nicht unerwähnt bleiben, die mich jederzeit, in jeder Hinsicht ünterstützten und immer an mich geglaubt haben.