

Identifizierung von immunreaktiven Proteinen in *Chlamydia psittaci*-infizierten Rindern

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



seit 1558

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin

Julia Kästner

geboren am 21.11.1984 in Jena

Jena, 2015

Gutachter

1. Prof. Dr. Hans Peter Saluz, Jena
2. Prof. Dr. Lloyd Vaughan, Zürich
3. PD Dr. Angela Berndt, Jena

Tag der Disputation: 28.05.2015

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung	4
1.1 Chlamydien	4
1.1.1 Taxonomie	4
1.1.2 Lebenszyklus	4
1.1.3 <i>C. psittaci</i> : Bedeutung und Besonderheiten.....	6
1.2 Wirt-Pathogen Wechselwirkungen.....	7
1.2.1 Eingreifen in Wirtszellprozesse und Immunevasion durch Chlamydien	8
1.2.2 <i>One Health</i> – das Rindermodell.....	11
1.2.3 Immunantwort des Wirtes	12
1.3 Identifizierung Infektions-assoziiierter Gene mit Fokus auf die <i>In vivo induced antigen technology</i> (IVIAT).....	15
1.3.1 Überblick und Bedeutung.....	16
1.3.2 IVIAT – Anwendungsbeispiele	19
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Geräte	21
2.1.2 Chemikalien	22
2.1.3 Verbrauchsmaterial	23
2.1.4 Kits	24
2.1.5 Marker	24
2.1.6 Puffer und Lösungen.....	25
2.1.7 Primer	27
2.1.8 Antikörper und Seren	27
2.1.9 Zelllinien.....	28
2.1.10 Bakterienstämme	28
2.1.11 Vektoren und Plasmidkonstrukte.....	29
2.1.12 Software und online Datenbanken.....	29
2.2 Zellbiologische Arbeitsmethoden	30
2.3 Mikrobiologische Arbeitsmethoden	30
2.3.1 Methoden zum Arbeiten mit Chlamydien.....	30
2.3.1.1 Kultivierung und Kryokonservierung von Chlamydien.....	30
2.3.1.2 Reinigung von Chlamydien durch Ultrazentrifugation.....	30
2.3.2 Methoden zum Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	31
2.3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	31
2.3.2.2 Chemische Transformation von <i>E. coli</i> nach Hanahan (1983)	31
2.3.2.3 Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> Zellen	31
2.3.2.4 Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	32

2.4	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	32
2.4.1	Methoden zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren	32
2.4.1.1	Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	32
2.4.1.2	Isolierung genomischer DNA aus <i>C. psittaci</i>	32
2.4.1.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. psittaci</i> -infizierten HEp-2-Zellen.....	32
2.4.1.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. psittaci</i> -infizierten Lungengewebe	33
2.4.1.5	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	33
2.4.1.6	Agarosegel-Elektrophorese	33
2.4.2	Klonierung von chlamydialen Genen.....	34
2.4.3	Detektion von chlamydialen Transkripten	35
2.4.3.1	Reverse Transkription	35
2.4.3.2	Quantitative <i>real-time</i> PCR (qRT-PCR)	35
2.5	Proteinanalytische Methoden	36
2.5.1	Expression chlamydialer Proteine in <i>E. coli</i>	36
2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	37
2.5.3	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western- /Immunblot.....	37
2.5.4	<i>In vivo induced antigen technology</i> (IVIAT; Rollins et al., 2005).....	38
2.5.4.1	Adsorption der Seren	38
2.5.4.2	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	39
2.5.4.3	Herstellung der genomischen Expressionslibrary	40
2.5.4.4	Kolonie Screening	40
3	Ergebnisse	42
3.1	Charakterisierung der Seren von <i>C. psittaci</i> -infizierten Kälbern und von nicht experimentell infizierten Kälbern.....	42
3.1.1	Seren von <i>C. psittaci</i> -infizierten Kälbern und nicht infizierten Kälbern reagieren mit Proteinlysaten von <i>C. psittaci</i> -infizierten Zellen.....	42
3.1.2	Kreuzreagierende Antikörper und Unspezifische Bindungen.....	43
3.2	Die extensive Abreicherung der Seren durch Inkubation mit <i>in vitro</i> kultivierten <i>E. coli</i> und <i>C. psittaci</i>	45
3.2.1	Die Abreicherung der Kälberseren von Antikörpern gegen <i>E. coli</i>	45
3.2.2	Die Abreicherung der Kälberseren von <i>C. psittaci</i> -spezifischen Antikörpern	47
3.3	Die chlamydiale Expressionsbank weist die erforderliche Variabilität und Größe der Insert DNA auf.....	48
3.3.1	Restriktionsanalysen von zufällig ausgewählten Klonen	49
3.3.2	Sequenzierung von Zufallsklonen.....	50
3.4	Optimierung der Parameter für das Screening der IPTG-induzierbaren chlamydialen Expressionsbank/Etablierung des Screenings.....	51
3.4.1	Festlegung der Mindestanzahl der zu screenenden Klone.....	51
3.4.2	Einfluss verschiedener Parameter auf das Wachstum und das Expressionsverhalten der Genbank	51
3.4.3	Empirische Bestimmung der Serum- und Protein G (HRP) Konzentrationen.....	53
3.5	Das <i>Major outer membrane protein</i> (MOMP) von <i>C. psittaci</i> fungiert als immunreaktives Kontrollprotein in den Screenings	54

3.6	Identifizierung immunreaktiver Proteine über das Screening der chlamydialen genomischen Expressionsbank.....	56
3.6.1	Kolonie Immunblots und Sequenzanalysen aller immunreaktiven Klone.....	56
3.6.2	Validierung der Expression subklonierter chlamydialer Gene	56
3.6.3	Validierung der Expression von IVIAT-selektierten Klonen	59
3.6.4	Eingrenzung der <i>in vivo</i> -induzierten immunreaktiven Proteine: Kolonie Screenings der Subklone und aller bestätigten <i>ivi</i> -Klone.....	60
3.6.5	Klassifizierung aller chlamydialen Gene der immunreaktiven Klone entsprechend der Funktion der Genprodukte	63
3.7	Untersuchung der Expression von chlamydialen Genen <i>in vivo</i> verglichen zu <i>in vitro</i>	66
3.7.1	Identifizierung chlamydialer RNA im Lungengewebe von infizierten Rindern.....	66
3.7.2	Quantifizierung der chlamydialen Transkripte in dem Lungengewebe relativ zur Expression chlamydialer Gene in der infizierten Zelle	67
4	Diskussion	72
4.1	Die Bedeutung der humoralen Immunantwort gegen <i>C. psittaci</i> im bovinen respiratorischen Infektionsmodell	72
4.2	Infektions-assoziierte immunreaktive Proteine von <i>C. psittaci</i>	76
4.2.1	Transport und oxidative Stressantwort.....	78
4.2.2	Häm- und Folat Biosynthese.....	82
4.2.3	DNA Replikation, Rekombination und Reparatur	83
4.2.4	Hypothetische Proteine und Proteine mit unbekannter Funktion.....	85
4.2.5	Membranproteine	86
4.2.6	Sekretionsapparate und Effektorproteine.....	89
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick.....	91
	Literaturverzeichnis.....	92
	Abbildungsverzeichnis.....	VII
	Tabellenverzeichnis.....	VIII
	Lebenslauf.....	IX
	Publikation und Präsentationen	X
	Unterstützung	XI
	Danksagung.....	XII
	Ehrenwörtliche Erklärung	XIII
	Anhang	XIV

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
BGM	<i>Buffalo Green Monkey</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C.	<i>Chlamydia</i>
Ca	Kalzium
cDNA	komplementäre DNA
CPAF	<i>Chlamydial protease/proteasome-like activity factor</i>
CPSOB/CPSOB	Locus Tag <i>C. psittaci</i> 02DC15 bzw. kodiertes Protein/ <i>entsprechendes Gen</i>
C _T	<i>Cycle treshold</i>
C-terminal	Carboxyl-terminal
Da	Dalton
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
d p. i.	<i>Days post infectionem</i>
dsDNA	<i>Double strand DNA</i>
EB	<i>Elementary body</i> (Elementarkörperchen)
EBE	Einschluss-bildende Einheit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FKS	fetales Kälberserum
G	Gramm
G	Beschleunigung
H	<i>hour</i> , Stunde
HCl	Salzsäure
HEp-2	Humane Epithelzellkarzinom-Linie 2
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
Inc	<i>Inclusion membrane protein</i>
ivi	<i>in vivo</i> -induziert
K ₂ HPO ₄	di-Kaliumhydrogenphosphat
Kan	Kanamycin
l	Liter

kDa	Kilo Dalton
L2	Sicherheitsstufe 2 im Labor
LB	Luria Bertani
LPS/LOS	Lipopolysaccharid/Lipooligosaccharid
M	Molar
Mg	Magnesium
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Milimolar
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> (Anzahl infektiöser Einheiten pro Zelle)
MOMP	<i>Major outer membrane protein</i>
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell</i>
N-terminal	Amino-terminal
OD _{600nm}	Optische Dichte bei 600 nm
Omp	<i>Outer membrane protein</i>
ORF	<i>Open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time-polymerase chain reaction</i>
RB	<i>Reticulate body</i> (Retikularkörperchen)
RIN	<i>RNA integrity number</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
rRNA/mRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid/messenger RNA</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i> (Natriumdodecylsulfat)
sec	<i>Second</i> , Sekunde(n)
T3SS	<i>Type III secretion system</i> (Typ III-Sekretionssystem)
Tab.	Tabelle
Tarp	<i>Translocated actin-recruiting phosphoprotein</i>
TAE	Tris/Acetat/EDTA Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
U/min	Umdrehung pro Minute
(v/v)	<i>Volume/volume</i> (Volumen pro Volumen bei Prozentangaben)
(w/v)	<i>Weight/volume</i> (Gewicht pro Volumen bei Prozentangaben)
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Eine Infektion mit dem obligat intrazellulären Pathogen *Chlamydia (C.) psittaci* ist ein komplexer Prozess, bei dem die Wechselwirkungen zwischen dem Erreger und dem Wirt ausschlaggebend für die Etablierung der Infektionskrankheit und die klinische Manifestation sind. *C. psittaci* besitzt ein ausgeprägtes zoonotisches Potential, wodurch besonders Menschen, die berufsbedingt mit infizierten Tieren zu tun haben, in den Fokus des Interesses rücken. Zudem sind Chlamydiosen bei Tieren nicht nur wegen der Übertragungsgefahr auf den Menschen von Bedeutung, sondern auch in Bezug auf die Produktqualität die von einem gesunden Tier ausgeht. Das Verständnis grundlegender Mechanismen der Virulenz von *C. psittaci* ebnet dabei den Weg für die Entwicklung geeigneter Diagnostika, Interventionsstrategien, Therapien oder Vakzine. Ziel dieser Arbeit war es, in einem genomweiten Ansatz nach chlamydialen Antigenen zu suchen, die spezifisch *in vivo* induziert werden und damit als potentielle Pathogenitätsfaktoren relevante Targets repräsentieren.

Zu diesem Zwecke wurde eine genomische *C. psittaci* Expressionsbibliothek mit Seren, die dem respiratorischen Infektionsmodell an Kälbern entstammen, gescreent und es wurden verschiedene Klassen von immunreaktiven Proteinen identifiziert. In Folge der intensiven Abreicherung der Seren von unspezifischen Antikörpern im Vorfeld der Untersuchungen, wurden daher nur chlamydiale Antigene selektiert, die *in vivo* im Rind induziert und auch nicht vom Serum der nicht infizierten Kontrolltiere erkannt wurden. Die zu Grunde liegende Technik ist als sogenannte *In vivo induced antigen technology (IVIAT)* bekannt, die mit dieser Arbeit erstmals bei einem obligat intrazellulären Pathogen Anwendung fand. Unter den 19 validierten immunreaktiven Proteinen sind solche zu finden, die als Komponenten von ABC-Transportsystemen am Import von Aminosäuren, Dipeptiden oder auch Sulfonat bzw. bei der Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern beteiligt sind. Zudem wurde ein chlamydialer Regulator der oxidativen Stressantwort und Enzyme aus den Biosynthesewegen der Kofaktoren Häm und Folat gefunden. Außerdem zählen Enzyme, die bei der DNA Replikation, Rekombination und Reparatur involviert sind, sowie Proteine der chlamydialen Zell- und Inklusionsmembran, Proteine des bakteriellen Typ II- bzw. des Typ III-Sekretion Systems (T3SS) und hypothetische Proteine zu den *in vivo*-induzierten (*ivi*) Proteinen. Etwa die Hälfte der identifizierten immunreaktiven Proteine sind bestätigte bzw. putative Effektorproteine, die über das T3SS in die Wirtszelle transloziert werden. Auf diese Weise kann *C. psittaci* in die Wirtszellprozesse eingreifen und seinen Wirt manipulieren sowie dem Immunsystem entgehen. Trotz ausgeklügelter Immunevasionsstrategien und dem etablierten

Entwicklungszyklus innerhalb der Inklusion ist die Wirtszelle in der Lage der Infektion mit *C. psittaci* entgegen zu wirken. Zudem ist *C. psittaci* auf die Nährstoffe des Wirtes angewiesen. Die hier identifizierten Infektions-assoziierten Proteine, insbesondere die ABC Importer, die Proteine des Typ III-Sekretionsapparates sowie der Folat-Biosynthese, das polymorphe Membranprotein und weitere Effektorproteine, die entweder ausschließlich in *C. psittaci* existieren oder zumindest auf Mikroorganismen beschränkt sind, bieten interessante Angriffspunkte für das Bestreben anti-chlamydiale Therapien oder Vakzine zu entwickeln.

Summary

Infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia (C.) psittaci* is a complex process with host-pathogen interactions being crucial for the establishment of infectious disease and the clinical manifestation. *C. psittaci* possess a distinct zoonotic potential that particularly impacts humans in close contact with infected animals due to their profession. Moreover, chlamydiosis of animals is not only relevant in terms of transmission to humans but equally important is the product quality coming from a healthy animal. Understanding the basic mechanisms of the virulence of *C. psittaci* paves the way for the development of diagnostics, intervention strategies, therapies and vaccines. By using a genome-wide approach, the aim of this study was the identification of chlamydial antigens being predominantly induced *in vivo* thus representing potential pathogenic factors being relevant targets.

For this purpose, a genomic DNA expression library of *C. psittaci* was screened with sera originated from the bovine model of respiratory *Chlamydia psittaci* infection and several immunogenic proteins were identified. Previous intense depletion of unspecific antibodies from the sera led to the selection of chlamydial antigens that had been induced *in vivo* and were not detected with the sera of control animals. The underlying technique, known as *In vivo induced antigen technology (IVIAT)*, was applied for the first time to obligate intracellular bacteria within this study. Of the nineteen immunoreactive proteins that were verified, components of the ABC transport system being involved in the import of amino acids, dipeptides and sulfonate as well as in the assembly of iron sulphur clusters were found. Furthermore, a chlamydial regulator of the oxidative stress response and enzymes of the heme and folate cofactor pathways were detected. In

addition, enzymes being involved in DNA replication, recombination and repair as well as proteins of the chlamydial cell wall and inclusion membrane, proteins of the type II- and type III secretion system (T3SS) and hypothetical proteins belong to the *in vivo*-induced (ivi) proteins. About half of the identified immunoreactive proteins were confirmed or putative effector proteins being translocated into the host cell by T3SS. By these means *C. psittaci* is able to access and manipulate host cell processes as well as evade the host immune system. Despite sophisticated immune evasion strategies and the well-established developmental cycle within the inclusion, the host cell is capable of combating *C. psittaci* infection. In addition, *C. psittaci* is also dependent on the nutrients of the host.

The identified infection-associated proteins, i.e. the ABC importer, proteins of the type III-secretion apparatus as well as proteins of the folate biosynthesis pathway, the polymorphic membrane protein and other effector proteins being exclusively found in *C. psittaci* or at least being restricted to microorganisms, are interesting targets for future attempts to develop anti-chlamydial therapies or vaccines.

1 Einleitung

1.1 Chlamydien

Chlamydien bilden die Gruppe obligat intrazellulärer Bakterien, die durch einen charakteristischen biphasischen Entwicklungszyklus gekennzeichnet sind und zu den *Eubacteria* gehören (Moulder, 1966). Sie besitzen sowohl eine human- als auch tierpathogene Bedeutung.

1.1.1 Taxonomie

Innerhalb der letzten Jahre wurde die taxonomische Einteilung der Chlamydien mehrfach überarbeitet. Nachdem 1907 das Taxon „*Chlamydozoa*“ erstmalig erwähnt wurde (Halberstädter und von Prowazek, 1907), veröffentlichte Page 1966 eine Vereinheitlichung der bis dato bestehenden variierenden Nomenklaturen innerhalb der Familie *Chlamydiaceae* bzw. der Psittakose-Lymphogranuloma Venerum-Trachoma Gruppe (PLT) zu dem Genus *Chlamydia* (Page et al., 1966). Kurze Zeit darauf beschrieb er die Unterteilung der *Chlamydia* in die zwei Spezies *C. trachomatis* und *C. psittaci* (Page et al., 1968). Im Jahr 1999 erweiterte Everett die Ordnung *Chlamydiales* um die drei Familien *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* und *Waddliaceae* (Everett et al., 1999). Basierend auf den phylogenetischen Analysen der 16S rRNA und 23S rRNA Gene erfolgte innerhalb der *Chlamydiaceae* eine zwischenzeitliche Unterteilung der bis dahin bestehenden einzigen Gattung *Chlamydia* in *Chlamydia* und *Chlamydophila* (Everett et al., 1999), die im Jahr 2011 erneut zu Gunsten einer Gattung, *Chlamydia*, zusammengefasst wurden (Krieg et al., 2011; Kuo et al., 2011). Das Genus *Chlamydia* (*C.*) lässt sich weiterhin in die verschiedenen Spezies *C. trachomatis*, *C. muridarum*, *C. suis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. caviae*, *C. felis* und *C. pecorum* unterteilen (Krieg et al., 2011). Erst kürzlich wurden zwei neue aviäre Chlamydien, *C. avium* und *C. gallinaceae*, entdeckt (Sachse et al., 2014). Gemeinsam mit der Familie *Chlamydiaceae* gehören aktuell 7 weitere Familien zu der Ordnung *Chlamydiales* (Wheelhouse and Longbottom, 2012).

1.1.2 Lebenszyklus

Um sich in ihrem Wirt erfolgreich vermehren zu können, haben Chlamydien eine Strategie entwickelt, die ihr Überleben in der Zelle sichert aber gleichermaßen die Infektion einer anderen angrenzenden Zelle ermöglicht. Dazu können 2 morphologisch und funktionell verschiedene chlamydiale Formen unterschieden werden, die zu unterschiedlichen

Zeitpunkten im chlamydialen Entwicklungszyklus auftreten. Dieser Zyklus wird daher auch als biphasischer Zyklus bezeichnet. Die extrazellulären Elementarkörperchen (EBs) grenzen sich durch ihre kleinere Erscheinungsform (0,2-0,4 μm) und ihre Infektiosität von den metabolisch aktiven, intrazellulären, größeren (0,6-1,5 μm) und nicht infektiösen Retikularkörperchen (RBs) ab. Zudem kann die unterschiedlich starke Kondensation der Chromatinstruktur in EBs und RBs mit Hilfe der Elektronenmikroskopie zur Unterscheidung beider Formen hinzugezogen werden. Dabei lassen sich im Gegensatz zu den RBs mit einer eher aufgelockerten Kernstruktur die elektronendichten EBs als dunkle kreisförmige Formen darstellen.

Mit der Anheftung eines EBs an eine Wirtszelle wird die Aufnahme durch den Wirt über noch unbekannte Mechanismen initiiert. Verschiedene Mechanismen werden diskutiert, denen Wirtszellrezeptoren als auch chlamydiale Proteine, wie *Major outer membrane protein* (MOMP), *Heat shock protein 70* (HSP70), *Outer membrane complex protein B* (OmcB), *Polymorphic membrane protein D* (PmpD) oder Glykosaminoglykane zugrunde liegen (Hackstadt et al., 1985; Bavoil et al., 2000; Fadel und Eley, 2007; Menozzi et al., 2002; Mölleken et al., 2010; Su et al., 1990,1996; Wuppermann et al., 2001). In Folge dessen werden die EBs über Rezeptor-vermittelte Endozytose oder Phagozytose aufgenommen (Finlay und Cossart, 1997). In der Wirtszelle sind die EBs durch eine Membran-umhüllte Vakuole, der Inklusion, von dem sie umgebenden Zytoplasma abgeschirmt. Dabei wird eine Fusion mit den Lysosomen verhindert (Eissenberg et al., 1983). Die EBs differenzieren zu RBs, die sich in der Inklusion vermehren. Nach einiger Zeit erfolgt eine erneute, aber asynchrone Umwandlung der RBs zu EBs. Etwa 48-72 h nach der Adhäsion der EBs endet der Entwicklungszyklus *in vitro* und die entstandenen EBs werden durch Zelllyse oder Extrusion freigesetzt (Abb. 1; Harkinezhad et al., 2009; Hybiske und Stephens, 2007; Rockey et al., 1996b).

Dieser beschriebene Entwicklungszyklus kann z. B. durch die Gabe (unter anderem von subinhibitorischen Konzentrationen) von Antibiotika, Interferon- γ aber auch Eisen- oder Aminosäuremangel unterbrochen werden (Beatty et al., 1994; Wyrick, 2010). Die unter diesen Bedingungen induzierte intrazelluläre Persistenz führt zu einer Differenzierung atypischer Retikularkörperchen, die sich morphologisch als vergrößerte aberrante Körperchen (AB; Aberrant Body) von den chlamydialen RBs und EBs abgrenzen lassen. Diese sind nicht kultivierbar und nicht infektiös, stellen jedoch reversible Formen dar, die nach Entzug der Persistenzinduktoren, wieder in den akuten Entwicklungszyklus übergehen (Goellner et al.,

2006; reviewed in Hogan et al., 2004; Wyrick, 2010). Ein Zusammenhang zwischen dem chlamydialen Persistenzstadium und chronischen Erkrankungen durch Chlamydieninfektion wird diskutiert (reviewed in Hogan et al., 2004).

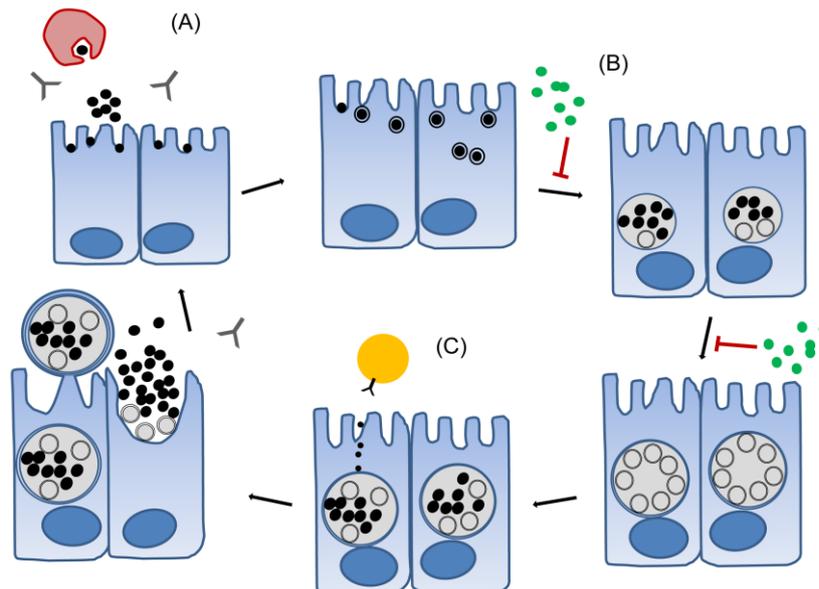


Abb. 1: Chlamydialer Lebenszyklus und mögliche Interventionen des Immunsystems der Wirtszelle. Chlamydiale Elementarkörperchen (EBs) werden internalisiert und differenzieren sich zu Retikularkörperchen (RBs). Nach Proliferation der RBs in einem Einschluss, der Inklusion, erfolgt die erneute Umwandlung in EBs. *C. psittaci* EBs werden nach etwa 48 h freigesetzt. Modifiziert nach Bastidas sowie Roan und Starnbach (Bastidas et al., 2013; Roan und Starnbach, 2008). **(A)** EBs werden von einer professionellen Antigen-präsentierenden Zelle bzw. Antikörpern attackiert; **(B)** Zytokine des Wirtes rekrutieren weitere Immunzellen oder inhibieren direkt den Entwicklungszyklus bzw. die Replikation von Chlamydien; **(C)** Präsentation prozessierter Peptide an eine CD8⁺ T-Zelle.

1.1.3 *C. psittaci*: Bedeutung und Besonderheiten

C. psittaci ist der Erreger der Psittakose bzw. Ornithose, einer Atemwegs- oder auch systemischen Erkrankung bei Papageien und anderen Vögeln (Andersen und Vanrompay, 2000; Kaleta und Taday, 2003). Das Pathogen zeichnet sich durch ein breites Wirtsspektrum aus, das neben Vögeln auch Säugetiere wie z. B. Rinder, Schweine, Schafe, Hunde, Katzen und Pferde (reviewed in Knittler et al., 2014) umfasst. Die Übertragung des Erregers von einem infizierten Tier auf den Menschen (Zoonose), stellt speziell für Menschen, die berufsbedingt in direkten Kontakt mit Exkrementen, respiratorischen Sekreten oder auch Federn eines infizierten Tieres kommen, eine Gefahrenquelle dar (Harkinezhad et al., 2009). Dabei wird das Pathogen hauptsächlich über den aerogenen Weg, aber auch über die unmittelbare Berührung übertragen. Bei einer aerogenen Infektion befällt *C. psittaci* primär die Epithelzellen der Luftsäcke bzw. der Lunge. In Folge einer Generalisation über das Blut

können viele andere Organe betroffen sein. In seinen natürlichen Wirten verursacht *C. psittaci* systemische Erkrankungen mit akuten, chronischen oder auch subklinischen Verläufen (Andersen und Vanrompay, 2000; Kaleta und Taday, 2003). Die Symptome beim infizierten Menschen ähneln denen einer Grippe-ähnlichen Erkrankung und können bis hin zu einer atypischen Pneumonie (Crosse, 1990; Cunha, 2006) und anderen schwerwiegenden Verläufen, wie Myokarditis, Hepatitis und Enzephalitis (Longbottom und Coulter, 2003; Pandeli und Ernest, 2006; Petrovay und Balla, 2008) reichen. Untersuchungen, mit denen geklärt werden sollte, weshalb aviäre Stämme von *C. psittaci* im Mensch virulenter sind als nicht-aviäre Stämme, lieferten bisher keine eindeutigen Schlüsse (reviewed in Knittler et al., 2014; Voigt et al., 2012). Es wird angenommen, dass ein Verlust der Virulenz der aviären Stämme mit der Passage im Säugetier einhergeht (reviewed in Knittler et al., 2014). Der Erregernachweis von *C. psittaci* während einer akuten Infektion (Ornithose) ist entsprechend §7 des Infektionsschutzgesetzes meldepflichtig (Robert-Koch-Institut, Berlin).

Eine vergleichende Analyse des *C. psittaci* Genoms mit denen anderer Spezies aus der Familie *Chlamydiaceae* resultierte in der Identifikation von 13 *C. psittaci*-spezifischen Genen. Zu diesen Genen zählen solche, die für Typ III-sekretierte Proteine, hypothetische Proteine, *Polymorphic membrane proteins* (Pmps) und Proteine der hypervariablen chlamydialen Plastizitätszone kodieren (Voigt et al., 2012). Den Genprodukten der beiden zuletzt genannten und genetisch hoch diversen Gruppen wird eine Funktion bei der Interaktion von Chlamydien mit ihren Wirtszellen und der chlamydialen Wirtspräferenz angedacht (reviewed in Knittler et al., 2014; Voigt et al., 2012).

1.2 Wirt-Pathogen Wechselwirkungen

Die Interaktion eines Pathogens mit seinem Wirt ist ein komplexer Vorgang, bei dem die unterschiedlichen Lebensformen und Strategien beider Partner sich entscheidend auf den Infektionsverlauf auswirken können. Gerade intrazelluläre Bakterien wie z. B. Chlamydien kommunizieren über eine Vielzahl von Proteinen mit der Wirtszelle, um einerseits ihr Überleben in den frühen Stadien des Entwicklungszykluses zu sichern und andererseits ihre Verbreitung durch die Infektion neuer Zellen gegen Ende des Entwicklungszykluses zu gewährleisten. Das Immunsystem des Wirtes versucht dabei das Pathogen zu bekämpfen und die Infektion einzudämmen. In den folgenden Kapiteln wird nun auf die Interaktion von *C. psittaci* mit seinem Wirt genauer eingegangen.

1.2.1 Eingreifen in Wirtszellprozesse und Immunevasion durch Chlamydien

Die Aufnahme von Chlamydien in ihre eukaryotische Wirtszelle wurde bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Es wird angenommen, dass EBs zunächst über eine reversible Interaktion an die Wirtszelle adhären und in einem zweiten Schritt irreversibel an einen Rezeptor binden (Dautry-Varsat et al., 2005). Die Beteiligung von chlamydialen MOMP, OmcB, PmpD und HSP70 bzw. Heparansulfat-Proteoglykan, dem Mannose-Rezeptor, dem Mannose 6-Phosphat-Rezeptor, dem Estrogen-Rezeptor, der Protein-Disulfid-Isomerase, Clathrin und Cholesterinreiche/Lipid-Mikrodomänen auf Seiten des eukaryotischen Wirtes werden in diesem Zusammenhang diskutiert (reviewed in Bastidas et al., 2013; Norkin et al., 2001; Jutras et al., 2003; Gabel et al., 2004). Die Internalisierung von *C. trachomatis* EBs in die Wirtszelle geht mit einer Reorganisation des Aktin-Zytoskelettes einher (z. B. Dautry-Varsat et al., 2005; Scidmore, 2011) und wird unter anderem durch das chlamydiale T3SS translozierte Effektorprotein *Translocated actin-recruiting phosphoprotein* (TARP) vermittelt (Jewett et al., 2006, 2010). *In-vitro*-Experimente zeigten, dass über die C-terminale WH2 Domäne von TARP Aktinfilamente direkt an die Internalisierungsstelle rekrutiert werden (Jewett et al., 2006). Außerdem kann über die Phosphorylierung der Tyrosinreste des EB-assoziierten TARP und die Bindung von Rac-GEFs (*guanin nucleotide exchange factors*) die Rac-abhängige Signalkaskade und damit die Aktin-Maschinerie aktiviert werden (Clifton et al., 2005; Lane et al., 2008). Die internalisierten EBs sind in einem Vakuolen-artigen Kompartiment organisiert, dessen umgebende Membran durch den Einbau von Typ III-sekretierten *Inclusion membrane proteins* (Incs) so modifiziert wird, dass sie vor der Fusion mit dem Lysosom und damit einem Abbau durch die Wirtszelle schützt (Fields und Hackstadt, 2002). In dieser intrazellulären Nische, der Inklusion, replizieren die Chlamydien. Über die Interaktion mit dem Zytoskelett des Wirtes gelangt die Inklusion in die Nähe des *Microtubule-organizing center* (MTOC; Böcker et al., 2014; Hackstadt et al., 1996). Für *C. psittaci* konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Kollokalisierung des Wirtspotein Snapin mit dem chlamydialen IncB und dem Motorprotein Dynein an der Inklusion *C. psittaci*-infizierter HEp-2-Zellen gezeigt werden (Böcker et al., 2014). Es wird vermutet, dass der Transport der Inklusion entlang der Mikrotubuli durch das Wirtspotein Snapin vermittelt wird, indem dieses mit dem chlamydialen IncB und dem Motorprotein Dynein interagiert (Böcker et al., 2014). Snapin gehört zu den *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor* (SNARE) assoziierten Proteinen (Ilardi et al., 1999). Proteine mit SNARE-Motifen sind in der eukaryotischen Zelle an der Fusion von Vesikeln und Organellen beteiligt, z. B. während einer Exozytose oder auch bei der

Fusion mit einem Lysosom. Bei *C. trachomatis* wurden Proteine mit SNARE-ähnlichen Motiven identifiziert, unter anderem IncA, CT223 und CT813 (Delevoeye et al., 2008). In der infizierten Zelle führt diese Nachahmung zur Interaktion mit verschiedenen SNARE Proteinen aus dem endosomalen Weg des Wirtes und damit zur Akkumulation von intrazellulären Kompartimenten an der Inklusion (Delevoeye et al., 2008). Ebenfalls wurde in einem *In-vitro*-Liposomen-Fusions-Assay die endozytotische SNARE-vermittelte Membranfusion in den eukaryotischen Zellen durch das chlamydiale IncA gehemmt (Paumet et al., 2009). Die IncA-abhängige Manipulation von verschiedenen Membran-Fusionseventen trägt dabei zum Wachstum der Inklusion und dem Überleben der Chlamydien in der Inklusion innerhalb der Wirtszelle in entscheidendem Maße bei. Zudem interagieren die Proteine der Inklusion mit Rab GTPasen, die sowohl mit Recycling-Endosomen assoziiert sind als auch den Transport von Vesikeln zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Golgi Apparat regulieren (*membrane traffic*) (reviewed in Bastidas et al., 2013; Hutagalung und Novick, 2011). Damit tragen die Rab Proteine zur Akquirierung von Sphingomyelin und Eisen bei (Capmany und Damiani, 2010; Ouellette und Carabeo, 2010; Rejman Lipinski et al., 2009; Rzomp et al., 2003). Die Zufuhr von Lipiden und anderen Nährstoffen aus der Wirtszelle dient sowohl der Vermehrung der chlamydialen RBs innerhalb der Inklusion als auch der Stabilität der Inklusion. Heuer und Kollegen klärten dazu den Mechanismus auf, der *C. trachomatis* ermöglicht die Lipide der Wirtszelle für die Inklusion verfügbar zu machen (Heuer et al., 2009). Sie demonstrierten, dass die Infektion von humanen Epithelzellen mit *C. trachomatis* in einer Fragmentierung des Golgi Apparates resultierte, dessen Fragmente sich um die Inklusion lokalisierten (Heuer et al., 2009). Der Einbau von Sphingolipiden in die Inklusionsmembran von *C. trachomatis* ist für die Stabilität und das Wachstum der Inklusion essentiell (Elwell et al., 2011). Für *C. psittaci* wurde die Fragmentierung ohne eine anschließende Rekrutierung der Golgi Fragmente um die Inklusion gezeigt (Knittler et al., 2014). Außerdem interagiert die *C. trachomatis* Inklusion mit weiteren Organellen, wie *Multivesicular bodies* (MVBs), Lipidtröpfchen und Lysosomen, die neben Sphingolipiden und Cholesterol auch als Quellen für neutrale Lipide und essentielle Aminosäuren dienen könnten (Beatty 2006; Kumar et al., 2006; Ouellette et al., 2011). Eine Assoziation mit Mitochondrien wurde bisher nur für *C. psittaci* und *C. caviae* beschrieben (Matsumoto et al., 1991; Derré et al., 2007).

Mitochondrien spielen eine wesentliche Rolle bei der Apoptose, dem sogenannten programmierten Zelltod. Chlamydien sichern ihr Überleben in der Wirtszelle indem sie in den Apoptose-Signalweg eingreifen (Byrne und Ojcius, 2004; Miyari und Byrne, 2006). In

mehreren Studien wurde die Spaltung von verschiedenen proapoptotischen Proteinen und damit eine Hemmung der Apoptose durch die chlamydiale Serin-Protease CPAF (*Chlamydial Protease/proteasome-like activity factor*) beschrieben (Dong et al., 2005; Fischer et al., 2001; Pirbhai et al., 2006; Ying et al., 2005). Da dies jedoch zumindest für Puma, Bik und Bim auf eine enzymatische Aktivität von CPAF während der Zellyse zurückgeführt werden konnte und damit widerlegt wurde, bleibt die Funktion des Proteins fragwürdig (Chen et al., 2012). Sicher ist jedoch, dass in *C. trachomatis*-infizierten Zellen die Freisetzung von Cytochrom C, einem zentralen Schritt im Apoptose-Programm, und die Aktivierung des Enzyms Caspase-3 der downstream-geschalteten Caspase-Kaskade inhibiert sind (Fan et al., 1998). Ein weiterer Chlamydien-induzierter anti-apoptotischer Effekt wird auch für die spezifische Interaktion des IncG von *C. trachomatis* mit dem humanen 14-3-3 β Protein angenommen, indem proapoptotisch-wirkendes Bad über 14-3-3 β an der Inklusion gebunden wird (Scidmore und Hackstadt, 2001; Zha et al., 1996). Bei *C. psittaci* und *C. pneumoniae* fehlt das funktionelle Homolog von IncG und damit auch die entsprechende Assoziation mit 14-3-3 β (Scidmore und Hackstadt, 2001). Entgegen der zuvor beschriebenen Inhibition einer frühzeitigen Apoptose, wird am Ende des chlamydialen Entwicklungszyklus der Zelltod induziert (Byrne und Ojcius, 2004; Ying et al., 2007). Versuche diese atypische Form des Zelltodes zu definieren, führten zu verschiedenen Bezeichnungen, z. B. Caspase-unabhängige Apoptose oder auch Aponekrose (Perfettini et al., 2002; Dumrese et al., 2005). Auf der Suche nach weiteren Modulatoren der Wirtszellapoptose wurde mit Hilfe bioinformatischer Analysen das *Chlamydia protein associating with death receptors* (CADD) entdeckt (Stenner-Liewen et al., 2002). Die ektopische Expression des Proteins führte in den verschiedenen humanen Zellen zum programmierten Zelltod, wohingegen in den infizierten Zellen eine Kolokalisation von CADD mit Fas, einem Ligand der *Tumor necrosis factor* (TNF)-Rezeptorfamilie, nahe der chlamydialen Inklusion detektiert werden konnte, jedoch eine Aktivierung der Apoptose-Signalkaskade nicht erfolgte (Stenner-Liewen et al., 2002). Es wird vermutet, dass die beobachtete Hemmung bzw. Stimulierung der Apoptose abhängig von der subzellulären Lokalisation von CADD ist (Stenner-Liewen et al., 2002).

Eine weitere chlamydiale Strategie ist die Modulation der Immunreaktion. Chlamydien inhibieren die Signalwege des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der in der nicht infizierten Zelle vielfältige Funktionen, z. B. die Regulation der Immunantwort und der Entzündungsreaktion sowie der Zellproliferation und des Zelltodes, erfüllt. In infizierten Zellen ist die Translokation von NF- κ B in den Zellkern durch die Spaltung von p65/RelA, der Untereinheit von NF- κ B,

blockiert (Lad et al., 2007a). Die dazu beschriebene *Tail-specific protease* (Tsp) CT441-vermittelte Spaltung von p65/RelA (Lad et al., 2007b) wurde etwas später von der CPAF-abhängigen Spaltung in den Hintergrund gerückt (Christian et al., 2010). Ob *In-vivo*-Experimente eine Proteolyse durch das sekretierte CPAF bestätigen können oder ob es sich um einen *In-vitro*-Artefakt handelt, ist unklar (Chen et al., 2012). Ebenfalls wird eine Inhibition der NF- κ B Aktivierung durch die Chlamydien kodierten Proteine ChlaDub1 und ChlaDub2 angenommen (Le Negrate et al., 2008; Misaghi et al., 2006). ChlaDub1 bindet an die inhibitorische Untereinheit I κ B α und unterbindet damit dessen Ubiquitinierung und Proteasom-vermittelte Degradation (Le Negrate et al., 2008).

Chlamydien haben eine Reihe von Strategien entwickelt um dem Immunsystem des Wirtes zu entfliehen. Dabei stellen gerade diese Mechanismen optimale Angriffsziele für die Entwicklung von Diagnostika oder anderen Interventionsansätzen dar.

1.2.2 One Health – das Rindermodell

Das Rindermodell wurde eingeführt um die Pathogenese von *C. psittaci* und die damit verbundenden Konsequenzen unter biologisch relevanten Bedingungen aufzuklären (Reinhold et al., 2012). Dazu wurden Rinder als natürliche Wirte mit dem Pathogen, einem Rinderisolat, intrabronchial infiziert und während des Verlaufes der akuten Infektion den verschiedenen Analysen unterzogen. Mit den Ergebnissen wurden Kenntnisse über die molekularen und physiologischen Prozesse während der Infektion, das zoonotische Potential des Erregers, die angeborene Immunantwort und die Akute-Phase-Reaktion des Wirtes (siehe Kapitel 1.3.3 „Immunantwort des Wirtes“) sowie erste Anhaltspunkte zur humoralen Immunreaktion gewonnen (Ostermann et al., 2013a,b,2014; Reinhold et al., 2012). Der Vergleich der genetischen, immunbiologischen und anatomischen Gegebenheiten im bovinen und im humanen Wirt erlaubt es Rückschlüsse auf das Infektionsszenario im Menschen zu ziehen. So ähneln sich Mensch und Rind auf diesen drei Ebenen mehr als Mensch und Maus, bei denen unter anderem große Unterschiede in der angeborenen und erworbenen Immunität existieren (Mestas und Hugges, 2004; Reinhold et al., 2012). Ebenso sind das Lungenvolumen und die Luftmenge von erwachsenen Menschen und Kälbern durch ein vergleichbares Körpergewicht ähnlich (Reinhold et al., 2012). Anatomische Besonderheiten der Rinderlunge sind die starke Segmentierung der Lungenareale und die Unabhängigkeit d. h. Unverbundenheit dieser, so dass bei einer Ventilationsstörung eine Kompensation durch eine Kollateralventilation nicht eintritt (Reinhold 1997). Zudem bietet dieses Großtier-Modell

die Möglichkeit der mehrfachen Probenahme zu den verschiedenen Zeitpunkten und damit einer Beobachtung, dem sogenannten Monitoring, verschiedener Parameter (Knittler et al., 2014). Ferner stellt es die Grundlage für zukünftige Vakzinierungsstudien dar (Knittler et al., 2014). Das bovine Modell der Infektion der Atemwege mit *C. psittaci* lässt sich folgendermaßen charakterisieren: i) Dosisabhängige Schwere der Erkrankung der Kälber, gekennzeichnet durch milde Symptome bei der Applikation von 10^6 ifu/Kalb und schwere Verläufe bei 10^9 ifu/Kalb; 10^8 ifu/Kalb resultieren 2-3 d p. I. in einer akuten Infektion, die mit einer lokalen Entzündungsreaktion einhergeht und sich ab 3 d p. I. als fibrinopurulente Bronchopneumonie mit nekrotisierendem Lungengewebe (etwa 15%) manifestiert, ab 7 d p. I. Regeneration des nekrotischen Gewebes mit Einstrom von DCs, Makrophagen, B- und T-Lymphozyten und Plasmazellen, 14 d p. I. Regeneration weitestgehend, aber noch nicht komplett, abgeschlossen (Ende der Studie) sowie Eliminierung *C. psittaci* durch eine starke lokale Immunreaktion; ii) Funktionsstörung der Lunge, insbesondere des Gasaustauschs; iii) Leukozytose im Rahmen der angeborenen Immunantwort und eine LBP-vermittelte Akute-Phase-Reaktion; iv) Übertragung des Pathogens von infizierten Rindern auf naive Kontroll-Tiere (Sentinel-Tiere); v) Subklinische Verläufe bei Sentinel-Tieren; vi) *C. psittaci*-infizierte Tiere sind nicht zwangsläufig seropositiv; vii) Ausschluß von Medium- und LPS-Effekten sowie Koinfektionen (Ostermann et al., 2013a,b,2014; Reinhold et al., 2012).

1.2.3 Immunantwort des Wirtes

Trotz der mannigfaltigen Strategien, die Chlamydien entwickelt haben um in ihrem Wirt zu überleben und sich vor dessen Immunsystem zu verstecken, versucht auch der Wirt diesem entgegen zu wirken und das Pathogen zu bekämpfen. Oft geht dies mit einer Entzündungsreaktion einher. Ein besonderes Augenmerk wird nun auf die *In-ovo*- und *In-vivo*-Studien mit *C. psittaci* gelegt. Generell können die angeborene und die erworbene Immunantwort unterschieden werden. Im Sinne der angeborenen Immunantwort stellt die Schleimhaut die erste Verteidigungslinie des Wirtes dar. Wird diese physische Barriere erfolgreich überwunden und die chlamydiale Infektion manifestiert sich in den Epithelzellen, kommt es zur einer lokalen Ausschüttung verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, z. B. Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, Tumornekrosefaktor (TNF)- α , durch die infizierte Wirtszelle (Rasmussen et al., 1997). Grundlage für diese Reaktion ist die Erkennung von konservierten Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) durch die entsprechenden Rezeptoren auf Makrophagen oder dendritischen Zellen. Beispiele dafür sind die Bindung des chlamydialen LPS durch den Toll-like Rezeptor (TLR) 4 (Heine et al., 2003;

Prebeck et al., 2001) oder auch des chlamydialen HSP60 durch TLR4 und TLR2 (Bulut et al., 2002, 2009; Vabulas et al., 2001).

Neben dem Auftreten pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, können auch antimikrobiell wirkende reaktive Sauerstoffspezies (ROS) im Laufe der Infektion detektiert werden (D'Autréaux und Toledano, 2007). Die Zytokin/Chemokin-bedingte Rekrutierung von phagozytierenden Zellen und Zellen, die fähig sind Antigene zu präsentieren, kann im *C. psittaci*-infizierten Rind mittels zytologischer Analyse der bronchoalveolären Lavage (BALF) gemessen werden (Reinhold et al., 2012). Der Einstrom von größtenteils Neutrophilen 2-3 d p. I. sowie alveolären Makrophagen und Lymphozyten konnte für die bronchoalveolären Kompartimente des Rindes gezeigt werden (Ostermann et al., 2013a; Reinhold et al., 2012). Kürzlich wurden Untersuchungen mit *C. psittaci* am embryonierten Hühnerei durchgeführt, die den Influx von Makrophagen und $\gamma\delta$ T-Zellen in die embryonalen Organe zeigten (Braukmann et al., 2012). Mit der Zunahme der rekrutierten Immunzellen können wiederum vermehrt inflammatorische Zytokine, z. B. TNF- α oder Interferon- γ (IFN- γ), gebildet werden. Bei *C. trachomatis*-infizierten Epithelzellen führt TNF- α zu einer massiven Reduktion des bakteriellen Wachstums *in vitro* (Dessus-Babus et al., 2002). IFN- γ fungiert bei der Aktivierung von Makrophagen und bei der Produktion von Stickstoffmonoxid durch die Hochregulierung der induzierbaren Stickstoffmonoxid Synthase iNOS. Damit richtet sich die antimikrobielle Wirkung von IFN- γ sowohl gegen extrazelluläre EBs als auch intrazelluläre Chlamydien (Chen et al., 1996; Igietsme et al., 1996). Zudem spielt IFN- γ bei der Entstehung einer erworbenen Immunität eine wesentliche Rolle. Für *C. psittaci* wurde die Induktion der Persistenz *in vitro* durch IFN- γ beschrieben (Goellner et al., 2006). In Leber, Milz und der Chorion-Allantois-Membran (CAM) von *C. psittaci*-infizierten Hühnerembryonen konnten signifikant erhöhte Transkriptmengen verschiedener Immunmediatoren, u. a. IL-1 β , IL-8, iNOS, LPS-induzierter Tumornekrosefaktor α (LITAF), IL-12, IL-18 und auch IFN- γ , nachgewiesen werden (Braukmann et al., 2012; Knittler et al., 2014). Die embryonale Immunreaktion lässt sich als eine frühe und akute Entzündungsreaktion charakterisieren (Braukmann et al., 2012). Die beim infizierten Rind im Rahmen der unspezifischen Immunantwort induzierte akute Entzündungsreaktion kann in der Lunge durch den Verlust der Integrität der Kapillarwand von Alveolen bzw. einer Permeabilität der Lungengefäße wahrgenommen werden und sich zu einer Nekrose manifestieren (Reinhold et al., 2012). In Abhängigkeit von der infektiösen Dosis wurde eine Reorganisation des befallenen Gewebes 14 d p. I. detektiert (Reinhold et al., 2012). Erhöhte Level von Leukozyten und LPS-Bindeprotein (LBP) im Blut bleiben auch nach

dem Abflammen der akuten Symptome bestehen und deuten auf eine erweiterte subklinische Phase hin, wie es auch bei natürlich infizierten Kälbern zu beobachten ist (Knittler et al., 2014; Ostermann et al., 2013a). In dem regenerierenden Gewebe konnten zum Zeitpunkt 10 d p. I. Infiltrate bestehend aus dendritischen Zellen (DC), Makrophagen, T- und B-Zellen als auch Plasmazellen beobachtet werden (Knittler et al., 2014). Da die dendritische Zellen ebenfalls chlamydiale Antigene T-Zellen präsentieren können (Steele et al., 2004) und damit extrem potente Stimulatoren von T-Zellen darstellen (Thacker und Janssen, 2012), bilden sie eine Brücke zwischen der angeborenen unspezifischen und der erworbenen Immunantwort. Die Initiierung der adaptiven Immunantwort beruht dabei auf der Präsentation von Antigenen durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC). Mit Hilfe *C. psittaci*-infizierter DCs in der Maus wurde dazu ein alternativer Weg der Antigenprozessierung über eine amphisomale Degradation, d. h. eine Preprozessierung von Chlamydien in einem Hybrid-Organell aus Autophagosom und MHC I-enthaltenden Endosom, mit anschließendem Reimport in den endosomalen Weg zur Beladung von MHC I, die sogenannte MHC I-vermittelte Kreuz-Präsentation, aufgeklärt (Fiegl et al., 2013). Dies ermöglicht die MHC I-Präsentation von intrazellulären Pathogenen ohne einen Wettstreit mit dem klassischen MHC I-Weg im ER, der für die Präsentation von zytosolischen Antigenen, z. B. Incs und sekretierten chlamydialen Proteinen, etabliert wurde, einzugehen (Fiegl et al., 2013). Dem voran ist eine Beeinträchtigung der Integrität der chlamydialen Inklusion und damit die Freisetzung von Chlamydien ins Zytosol gestellt (Fiegl et al., 2013). Es wird angenommen, dass eine gestörte Translokation von CPAF in Folge einer IFN- γ induzierten Einschränkung des chlamydialen Wachstums der amphisomalen Degradation zu Grunde liegt (reviewed in Knittler et al., 2014). Zudem unterliegt die Expression von MHC I der Kontrolle durch TNF- α (Fiegl et al., 2013), das im Rahmen der TLR2-Signalkaskade gebildet wird (Prebeck et al., 2001). *In-vitro*-Studien bestätigten weiterhin, dass die chlamydiale Infektion per se und unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von IFN- γ keinen Einfluss auf die MHC I Expression und Oberflächenpräsentation von Epithelzellen hat (Kägebein et al., 2014). Die Aktivierung zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen durch MHC I und deren IFN- γ Produktion werden mit der Lyse infizierter Zellen und einem protektiven Effekt gegen Chlamydien in Zusammenhang gebracht (Balsara und Starnbach, 2007; Starnbach et al., 1994). Die Antigen-präsentierenden DCs tragen nicht nur zur Differenzierung der naiven T-Zellen in die CD8⁺ T-Zellen, sondern auch in die CD4⁺ T-Helferzellen bei. Diese unterstützen entweder die zelluläre Immunantwort, bei der Th1-Zellen durch die Sekretion von IFN- γ sowohl Makrophagen aktivieren als auch die Produktion von B-Zellen ankurbeln können, oder die humorale Immunantwort, bei der

Th2-Zellen über die Interaktion mit B-Zellen die Produktion und Ausschüttung spezifischer Antikörper induzieren. Mittels Western Immunblotting konnte das Einsetzen der generell schwachen humoralen Immunantwort von *C. psittaci*-infizierten Rindern in dem Zeitraum 7-14 d p. i. festgestellt werden (Ostermann et al., 2013a; Reinhold et al., 2012). In Anaphylatoxin C3a Rezeptor (C3aR) *Knockout* Mäusen, denen Hyperimmunserum vor der Infektion der Lunge mit *C. psittaci* verabreicht wurde, zeichnete sich die protektive Wirkung von Antikörpern bei einer Reinfektion ab (Dutow et al., 2014). Die Studie deutet zudem an, dass das Komplementsystem bzw. dessen Faktoren C3a/C3aR bei einer Infektion mit *C. psittaci* an der Entwicklung einer effektiven adaptiven Immunantwort beteiligt sind und eine protektive Funktion ausüben (Dutow et al., 2014). Damit wird dem Komplementsystem, das klassischerweise z. B. durch extrazelluläre Pathogene im Rahmen der angeborenen Immunantwort aktiviert wird und die Entzündungsreaktion moduliert, eine neue Rolle zu Teil.

Analysen zur humoralen Immunantwort bzw. die Identifizierung von chlamydialen Antigenen, die *in vivo* exprimiert werden, existieren fast ausschließlich für *C. trachomatis* (z. B. Cruz-Fisher et al., 2011; Follmann et al., 2008; Forsbach-Birk et al., 2010; Sharma et al., 2006; Wang et al., 2009,2010) sowie in geringerem Maße auch für *C. pneumoniae* (Fong et al., 2002; Iijima et al., 1994) und *C. abortus* (Forsbach-Birk et al., 2013). MOMP (Caldwell und Judd, 1982; Zhang et al., 1989), IncA (Rockey et al., 1995), LPS (Kaltenboeck et al., 1997; Perez-Martinez et al., 1986) und das 60/62 kDa OmcB (Hatch et al., 1984; Watson et al., 1994) sind prominente Beispiele immundominanter Proteine von *C. psittaci* und anderen Chlamydien. Mit Hilfe des Serum *C. psittaci*-infizierter Meerschweinchen wurde zudem das 28 kDa *Macrophage infectivity potentiator* (Mip) entdeckt (Rockey et al., 1996a). Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher der Fokus auf die Antigene von *C. psittaci*, die *in vivo* d. h. im Kalb induziert und von dem Immunsystem erkannt werden, gelegt werden.

1.3 Identifizierung Infektions-assoziiierter Gene mit Fokus auf die *In vivo induced antigen technology* (IVIAT)

Verschiedene Techniken wurden entwickelt um gezielt bakterielle Gene identifizieren zu können, die während einer Infektion exprimiert werden. Mit der Entdeckung neuer Virulenzfaktoren sollen pathogenetische Mechanismen aufgeklärt werden und alternative Vakzinierungsstrategien entwickelt werden. Eine Möglichkeit Antigene von pathogenen Mikroorganismen zu identifizieren, die *in vivo* induziert werden, bietet die sogenannte *In vivo induced antigen technology* (IVIAT). Diese immunologische Screening Technik beruht auf der

Erkennung von Antigenen durch Antikörper aus Seren infizierter Tiere oder auch Patienten. In Kombination mit einer Abreicherung der Seren von Antikörpern, die generell vorhandene Antigene binden, fokussiert diese Methode solche Antikörper-Antigen-Reaktionen, die die *In-vivo*-Situation nachempfinden.

1.3.1 Überblick und Bedeutung

Neben der *In vivo expression technology* (IVET; Mahan et al., 1993; Angelichio und Camilli, 2002), *Signature-tagged mutagenesis* (STM; Hensel et al., 1995), *Differential fluorescence induction* (DFI; Validivia und Falkow, 1997), Transkriptionsstudien sowie Proteom Analysen, wurde 2005 IVIAT (Rollins et al., 2005) etabliert. Im Prinzip stellt IVIAT ein immunologisches Screening dar, bei dem eine genomische Expressionsbank eines Pathogens erstellt und mit dem entsprechenden und adsorbierten Serum infizierter Patienten oder Tiere gescreent wird (Abb. 2). Optimalerweise wird dazu das Serum mehrerer, mit dem gleichen Pathogen, infizierter Patienten oder Tiere mit unterschiedlichen Infektions-Verläufen oder klinischen Symptomen gepoolt und in einer Reihe von Adsorptionen mit dem *in vitro* kultivierten Pathogen und dem verwendeten Expressionsstamm von „unspezifischen“ Antikörpern abgereichert. Das Serum enthält nach dieser Behandlung nur noch Antikörper, die *in vivo* d. h. während der Infektion durch das Pathogen gebildet wurden. Gleichermaßen ist das Vorhandensein von *in vivo* produzierten Antikörpern eine Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieser Technik. Schließlich wird das adsorbierte Serum eingesetzt um die Antigene zu erkennen, die ausschließlich während einer Infektion im Wirt vom Pathogen gebildet werden und damit eine spezifische Immunantwort auslösen.

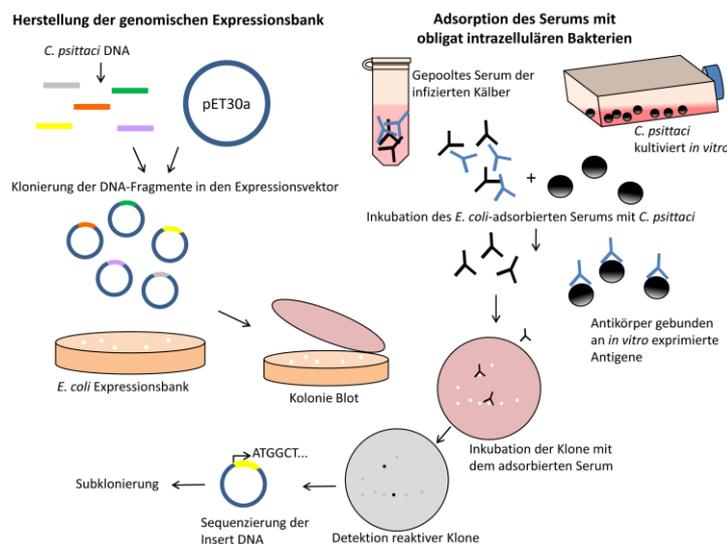


Abb. 2: IVIAT. Schematische Darstellung.

Im Gegensatz zu IVIAT basiert IVET auf homologer Rekombination bei der Plasmide mit DNA-Fragmenten eines Pathogens und einem Promotor-losen Reporter-gen mittels Konjugation in das Pathogen transferiert und anschließend in das Genom integriert werden. Nach der Infektion eines Wirtes mit dem rekombinanten Pathogen werden die Reporter-gene nur aktiviert, wenn der Promotor des entsprechenden upstream gelegenen Gens *in vivo* angeschaltet wird. Diese transkriptionelle Fusion wird auch als Promotor-Trap Konstrukt bezeichnet (Springer, 2000). Auf diese Weise wurden zuerst bei *Salmonella typhimurium* Gene identifiziert, deren Expression während einer Infektion induziert wird (Mahan et al., 1993).

STM beruht auf negativer Selektion. Dabei werden mittels individuell getaggtter Transposons Gene des Pathogens zufällig mutiert und ein Pool dieser rekombinanten Pathogene einem Tier im entsprechenden Modell verabreicht. Die Transposon-bedingte Inaktivierung eines essentiellen Virulenzgens führt zum Absterben des Pathogens im Wirt. Über den fehlenden Nachweis des entsprechenden Rekombinanten im Wirt, kann das Virulenzgen aus dem ursprünglich eingesetzten Pool identifiziert werden.

Bei DFI wird das Promotor-lose *green fluorescent protein (gfp)*, ähnlich dem Promotor-Trap Prinzip bei IVET, an die fragmentierte chromosomale DNA des zu untersuchenden Pathogens gekoppelt. Wird ein spezifischer Promotor des Pathogens unter bestimmten Bedingungen aktiviert, wird ebenfalls GFP exprimiert und das fluoreszierende Pathogen kann im *Fluorescence-activated cell sorting (FACS)* isoliert werden.

Zudem bieten Proteom Analysen mittels Proteom Microarray (Bina et al., 2003) oder auch 2D Gel (Forsbach-Birk et al., 2013) die Möglichkeit Virulenzfaktoren zu identifizieren ohne die genetische Manipulation eines Pathogens zu erfordern. Die Grundlage dazu bietet die kombinierte Anwendung des Microarrays oder 2D Gels zusammen mit einem serologischen Screening. Ein Spezialfall ist der *Self-assembling protein microarray* oder auch *nucleic acid programmable protein array (NAPPA-Microarray)* bei dem die rekombinanten Plasmide mit der Protein-kodierenden cDNA des Pathogens zusammen mit einem anti-Tag-Antikörper auf dem Microarray immobilisiert (gespottet) werden und *in situ* translatiert werden (Ramachandran et al., 2004). Die exprimierten Proteine werden über einen Fusionstag an den Microarray-gekoppelten Antikörper gebunden und mit dem zu untersuchenden Serum inkubiert (Ramachandran et al., 2008).

Alle hier genannten Techniken können eingesetzt werden um neue Infektions-assoziierte Marker aufzuspüren. Dennoch bietet das Screening einer Expressionsbank mittels IVIAT mehrere Vorteile, aber auch einige wenige Nachteile gegenüber den weiteren genannten Strategien und Techniken. Im Gegensatz zu IVET, STM und DFI erfordert IVIAT kein Screening lebender Tiere. Dennoch wird oft gerade dieser direkte Bezug zu *in vivo* bei diesen drei Techniken hervorgehoben, da z. B. die gegebenen Gewebebarrieren und das Immunsystem des Tieres ein natürliches Szenario widerspiegeln sollen. Daraus gezogene Rückschlüsse auf die humane Situation bleiben zu klären. Zudem ist die Detektierbarkeit eines Gens bei IVIAT nicht vom Transkriptionszeitpunkt im infizierten Tier abhängig und auch eine genetische Manipulierbarkeit eines Pathogens wird nicht vorausgesetzt. Eine Herausforderung stellen in vielerlei Hinsicht die Transkriptionslevel der zu untersuchenden Gene dar. Niedrig exprimierte Gene und konstitutiv exprimierte Gene werden mit IVIAT und den anderen Techniken nicht berücksichtigt. Der NAPPA Microarray bietet eine Strategie bei der reproduzierbare Transkriptionslevel und optimierte physiochemische Bedingungen gewährleistet werden (Ramachandran et al., 2004). Jedoch gibt es auch einige Schwächen des NAPPA Microarrays, IVIATs und anderer Methoden, die auf heterologer Expression im bakteriellen System beruhen, z. B. eine eventuell veränderte dreidimensionale Struktur des exprimierten Proteins, eine abweichende Aktivität des Proteins sowie die fehlende posttranslationale Modifikation des Proteins entsprechend der in Eukaryoten. Sind räumliche und zeitliche Verteilungsmuster der Genexpression von Virulenzfaktoren im Wirt von Interesse, eignen sich heterologe bakterielle Expressionssysteme ebenfalls nicht. 2D-Immunblots, die für die Identifizierung von Virulenzfaktoren eingesetzt werden, erfordern scheinbar wenige, aber dennoch ausschlaggebende Kriterien. Geeignetes und ausreichend vorhandenes biologisches Material, das im Gel analysiert werden soll und damit die zur Verfügung stehende Proteinmenge sind die Hürde. Ergebnisse aus Genexpressionsanalysen, die putative Virulenzfaktoren identifizieren, verlangen Bestätigungsexperimente auf einer funktionellen Ebene.

Trotz einiger Schwächen hebt sich IVIAT von allen anderen Strategien ab, indem dieses high-throughput Screening mit dem gepooltem und adsorbierten Serum i) mögliche Schwankungen von individuellen Immunantworten kompensiert bzw. abdeckt; ii) verschiedene Infektionsverläufe und Symptomatiken einschließt; iii) kein Tiermodell erfordert; iv) die Verwendung attenuierter Stämme für die Erstellung der Expressionsbank ermöglicht, in Kombination mit dem Patienten- oder Tier-Serum, das auf der Infektion mit

dem virulenten Erreger basiert und schließlich v) *in vivo*-induzierte immunogene Antigene identifiziert, auf relativ schnelle, einfache und kostengünstige Art und Weise.

1.3.2 IVIAT – Anwendungsbeispiele

Bis heute wurden hauptsächlich Bakterien aber auch Parasiten und Pilze mit IVIAT oder dessen abgewandelter Methode, *Change mediated antigen technology* (CMAT), untersucht. Sowohl Gram-negative als auch Gram-positive pathogene Bakterien, die zum Teil eine fakultativ intrazelluläre Lebensweise haben, zählen dazu.

IVIAT wurde an humanpathogenen Bakterien, wie dem Typhus-Erreger *Salmonella enterica* Serovar Typhi als auch dem Erreger des Paratyphus *Salmonella enterica* Serotype Paratyphi A (Alam et al., 2013; Harris et al., 2006), dem Erreger der Cholera *Vibrio cholerae* (Hang et al., 2003) oder dem Erreger des Milzbrands *Bacillus anthracis* (Rollins et al., 2008) angewendet. In weiteren Studien wurden die zoonotischen Bakterien *Mycobacterium tuberculosis* (Deb et al., 2002; Kumar et al., 2011), *Streptococcus suis* (Gu et al., 2009) und *Brucella abortus* (Lowry et al., 2010) sowie Streptokokken der Gruppe A (Salim et al., 2005), uropathogene *E. coli* (Vigil et al., 2011), enterohämorrhagische *E. coli* O157:H7 (John et al., 2005), parodonto-pathogene Erreger *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Song et al., 2002) und *Taennergella forsythia* (Yoo et al., 2007), sowie das opportunistische Bakterium *Vibrio vulnificus* (Kim et al., 2003) mit IVIAT untersucht. Neben der Analyse vieler verschiedener Bakterien wurde das immunologische Screening Verfahren auch bei dem opportunistischen Pilz *Candida albicans* (Cheng et al., 2003) und bei den Parasiten *Leishmania pifanoi* bzw. *Leishmania donovani* (Kima et al., 2010) und *Toxoplasma gondii* (Amerizadeh et al., 2013a,b) erfolgreich angewendet. Da für sehr viele Proteine von *Toxoplasma gondii* RH eine Funktion bisher nicht beschrieben ist, beruhen alle Analysen auf Sequenz-Vergleichen mit dem Stamm *Toxoplasma gondii* ME49. Im Fall des immunologischen Screenings von *Leishmania*, bei dem ebenfalls Homologien zu Hilfe gezogen wurden, wurde diese Technik sogar neu definiert – die sogenannte *Change mediated antigen technology* CMAT (Kima et al., 2010).

In dieser Arbeit wurde IVIAT erstmals bei einem obligat intrazellulären Pathogen angewendet.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Das obligat intrazelluläre Bakterium *C. psittaci* hat sowohl eine tier- als auch humanpathogene Bedeutung. Vor allem das starke zoonotische Potential des Pathogens und die damit verbundenen Folgen wurden oft unterschätzt und erst kürzlich durch die Untersuchungen in einem relevanten Großtier-Modell verdeutlicht. Geeignete Therapie- und Vakzinierungsansätze gegen *C. psittaci* sind bisher jedoch nicht verfügbar. Ziel dieser Arbeit war es daher das Verständnis zu den Wechselwirkungen von *C. psittaci* mit seinem natürlichen Wirt auf der Ebene der Genexpression zu vertiefen, die bisher bekannten Prozesse der Wirts-Pathogen-Interaktion zu ergänzen und mögliche Interventionsstrategien aufzuzeigen. Dazu sollte mit Hilfe des Serums experimentell infizierter Rinder eine induzierbare Expressionsbank, die das chlamydiale Genom repräsentiert, gescreent werden. Immunreaktive Klone sollten anschließend auf Sequenz- und Proteinebene analysiert und validiert werden. Da das Serum die humorale Immunreaktion des Wirtes widerspiegelt und damit eine spezifische Antwort auf das Pathogen ist, können Aussagen über *in vivo*-induzierte Antigene getroffen werden. Damit trägt diese Arbeit zur Aufklärung der der Virulenz *C. psittaci* zu Grunde liegenden Prozesse bei, die zu Teilen bereits im Rahmen eines Verbundprojektes mit den verschiedensten experimentellen Ansätzen und Modellen, auch im Sinne von *One Health*, auf genomischer, (physio) pathologischer, immunologischer (mit Fokus auf die angeborene Immunität bzw. die Brücken zur erworbenen Immunität) und auch auf molekularbiologischer Ebene erforscht wurden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 1: Technische Geräte und Hilfsmittel.

Gerät	Hersteller
2100 Electrophoresis Bioanalyzer Instrument	Agilent Technologies (Waldbronn, D)
Amersham ECL Gel Box (horizontal)	GE Healthcare (München, D)
arium [®] pro VF System	Sartorius (Göttingen, D)
ChemiDoc XRS	Bio-Rad (München, D)
CO ₂ Inkubator IG150	Jouan/Thermo Scientific (Schwerte, D)
CO ₂ Inkubator Heracell™ 150i	Thermo Scientific (Dreieich, D)
Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg, D)
Durchlaufkühler DLK 402	FRYKA-Kältetechnik GmbH (Esslingen, D)
Elektrophorese System (horizontal)	Bio-Rad (München, D)
Fluoreszenzmikroskop BX-51 M	Olympus (Hamburg, D)
Gel Doc™ EZ System	Bio-Rad (München, D)
Gel Dryer MGD-4534	VWR (Dresden, D)
Gene Pulser, Pulse Controller, Capacitance Extender	Bio-Rad (München, D)
Homogenisator Precellys [®] 24	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, D)
Incubating Microplate Shaker	VWR (Dresden, D)
Kreisschüttler KS 250basic	IKA Labortechnik (Staufen, D)
Laboklav	SHP Steriltechnik (Detzel Schloss/Satuelle, D)
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Microimaging (Göttingen, D)
Magnetrührer mit Heizplatte IKAMAG [®] RCT	IKA Labortechnik (Staufen, D)
Mikrowelle	Siemens (München, D)
Mini Protean 3 Elektrophorese System	Bio-Rad (München, D)
Multiskan Spectrum	Thermo Labsystems (Egelsbach, D)
NanoDrop™ ND-1000 Spectrometer	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, D)
NanoPhotometer	Implen (Westlake Village, USA)
pH-Meter Lab 850	Schott Instruments (Mainz, D)
Pipetten Eppendorf <i>Research</i>	Eppendorf (Hamburg, D)
Präzisionswaage ME235S	Sartorius (Göttingen, D)

Gerät	Hersteller
Präzisionswaage Talent TE1502S	Sartorius (Göttingen, D)
Rollenmischer Stuart SRT1	Stuart Scientific (Staffordshire, UK)
Schüttelinkubator innova 44	New Brunswick Scientific Co., Inc. (Enfield, USA)
Semi-Dry-Blotter V20-SDB	Scie-Plas Ltd. (Cambridge, UK)
Sicherheitswerkbank HeraSafe	Thermo Scientific (Dreieich, D)
Spannungsgeräte EPS 200, EPS 600	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
StepOnePlus™ Real-time PCR System	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg, D)
Trockenschrank Heraeus	Thermo Scientific (Dreieich, D)
Ultraschall-Desintegrator Sonifier W-450	Branson Ultrasonics (Danbury, USA)
Ultrasonic processor Labsonic® M	Sartorius (Göttingen, D)
Ultrazentrifuge L-70	Beckmann Coulter (Krefeld, D)
Universalzentrifuge 32 R	Hettich (Tuttlingen, D)
Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Vortex Genie 2™	Scientific Industries (New York, USA)
Wasserbad	GFL (Burgwedel, D)
Zentrifuge 4K15 C	Sigma (Osterode am Harz, D)
Zentrifugen 5415 R, 5417 R	Eppendorf (Hamburg, D)
Zentrifuge ROTANTA 460 RS	Hettich (Tuttlingen, D)

2.1.2 Chemikalien

Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D), VWR (Darmstadt, D), Sigma-Aldrich (Steinheim/Seelze, D), Merck (Darmstadt, D), Lonza (Köln, D) und Bionline (Luckenwalde, D).

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Blotting Papier, extra dick	BioRad (München, D)
CL-Xposure Film	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, D)
Deckglasröhrchen 129 AX/1	Fisher Scientific (Nidderau, D)
Deep Well Block	Macherey-Nagel (Düren, D)
Einmal Küvetten aus Polysterol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad (München, D)
Hybond™-PVDF Membran	GE Healthcare (München, D)
Kryoröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Multiwell Platte (6 Well)	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
MicroAmp® Fast 96 well Reaktionsplatten	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Nunc MaxiSorp® 96-Well-Platte, flacher Wellboden	Thermo Scientific (Dreieich, D)
optische + nichtoptische adhesive Filme (MicroAmp®)	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Petrischalen (Ø 90 mm)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Pipettenspitzen mit Filter (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Starlab (Ahrensburg, D)
Polyacrylamid-Gradienten Gele 4-20%	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf, D)
Polyacrylamid-Gradienten Gele 4-20%	GE Healthcare (München, D)
Precellys Ceramic Kit 1.4 mm	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, D)
Protran® BA83, Rundmembran (Ø 82mm), Nitrocellulose	GE Healthcare (Freiburg, D)
Reaktionsgefäße SafeSeal (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg, D)
Rotilabo®-Verschlussfilm für Zellkulturen	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Sartolab® RF	Sartorius Stedim Biotech GmbH (Göttingen, D)
serologische Pipetten	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Ultrazentrifugenröhrchen, Polyallomer, Quick-Seal	Beckmann Coulter (Krefeld, D)
Zellkulturflaschen (25 cm ²)	Greiner BioOne (Frickenhausen, D)
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Zellschaber (24 cm, 38 cm)	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zentrifugenröhrchen Falcon (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg, D)

2.1.4 Kits

Tab. 3: Kommerziell erwerbbar Kits.

Kit	Hersteller
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN GmbH (Hilden, D)
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH (Hilden, D)
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, D)
1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, D)
Ambion® TURBO DNA- <i>free</i> ™ Kit	Life Technologies (Darmstadt, D)
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Life Technologies (Darmstadt, D)
RNA Clean and Concentrator™-5	Zymo Research Europe GmbH (Freiburg, D)
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH (Hilden, D)
SensiFAST™ SYBR® Lo-ROX One-Step Kit	Bioline GmbH (Luckenwalde, D)
IMAGEN™ Chlamydia Kit	Oxoid (Wesel, D)
pET Expression System 30 plus Competent Cells	Merck Chemicals Ltd. (Nottingham, UK)
Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific (Dreieich, D)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG (Düren, D)
SuperScript® III Reverse Transcriptase (RT)	Life Technologies (Darmstadt, D)
Precellys Ceramic Kit 1.4 mm	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, D)
T4 DNA Ligase	Life Technologies (Darmstadt, D)
NucleoBond Xtra Midi Plus	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG(Düren, D)
GeneAmp Fast PCR Master Mix (2X)	Life Technologies (Darmstadt, D)

2.1.5 Marker

Tab. 4: DNA- und Protein-Größenstandards.

Marker	Firma
FastRuler™ DNA Low Range DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, D)
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, D)
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Life Technologies (Darmstadt, D)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, D)

2.1.6 Puffer und Lösungen

Tab. 5: Puffer, Lösungen und deren Zusammensetzung.

Name	Bestandteile	Konzentration
Ammoniumpersulfat (APS) Lösung	APS (w/v)	10%
Blocking Puffer	TBS Puffer (10x) (v/v)	10%
	Tween 20 (v/v)	0,1%
	non-fat dry milk (w/v)	5%
Bradford Stock Lösung (bei RT im Dunkeln gelagert)	Ethanol (96%)	100 ml
	o-Phosphorsäure (88%)	200 ml
	Coomassie Brilliant Blau G -250	350 mg
Bradford Arbeits Lösung (bei RT im Dunkeln gelagert, 6 Wochen verwendbar)	H ₂ O	425 ml
	Ethanol (96%)	15 ml
	o-Phosphorsäure (88%)	30 ml
	Bradford Stock Lösung	30 ml
Ethidiumbromid Stock Lösung (4 °C, Lichtgeschützt aufbewahren)	Ethidiumbromid	10 mg/ml
IPTG Stock-Lösung	IPTG	100 mM
	H ₂ O	
Kanamycin Stock Lösung (SL)	Kanamycin	30 mg/ml
	H ₂ O	
LB-Medium + Kanamycin	Bacto-Trypton	10 g/l
	Hefe-Extract	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	nach Autoklavieren, Zugabe von Kanamycin SL	30 µg/ml
LB-Agar 1,5% + Kanamycin	Bacto-Agar (w/v)	1,5%
	LB-Medium	
	nach Autoklavieren, Zugabe von Kanamycin SL	30 µg/ml
Lämmli Puffer (4x; bei -20 °C gelagert)	Glycerol (v/v)	20%
	SDS (w/v)	4%
	2-Mercaptoethanol	1,4 M
	Tris pH 6,8	0,25 M
	Bromphenolblau	50 µg/ml
Lösung B	Tris	1,5 M
	SDS (w/v)	0,4%
	pH 8,9	
Lösung C	Tris	0,5 M
	SDS (w/v)	0,4%
	pH 6,8	
PAA Trenngel 12,5%	PAA Stock Lösung (30%)	1,7 ml
	H ₂ O	1,3 ml
	Lösung B	1 ml
	TEMED	4 µl
	APS (10% (w/v))	24 µl

Name	Bestandteile	Konzentration
PAA Sammelgel (3,75%)	PAA Stock Lösung (30%)	0,3 ml
	H ₂ O	1,5 ml
	Lösung C	0,6 ml
	TEMED	2,5 µl
	APS (10% (w/v))	12,5 µl
PBS (10x)	NaCl	80 g/l
	KCl	2 g/l
	Na ₂ HPO ₄	14,4 g/l
	KH ₂ PO ₄	2,4 g/l
	pH 7,4 (mit HCl oder NaCl einstellen)	
PBS Puffer (1x) + Tween 20 (PBST)	PBS Puffer (10x) (v/v)	10%
	Tween 20 (v/v)	0,1%
RIPA	NaCl	150 mM
	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
	Natriumdeoxycholat (w/v)	1%
	Triton X-100 (v/v)	1%
	SDS (w/v)	0,1%
	vor Verwendung Proteaseinhibitor zugeben	
RIPA, modified	NaCl	150 mM
	Tris-HCl pH 7,5	50 mM
	Triton X-100 (v/v)	1%
	vor Verwendung Proteaseinhibitor zugeben	
SB-Puffer 10x	NaOH	100 mM
	pH 8,0 mit Borsäure einstellen	
SDS PAGE Puffer (10x)	Tris	30,2 g/l
	Glycin	188 g/l
	SDS	10 g/l
SOC-Medium	Bacto-Trypton	2 g/l
	Bacto-Hefeextract	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgSO ₄	10 mM
	MgCl ₂	10 mM
	Glukose	20 mM
SPGA (bei -20 °C gelagert)	Saccharose	74,6 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,52 g/l
	K ₂ HPO ₄	1,25 g/l
	L-Glutaminsäure (Na-Salz)	0,92 g/l
	BSA (Fraktion V)	1 g/l
Stripping Puffer	2-Mercaptoethanol	100 mM
	Tris pH 6,8	62,5 mM
	SDS (w/v)	2%

Name	Bestandteile	Konzentration
TAE Puffer (10x)	Tris	0,4 M
	EDTA	0,01 M
	Eisessig	0,2 M
	pH 8,4	
TBS Puffer (10x)	Tris pH 7,5	500 mM
	NaCl	1,5 M
TBS Puffer (1x) + Tween 20 (TBST)	TBS Puffer (10x) (v/v)	10%
	Tween 20 (v/v)	0,1%
TFB I	KAcetat pH 6,0	30 mM
	MnCl ₂	50 mM
	KCl	100 mM
	CaCl ₂	10 mM
	Glycerin (w/v)	15%
TFB II	MOPS	10 mM
	KCl	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	Glycerin (w/v)	15%
Transfer Puffer	SDS PAGE Puffer (10 x)	10%
	Methanol (v/v)	20%
Zell-Resuspensionspuffer	Tris-HCl pH 8,0	50 mM
	EDTA	10 mM

2.1.7 Primer

Die Sequenzen der chlamydialen Primer für die Klonierung bzw. qRT-PCR sind in Tabelle 15 und 16 im Anhang aufgeführt.

2.1.8 Antikörper und Seren

Tab. 6: Antikörper.

Antikörper	Konjugation	Wirt	Hersteller	Konzentration	Verdünnung
(His) ₆	-	Maus	Dianova, Hamburg, D (#DIA-900)	0,2 mg/ml	1/200
β-Aktin	HRP	Maus	antibodies-online.de, Aachen, D (#ABIN387705)	40 µg in 40 µl	1/1000
Chlamydia LPS	-	Maus	AbD Serotec, Oxford, UK (#MCA2718)	1 mg/ml	1/200
GAPDH	HRP	Ziege	antibodies-online.de, Aachen, D (#ABIN398425)	40 µg in 80 µl	1/500 = 1µg/ml
Protein G	HRP	-	GenScript, Piscataway, USA (#M00090)	1 mg/ml	1/10000
Streptavidin (polyklonal)	HRP	Kaninchen	Abcam plc, Cambridge, UK (#ab18589)	1 mg/ml	1/1000

Tab. 7: Rinderseren.

Kalb-Nr.	Dosis <i>C. psittaci</i> (EBEs)	D p. l. bzw. Alter der Kontrolltiere bei Blutabnahme (in Monaten)	Sektion
1	10 ⁸	14; 28; 36	Oktober 2009
2	10 ⁸	28; 37	Oktober 2009
3	10 ⁸	14	Oktober 2009
4	10 ⁸	14	April 2009
5	10 ⁸	14	April 2009
6	10 ⁸	3	Sept. 2009
7	10 ⁸	7	Sept. 2009
8, 9	-	1 Monat	-
10, 11	-	12 Monate	-
12	-	14; 28	-

2.1.9 Zelllinien

Tab. 8: Zelllinien.

Zelllinie	Referenz
HEp-2	<i>Human Epithelial Cell-2</i> , ATCC*-CCL-23 humane, adhärenzte Zelllinie von immortalisierten Platten-Epithelzellen eines Larynxkarzinoms, durch Kontamination mit HeLa-Zellen entstanden (K. Sachse, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena)
BGM	<i>Buffalo Green Monkey</i> adhärenzte Zelllinie aus Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze (K. Sachse, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena)

*ATCC, American Type Culture Collection

2.1.10 Bakterienstämme

Tab. 9: Stämme von *Chlamydia psittaci* und *Escherichia coli*.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz/Bezugsquelle
<i>Chlamydia psittaci</i> 02DC15	A	Isolat aus einem abortierten Rinderfetus vom Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt, Stendal (K. Sachse, FLI Jena; Goellner <i>et al.</i> , 2006)
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Life Technologies/Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Merck Chemicals Ltd./Novagen (Nottingham, UK)
NovaBlue	<i>endA1 hsdR17</i> (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) <i>supE44</i> <i>thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> F' <i>[proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15::Tn10]</i> (Tet ^R)	Merck Chemicals Ltd./Novagen (Nottingham, UK)

2.1.11 Vektoren und Plasmidkonstrukte

Tab. 10: Vektoren und Plasmidkonstrukte.

Plasmid	Insert	Restriktions- endonukleasen	Charakteristika	Referenz
pET30a	-	multiple Klonierungsstellen	N-terminaler His ₆ - und S-Epitop-Tag, optional: C-term. His ₆ - Tag; T7-Promotor	Merck Chemicals Ltd./Novagen (Nottingham, UK)
pCR [®] 2.1	-	multiple Klonierungsstellen	<i>LacZα</i> Fragment; T7- Promotor	Life Technologies (Darmstadt, D)
pET30a- MOMP	CPSOB_0059 (aa 1-402)	<i>Bam</i> HI, <i>Xho</i> I	N-terminaler His ₆ -Tag	diese Arbeit (siehe 2.4.2)
pET30a-0061	CPSOB_0061 (aa 47-263)	<i>Nde</i> I, <i>Xho</i> I	C-terminaler His ₆ -Tag	diese Arbeit (siehe 2.4.2)
pET30a-SufB	CPSOB_0063 (aa 1-469)	<i>Nde</i> I, <i>Xho</i> I	C-terminaler Pro ₅ -Tag	diese Arbeit (siehe 2.4.2)
pET30a-TrxA	CPSOB_0094 (aa 1-102)	<i>Nde</i> I, <i>Xho</i> I	C-terminaler His ₆ -Tag	diese Arbeit (siehe 2.4.2)
pET30a-0417	CPSOB_0417 (aa 1-334)	<i>Nde</i> I, <i>Xho</i> I	C-terminaler His ₆ -Tag	diese Arbeit (siehe 2.4.2)
pET30a-0736	CPSOB_0736 (aa 297-590)	<i>Nde</i> I, <i>Xho</i> I	C-terminaler His ₆ -Tag	diese Arbeit (siehe 2.4.2)
pET30a-0790	CPSOB_0790 (aa 1-220)	<i>Nde</i> I, <i>Xho</i> I	C-terminaler His ₆ -Tag	diese Arbeit (siehe 2.4.2)
pET30a-1013	CPSOB_1013 (aa 330-646)	<i>Nde</i> I, <i>Xho</i> I	C-terminaler His ₆ -Tag; Basen-Substitution T>C (1097696) und T>A (1097648)	diese Arbeit (siehe 2.4.2)
pET30a- pGP6-D-like	CPSOB_1025 (aa 1-250)	<i>Nde</i> I, <i>Xho</i> I	C-terminaler His ₆ -Tag	diese Arbeit (siehe 2.4.2)
pET30a- CPSIT_p2	CPSIT_p2 (aa 1-246)	<i>Nde</i> I, <i>Xho</i> I	Basen-Substitution A>G (1764) führt zu Asn>Asp	diese Arbeit (siehe 2.4.2)

2.1.12 Software und online Datenbanken

Tab. 11: Software und Datenbanken.

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS3	Adobe Systems (Unterschleissheim, D)
Cell [^] D	Olympus (Hamburg, D)
Microsoft Office 2007	Microsoft Deutschland GmbH (Bad Homburg, D)
Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
Mendeley	http://www.mendeley.com/library/

2.2 Zellbiologische Arbeitsmethoden

Die hier verwendeten obligat intrazellulären Chlamydien wurden in BGM- oder HEp-2-Zellkulturen vermehrt. Die Zelllinien wurden in, mit fetalem Kälberserum angereichertem, DMEM bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert und bei 90% Konfluenz passagiert. Dazu erfolgte nach Waschen des Zellrasens mit 1x PBS-Puffer eine Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung für 5 min. Zugabe von Zellkulturmedium stoppte anschließend die Aktivität des Trypsins und die abgelöste Zellsuspension wurde für 3 min bei 800 rpm zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und, je nach Verwendungszweck, erneut ausgesät. Die Kontrolle auf eine Verunreinigung mit Mycoplasmen erfolgte in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des VenorGeM Mycoplasma Detection Kit (Biochrom AG, Berlin, D) entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.3 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

2.3.1 Methoden zum Arbeiten mit Chlamydien

2.3.1.1 Kultivierung und Kryokonservierung von Chlamydien

Die Infektion von BGM-Zellen mit *C. psittaci* 02DC15 (boviner Stamm) wurde unter S2-Bedingungen durchgeführt und erfolgte in 2 Schritten. Zu Beginn wurde der konfluente BGM-Zellrasen mit 1×10^8 Einschluss-bildenden Einheiten (EBE) von *C. psittaci*/T25 Zellkulturflasche infiziert, die Chlamydien bei 2000 rpm und 37 °C für 1 h aufzentrifugiert und im Anschluss bei 37 °C und 5% CO₂ für 46 h kultiviert. Daraufhin erfolgte durch Abschaben die Ernte der infizierten Zellen und die so gewonnene Vorkultur diente als Inokulum für eine erneute Infektion konfluenter BGM-Zellen im größeren Maßstab. Nach 46 h Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, der infizierte Zellrasen in SPGA-Konservierungsmedium vereinigt und je 0,5 ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.3.1.2 Reinigung von Chlamydien durch Ultrazentrifugation

Um chlamydiale Elementarkörperchen (EB) und Retikularkörperchen (RB) in reiner Form, d. h. ohne Wirtszellbestandteile vorliegen zu haben, wurde eine Ultrazentrifugation über einen Visipaque (GE Healthcare, München, D)-Dichtegradienten durchgeführt. Dazu wurden HEp-2-Zellen mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 3 infiziert, 46 h bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert und geerntet. Je 25 ml der Chlamydien-Zell-Suspension wurden für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und 24 ml des Chlamydien-haltigen Überstandes wurden mittels

Schlauchpumpe in Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Folgende Visipaque-Konzentrationen, hergestellt in 1x PBS, dienen der Unterschichtung: 2 ml 8%, 3 ml 15% und 5 ml 15%. Anschließend erfolgte die Ultrazentrifugation für 50 min bei 40000 x g und 8 °C. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Sediment in 1x PBS aufgenommen, homogenisiert und erneut für 50 min bei 30000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Sediment mit den gereinigten Chlamydien wurde in geringem Volumen 1x PBS resuspendiert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Methoden zum Arbeiten mit *Escherichia coli*

2.3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

E. coli DH5 α oder *E. coli* BL21(DE3) wurden über Nacht in LB Medium bei 37 °C und 180 rpm unter Belüftung kultiviert. Für die Hauptkultur wurden 100 ml LB Medium mit 10 mM KCl und 20 mM MgSO₄ angereichert und mit 1 ml der Vorkultur beimpft und wie oben aufgeführt inkubiert. Bei Erreichen einer OD_{600nm} von 0,6-0,8 wurde *E. coli* bei 3500 rpm und 4 °C geerntet. Das Pellet wurde mit 15 ml TFB I versetzt und nach 10 min auf Eis wiederholt für 10 min bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 2 ml TFB II aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Aliquots (100 μ l, 200 μ l) wurden in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.2.2 Chemische Transformation von *E. coli* nach Hanahan (1983)

Die kompetenten Zellen wurden mit der zu transformierenden DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C und eine sofortige Abkühlung auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 900 μ l SOC-Medium wurden die Zellen für 45 min bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 3000 rpm wurden die transformierten Zellen konzentriert und in geringem Volumen resuspendiert auf LB-Agar mit Kanamycin ausplattiert.

2.3.2.3 Herstellung elektrokompeter *E. coli* Zellen

LB Medium wurde 1:50 mit einer Übernachtskultur des gewünschten Stammes von *E. coli* beimpft und unter gleichen Bedingungen, wie unter 2.3.2.1 aufgeführt, inkubiert. Bei Erreichen einer OD_{600nm} von 0,8 wurden die Bakterien für 15 min auf Eis überführt und bei 4 °C und 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 ml und anschließend 100 ml sterilem, eiskaltem H₂O gewaschen und in 20 ml eiskaltem, sterilem 10%igen (w/v)

Glycerin resuspendiert. Nach wiederholter Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min wurde das Pellet in sehr wenig eiskalter, steriler Glycerinlösung aufgenommen und im 100 µl Maßstab in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Die kompetenten *E. coli* wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.2.4 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Die kompetenten Zellen wurden zusammen mit der zu transformierenden DNA in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Der anschließende kurze elektrische Schock bei 1,8 V führte zur Aufnahme der DNA in die Zellen, die sofort in 900 µl SOC-Medium gerettet und für 60 min bei 37 °C und 300 rpm inkubiert wurden. Der chemischen Transformation gleichermaßen (2.3.2.2) erfolgte die Ausplattierung auf Selektivplatten.

2.4 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.4.1 Methoden zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

2.4.1.1 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden, D) im kleinen Maßstab und durch Verwendung von NucleoBond Xtra Midi Plus (Macherey-Nagel, Düren, D) im großen Maßstab nach den Angaben der Hersteller.

2.4.1.2 Isolierung genomischer DNA aus *C. psittaci*

Um DNA aus reinen Chlamydien (siehe 2.3.1.2) zu erhalten, wurde nach einer Hitzeinaktivierung der Chlamydien für 30 min bei 70 °C mit dem QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, D) genomische DNA entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert, wobei die Inkubation mit Proteinase K bei 56 °C für 3 h erfolgte.

2.4.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. psittaci*-infizierten HEp-2-Zellen

HEp-2-Zellen, die im Vorfeld im 6-well-Format sowohl mit einer MOI 1 von *C. psittaci* infiziert wurden als auch nicht infizierte Zellen, wurden 6 h, 12 h, 24 h, 30 h und 48 h nach Infektion in 1 ml TRIzol aufgenommen, lysiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die bei -80 °C gelagerten Proben wurden zu einem späteren Zeitpunkt gemeinsam weiter bearbeitet. Dazu erfolgten die Phasentrennung der aufgetauten Proben mit Chloroform entsprechend Life Technologies und eine anschließende Waschung der wässrigen RNA-enthaltenden Phase mit dem RNeasy Mini Kit von QIAGEN (Hilden, D). Dabei wurde nach Zugabe von 70% Ethanol die

Probe auf die RNAesy Silica Membran der Säule gegeben. Nach mehrmaligem Waschen, gemäß Hersteller, wurde die reine RNA in DNase/RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

2.4.1.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. psittaci*-infizierten Lungengewebe

Je 50 mg Lungengewebe von 5 *C. psittaci*-infizierten und 2 nicht infizierten Kälbern (Reinhold et al., 2012), das in RNAlater (QIAGEN, Hilden, D) gelagert worden war, wurde in 1 ml TRIzol mit Hilfe von Keramik-Kügelchen (Durchmesser: 1,4 mm; Peqlab Biotechnologie, Erlangen, D) und dem Precellys Homogenisator (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, D) bei 5000 rpm für 2 x 20 s (5 s Pause zwischen den Intervallen) aufgeschlossen. Im Anschluß wurde das homogenisierte Gewebe mit den Keramik-Kügelchen bei 4 °C und 15000 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Extraktion und Aufreinigung der RNA aus dem jeweiligen Überstand erfolgte nach den Hersteller-Protokollen von/mit TRIzol und dem RNAesy Mini Kit, wie unter 2.4.1.3 beschrieben.

2.4.1.5 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die isolierten Nukleinsäuren (DNA, RNA) wurden mit Hilfe eines Spektralphotometers (NanoDrop; Peqlab Biotechnologie, Erlangen, D) auf ihre Reinheit überprüft. Dazu wurde das Verhältnis der Absorption bei den Wellenlängen (λ) 260 nm zu 280 nm bzw. 260 nm zu 230 nm bestimmt. DNA gilt frei von Proteinen, Phenolen o.ä. und somit „rein“ wenn ein Verhältnis 260/280 \approx 1,8 vorliegt und RNA gilt „rein“ bei 260/280 \approx 2,0. Desweiteren deutet ein Verhältnis 260/230 < 2,0 auf Verunreinigungen, z. B. mit TRIzol hin, das für die RNA Isolation verwendet wurde und unter anderem bei 230 nm absorbiert. Die Konzentrationen von doppelsträngiger DNA (dsDNA) bzw. einzelsträngiger RNA (ssRNA) wurden basierend auf der Absorption bei 260 nm, wie folgt, berechnet:

$$\text{dsDNA: } 1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}; \text{ ssRNA: } 1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

2.4.1.6 Agarosegel-Elektrophorese

Da DNA negativ geladen ist, wandert sie in Abhängigkeit ihrer Größe unterschiedlich schnell durch ein elektrisches Feld in einem Agarose-Gel. Entsprechend der erwartenden Fragmentgröße und des Verwendungszweckes wurde DNA entweder in 1%igen Agarose-Gelen in 1x TAE-Puffer (z. B. enzymatisch verdaute Vektor-DNA für die Klonierung) oder in 2%igen Agarose-Gelen in 1x SB-Puffer (z. B. *real-time* PCR Produkte) elektrophoretisch

aufgetrennt. Letzteres konnte auf Grund der geringeren elektrischen Leitfähigkeit des Puffers bei höherer Spannung in kürzerer Zeit erfolgen (z. B. 250 V, 12 min vs. 100 V 60 min). Alle Gele enthielten 0,3 µg/ml Ethidiumbromid um die DNA mit dem Gel Doc™ EZ Imaging System (Bio-Rad, München, D) im UV-Licht zu visualisieren. Die DNA wurde im Vorfeld mit 6x Ladepuffer versetzt und ein Größenstandard auf das Gel aufgetragen.

2.4.2 Klonierung von chlamydialen Genen

Für die Klonierung chlamydialer Gene in den Expressionsvektor pET30a (Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK) wurde chlamydiale DNA mit spezifischen Oligonukleotiden (Eurofins MWG, Ebersberg, D) durch die Pfu-Polymerase (Life Technologies, Darmstadt, D) selektiv in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die, durch die Primer generierten, Überhänge der Amplifikate („sticky ends“) wiesen entweder Restriktionsschnittstellen für *NdeI* und *XhoI* oder *BamHI* und *XhoI* (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, D) auf. Ein PCR Ansatz im 20 µl Maßstab bestand aus 1 µl DNA (40-50 ng/µl), 2 µl 10x Pfu-Puffer mit MgSO₄, 0,4 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µl Primer forward (10 µM), 0,5 µl Primer reverse (10 µM), 0,5 µl Pfu-DNA Polymerase (2,5 U/µl) und 15 µl DNase/RNase-freies H₂O. Folgender Temperaturgradient wurde für die PCR gewählt, wobei die Annealing-Temperatur dem GC-Gehaltes der Primer angepasst wurde: 3 min 95 °C (initiale Denaturierung); 30 s 95 °C, 30 s 58 °C, 120 s 72°C (Denaturierung, Annealing, Elongation; 35 Zyklen); 7 min 72 °C (finale Elongation). Ein Restriktionsverdau im 100 µl Ansatz bei 37 °C für 2 h mit *NdeI/BamHI* und *XhoI* schloss sich entweder direkt der PCR oder erst nach einer Gel-Aufreinigung der Amplifikate mit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, D) an. Parallel wurde die Vektor DNA gleichermaßen behandelt. Nach Aufreinigung der verdauten DNA mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, D) wurden durch Einsatz der T4 DNA Ligase (Life Technologies, Darmstadt, D) bei 16 °C über Nacht die freien 3'-OH- und 5'-Phosphatgruppen der „sticky ends“ von Insert und Vektor DNA kovalent verbunden. Die Transformation von kompetenten *E. coli* erfolgte nach einer Fällung der ligierten Plasmid DNA mit eiskaltem 1-Butanol und 70%igem Ethanol wie unter 2.3.2.2 bzw. 2.3.2.4 beschrieben. In einem weiteren Ansatz wurde mit Hilfe des TOPO® TA Cloning® Kit (mit pCR® 2.1 Vektor; Life Technologies, Darmstadt, D) die amplifizierte DNA entsprechend den Angaben des Herstellers zunächst in den pCR® 2.1 Vektor Ligase-unabhängig eingebracht. Dies hatte den Zweck die Effizienz der nachfolgenden Restriktion zu erhöhen. Anschließend erfolgte eine Umklonierung in den Expressionsvektor pET30a wie bereits beschrieben wurde.

2.4.3 Detektion von chlamydialen Transkripten

2.4.3.1 Reverse Transkription

Die RNA Proben wurden, entsprechend den Herstellerprotokollen, zunächst mit Ambion® TURBO DNA-free™ Kit (Life Technologies, Darmstadt, D) behandelt, um genomische DNA zu beseitigen und anschließend mit dem RNA Clean and Concentrator™-5 (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, D) aufgereinigt. Für die reverse Transkription wurden nur RNA Proben mit folgenden Voraussetzungen verwendet: $260/280 \approx 2$, $260/230 = 1,8-2,0$; RIN (*RNA integrity number*) = 8-10. RNA wurde mit Hilfe SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Darmstadt, D) und random hexamer Primern (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D) in cDNA umgeschrieben, entsprechend den Angaben der Firmen.

2.4.3.2 Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

Um die Menge der chlamydialen RNA Transkripte im Lungengewebe und den HEp-2-Zellen bestimmen zu können, wurden die umgeschriebenen cDNAs in einer qRT-PCR unter Verwendung des StepOnePlus™ Real-time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, D) gemessen. Ebenfalls wurde die isolierte RNA mit den chlamydialen 16S rRNA-Primern auf die Freiheit von genomischer DNA hin überprüft. Mit Einsatz des 2xSensiFAST™ SYBR Lo-ROX Kit (Bioline GmbH, Luckenwalde, D) konnte die im Verlauf der PCR zunehmende Amplifikation von DNA nach jedem Zyklus detektiert werden, da SYBR-Green sich unspezifisch in doppelsträngige DNA einlagert und eine Fluoreszenz hervorruft (Higuchi 1993; Wilhelm und Pingoud, 2003). Eine 20 µl Reaktion enthielt 10 µl des 2x Mastermixes, 7,2 µl Nuklease-freies H₂O, 0,4 µl forward Primer (10 µM), 0,4 µl reverse Primer (10 µM) sowie 2 µl cDNA (1:20). Entsprechend den Angaben von Bioline wurde ein 2-stufiges Protokoll, das eine Polymerase Aktivierung für 2 min bei 95 °C sowie 40 Zyklen á 15 s 95°C und 60 s 60°C beinhaltet, verwendet. Mit einer Schmelzkurvenanalyse wurde im Anschluss der PCR-Reaktion die Spezifität der Amplifikate überprüft. Die Größe der PCR Produkte wurde im Agarose-Gel (siehe 2.4.1.6) kontrolliert.

Für die Auswertung der Daten wurde eine modifizierte Variante der Methode nach Kokab (Kokab et al., 2010; Rödel et al., 2012) und die relative Quantifizierung mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak und Schmittken, 2001) herangezogen. Dazu wurde in einem ersten Schritt die Expression des Zielgens, bestimmt durch den sogenannten threshold cycle (C_T)-Wert, mit den entsprechenden C_T -Wert des Referenzgens, dem 16S rRNA-Gen, normalisiert, entsprechend $\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$. Der C_T -Wert zeigt den Zyklus an, an dem ein gewisser

Schwellenwert an Hintergrund-Fluoreszenz überschritten wird und korreliert daher mit der Anzahl der Ziel cDNA-Moleküle (Wilhelm und Pingoud, 2003). Die Kokab-Methode diente dazu, die Expression der Zielgene im Verlauf der Zeit relativ zur 16S rRNA darzustellen und wird mit der Formel $2^{-\Delta C_T} \times 100\%$ berechnet (Kokab et al., 2010). In dieser Arbeit wurde entsprechend Rödel eine Effizienzkorrektur in die Berechnung integriert, so dass $E^{-\Delta C_T} \times 100\%$ galt (Rödel et al., 2012). Im Gegensatz dazu wird bei der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode im Anschluss der ΔC_T -Berechnung das Verhältnis des Expressionslevels des normalisierten Zielgens *in vivo* zu *in vitro* bestimmt und als *fold change* (Ratio, n-fache Expression) ausgedrückt, entsprechend *fold change* = $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ in vivo} - \Delta C_T \text{ in vitro}$). Die Amplifikations Effizienzen der Primer in dem infizierten Lungengewebe und in den infizierten HEP-2-Zellen wurden in einer *real-time* PCR bestimmt, indem eine seriellen Verdünnungsreihe der jeweiligen cDNA eingesetzt wurde. Die C_T -Werte wurden gegen den Logarithmus der cDNA-Konzentrationen aufgetragen und eine Regressionsgerade erstellt. Aus dem Anstieg der Regressionsgeraden wurde die Effizienz (E) wie folgt berechnet: $E = 10^{-1/\text{Anstieg}}$ (Pfaffl, 2001) (Abb. 20 im Anhang).

Die Auswertung der Ergebnisse der quantitativen *real-time* PCR beruht auf zwei unabhängigen Infektionsexperimenten *in vitro* sowie zwei RNA-Isolierungen aus den infizierten Geweben und erfolgte mit Hilfe der Software REST© (Pfaffl et al., 2002; Quiagen, Hilden, DL). Basierend auf einem Randomisierungstest konnte dabei ermittelt werden ob ein Ergebnis als \pm signifikant einzustufen war.

Der Vergleich der relativen mRNA-Level eines Gens *in vivo* zu *in vitro* (48 h p. I.) wurde mit Hilfe der Varianzanalyse in Kombination eines Post Hoc Tests (One-way ANOVA, Fisher's Least Significant Difference (LSD) Test; GraphPad Prism 6.0) auf signifikante Ergebnisse getestet.

2.5 Proteinanalytische Methoden

2.5.1 Expression chlamydialer Proteine in *E. coli*

LB-Medium (100 ml) mit Kanamycin wurde 1:50 mit einer Übernachtskultur des gewünschten *E. coli* Klones beimpft und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,6 inkubiert. Durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM) wurde die Expression induziert. Im stündlichen Rhythmus wurde die OD_{600nm} dokumentiert und Proben für die SDS PAGE-Analyse steril entnommen. Außerdem wurde im kleinen Maßstab (96-Well-Format) die Expression von 400 μ l-Kulturen, die mit den entsprechenden Vorkulturen beimpft wurden, mit 1 mM IPTG für 4 h bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) und Belüftung induziert.

2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration proteinhaltiger Lösungen wurde photometrisch mit Hilfe des Bradford-Tests bestimmt (Bradford et al., 1976). Dazu wurde die Proteinprobe auf 100 µl mit ddH₂O aufgefüllt und nach Zugabe von 900 µl Bradford-Arbeitslösung erfolgte die Messung der OD bei 600 nm. Unter Verwendung einer BSA Eichgerade konnte die Konzentration der Probe ermittelt werden.

2.5.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-/Immunblot

Für die SDS-PAGE wurden 20 µg der Proteinprobe, z. B. das *C. psittaci*-BGM Lysat oder auch die Proben aus den Expressionstests (siehe 2.5.1, pET System Manual, Merck Chemicals Ltd./Novagen, Nottingham, UK), bzw. das Pellet von 10 µl der 400 µl-Kulturen im 96-Well-Format verwendet. Die Auftrennung der Proteine im 13% Polyacrylamid Gel oder 4-20%igen Polyacrylamid-Gradientengel (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldenburg, D; GE Healthcare, München, D) erfolgte nach Laemmli (Laemmli, 1970). Zur spezifischen Detektion von Streptavidin- und/oder (His)₆-markierten Proteinen wurden die aufgetrennten Proben auf eine Methanol-aktivierte Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (GE Healthcare, München, D) bei 15 V (1 Gel) oder 25 V (2 Gele) und 400 mA für 45-60 min mit einem Semi-Dry-Blotter (Scie-Plas Ltd., Cambridge, UK) geblottet. Im Anschluss erfolgte bei Raumtemperatur (RT) für mindestens 1 h das Blocken der Membran mit 5% Milchpulver oder 5% BSA gelöst in TBST (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1% (v/v) Tween 20) um die freien Bindungsstellen abzusättigen. Die geblotteten Polyacrylamid-Gele wurden mit kolloidalem Coomassie-Brillant-Blau G250 (Roti® Blue; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D), entsprechend den Angaben des Herstellers, gefärbt. Nach dreimaligen Waschen für jeweils 5 min in TBST wurde die Membran mit dem gewünschten Antikörper oder, im Falle des Immunblotes, mit dem Serum in 5%iger Milchpulver- oder 5%iger BSA-TBST-Lösung, in Abhängigkeit des verwendeten Antikörpers bzw. Serums, bei 4 °C über Nacht auf einem Rollenmischer (Stuart Scientific, Staffordshire, UK) inkubiert. Erneut folgten 3 Waschschrte für jeweils 5 min in TBST, woraufhin die Membran mit HRP-gekoppelten Protein G (GenScript, Piscataway, USA) in 5% Milchpulver- oder 5% BSA-TBST-Lösung für 1 h bei RT geschüttelt wurde. Anschließend wurde die Membran zweimal für 5 min in TBST und einmal für 5 min in TBS gewaschen und die Antikörper-markierten Proteinbanden mittels Chemilumineszenz (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, D) auf einem CL-

Xposure Film (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, D) sichtbar gemacht. Sofern nicht anders angegeben, erfolgten alle Waschschritte und Inkubationen bei RT und leichtem Schütteln (Schüttelfrequenz: 15 Zyklen pro Minute).

Um eine geblottete PVDF-Membran mit einem weiteren Antikörper inkubieren zu können, wurde diese mit Stripping-Puffer für 5-30 min (in Abhängigkeit vom primären Antikörper bzw. Serum) bei RT leicht geschüttelt, mehrfach mit TBST gewaschen, anschließend geblockt und mit dem gewünschten Antikörper, wie bereits beschrieben, weiterbehandelt.

2.5.4 *In vivo induced antigen technology (IVIAT; Rollins et al., 2005)*

2.5.4.1 Adsorption der Seren

Serum von 7 experimentell mit *C. psittaci* infizierten männlichen Holstein-Friesian Kälbern (Ostermann et al., 2013a) wurde gepoolt (finales Volumen 2,5 ml) und stufenweise mit Lysat von *C. psittaci*-infizierten BGM-Zellen sowie nicht-lysierten Zellen und Lysat des Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3), wie folgt, adsorbiert. *E. coli* BL21 (DE3), die das Plasmid pET30a tragen, wurden bis zu einer OD_{600nm} von 5,8 in LB-Kanamycin-Medium kultiviert und anschließend mittels Zentrifugation geerntet. Das gepoolte Serum wurde auf das Zellpellet gegeben und für 5 h bei 4 °C auf einem Schüttler (KS 250basic; IKA®, Staufen, D) inkubiert. Dieser Prozess wurde mit dem Überstand des Serum-Zell-Ansatzes bei 4 °C über Nacht wiederholt. Zur Herstellung von Zelllysat wurde *E. coli* BL21 (DE3) in Resuspension-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) aufgenommen und mit Ultraschall (Sartorius Labsonic®M, Göttingen, D) 6 mal 20 Sekunden bei 30kHz auf Eis, wie empfohlen (Sambrook und Russell, 2001), behandelt. Das durch 10-minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit geklärte Zelllysat wurde bei 4 °C über Nacht auf den Protran® Nitrocellulose Membranen (Whatman®, D) immobilisiert. Die Membranen wurden bei RT für 1 h in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,4), die mit 5% Magermilch (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) und 0,05% Tween® 20 (T; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) versetzt war, inkubiert. Nach Zugabe von Natriumazid (0,03% finale Konzentration; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) erfolgte die Adsorption des Serums mit dem Lysat bei 4 °C über Nacht unter leichtem Schütteln. Desweiteren wurde Lysat von *C. psittaci*-infizierten BGM-Zellen 46 h p. I. gewonnen, indem diese mit eiskaltem modifizierten Radio-Immunopräzipitation Assay (RIPA) Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton X 100), der mit 100x Protease Inhibitor Cocktail (100 mM 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid (AEBSF)-HCl, 80 µM Aprotinin, 5 mM

Bestatin, 1,5 mM E-64, 2 mM Leupeptin, 1 mM Pepstatin A (Thermo Fisher Scientific, Bonn, D)) versetzt und bei 4 °C mittels Ultraschall (Amplitude 8, 3 x 30 Sekunden; Branson Sonifier Ultrasonic Desintegrator W-450, ULT Heinemann, D) aufgeschlossen wurden. Das Chlamydien-BGM-Zellysate wurde auf Protran® Nitrocellulose Membranen immobilisiert und die Membranen anschließend geblockt, wie bereits für *E. coli* BL21 (DE3) beschrieben. Das mit *E. coli* BL21 (DE3) adsorbierte Serum wurde auf die geblockte Membran gegeben und für 3-4 h bei 4 °C leicht geschüttelt. Dieser Schritt wurde mit dem Serum aus dem Überstand wiederholt.

Um die erfolgreiche Abreicherung des gepoolten Serums während der einzelnen Absorptionsschritte zu überprüfen, wurden Aliquots nach jedem Absorptionsschritt entnommen und im *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) oder mit Western Blot Experimenten gegen die Lysate von *E. coli* BL21 (DE3) oder *C. psittaci* getestet.

2.5.4.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Die in 2.5.4.1. gewonnenen Serumproben wurden mit einem Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest gegen die Lysate von *E. coli* und *C. psittaci* (Herstellung der Lysate siehe 2.5.4.1.) auf ihre Abreicherung hin überprüft. Dazu wurden Nunc MaxiSorp® 96-Well-Platten (Thermo Scientific, Dreieich, D) entweder mit 100 µl von 1 µg/µl lysierten *E. coli* BL21 (DE3)-pET30a oder *C. psittaci*-infizierten BGM-Zellysate in 1x PBS (pH 7,4) über Nacht bei 4 °C beschichtet (Coating). Nachdem zweimal mit 200 µl PBST pro Well für 5 min bei 500 rpm (Mikrotiterplatten-Inkubationsschüttler, VWR, D) gewaschen wurde, folgte das Blocken der freien unspezifischen Bindungsstellen mit 200 µl 5% Magermilch-PBST für mindestens 2 h bei RT und 500 rpm. Erneutes dreimaliges Waschen mit 200 µl PBST bei RT und 500 rpm für 5 min schlossen sich an bevor die verschiedenen seriell 1:2 in 5% Magermilch-PBST verdünnten Serumproben zugegeben wurden. Anschließend wurden die beschichteten Mikrotiterplatten mit den Seren bei 25 °C und einer Frequenz von 500 rpm für 2 h geschüttelt. Die Platten wurden dreimal mit 200 µl PBST bei RT und 500 rpm für jeweils 5 min gewaschen und 100 µl des HRP-gekoppelten Protein G 1:10000 in 5% Magermilch-PBST wurden zugegeben. Die anschließende Inkubation mit Protein G-HRP erfolgte für 1 h bei RT unter Schütteln (500 rpm). Intensives Waschen mit 3 x 200 µl PBST und 3 x 200 µl PBS für jeweils 5 min bei 500 rpm gingen der Inkubation im Dunkeln mit 100 µl TMB Substrat (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, D) voraus. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion der Peroxidase mit dem Substrat mit 2 N Schwefelsäure abgestoppt und photometrisch bei

450 nm vermessen (Multiskan Spectrum; Thermo LabSystems, Egelsbach, D). Während der verschiedenen Inkubationsschritte wurden die ELISA Platten zum Schutz vor Austrocknung abgedeckt. Von allen gemessenen Werten wurde der Absorbtionswert des Nullstandards (Blank; Kavität ohne Serum) subtrahiert.

2.5.4.3 Herstellung der genomischen Expressionslibrary

Die genomische DNA von *C. psittaci* 02DC15 wurde, wie unter 2.4.1.2 beschrieben, isoliert. Die Herstellung der induzierbaren Expressionsbank erfolgte daraufhin bei LGC Genomics (LGC Genomics GmbH, Berlin, D). Dazu wurden Fragmente der chlamydialen DNA mit einer Größe von 0,5-1,5 kb in die EcoRV Restriktionsschnittstelle des Expressionvektors pET30a (pET Expression System 30, Merck Chemicals Ltd./Novagen, Nottingham, UK) ligiert und *E. coli* DH10 α mit den Konstrukten transformiert. Das Vorhandensein (>90%) und die Größen der Inserts wurden mit Restriktionsanalysen und anschließender Gelelektrophorese kontrolliert. Nach Extraktion der DNA aus den Zellen im großen Maßstab, siehe 2.4.1.1, und Transformation in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) entsprechend 2.3.2.4, wurde wiederholt Plasmid DNA isoliert und eine Restriktionsanalyse mit *Bam*HI und *Xba*I (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, D) bei 37 °C durchgeführt. Desweiteren wurden die isolierten Plasmide mit pET30a-spezifischen Vorwärts-Primern sequenziert. *E. coli* BL21 (DE3) Zellen, die mit pET30a transformiert wurden, fungierten als Negativ-Kontrolle bei den Screenings. Die genomische Expressionsbank und die Kontrollklone wurden mit 25% Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

2.5.4.4 Kolonie Screening

Für das Immunoscreening wurde eine 1:10⁷ Verdünnung der genomischen Expressionsbank auf Selektiv-LB-Agar mit Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die so erhaltenen 300-500 Kolonien auf der Agarplatte wurden auf eine Protran[®] Nitrocellulose Membran übertragen und zur Induktion der Proteinexpression auf LB-Agar, der mit 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) versetzt war, für 4 h bei 37 °C platziert. Im Anschluss wurden die den Membranen adhärenen Kolonien einer partiellen Zellyse unterzogen, indem sie entweder für 20 min in einem Glasgefäß Chloroform Dämpfen ausgesetzt wurden (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) oder direkt für 15 Sekunden in Chloroform inkubiert wurden. Nach dem Trocknen der Membranfilter bei RT, wurden diese mit einer 5%igen Magermilch-PBST-Lösung für 1 h bei RT geblockt, einmal mit PBST gewaschen und dem adsorbierten Serum 1:1000 in

5% Magermilch-PBST bei 4 °C über Nacht auf einem Rollenmischer (Stuart Scientific, Staffordshire, UK) inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBST wurde HRP-konjugiertes Protein G (Genscript, Piscataway, USA) in einer 1:10000 Verdünnung in 5% Magermilch-PBST zugegeben und für 1 h bei RT mit einer Frequenz von 15 Zyklen pro Minute leicht geschüttelt. Die Detektion der immunreaktiven Klone erfolgte, wie unter 2.5.3 angegeben, über Chemilumineszenz.

Um die Ergebnisse zu bestätigen, wurden die positiven Klone mit dem adsorbierten Serum in mindestens 2 weiteren Kolonie Immunblots getestet. Dazu erfolgte das Beimpfen von 300 µl LB-Kanamycin-Medium in 96-Lochplatten mit den gewünschten und vereinzelt Klone, die bei -80 °C in 25% Glycerin-LB-Kanamycin-Medium in 96-Loch-Mikrotiterplatten (Macherey-Nagel) gelagert wurden, und die anschließende Inkubation bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 200 Zyklen pro Minute für 16-18 h. Von diesen Vorkulturen wurde jeweils 1 µl entnommen und direkt auf eine Nitrocellulose Membran, die sich auf LB-Kanamycin-Agar befand, punktuell aufgetragen und *E. coli* erneut bei 37 °C für 1-1,5 h wachsen gelassen. Die Induktion der Proteinexpression bei 1 mM IPTG und die Detektion der positiven Klone wurden, wie oben beschrieben, durchgeführt. Klone wurden als immunreaktiv eingestuft, wenn sie im Vergleich zum *E. coli* Kontrollklon, der den unbehandelten Expressionsvektor pET30a enthielt, eine für das Auge deutlich sichtbare Färbung aufwies und beim Beprobieren mit dem adsorbierten negativen Kontrollserum nicht detektiert wurden bzw. ohne Anfärbung blieben. Die Plasmid DNA aller positiven Klone wurde isoliert (siehe 2.4.1.1) und zur Sequenzierung mit pET30a-spezifischen Vorwärts-Primern zu LGC Genomis (LGC Genomics GmbH, Berlin, D) gesendet. Die Analysen der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) der *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Die *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) Datenbank (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) sowie die *Clusters of Orthologous Groups* (COG) Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/coxik.cgi?gi=646>) wurden für die Klassifizierung der chlamydialen Proteine in die verschiedenen funktionellen Gruppen herangezogen. Desweiteren wurde mit PSORTb v3.0 (<http://psort.org/psortb/index.html>) die subzelluläre Lokalisation der Proteine vorhergesagt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Seren von experimentell mit *C. psittaci* infizierten und nicht infizierten Kälbern

In dieser Arbeit fanden die Seren von *C. psittaci*-infizierten Kälbern im Rahmen der *In vivo induced antigen technology* (IVIAT) Anwendung, mit dem Zweck chlamydiale Antigene zu identifizieren, die im Kalb d. h. *in vivo* synthetisiert werden. Dazu wurden die Seren zunächst mit Hilfe von 1D-Immunblots charakterisiert.

3.1.1 Seren von *C. psittaci*-infizierten Kälbern und nicht infizierten Kälbern reagieren mit Proteinlysaten von *C. psittaci*-infizierten Zellen

Mit Hilfe von Immunblot-Analysen wurden die unbehandelten Seren der Kälber, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion entnommen wurden, in einer 1:50 Verdünnung (Abb. 3A) und 1:1000 Verdünnung (Abb. 3B) mit Lysaten von *C. psittaci*-infizierten BGM- und/oder HEp-2-Zellen als auch mit nicht infizierten BGM- und/oder HEp-2-Zellen getestet. Dabei konnten verschiedene reaktive Banden in allen Molekulargewichtsbereichen ermittelt werden (Abb. 3A), die zum größten Teil ausschließlich den infizierten Proben zugeordnet werden konnten d. h. Chlamydien-spezifisch sind. Entsprechend Essig und Kollegen (Essig et al., 1999) wurden nun Vergleiche mit chlamydialen Proteinen herangezogen, die bekanntermaßen eine Immunreaktion des Wirtes auslösen. Die etwas unscharfe Bande im niedrigmolekularen Bereich entspricht dabei wohl am ehestem dem 8-10 kDa großen chlamydialen Lipopolysaccharid (LPS; siehe auch anti-LPS Blot in Abb. 3A). Dazu fallen prominente Banden der infizierten Zellen mit Größen zwischen 40-45 kDa und bei etwa 60 kDa besonders auf. Im Bereich 40-50 kDa lässt sich z. B. MOMP (etwa 43 kDa) einordnen. Die 60 kDa Bande könnte dem chlamydialen Membranprotein OMP2 (60 kDa) sowie dem Hitzeschockprotein HSP60 (57 kDa) entsprechen. Auch im Bereich 20-30 kDa sind einige Banden zu erkennen. Proteine in diesem Bereich könnten das Plasmid-kodierte Protein Pgp3 (28 kDa) oder auch MIP (etwa 28 kDa) repräsentieren. Bis auf einige wenige Ausnahmen blieben die BGM-Kontrollen vom Serum unerkant. So wurden unspezifische Signale der Seren mit BGM-Zellen einmalig in Höhe der 60 kDa Bande (Serum 4) und bei einer weiteren Serumprobe (Serum 2) im Bereich der 40-50 kDa Bande detektiert. Oftmals bedingt eine zu hohe Proteinkonzentration in den Lysaten oder eine zu hoch konzentrierte Serumprobe eine falsch positive Reaktion. Zudem kann die Entwicklungslänge eines Films zu dem Erscheinen spezifischer bzw. unspezifischer Signale in erheblichem Maße beitragen. Die Vermischung

angrenzender Proben während des Beladens des Gels muss jedoch auch in Erwägung gezogen werden. Dieses konnte bei der Verwendung von stärker verdünnten Seren nicht mehr beobachtet werden (Abb. 3B). Um darüber hinaus die mittleren Molekulargewichtsbereiche besser analysieren zu können, wurden Gele mit einer veränderten Polyacrylamid-Konzentration verwendet. In Abbildung 3B wird der Fokus auf die Molekulargewichtsbereiche 30-60 kDa gelegt. Mit Ausnahme von Serum 5 hebt sich dabei die 60 kDa Bande sehr stark von der Intensität der anderen detektierbaren Banden ab. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass im Serum 3 (14 d p. I.) bereits vor der experimentellen Infektion des Rindes Antikörper gegen *C. psittaci* nachgewiesen werden konnten (FLI, Jena), zeigen die Seren, die 36 bzw. 37 d p. I. entnommen wurden (Abb. 3B; Serum 1, 2) ein etwas stärker differenziertes Bandenmuster im Bereich 40-50 kDa verglichen zu den Seren 14 d p. I. (Serum 4, 5).

3.1.2 Kreuzreagierende Antikörper und unspezifische Bindungen

Kreuzreaktivitäten von Antikörpern können auftreten, wenn die Antikörperbindestellen (Epitope) von 2 Antigenen identisch sind oder sich ähneln. Bei Chlamydien wurden mittels Immunisierung von Mäusen Antikörper erhalten, die das LPS binden und sich zwischen den verschiedenen Spezies als kreuzreaktiv erwiesen (Fu et al., 1992). Auch die Kreuzreaktivität von Antikörpern mit LPS von *E. coli* wurde beobachtet (Caldwell und Hitchcock, 1984). Zudem sind Homologien zwischen konservierten Epitopen von humanen und chlamydialen Hitzeschockproteinen, z. B. HSP60, bekannt. Die Expression dieser Proteine resultiert oft aus einer Stresssituation der Zelle (Entzündung, Infektion). Humane Antikörper gegen HSP60 können das homologe Protein in Chlamydien binden. In dieser Arbeit, wies das Serum der infizierten Kälber eine Kreuzreaktivität unter anderem mit dem LPS von *E. coli* auf. Seren von nicht experimentell infizierten Kälbern zweier unterschiedlicher Altersgruppen stellten sich im Immunblot mit infizierten BGM- oder HEp-2-Zellen als schwache Reaktion im Falle der Seren von Kälbern, die ein Monat alt sind und als moderate Reaktion für die Seren der 1 Jahr alten Kälber dar (Abb. 3A, unten). Die unspezifische Signalstärke unterscheidet sich zwar deutlich von der der positiven Seren, zeigt dennoch eine nicht unerhebliche Antikörperbindung. Das putative chlamydiale LPS (unscharfe Banden bei etwa 15 kDa) in den infizierten BGM- und HEp-2-Zellen erwies sich als reaktiv mit den Kontrollseren. Ebenso wurde ein 60 kDa großes Protein in beiden Zelltypen, in Unabhängigkeit des Infektionsstatus dieser, verstärkt mit den Seren der älteren Tiere detektiert (Abb. 3A, unten). Es wird angenommen, dass kreuzreagierende Antikörper, die z. B. gegen das LPS von *E. coli* oder das bovine HSP60 gerichtet sind, diese unspezifischen Signale verursachen.

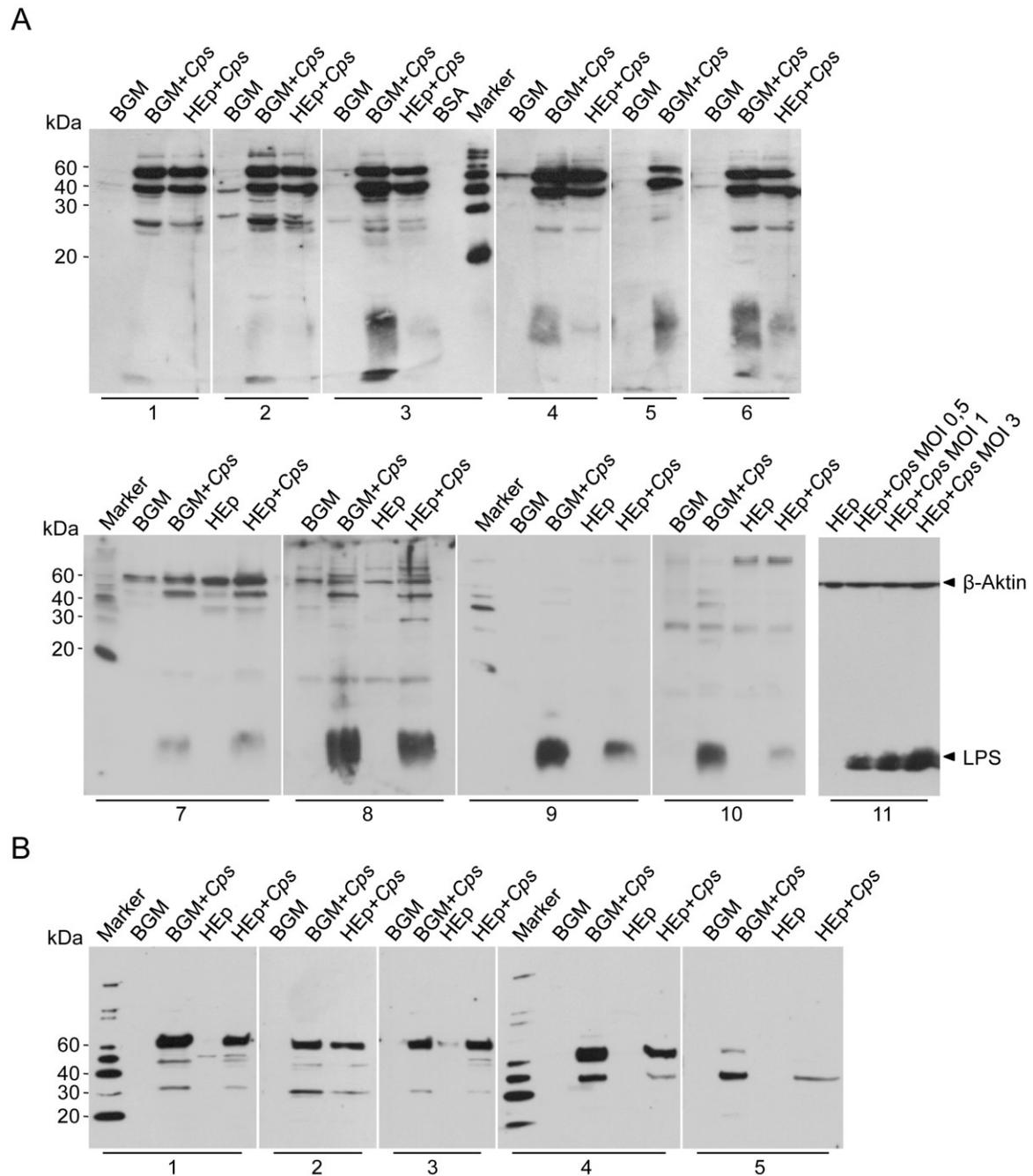


Abb. 3: Immunblots der Seren *C. psittaci*-infizierter Rinder und nicht infizierter Kontrolltiere. Die Lysate von *C. psittaci*-infizierten (BGM/HEp+Cps) bzw. nicht infizierten BGM- oder HEp-2-Zellen (BGM/HEp) wurden in einem **(A)** 12%igen oder **(B)** 4-20%igen Polyacrylamid Gel aufgetrennt, geblottet und mit den verschiedenen Seren in einer **(A)** 1:50 Verdünnung oder **(B)** 1:1000 Verdünnung für 16 h bei 4 °C inkubiert. **(A)** Die unten dargestellten Filme wurden doppelt so lang in der Entwicklerlösung (10 sec) inkubiert wie die oben dargestellten Blots (5 sec), um die unspezifischen Signale identifizieren zu können. **(B)** Die Inkubationszeit der Filme in der Entwicklerlösung betrug 1 min. 1, Serum 36 d p. I.; 2, Serum 37 d p. I.; 3-5, Serum 14 d p. I.; 6, Serum 7 d p. I.; 7, 8 Serum nicht infizierter 1 Jahr alter Kälber; 9, 10 Serum nicht infizierter 1 Monat alter Kälber; 11, anti-β-Aktin Antikörper und anti-Chlamydia LPS Antikörper; Marker, MagicMark™ XP Western Protein Standard; MOI, *Multiplicity of infection*.

3.2 Die extensive Abreicherung der Seren durch Inkubation mit *in vitro* kultivierten *E. coli* und *C. psittaci*

Die beschriebenen Rinderseren der *C. psittaci*-infizierten Tiere wurden für die folgenden Versuche zu gleichen Teilen gepoolt und mit Zellen und Zelllysaten von *E. coli* sowie Lysaten von *C. psittaci*-infizierten BGM-Zellen inkubiert, um nur solche Immunreaktionen zu ermöglichen, die *in vivo* d. h. während der Infektion im Rind vorherrschend sind. Mit Western Blots und ELISAs wurden die Erfolge des Adsorptionsprozesses kontrolliert und dokumentiert.

3.2.1 Die Abreicherung der Kälberseren von Antikörpern gegen *E. coli*

In einem ersten Schritt erfolgte eine Abreicherung des gepoolten Serums von anti-*E. coli*-Antikörpern, da in den folgenden Screenings *E. coli* als Expressionswirt fungierte. Abbildung 4 veranschaulicht, dass die Antikörper, die *E. coli* Antigene erkennen und binden, in großem Umfang durch die mehrfachen Inkubationen des Serumpools sowohl mit Zelllysat als auch ganzen Zellen von *E. coli* beseitigt wurden. In dem dazu durchgeführten ELISA (Abb. 4A) wurden 96-Well-Loch-Platten mit demselben Zelllysat gecoatet, das auch für die Adsorptionen verwendet wurde. Das unbehandelte Serum in einer 1:50 Verdünnung weist dabei eine OD_{450nm} von etwa 0,6 auf. Durch die Vorbehandlung mit *E. coli* wird eine Reduktion um etwa das 5-fache erzielt. Das Serum, das mit *E. coli* und *C. psittaci* adsorbiert wurde, zeigt eine vergleichbar niedrige Reaktivität im ELISA, wie das *E. coli*-adsorbierte Serum. Fetales Kälberserum, das gewöhnlicherweise als Zusatz für die Nährmedien verwendet wird, die in der Zellkultur ihre Anwendung finden, wurde als Negativ-Kontrolle in den Assay integriert. Desweiteren wurde mit Western Blot Experimenten nicht nur die stufenweise Abreicherung des gepoolten Serums *C. psittaci*-infizierter Kälber dargestellt (Abb. 4B, links), sondern auch die vom Serum (14 d p. I. und 28 d p. I. gepoolt) eines nicht infizierten Kalbes (Abb. 4B, rechts). Entsprechend dem Resultat des ELISA-Tests wurden die anti-*E. coli*-Antikörper durch die mehrfache Präadsorption mit *E. coli* beseitigt, was durch die Verringerung der reaktiven Banden im Western Blot sichtbar ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gepoolten und unbehandelten Seren *C. psittaci*-infizierter und nicht infizierter Kälber in hohem Maße Antikörper gegen *E. coli* aufweisen.

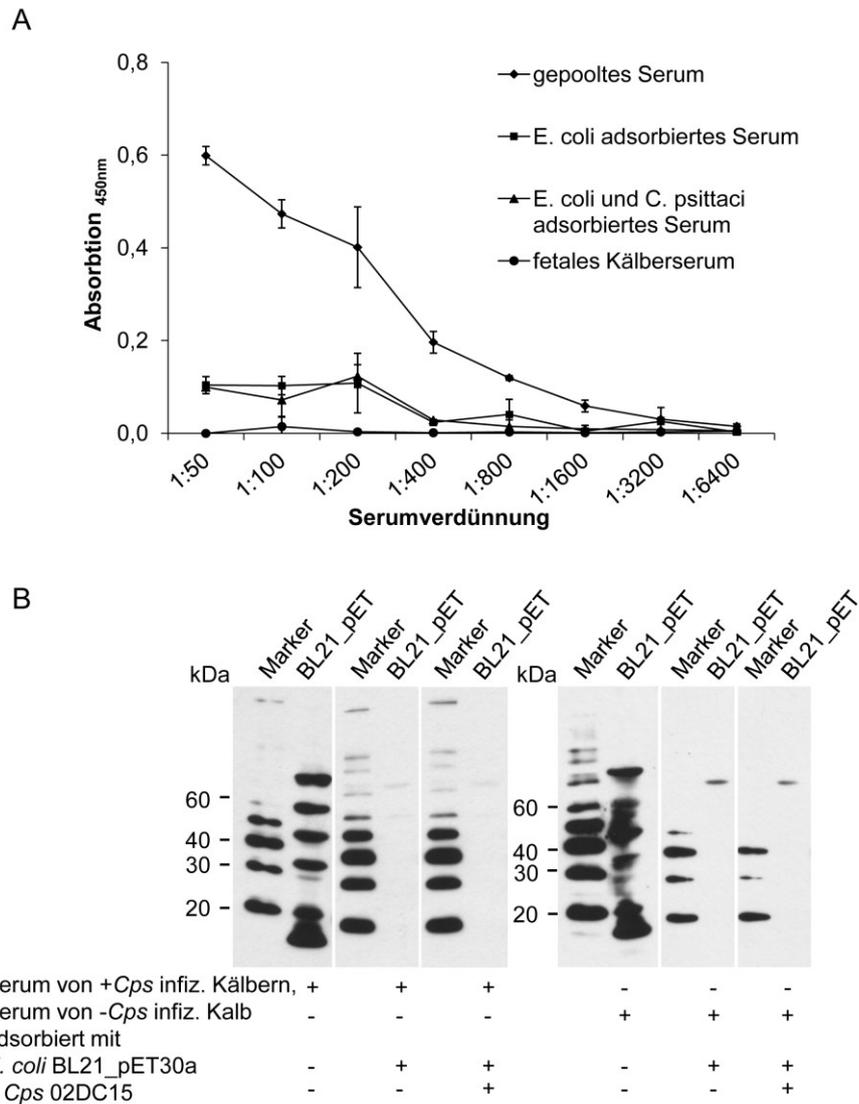


Abb. 4: Die Abreicherung des gepoolten Serums von *E. coli*-spezifischen Antikörpern. (A) ELISA-Platten wurden mit 100 µg Zelllysate von *E. coli* BL21 (DE3)-pET30a pro Well für 16 h bei 4 °C gecoatet und mit den 1:2 Verdünnungsreihen der verschiedenen Serumproben inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Hintergrund-korrigierten Absorptionswerte aus zwei unabhängigen ELISA-Tests. **(B)** Zelllysate von *E. coli* BL21 (DE3)-pET30a (BL21_pET30a) wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Gepooltes Serum von *C. psittaci*-infizierten Kälbern (+Cps infiz.) und Serum eines nicht infizierten Kalbes (-Cps infiz.) wurden vor und nach der Adsorption mit *E. coli* BL21 (DE3)-pET30a (*E. coli* BL21_pET30a) und mit Zelllysate *in vitro* kultivierter *C. psittaci* 02DC15 zugegeben. *Cps*, *C. psittaci*; +, vorhanden; -, nicht vorhanden; Marker, MagicMark™ XP Western Protein Standard.

3.2.2 Die Abreicherung der Kälberseren von *C. psittaci*-spezifischen Antikörpern

Im Anschluss zu den Untersuchungen mit *E. coli*, wurden die Seren ebenfalls auf eine Abreicherung der *C. psittaci*-spezifischen Antikörper getestet. Zielführend war es alle Antikörper in den Seren zu eliminieren die chlamydiale Antigene erkennen, die *in vitro* d. h. in der infizierten Zelle unter kontrollierten Laborbedingungen exprimiert werden. Das adsorbierte Serum der *C. psittaci*-infizierten Kälber sollte demnach nur Antikörper enthalten, die chlamydiale Proteine binden, die *in vivo* d. h. in der infizierten Rinderlunge, synthetisiert wurden. Abbildung 5 bestätigt diese Erwartung, indem gezeigt wird, dass die Reaktivität der sukzessiv gewonnenen Serum-Proben mit Zunahme der Adsorptionen im ELISA gegen chlamydiales Lysat sinkt. Weiterhin wurden für das gepoolte Serum der *C. psittaci*-infizierten Rinder zwei Auffälligkeiten festgestellt (Abb. 5A): Mit dem Mittelwert \pm Standardabweichung von $0,11 \pm 0,012$ lag die Absorption des unbehandelten und gepoolten Serums einer 1:50 Verdünnung gegen *C. psittaci* weit unter der, die für dieselbe Probe im ELISA gegen *E. coli* ($0,599 \pm 0,02$) bestimmt wurde. Darüber hinaus führte die Abreicherung des Serums von Antikörpern, die *E. coli* binden, bereits zu einer partiellen Abreicherung von Antikörpern, die *C. psittaci* erkennen (etwa 6-fache Absenkung der Absorption). Dieser Tatsache liegen sehr wahrscheinlich Antikörper mit kreuzreagierenden Eigenschaften zu Grunde. Solche Annahmen konnten bereits für Antikörper gegen die homologen Hitzeschockproteine von *C. psittaci* und *E. coli* in einer älteren Studie bestätigt werden. Diese Erkenntnisse unterstützend, wurde für das unbehandelte Serum eines nicht infizierten Rindes (Verdünnung 1:20), wenn auch sehr niedrig, eine positive Absorption bei 0,135 im ELISA gegen *C. psittaci* detektiert. Dies führt zu der Annahme, dass hier ein falsch-positives Ergebnis basierend auf kreuzreaktiven Antikörpern vorliegt. Die Western- bzw. Immunblots (Abb. 5B) bestätigen die bereits im ELISA gezeigte Abreicherung des Serums infizierter Rinder von Antikörpern, die mit Antigenen von *in vitro* kultivierten *C. psittaci* reagieren. Ferner liefern sie durch den direkten Vergleich von *C. psittaci*-infizierten BGM-/HEp-2-Zelllysate mit Lysat nicht infizierter Zellen Hinweise auf das Bandenmuster und die Größe von generell immunreaktiven chlamydialen Proteinen (Abb. 5B, links).

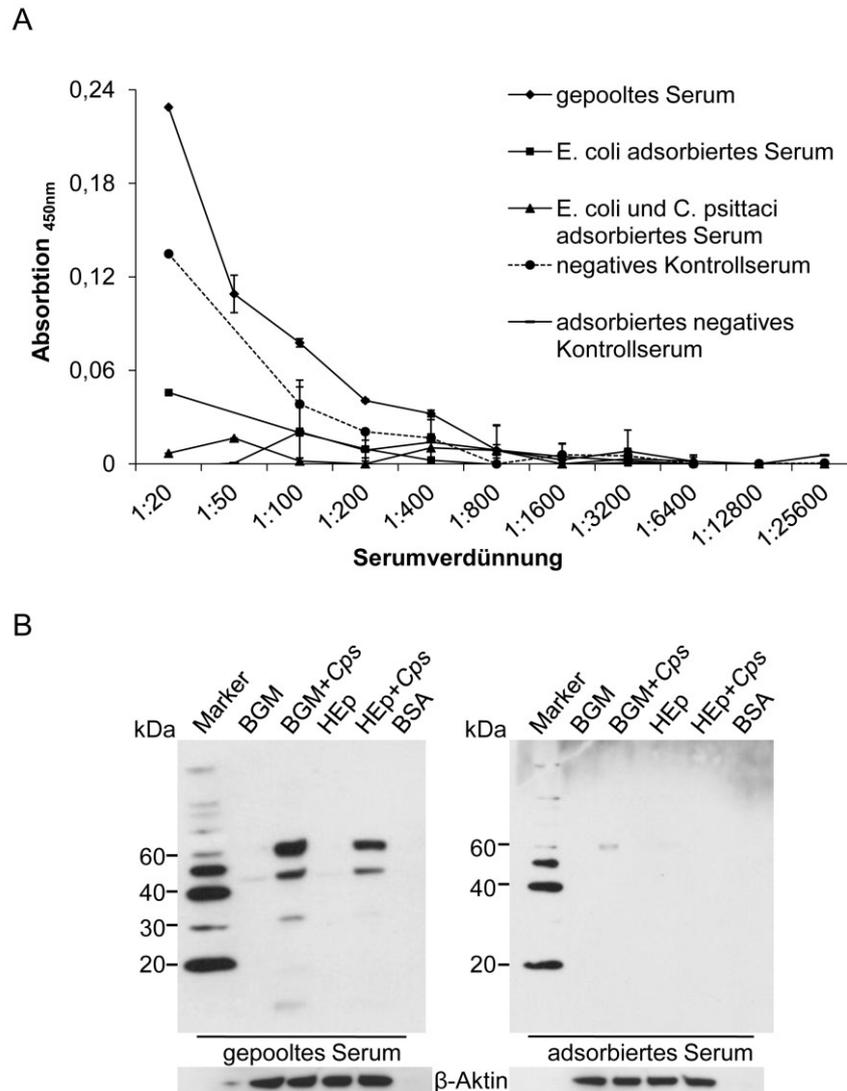


Abb. 5: Die Abreicherung des gepoolten Serums von *C. psittaci*-spezifischen Antikörpern. (A) ELISA-Platten wurden mit 100 µg Lysat von *C. psittaci*-infizierten BGM-Zellen pro Well, wie in Abb. 4 beschrieben, gecoatet und mit den verschiedenen Serumproben inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Hintergrund-korrigierten Absorbationswerte aus zwei unabhängigen ELISA-Tests. **(B)** Zelllysat von *C. psittaci*-infizierten BGM- oder HEp-2-Zellen (BGM/HEp+Cps) bzw. nicht infizierten Zellen (BGM/HEp) wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit dem gepooltem Serum von *C. psittaci*-infizierten Kälbern vor und nach der Adsorption mit *in vitro* kultivierten *E. coli* und *C. psittaci* inkubiert. Als Ladekontrolle sind jeweils die entsprechenden Blots gegen das β-Aktin gezeigt. BSA, Bovines Serumalbumin; *Cps*, *C. psittaci*; Marker, MagicMark™ XP Western Protein Standard.

3.3 Die chlamydiale Expressionsbank weist die erforderliche Variabilität und Größe der Insert DNA auf

Die in dieser Studie hergestellte genomische Expressionsbank stellt eine Genbibliothek dar, bei der fragmentierte genomische DNA von *C. psittaci* in einen Expressionsvektor kloniert wurde. Mit der Konstruktion der Expressionsbank aus chlamydialer DNA wurde die

Möglichkeit geschaffen definierte DNA Abschnitte zu exprimieren, die das gesamte Genom von *C. psittaci* repräsentieren. Es handelt sich um eine induzierbare Expressionsbank, die mit dem Expressionswirt *E. coli* kontrolliert d. h. nach Zugabe des Induktors IPTG die klonierten Peptide und Proteine synthetisiert. Werden die auf diese Weise exprimierten Genprodukte im Anschluss mit dem adsorbierten Serum beprobt, können immunreaktive Proteine bzw. Epitope identifiziert werden.

3.3.1 Restriktionsanalysen von zufällig ausgewählten Klonen

Die Konstruktion einer Expressionsbank verläuft in mehreren Schritten und erfordert dabei verschiedene Tests und Kontrollen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der klonierten DNA-Fragmente, die durch die Behandlung der isolierten Plasmid-DNA mit kompatiblen Restriktionsendonukleasen erhalten werden kann, ist notwendig um die Richtigkeit der Größe der klonierten DNA-Fragmente zu überprüfen und den Anteil der Vektoren, in die keine chlamydiale DNA eingebracht wurde, zu bestimmen. In Abbildung 6 ist die Restriktionsanalyse der Plasmide von 25 zufällig gewählten Klonen mit den Enzymen *Bam*HI und *Xba*I dargestellt. Im direkten Vergleich zu der unverdauten Plasmid-DNA wird offensichtlich, dass DNA-Fragmente mit einer Größe von 500-1500 bp detektiert werden können und, dass sogenannte pET30a Leer-Vektoren Bestandteil der Expressionsbank sind. Im Folgenden wird auf die Sequenzen der klonierten DNA-Fragmente eingegangen.

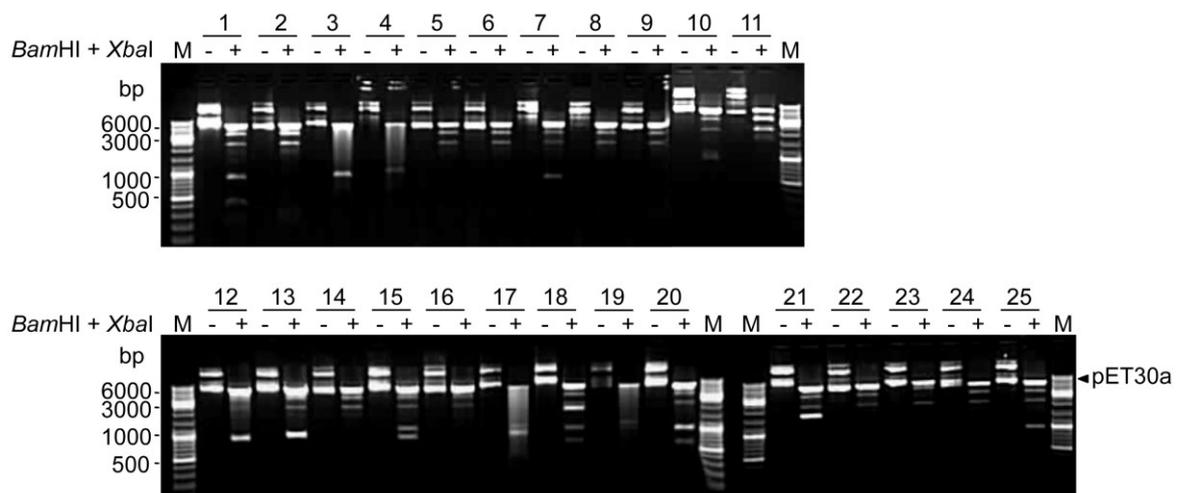


Abb. 6: Restriktionsanalyse von zufällig gewählten Klonen der genomischen Expressionsbank. Dargestellt sind die Kontrollverdau der isolierten Plasmide von 25 Klonen mit *Bam*HI und *Xba*I im Ethidiumbromid-gefärbten 1%igen Agarose-Gel. -, unverdautes Plasmid; +, mit Restriktionsenzymen behandeltes Plasmid; M, Größenstandard.

3.3.2 Sequenzierung von Zufallsklonen

Zusammen mit den 25 zufällig gewählten Klonen aus den Restriktionsanalysen wurden 71 weitere beliebige Klone direkt nach der Transformation des Expressionswirt *E. coli* BL21 (DE3) gepickt und für die Sequenzanalyse mit dem pET30a-spezifischen Vorwärts-Primer vorbereitet. Das Kreisdiagramm (Abb. 7) hebt die prozentualen Anteile der Gruppen hervor, die als Bestandteil der Expressionsbank identifiziert worden sind. Erwartungsgemäß stellen die Klone, die chlamydiale DNA enthalten, mit 62% den größten Anteil dar. Expressionsvektoren ohne Insert wurden in 25% der Klone nachgewiesen. Einen sehr geringen Bruchteil der Expressionsbank bilden solche DNA-Sequenzen, die entweder dem Klonierungsstamm *E. coli* oder auch dem humanen Wirt zugeordnet werden können. Trotz der Aufreinigung der Chlamydien von ihren Wirtszellen, wie unter 2.3.1.2 beschrieben, kann eine 100%ige Reinheit der Bakterien nicht garantiert werden. Ein Zehntel der sequenzierten DNA-Insert konnte entweder keiner dieser hier aufgeführten Gruppen zugeordnet werden oder konnte nicht identifiziert werden, da die Sequenzierung immer direkt an der Klonierungsstelle abbrach. Die im Rahmen dieser Studie und die im Vorfeld durch die Firma LGC, die die ersten Klonierungsschritte vollzog, durchgeführten Analysen weisen eine hinreichende Variabilität und Größe der chlamydialen Expressionsbank nach.

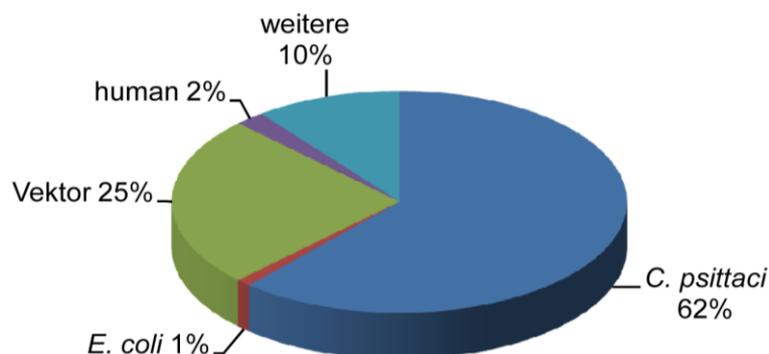


Abb. 7: Sequenzierung der Plasmid-DNA von 96 zufällig gewählten Klonen der genomischen Expressionsbank. Im Kreisdiagramm dargestellt ist die prozentuale Verteilung der identifizierten Inserts, gruppiert entsprechend der Sequenzanalysen.

3.4 Optimierung der Parameter für das Screening der IPTG-induzierbaren chlamydialen Expressionsbank/Etablierung des Screenings

In dem folgenden Teil dieser Arbeit wird beschrieben, wie die induzierbare chlamydiale Expressionsbank eingesetzt wird und welche bzw. wie die Testbedingungen gewählt wurden.

3.4.1 Festlegung der Mindestanzahl der zu screenenden Klone

Zunächst wird eine Berechnung aufgeführt, mit der ermittelt wurde, wieviele Klone der Expressionsbank gescreent werden müssen um mit einer Wahrscheinlichkeit (p) von 99% das gesamte chlamydiale Genom abzudecken: $N = \ln(1-p) / \ln(1-f)$ (Clarke und Carbon, 1976). Für die Berechnung wird eine durchschnittliche Größe der DNA-Fragmente von 1000 bp angenommen und in Relation zur Größe des *C. psittaci* Genoms ($f = 1000 \text{ bp} / 1,172 \times 10^6 \text{ bp}$) gesetzt. Folglich wird eine Anzahl von 5395 Klonen erhalten. Da die Expressionsbank ungerichtet kloniert wurde d. h. mit nur einer Restriktionsendonuklease, die blunt ends produziert (*EcoRV*), wird bezugnehmend auf alle drei möglichen Leserahmen und Leserichtungen der doppelsträngigen DNA in *C. psittaci* die 6-fache Menge der zuvor berechneten Klonzahl angenommen. Mit dem Einsatz von mindestens 32370 Klonen ist diese Bedingung erfüllt und jedes Fragment des klonierten chlamydialen Genoms sollte mindestens einmal vorhanden sein ($P = 0,99$). Insgesamt besteht die Expressionsbank aus 105000 *E. coli* Klonen des Stammes DH10 (LGC, Berlin, D). Nachdem ein Teil der Expressionsbank aus diesem Transformationsstamm in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) transferiert wurde, konnten etwa 75000 Klone nachgewiesen werden. Die Anforderungen an die Komplexität der Expressionsbank sind damit erfüllt.

3.4.2 Einfluss verschiedener Parameter auf das Wachstum und das Expressionsverhalten der Genbank

Um die erforderliche Anzahl der Klone unter optimalen Bedingungen screenen zu können, wurden im Vorfeld einige Parameter getestet, z. B. der Einfluss von verschiedenen Zeiten und Temperaturen auf das Wachstum der Klone, auf die Induktion der Proteinsynthese nach der Zugabe von IPTG und die Auswirkungen der Behandlungsdauer mit Chloroform zur partiellen Lyse von *E. coli* auf die Detektierbarkeit der exprimierten Proteine. Um diese Dinge klären zu können, wurden Test-Screenings durchgeführt, bei denen immer einige Parameter konstant gehalten wurden während andere variiert wurden. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

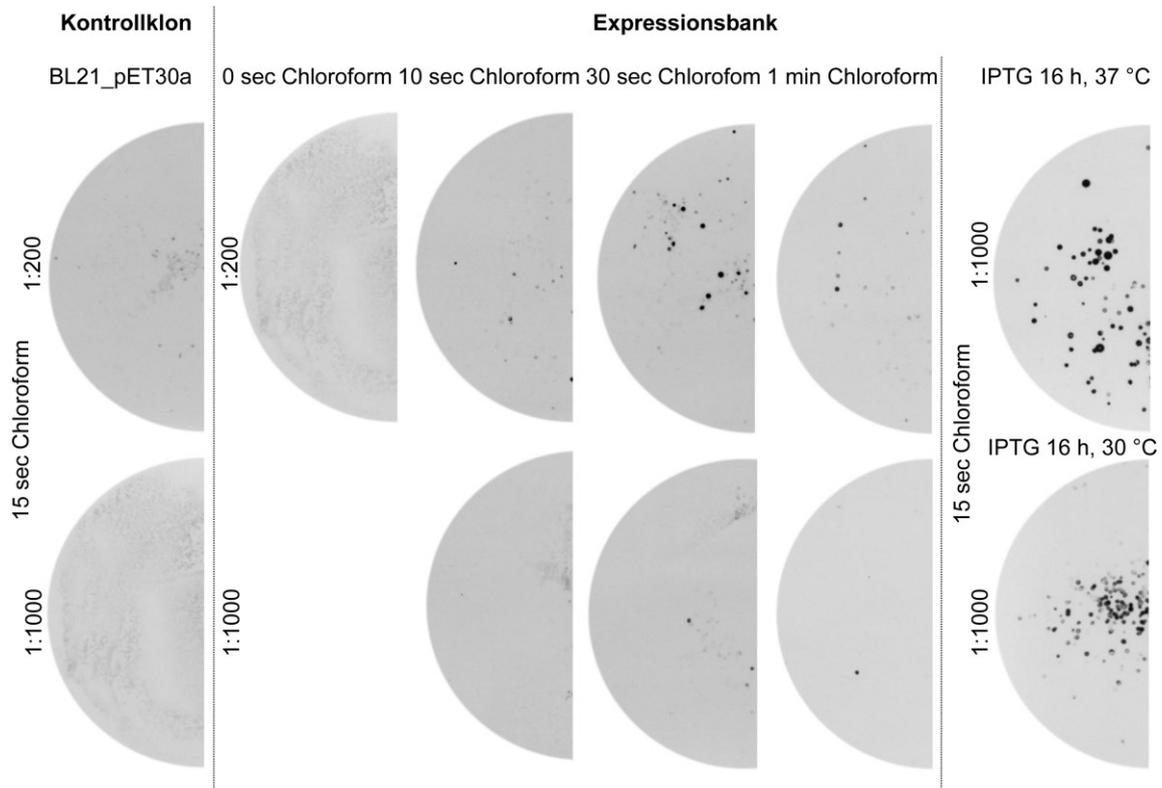


Abb. 8: Einfluss der Temperatur und Induktions-Dauer auf das Expressionsverhalten der Genbank sowie die Auswirkungen verschiedener Behandlungslängen mit Chloroform. Dargestellt sind Blots der heterologen Expressionsbank und des Kontrollklons (*E. coli* mit dem nativen Expressionsvektor pET30a) in Abhängigkeit der verschiedenen Behandlungen nach Inkubation mit einem anti-(His)₆-Tag Antikörper (1:200, 1:1000) und Chemolumineszenz-Detektion. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Induktion der Proteinsynthese für 4 h bei 37 °C und 1 mM IPTG. Die Dauer der Chloroformbehandlung ist aufgeführt.

Der Expressionsstamm mit dem nativen Vektor pET30a (kein Insert) fungierte dabei als Kontrolle. Da die heterolog exprimierte Proteine in der Mehrheit als Fusionsprodukte mit mindestens einem (N-terminal) oder auch zwei (His)₆-Tags (N- und C-terminal) auftreten, wurde ein Antikörper, der eben diese detektieren kann, in den Tests zum Nachweis verwendet.

Zu Beginn der Untersuchungen wurde getestet unter welchen Wachstumsbedingungen die Expressionsbank die optimale Voraussetzung für die Synthese der heterologen Proteine bietet. Den Empfehlungen entsprechend (Rollins et al., 2005) wurde die Dauer und Temperatur gewählt, bei der die Kolonien etwa die Größe eines Stecknadelkopfes erreichten. Dies geschah bei einer Inkubation von 16 h bei 30 °C auf Selektiv-Agar.

Im Vorfeld der Untersuchungen zur Dauer bzw. Temperatur der Induktion wurde festgelegt, wie lang Chloroform zur partiellen Lyse der *E. coli* in den Screenings verabreicht werden sollte. Sofern nicht anders erwähnt, erfolgte die Induktion der Bakterien in diesen Experimenten mit 1 mM IPTG für 4 h bei 37 °C. Es wurde gezeigt, dass mit steigender Dauer

der Chloroform-Behandlung bis maximal 30 Sekunden eine Zunahme der detektierbaren Klone, die ein Fusionsprotein tragen, zu verzeichnen ist. Darüber hinaus führt eine längere Behandlungsdauer zu einem Verlust der detektierbaren Signale. Die Versuchsreihe wurde mit 2 verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers durchgeführt, wobei die Verwendung der niedrigeren Konzentration in einer geringeren Signalstärke resultierte. Wie zu erwarten war, wurden sowohl bei der induzierten, mit Chloroform behandelten Kontrolle als auch bei der induzierten, aber nicht mit Chloroform behandelten Expressionsbank keine spezifischen Markierungen durch die Inkubation mit dem anti-(His)₆-Tag-Antikörper erzielt. Für die folgenden Experimente wurde eine Zwischenstufe (15 Sekunden) der untersuchten Behandlungsdauer mit Chloroform gewählt.

Im rechten Teil der Abbildung 8 ist dargestellt, wie die Temperatur die Induktion der Proteinsynthese bei gleichbleibender Induktions-Dauer (16 h) beeinflusst. Sowohl bei 37 °C als auch bei 30 °C ist eine Vielzahl von spezifischen Signalen der Fusionsproteine zu erkennen. Unterschiede können jedoch in der Größe der Kolonien und damit der detektierbaren Signale wahrgenommen werden. Vergleicht man nun die Ergebnisse der 16-stündigen Induktion bei 37 °C mit der Induktion für 4 h bei 37 °C werden die Abstufungen noch größer. Basierend auf der Antikörper-quantifizierten Expressionsstärke unter den verschiedenen Bedingungen, wurde für die Induktion der Proteinsynthese während des primären Screenings der Expressionsbank eine Temperatur von 37 °C für 4 h festgelegt. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass unspezifische Produkte exprimiert werden und falsch-positive Klone selektiert werden, z. B. solche, die ausgehend vom pET30a-spezifischen Startcodon nur das 8,13 kDa große Produkt, bestehend aus einem Poly-Histidin-Affinitäts-Tag und einem Streptavidin-Tag, exprimieren.

3.4.3 Empirische Bestimmung der Serum- und Protein G (HRP) Konzentrationen

Im Anschluss wurde die Expressionsbank unter den definierten Bedingungen (siehe 3.4.2) in Kombination mit dem gepooltem, unbehandelten Serum oder dem gepoolten, adsorbierten Serum getestet. Mit der Verwendung des letzteren wird die sogenannte *In vivo induced antigen technology* (IVIAT) beschrieben. In Abbildung 9 wird für beide Serumproben gezeigt, dass mit der Zunahme der Verdünnungsstufen sowohl der jeweiligen Serumprobe als auch der des HRP-gekoppelten Protein G, das an die Immunglobuline zur Detektion bindet, die Signalstärke abnimmt. Mit dem Erfahrungswert aus der

Verdünnungsserie des unbehandelten Serumpools (links) und der Erwartung, dass aufgrund der Adsorption deutlich weniger Signale detektiert werden können, wurden die Verdünnungsstufen des adsorbierten Serums (rechts) für die Testreihe im Vorfeld entsprechend angepasst. Eine sehr hohe Konzentration (1:5000) des Proteins G resultiert dabei in einer unspezifischen Anfärbung der Kolonien (Hintergrundfärbung). Stringente Bedingungen mit einem kombinierten Einsatz des adsorbierten Serums und des konjugierten Proteins G in einer 1:1000 bzw. 1:10000 Verdünnung wurden für die anschließenden Screenings gewählt.

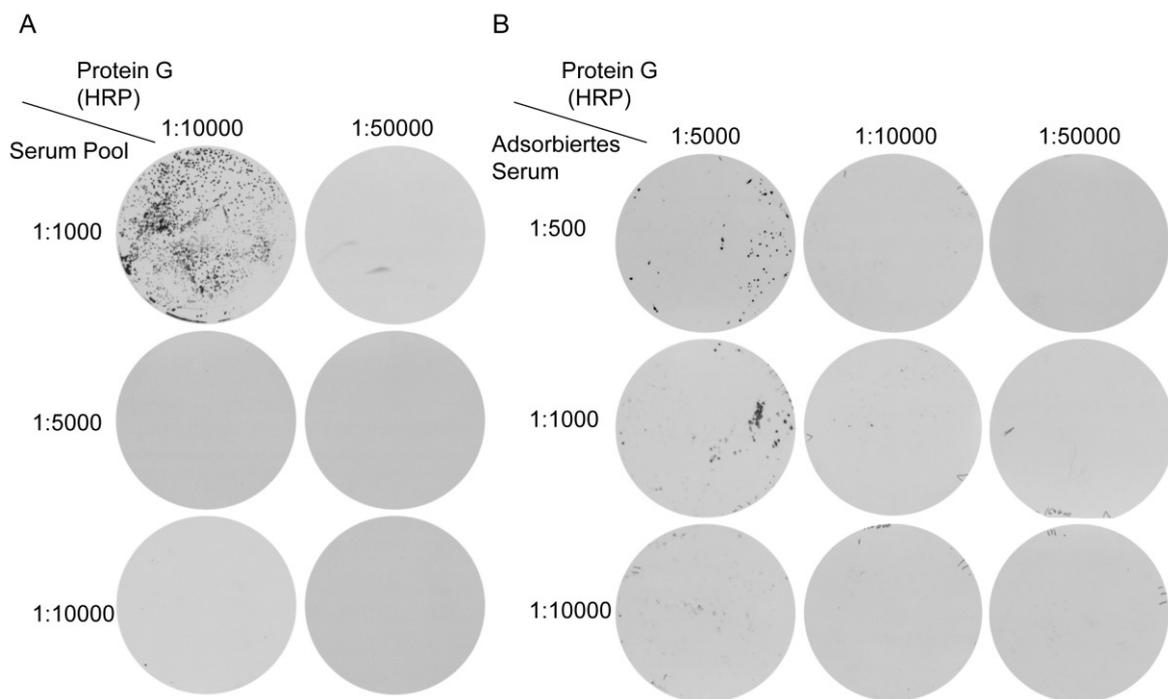


Abb. 9: Untersuchung verschiedener Kombinationen von gepoolten Serum und HRP-gekoppeltem Protein G. Dargestellt sind die Blots der Expressionsbank nach der Induktion der Proteinsynthese mit 1 mM IPTG bei 37 °C für 4 h und einer 15-sekündigen Behandlung mit Chloroform. Die verwendeten Konzentrationen von Serum und Protein G (HRP) in den verschiedenen Kombinationen sind aufgeführt. **(A)** Gepooltes unbehandeltes Serum; **(B)** Gepooltes und adsorbiertes Serum.

3.5 Das Major outer membrane protein (MOMP) von *C. psittaci* fungiert als immunreaktives Kontrollprotein in den Screenings

In der äußeren Membran von Chlamydien können viele Proteine gefunden werden (Abb. 10A), dabei ist MOMP das am häufigsten auftretende Protein. Im Sinne einer Validitätskontrolle in den Screenings wurde dieses Membranprotein herangezogen, da bereits in einigen Studien die starke Immunogenität des *C. psittaci* MOMP (Vanrompay et al., 1999; Zhang et al., 1989) gezeigt werden konnte. In einem ersten Schritt erfolgte die Klonierung des gesamten *open reading frames* (ORF) von MOMP (*ompA*) in denselben Expressionsvektor, der

für die Erstellung der Expressionsbank verwendet wurde (Abb. 10B). Bei der heterologen Expression von MOMP mit dem hier verwendeten T7-Promotor getriebenen pET-System offenbarte sich deutlich die Problematik der Toxizität dieses Membranproteins für *E. coli*. Nach Zugabe des Induktors IPTG konnte ein Abfall der optischen Dichte bei 600 nm und damit das eintretende Zellsterben wahrgenommen werden. Dennoch konnte MOMP unter den gegebenen Bedingungen der Screenings in erforderlichem Maße synthetisiert werden um seiner Funktion gerecht zu werden. Abbildung 10C stellt das 48,66 kDa große rekombinante MOMP-Fusionsprotein dar, das zum Zeitpunkt 2 h und 4 h nach der IPTG-Induktion gebildet wurde und im Western Blot mit einem anti-(His)₆-Tag Antikörper sichtbar gemacht werden kann.

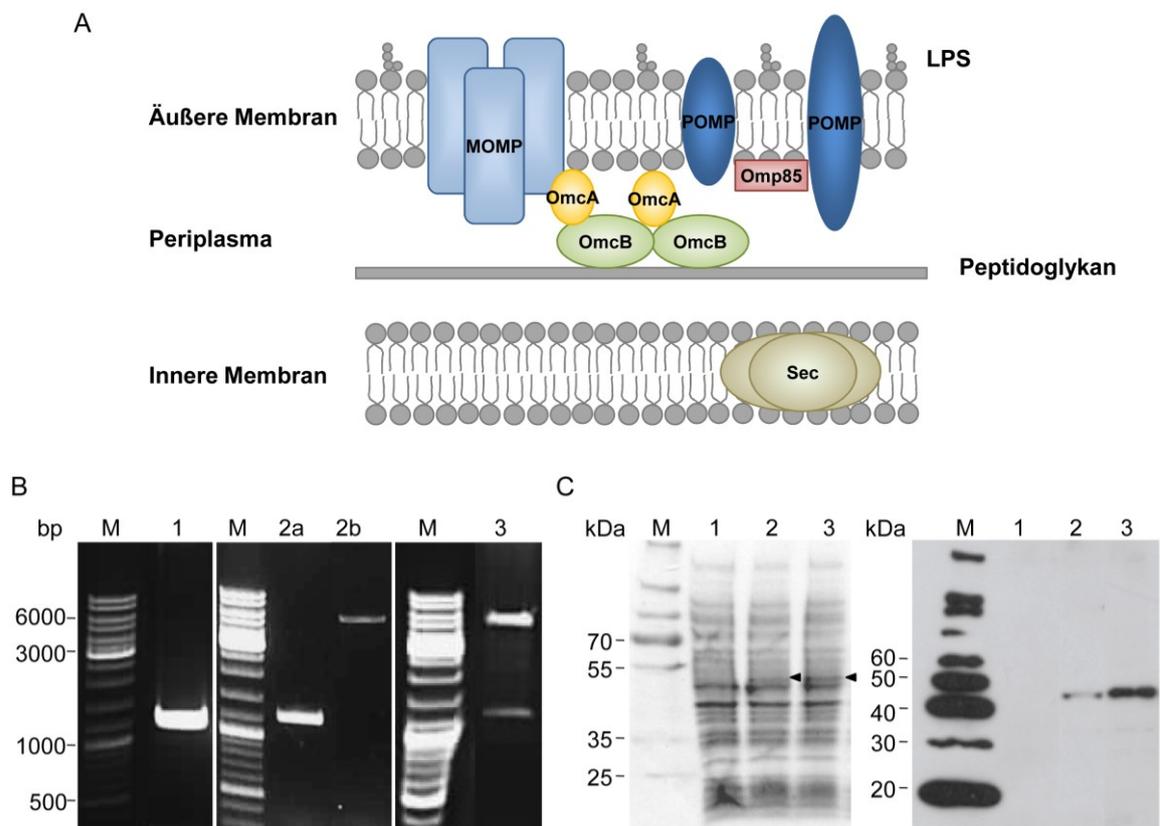


Abb. 10: Klonierung und Expressionskontrolle von *C. psittaci* MOMP. (A) Schematische Darstellung der chlamydialen Zellwand und ihrer assoziierten Proteine (MOMP, POMP, OmcA, OmcB, Omp85) und andere Komponenten (Lipopolysaccharid, Peptidoglykan). (B) Klonierung der 1209 bp großen Gensequenz des chlamydialen MOMP (*ompA*) in den Expressionsvektor pET30a. Dargestellt sind die einzelnen Schritte im Ethidiumbromid-gefärbten 1%igen Agarose-Gel. 1, PCR amplifiziertes 1225 bp großes MOMP mit *Bam*HI/*Xho*I Erkennungsstellen; 2, *Bam*HI + *Xho*I verdautes und aufgereinigtes 1219 bp großes Insert (2a) und 5392 bp große Vektor DNA (2b), die für die Ligation eingesetzt wurden; 3, Kontrollverdau der rekombinanten Plasmid-DNA mit *Bam*HI + *Xho*I. M, GeneRuler™ DNA Ladder Mix. (C) Überexpression von MOMP (siehe Pfeil) in *E. coli*. SDS-Polyacrylamidgel gefärbt mit Coomassie-Brillant-Blau G250 (links) und Detektion des (His)₆-Fusionsproteins im Western Blot (rechts). 1, vor Induktion; 2, 2 h nach Induktion mit 1 mM IPTG; 3, 4 h nach Induktion mit 1 mM IPTG; M, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (links) und MagicMark™ XP Western Protein Standard (rechts).

3.6 Identifizierung immunreaktiver Proteine über das Screening der chlamydialen genomischen Expressionsbank

Nachdem viele, für das IVIAT-Screening wichtige Parameter und Faktoren untersucht und festgelegt wurden, werden in diesem Kapitel die Ergebnisse zu den identifizierten immunreaktiven Kandidaten hervorgehoben.

3.6.1 Kolonie Immunblots und Sequenzanalysen aller immunreaktiven Klone

Mit dem Ziel die erforderliche Klonzahl, die jedes Gen des chlamydialen Genoms mindestens einmal repräsentiert, mit dem adsorbierten Serum zu screenen, wurden primäre Kolonie Immunblots (IVIAT-Screening) durchgeführt. Etwa 170 Klone hoben sich von der Signalstärke des Hintergrundes, der die negativen Klone repräsentiert, ab und wurden daraufhin als putativ immunreaktive Kandidaten selektiert um erneut mit dem adsorbiertem Serum getestet zu werden. In den sogenannten sekundären IVIAT-Screenings bzw. Kolonie Immunblots wurde mit einem leicht abgewandelten Verfahren überprüft, ob das zuvor erzielte Ergebnis eines Klons bestätigt werden konnte. Für die sekundären Kolonie Immunblots wurden die Versuchsbedingungen so gewählt, dass der direkte Vergleich eines Klons immer zur Positivkontrolle MOMP als auch zur Negativkontrolle pET30a gegeben war. Zudem wurde die Immunreaktivität der positiven Klone mit dem adsorbierten Serum eines nicht *C. psittaci*-infizierten Rindes (negatives Kontrollserum) getestet. 79 positive Klone, inklusive der Kontrolle MOMP, konnten auf diese Weise verifiziert werden. Von allen Kandidaten wurden die DNA-Sequenzen der Inserts bestimmt und mit Hilfe der BLAST Funktion der Datenbank NCBI analysiert. In 47 Fällen enthielten die Klone Inserts mit multiplen Genen oder Teilen dieser. Für 31 Klone konnte immer nur ein Gen bzw. das Fragment eines Gens nachgewiesen werden. Tabelle 17 im Anhang bietet eine Übersicht aller identifizierten Gene, gelistet nach steigendem Locus Tag (entsprechend *Accession* Nr. CP002806 und CP002550).

3.6.2 Validierung der Expression subklonierter chlamydialer Gene

Die Sequenzanalysen der positiven Klone legten dar, dass ein spezifisches chlamydiales Gen nicht immer zwangsläufig in dem durch das Start-Codon ATG des Expressionsvektors vorgegebenen Leserahmen bzw. Leserichtung kloniert wurde. Im Vorfeld war bereits zu erwarten, dass die Wahrscheinlichkeit einer klonierten Sequenz im richtigen Leserahmen und in der entsprechenden Leserichtung etwa ein Sechstel beträgt. Um zu klären, ob die

spezifischen Produkte der Klone mit multiplen Genen im Insert oder Genen mit theoretisch abweichenden Leserahmen bzw. Leserichtungen auch im Einzelnen mit dem adsorbierten Serum reagieren, wurden die Gene einiger ausgewählter Klone entweder komplett oder teilweise subkloniert. Dazu wurden die Sequenzen vom Thioredoxin (*trxA*, CPS0B_0094), Pgp6-D-like Protein (CPS0B_1025) und einem Plasmid-kodierten Protein (CPSIT_p2) unter Verwendung des Vektors pET30a kloniert. Die N-terminalen 220 Aminosäuren der Tyrosin-Rekombinase (*xerD*, CPS0B_0790), die Aminosäuren 47-263 des putativen Penicillin-Bindeproteins (CPS0B_0061), die C-terminalen Aminosäuren 297-590 der V-Typ ATP Synthase Untereinheit A (CPS0B_0736), die N-terminalen 334 Aminosäuren des ABC Transporter ATP-Bindeproteins (CPS0B_0417), die Aminosäuren 330-646 des Typ II/III Sekretion System Familienproteins (CPS0B_1013) und die N-terminalen 469 Aminosäuren des Eisen-Schwefel-Assemblierungsproteins SufB (CPS0B_0063) wurden ebenfalls für die anschließende heterologe Expression in *E. coli* in pET30a eingebracht. In der Abbildung 11A ist die erfolgreiche Klonierung der 9 Sequenzen dargestellt.

Mit Ausnahme von SufB und dem Genprodukt von CPSIT_p2, die auch mit bloßem Auge in der Coomassie Blau-gefärbten SDS PAGE zu erkennen waren, wurden alle Proteine mit einem C-terminalen (His)₆-Tag exprimiert (Abb. 11B). Dies wurde sich zu Nutze gemacht, um die Fusionsproteine mit dem anti-(His)₆-Antikörper im Western Blot zur Kontrolle detektieren zu können (Abb. 11B, unten). Das putative Penicillin-Bindeprotein wurde in so geringem Maße exprimiert, dass es in dieser Abbildung nicht dargestellt werden konnte.

Zudem wurden die individuellen *E. coli*-Zelllysate mit den rekombinanten Proteinen im Immunblot mit dem adsorbierten Serum analysiert. Lediglich für XerD und CPSIT_p2 konnte im Vergleich zur nicht induzierten Probe eine moderate Bindung des adsorbierten Serums detektiert werden (Abb. 11B, siehe Hervorhebungen mittlere Blots). SufB und das Pgp6-D-like-Protein waren mit dem adsorbierten Serum nachweisbar, jedoch verglichen zu der unspezifischen Signalstärke des Hintergrundes in nur sehr geringem Maße (Abb. 11B, siehe Mitte). Thioredoxin, die V-Typ ATP Synthase Untereinheit A, das ABC Transporter ATP-Bindeprotein und das CPS0B_1013 kodierte Protein wurden von dem adsorbierten Serum unter den gewählten Bedingungen nicht erkannt. Gründe dafür könnten sein, dass bei der vorrausgehenden denaturierenden Gelelektrophorese die nativen Konformationen der Proteine verändert wurden und damit die fehlende Antikörperbindung der verschiedenen Proteine einherging. Weiterhin ist anzumerken, dass der Titer des adsorbierten Serums im

Laufe der Zeit niedriger wurde, so dass auch die Degradation der Immunglobuline und damit der Verlust spezifischer Antikörper eine Rolle spielt.

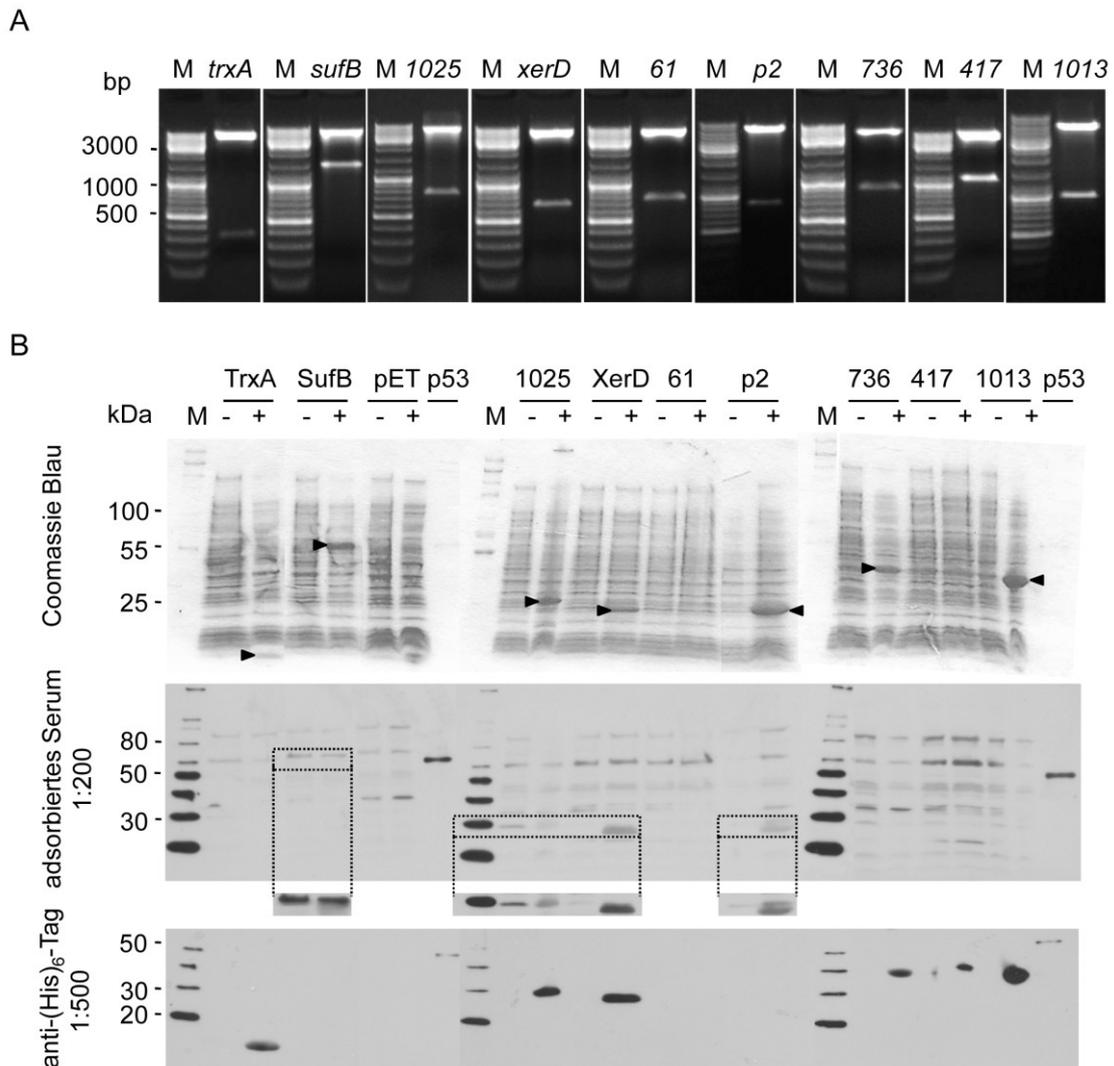


Abb. 11: Subklonierung und Expression ausgewählter chlamydialer Gene. (A) Dargestellt sind 9 rekombinante Plasmide nach dem Verdau mit *NdeI* + *XhoI* im Ethidiumbromid-gefärbten 1%igen Agarose-Gel. M, GeneRuler™ DNA Ladder Mix. **(B)** Überexpression aller 9 Proteine (Protein bzw. Kurzform des Locus Tag) und des nativen Expressionsvektors (pET) in *E. coli*. SDS-Polyacrylamidgel gefärbt mit Coomassie-Brillant-Blau G250 (oben) und Western Blot Analyse unter Verwendung des adsorbierten Serums (Mitte) bzw. anti-(His)₆-Tag Antikörpers (unten). +, vor Induktion; -, 4 h nach Induktion mit 1 mM IPTG; M, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (oben) und MagicMark™ XP Western Protein Standard (Mitte, unten); p53, (His)₆-p53.

3.6.3 Validierung der Expression von IVIAT-selektierten Klonen

Zusätzlich zu den subklonierten Kandidaten wurden mit Western Blot Experimenten das Vorhandensein und die Größe der rekombinanten *in vivo*-induzierten (ivi) Proteine bzw. Peptide aller selektierten immunreaktiven Klone kontrolliert. Von den 79 positiven Klonen konnte für 18 Kandidaten (siehe auch Abb. 13,14; Tabelle 12), inklusive der bereits aufgeführten Proteine TrxA, SufB, Pgp6-D-like Protein (Abb. 11) und MOMP (Abb. 10C), das entsprechende Genprodukt bzw. die Genprodukte (Klon #9) gezeigt werden. In Abbildung 12A und 12B wurden die entsprechenden Genprodukte zur besseren Übersicht mit Pfeilen markiert.

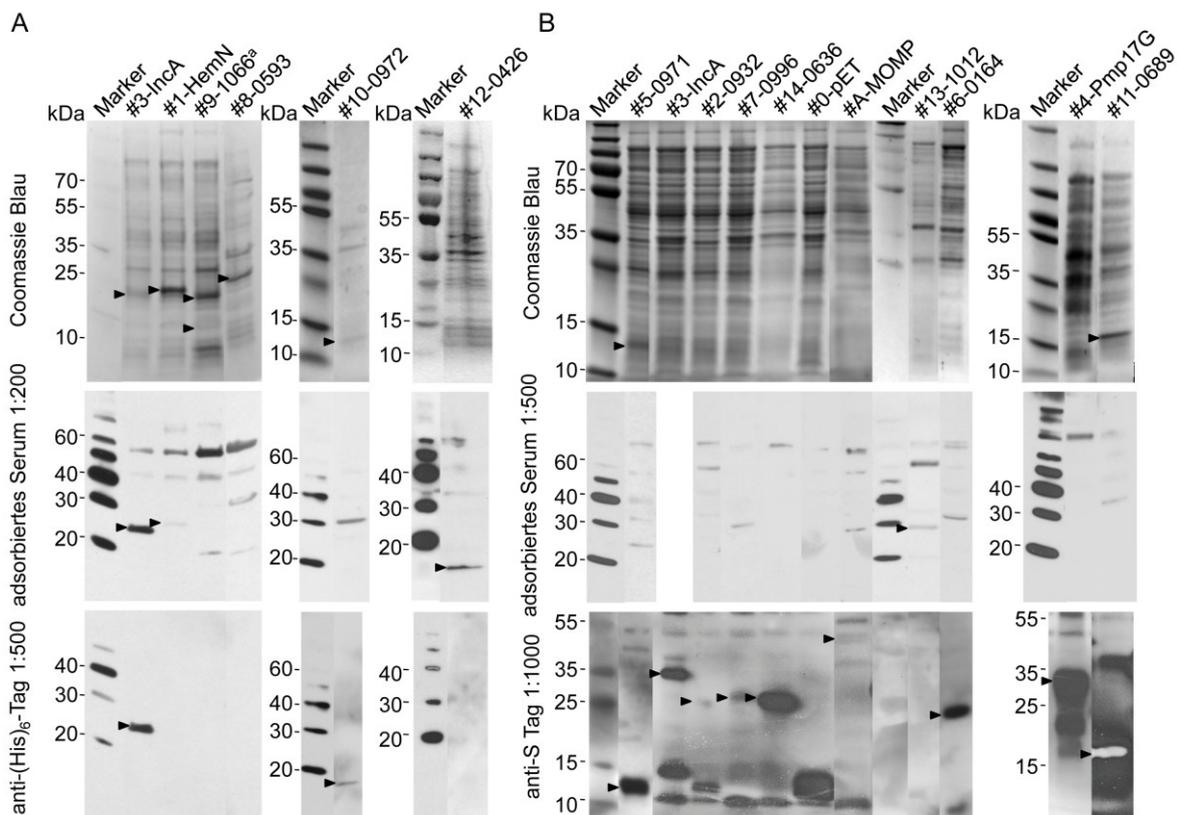


Abb. 12: Expression der rekombinanten Proteine der immunreaktiven Klone. Die Klone wurden in 96-Deepwell Mikrotiterplatten in 200 µl selektiven LB-Medium kultiviert und mit 1 mM IPTG für 4 h bei 37 °C induziert. **(A)** SDS-Polyacrylamidgel gefärbt mit Coomassie-Brillant-Blau G250 (oben) und Western Blot Analyse unter Verwendung des adsorbierten Serums (Mitte) bzw. anti-(His)₆-Tag-Antikörpers (unten). **(B)** Entsprechend 12A, aber unter Verwendung eines anti-S Tag Antikörpers. Die Bezeichnung der Proben erfolgte nach dem Protein bzw. entsprechenden Locus Tag von *C. psittaci* (Accession Nr. CP002806). Die erwarteten Proteine sind mit Pfeilen markiert. #11, invertierte Bande; M, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (oben) und MagicMark™ XP Western Protein Standard (Mitte, unten); pET, *E. coli* mit nativen Expressionsvektor.

Da die Klone der Expressionsbank, im Gegensatz zu den subklonierten Kandidaten, Fusionsproteine exprimieren, die sowohl einen N-terminalen (His)₆-Tag als auch einen Streptavidin-Tag aufweisen, konnten die rekombinanten Proteine mit Hilfe eines anti-(His)₆-Tag- (Abb. 12A) oder anti-Streptavidin-Antikörpers veranschaulicht werden (Abb. 12B). Ausschließlich IncA, die Genprodukte von CPS0B_0426, CPS0B_1012 sowie in geringem Maße auch HemN wurden mit dem adsorbierten Serum detektiert.

3.6.4 Eingrenzung der *in vivo*-induzierten immunreaktiven Proteine: Kolonie Screenings der Subklone und aller bestätigten ivi-Klone

Um schließlich die Immunreaktivität der subklonierten Proteine zu überprüfen, wurden Kolonie Immunblots mit dem adsorbierten Serum durchgeführt. In Abbildung 13 repräsentiert jede kreisrunde Kolonie einen individuellen Klon. Zusätzlich zu den Untersuchungen mit dem adsorbierten Serum wurden mehrere Kontrollen zur Verifizierung der Ergebnisse ergänzt. Neben einem direkten Vergleich zu der Reaktivität eines Klons mit dem adsorbierten Serum eines nicht infizierten Rindes (negatives Kontrollserum), wurde die Expression der Proteine mit einem anti-(His)₆-Tag Antikörper kontrolliert. In den beiden folgenden Prüfungen wurde erwartet, dass der *E. coli* Klon, der nur einen leeren Expressionsvektor trägt, von beiden verwendeten Seren zu keiner Zeit und MOMP nur von dem adsorbierten Serum detektiert werden kann. Unter diesen Voraussetzungen konnten von den 9 subklonierten Proteinen die 3 Kandidaten SufB, TrxA und das Pgp6-D-like Protein als immunreaktiv bestätigt werden. Das Typ II/III Sekretionssystem Familien Protein und das Plasmid-kodierte Protein (CPSIT_p2) hoben sich ebenfalls von der Kontrolle ab, jedoch in nur sehr geringem Maße (Abb. 13). In Abhängigkeit von der Klonierungsstrategie konnte die Expression der (His)₆-Tag-Fusionsproteine TrxA, Pgp6-D-like Protein, CPS0B_0736 und CPS0B_1013 mit dem monoklonalen Kontroll-Antikörper veranschaulicht werden. Für SufB und CPSIT_p2 war dies nicht zu erwarten, da sie ohne Fusions-Tags exprimiert wurden. Da die Expressionstests des putativen Penicillin-Bindeproteins, XerD und CPS0B_0417 negativ ausfielen, kann nicht geschlussfolgert werden, dass diese Proteine nicht mit dem adsorbierten Serum reagieren. Jedoch muss auch in Betracht gezogen werden, dass die Faltung der Proteine eine Behinderung der (His)₆-Tag Erreichbarkeit für den Kontroll-Antikörper darstellen könnte und damit doch ein negatives Ergebnis vorliegt. Bei MOMP verdeckt sehr wahrscheinlich die dreidimensionale Struktur des Proteins den N-terminalen (His)₆-Tag.

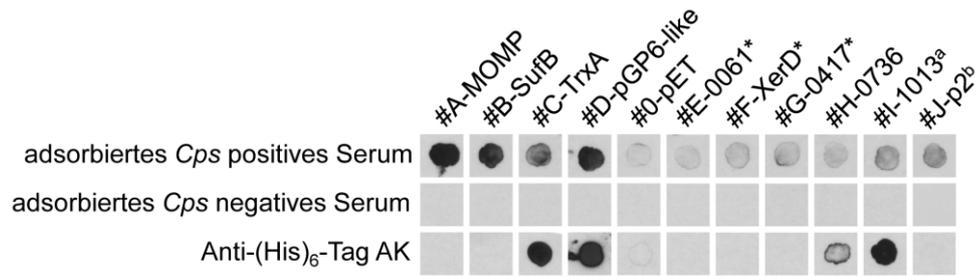


Abb. 13: Kolonie Immunblots der Klone mit subklonierten Genen oder Genfragmenten. Dargestellt sind repräsentative Blots der IPTG-induzierten und mit Chloroform behandelten Kolonien, die entweder mit dem adsorbierten Serum von *C. psittaci*-infizierten Kälbern, dem adsorbierten Serum eines nicht infizierten Kalbes oder einem anti-(His)₆-Tag Antikörper inkubiert wurden. *E. coli* mit dem rekombinanten MOMP und *E. coli* mit dem unbehandelten Plasmid pET30a (pET) wurden als Kontrollen mitgeführt. Die Bezeichnung der Klone basiert auf den chlamydialen Proteinen oder auf den Locus Tags von *C. psittaci* (Accession Nr. CP002806). Siehe auch Tabelle 12. * Expression der rekombinanten Fusionsproteine zweifelhaft; ^{a,b} siehe Tab. 10 (Material und Methoden).

Zieht man nun die Resultate der Western Blots hinzu, können verschiedene Annahmen getroffen werden. Dabei spielt die unterschiedliche Konformation der Proteine für die Detektierbarkeit mit dem adsorbierten Serum in den verschiedenen Experimenten eine Rolle. Unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE und anschließendem Western Blot werden die Proteine entfaltet. Demnach scheinen MOMP und TrxA von Antikörpern aus dem Serum gebunden zu werden, die gegen diskontinuierliche bzw. konformelle Epitope der Proteine gerichtet sind. Im Gegensatz dazu weisen die Ergebnisse von SufB und dem Pgp6-D-like Protein darauf hin, dass sowohl diskontinuierliche als auch kontinuierliche Epitope von den Antikörpern im Serum erkannt worden sind. Mit einer deutlich niedrigeren Immunreaktivität kann dies auch für CPS0B_1013 und CPSIT_p2 angenommen werden. XerD zeigte unter allen untersuchten Kandidaten die stärkste Erkennung durch das adsorbierte Serum im Western Blot und deutet damit auf die Existenz von mindestens einem kontinuierlichen Epitop hin. Wird ausgeschlossen, dass der fehlenden Detektion von XerD und auch CPS0B_0417 durch den Kontroll-Antikörper im Kolonie Blot ein nicht erreichbarer Fusions-Tag zu Grunde liegt, scheinen die Expressionsbedingungen im Rahmen der Kolonie Blots eher ungeeignet für diese Proteine, so dass Aussagen über weitere Epitope nicht gemacht werden können. Die unzureichende Expression des putativen Penicillin-Bindeproteins lässt Fragen zur Immunreaktivität des Proteins weiterhin offen. Das hier gebildete CPS0B_0736 wird von dem adsorbierten Serum in allen Anwendungen nicht erkannt. Abschließend sind in Abbildung 14 alle immunreaktiven Klone (3.6.2), die nicht subkloniert wurden, mit allen zugehörigen Kontrollen dargestellt. In Tabelle 12 sind die verifizierten ivi-Kandidaten aufgelistet.

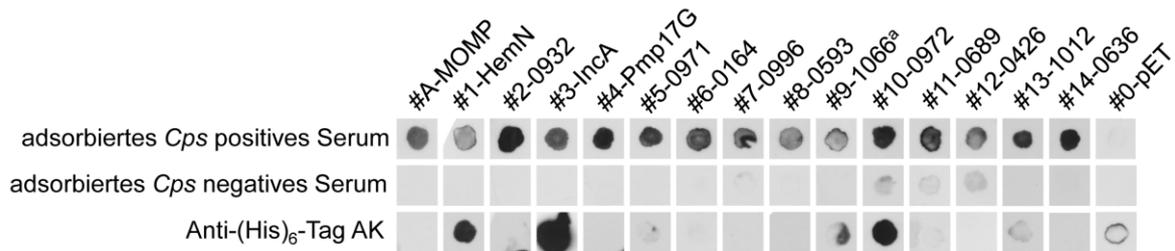


Abb. 14: Kolonie Immunblots der selektierten Klone. Dargestellt sind repräsentative Blots von Klonen, die im primären Screening selektiert wurden und deren Proteinexpression mit SDS-PAGE und/oder Western Blot Analysen bestätigt wurde. Die Durchführung der Immunblots und die dazugehörige Bildbeschreibung entspricht der in Abbildung 13, Tabelle 12. 1066^a, Klon der sowohl CPSOB_1066 als auch CPSOB_1065 exprimiert.

Tab. 12: IVIAT. Bestätigte *in vivo*-induzierte Proteine von *C. psittaci*. Die Gruppierungen der Proteine basieren auf einem *Cluster of orthologous groups of proteins* (COGs) bzw. KEGG-Analysen (siehe Material und Methoden). Die Vorhersage der subzellulären Lokalisation der Proteine erfolgte mit Hilfe von PSORTb v3.0.

funktionelle Kategorie	Locus Tag (Gen)	Funktion des Genproduktes	vorhergesagte zelluläre Lokalisation	Identifikations-Nr. in Abb. 13 und 14
Transport	CPSOB_0063 (<i>sufB</i>)	<i>FeS assembly protein</i> SufB	Zytoplasma	B
	CPSOB_0164	<i>extracellular solute-binding protein</i>	Unbekannt	6
	CPSOB_0593	ABC Transporter ATP-Bindeprotein	Zytoplasma Membran	8
	CPSOB_0636	ABC Transporter ATP-Bindeprotein	Zytoplasma Membran	14
Posttranslationale Modifikation/Energieproduktion	CPSOB_0094 (<i>trxA</i>)	Thioredoxin, TrxA	Zytoplasma	C
Cofaktor Metabolismus	CPSOB_0934 (<i>hemN</i>)	sauerstoffunabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase, HemN	Zytoplasma	1
	CPSOB_1066	Dihydrofolat Reduktase	Zytoplasma	9
Nukleotid-Exzisions-Reparatur	CPSOB_0932	<i>transcription-repair coupling factor</i> , TRCF	Zytoplasma	2
Transkription/DNA Replikation, Rekombination und Reparatur	CPSOB_0996	putative DNA Helikase	Zytoplasma	7
Hypothetische Proteine	CPSOB_0426	hypothetisches Protein	Unbekannt	12
	CPSOB_0689	hypothetisches Protein	Zytoplasma Membran	11
	CPSOB_1065	hypothetisches Protein	Zytoplasma	9

funktionelle Kategorie	Locus Tag (Gen)	Funktion des Genproduktes	vorhergesagte zelluläre Lokalisation	Identifikations-Nr. in Abb. 13 und 14
Uncharacterized protein family (UPF0137)	CPSOB_1025	virulence protein pGP6-D-like protein	Zytoplasma	D
Zellhülle	CPSOB_0059	major outer membrane porin, MOMP	Äußere Membran	A
	CPSOB_0319 (pmp17G)	polymorphic outer membrane protein G family protein, Pmp17G	Äußere Membran (evtl. weitere Lokalisationen)	4
	CPSOB_0598	inclusion membrane protein A, IncA	Unbekannt	3
Bakterielles Sekretionssystem	CPSOB_1012	Typ II/IV Sekretionssystem Familienprotein	Zytoplasma	13
Assemblierung der "Flagella"	CPSOB_0971	Typ III secretory flagellar biosynthesis	Zytoplasma	5
	CPSOB_0972	Typ III Sekretionssystem ATPase	Zytoplasma	10

3.6.5 Klassifizierung aller chlamydialen Gene der immunreaktiven Klone entsprechend der Funktion der Genprodukte

Alle in dieser Studie identifizierten Gene der immunreaktiven Klone, inklusive der Kandidaten in Tabelle 12, wurden entsprechend ihrer Zuordnung zu einem *Cluster of orthologous groups of proteins* (COGs) gruppiert. Tabelle 13 und Abbildung 15 fassen die Ergebnisse zusammen. 16 verschiedene Klassen wurden gefunden, wobei 4 von diesen in 2 Gruppen (Replikation, Rekombination und Reparatur/Transkription sowie Intrazellulärer Verkehr und Sekretion/Zellmotilität) zusammengefasst wurden, da einigen Kandidatengenen (*CPSOB_0253*, *CPSOB_0932*, *CPSOB_0996*) multiple Funktionen zugeordnet werden konnten. Zusätzlich zu den Gruppierungen entsprechend den COGs wurden die Gruppierungen Plasmid, *Inclusion membrane proteins* (Incs), *Polymorphic membrane proteins* (Pmps) und Lipoproteine eingeführt.

Tab. 13: Gruppierung aller identifizierten chlamydialen Gene der immunreaktiven Klone entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu einem Cluster of orthologous groups (COGs).

Funktionelle Kategorie (basiert auf COGs)	Locus Tag <i>Chlamydia psittaci</i> 02DC15 bzw. <i>Chlamydia psittaci</i> 6BC (Plasmid Hits)	Anzahl individueller Hits	Summe aller Hits
Translation	CPSOB_0120, CPSOB_0121, CPSOB_0122, CPSOB_0293, CPSOB_0504, CPSOB_0881, CPSOB_0890, CPSOB_0891, CPSOB_0960, CPSOB_0987, CPSOB_0993	11	12
Replikation, Rekombination und Reparatur/Transkription	CPSOB_0268, CPSOB_0368, CPSOB_0790, CPSOB_0904, CPSOB_0932, CPSOB_0996	6	10
Abwehrmechanismen	CPSOB_0417, CPSOB_0577, CPSOB_0611	3	3
Signaltransduktion	CPSOB_0046	1	1
Zellwand/Membran Biogenese	CPSOB_0059, CPSOB_0061, CPSOB_0210, CPSOB_0799, CPSOB_0843	5	7
Posttranslationale Modifikation, Protein turnover, Chaperone	CPSOB_0063, CPSOB_0094, CPSOB_0253, CPSOB_0269, CPSOB_0389, CPSOB_0632, CPSOB_0868	7	12
Transport und Stoffwechsel anorganischer Ionen	CPSOB_0636, CPSOB_0653, CPSOB_0800	3	3
Energieerzeugung and Umwandlung	CPSOB_0459, CPSOB_0520, CPSOB_0735, CPSOB_0736, CPSOB_0903, CPSOB_0941	6	8
Kohlenhydrattransport und Stoffwechsel	CPSOB_0588, CPSOB_0654, CPSOB_0789, CPSOB_0930	4	6
Aminosäuretransport und Stoffwechsel	CPSOB_0164, CPSOB_0254, CPSOB_0589, CPSOB_0592, CPSOB_0593, CPSOB_0784, CPSOB_0953	7	7
Coenzym Transport und Stoffwechsel	CPSOB_0597, CPSOB_0933, CPSOB_0934, CPSOB_1065, CPSOB_1066	5	6
Nicht klassifizierte/ hypothetische Proteine	CPSOB_0134, CPSOB_0426, CPSOB_0458, CPSOB_0578, CPSOB_0631, CPSOB_0635, CPSOB_0688, CPSOB_0689, CPSOB_0415, CPSOB_0703, CPSOB_0942, CPSOB_0961, CPSOB_0997, CPSOB_1025, CPSOB_1026	15	17

Funktionelle Kategorie (basiert auf COGs)	Locus Tag <i>Chlamydia psittaci</i> 02DC15 bzw. <i>Chlamydia psittaci</i> 6BC (Plasmid Hits)	Anzahl individueller Hits	Summe aller Hits
Transport und Stoffwechsel von Fetten	CPSOB_0416, CPSOB_0879, CPSOB_0905, CPSOB_0992	4	4
Intrazellulärer Verkehr und Sekretion/Zellmotilität	CPSOB_0045, CPSOB_0062, CPSOB_0253, CPSOB_0471, CPSOB_0500, CPSOB_0501, CPSOB_0502, CPSOB_0503, CPSOB_0842, CPSOB_0971, CPSOB_0972, CPSOB_1012, CPSOB_1013	13	17
Plasmid*	CSPIT_p2, CSPIT_p3, CSPIT_p4	3	4
<i>Inclusion membrane proteins</i> (Incs)*	CPSOB_0598	1	2
<i>Polymorphic membrane proteins</i> (Pmps)*	CPSOB_0319	1	1
Lipoproteine*	CPSOB_0791, CPSOB_0954	2	3

*keine COG Klassifikation

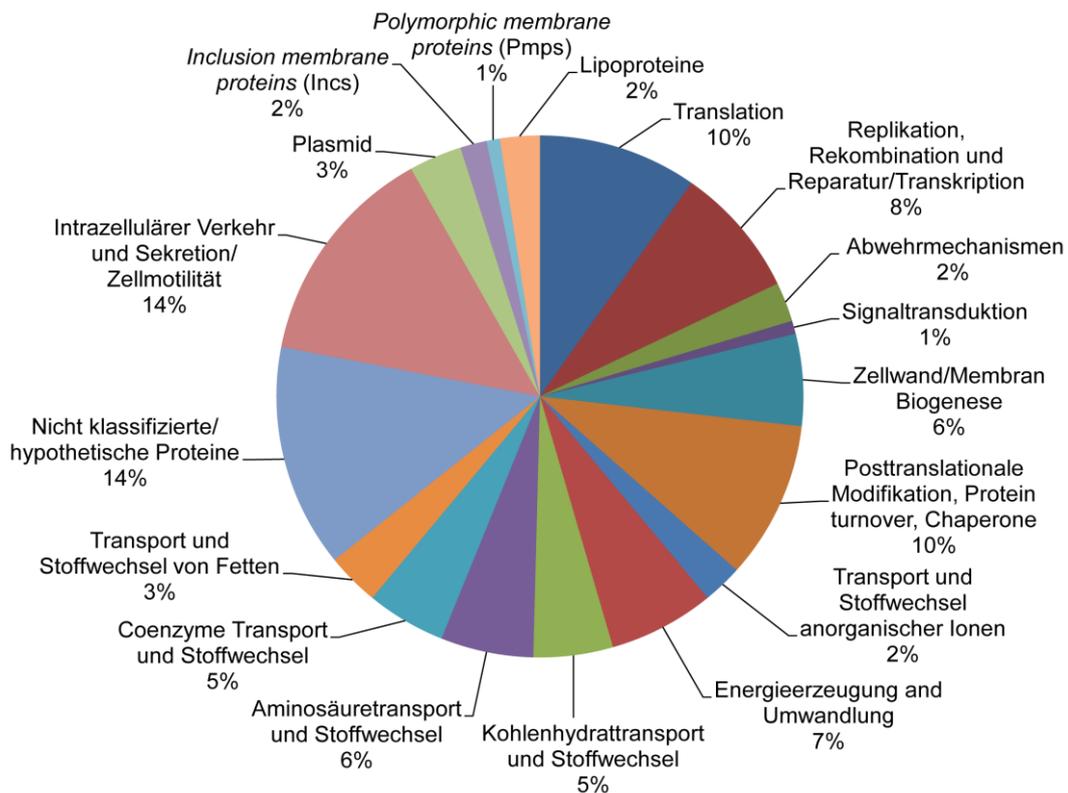


Abb. 15: Klassifikation aller identifizierten Gene der immunreaktiven Klone. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der *Polymorphic membrane proteins* (Pmps), *Inclusion membrane proteins* (Incs), Plasmid Proteine, Lipoproteine bzw. der verschiedenen Gruppierungen entsprechend *Cluster of orthologous groups of proteins* (COGs).

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass alle aufgeführten chlamydialen Proteine der immunreaktiven Klone nicht nur einer Gruppierung zugehörig sind, sondern breit über die verschiedenen funktionellen Gruppen verteilt sind. Mit einem Anteil von 14% bilden die nicht klassifizierten bzw. hypothetischen Proteine und die Proteine, die dem intrazellulären Verkehr und der Sekretion/Zellmotilität angehören, die größte Gruppe. Die Gene für 3 Leucin-tRNAs wurden in den Darstellungen nicht berücksichtigt, da sie in den immunreaktiven Klonen immer in Kombination mit einem benachbarten Protein-kodierenden Gen auftraten und es wahrscheinlicher ist, dass das Genprodukt des letzteren die Immunreaktivität bedingt.

3.7 Untersuchung der Expression von chlamydialen Genen *in vivo* verglichen zu *in vitro*

Schließlich sollte untersucht werden, inwieweit die Expression chlamydialer Gene *in vivo* d. h. in der infizierten Rinderlunge verglichen zu *in vitro*, in infizierten HEp-2-Zellen, hoch- oder herunterreguliert ist.

3.7.1 Identifizierung chlamydialer RNA im Lungengewebe von infizierten Rindern

In dieser Studie wurde RNA aus dem linken Basallappen von *C. psittaci*-infizierten Rinderlungen isoliert, die 2 d (n=2), 3 d (n=2) bzw. 7 d (n=1) nach der Infektion entnommen wurden (FLI, Jena). Als Kontrolle dienten Lungengewebe nicht infizierter Rinder (n=2). Mit Hilfe der kombinierten Trizol/Quiagen RNeasy-Methode konnte RNA mit einer Konzentration von 600-1400 ng/μl pro 50 mg Lungengewebe im 50 μl Maßstab gewonnen werden. Alle RNAs wiesen mit einer Ratio_{260/280} von $\geq 2,02$ eine hohe Reinheit auf. Chlamydiale 16S rRNA konnte mittels qRT-PCR in allen infizierten Geweben nachgewiesen werden (Abb. 16). Dabei enthielten die Gewebe, die 2 d nach der Infektion entnommen wurden, die höchsten Transkriptmengen, wohingegen in dem Basallappen des Gewebes, das 7 d nach Infektion entnommen wurden, nur noch minimale Mengen der 16S rRNA von *C. psittaci* detektierbar waren (Abb. 16). In den Kontrollgeweben wurde keine chlamydiale 16S rRNA nachgewiesen. Für die folgenden vergleichenden Genexpressions-Experimente wurden die RNAs aus den 2 d p. I. entnommenen Geweben analysiert. Dabei fungierte das 16S rRNA-Gen als Normalisierungsgen für die relative Quantifizierung aller untersuchten chlamydialen Gene in der qRT-PCR.

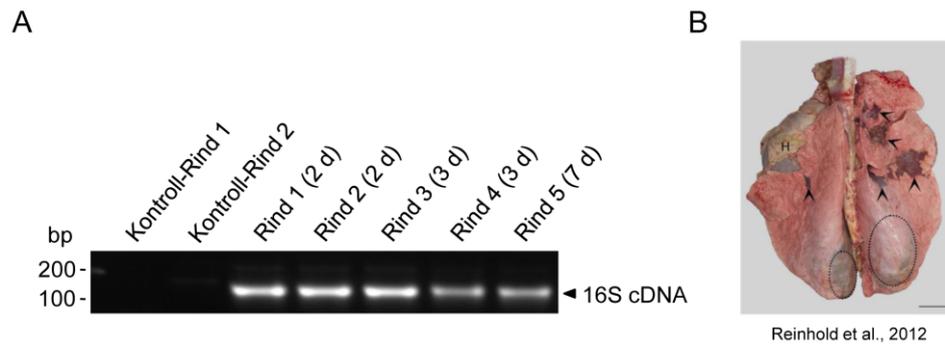


Abb. 16: Detektion von *C. psittaci* 16S rRNA im Lungengewebe infizierter Kälber. (A) Gesamt-RNA aus dem Lungengewebe (50 mg, linker Basallappen) von infizierten (n=5; Dosis/Kalb: 10^8 EBE) und nicht infizierten Kälbern (n=2) wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit 5 ng/Reaktion in der qRT-PCR eingesetzt. Dargestellt sind repräsentative Amplifikate aus der qRT-PCR im Ethidiumbromid-gefärbten 2%igen Agarose-Gel. (B) Lunge eines Kalbes, das mit 10^9 EBE von *C. psittaci* infiziert wurde, 3 d p. I. Balken = 5 cm.

3.7.2 Quantifizierung der chlamydialen Transkripte in dem Lungengewebe relativ zur Expression chlamydialer Gene in der infizierten Zelle

Um die Expression chlamydialer Gene während einer Infektion von Kälbern (*in vivo*) mit der von infizierten Zellen unter Laborbedingungen (*in vitro*) zu vergleichen, wurde die relative Quantifizierung nach Livak und Schmittgen herangezogen. Zudem wurde der Verlauf der Expression ausgewählter Gene *in vitro* über die Zeit dargestellt (Abb. 17). Für die vergleichende Analyse wurde bei allen hier untersuchten Genen der Zeitpunkt 48 h nach der Infektion *in vitro* gewählt, entsprechend der Situation *in vivo* (2 d) (Tab. 14). Es wurden Gene untersucht, die in den selektierten IVIAT-Klonen identifiziert wurden sowie subklonierte Gene und die Gene des Membranproteins OmcB und des Hitzeschockproteins HSP60, die sehr wahrscheinlich die reaktiven Banden im Immunblot (Abb. 3) repräsentieren. Das Gen-Repertoire umfasst dabei verschiedene funktionelle Klassen (entsprechend COGs) und andere Funktionen: Zellwand/Membran Biogenese (*CPSOB_0061*, *omcB*), Intrazellulärer Verkehr und Sekretion/Zellmotilität (*CPSOB_0253*), Energieerzeugung und Umwandlung (*CPSOB_0736*), Transport und Stoffwechsel anorganischer Ionen (*CPSOB_0653*), Aminosäuretransport und Stoffwechsel (*CPSOB_0592*), Posttranslationale Modifikation, Protein turnover, Chaperone (*sufB*, *groEL*), Translation (*rplL*) und Plasmid (*CPSIT_p4*). Dabei konnten *in vitro* verschiedene Transkriptionsprofile hervorgehoben werden (Abb. 17, 18), die im Folgenden genauer betrachtet werden. Für die 5 untersuchten Zeitpunkte aller 10 Gene *in vitro* konnten mit Hilfe der ANOVA keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden. *GroEL* zeigte zu den hier analysierten Zeitpunkten nur geringe Änderungen der relativen mRNA-Mengen 6-48 h p. I. Ebenfalls minimale Unterschiede in den Transkriptmengen 6-48 h p. I. wurden

auch für *CPSOB_0653*, *CPSOB_0592*, *CPSOB_0253* und *CPSIT_p4* beobachtet (Abb. 17), verglichen zu *CPSOB_0736*, *CPSOB_0061*, *omcB*, *rplL* und *sufB* (Abb. 18).

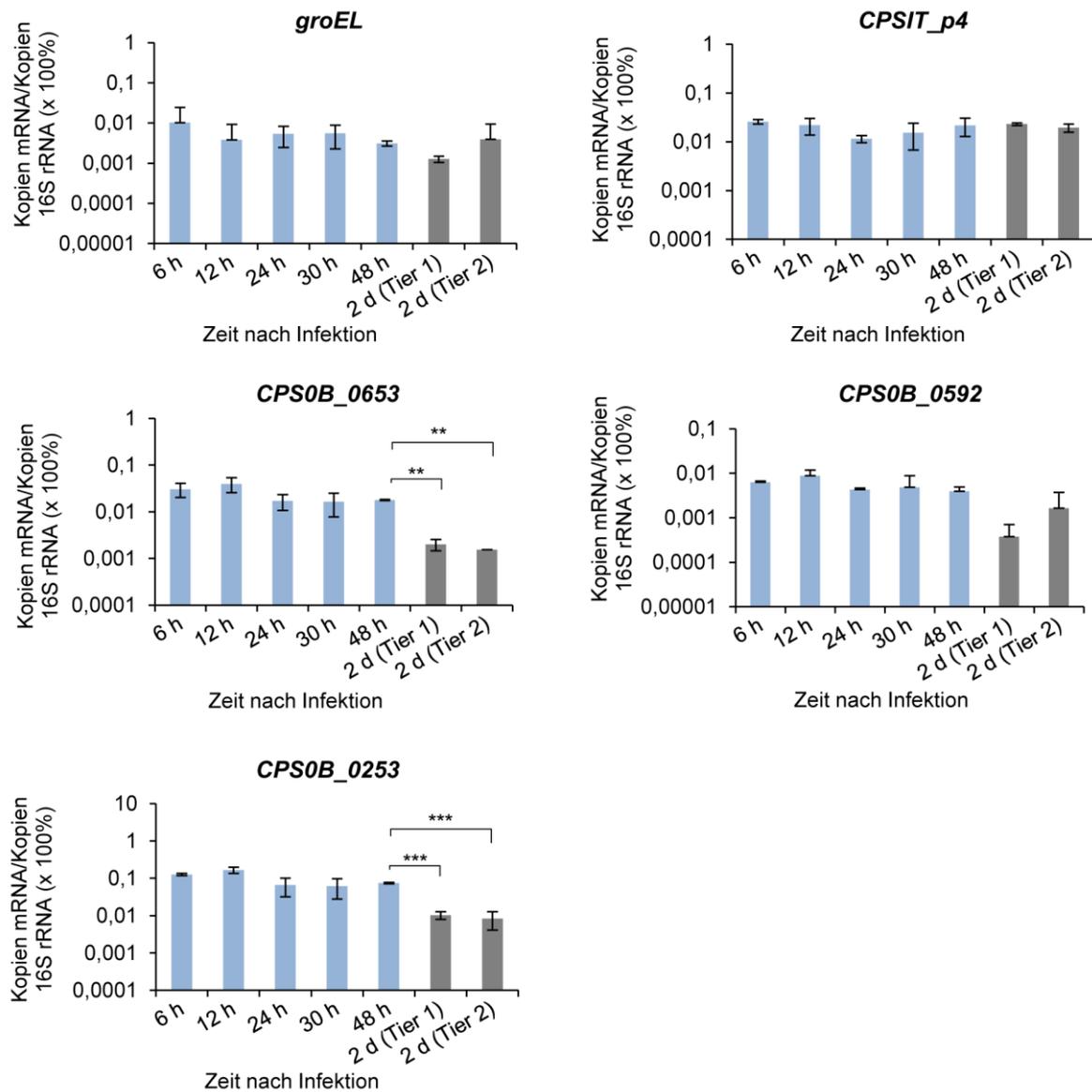


Abb. 17: Basale Expression chlamydialer Gene *in vitro* und *in vivo*. RNA aus *C. psittaci*-infizierten HEp-2-Zellen (MOI 1) bzw. *C. psittaci*-infizierten bovinen Lungengewebe wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Genexpression des Testgens zur 16S rRNA aus zwei unabhängigen Infektionsexperimenten (*in vitro*) bzw. zweier RNA-Isolierungen aus dem Gewebe (*in vivo*). Signifikante Unterschiede (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$) *in vivo* zu *in vitro* (48 h) sind angezeigt.

Dennoch waren verschiedene Transkriptionsniveaus und Expressionsmaxima erkennbar. *CPSOB_0653*, *CPSOB_0592* und *CPSOB_0253* zeigten im frühen und mittleren Stadium des Entwicklungszyklus (12 h p. I.) eine erhöhte Transkriptionsrate, wobei bei *CPSOB_0253*, das die proteolytische Untereinheit der ATP-abhängigen Clp Protease kodiert, die höchsten Transkriptmengen zu verzeichnen waren. *CPSOB_0653* kodiert für einen putativen Natrium-Sulfat Symporter und *CPSOB_0592* für die Permease eines ABC Transporters für Aminosäuren, dessen ATP-Bindeprotein bereits als ivi-Protein in dieser Arbeit identifiziert wurde. Ähnlich den Transkriptmengen von *CPSOB_0592* konnte das Level der GroEL-Transkripte als niedrig eingestuft werden und ließ ein Expressions-Maxima 6 h p. I. erkennen. Für das Plasmid-kodierte *CPSIT_p4* wurde 24 h p. I. eine Senkung des mRNA-Levels detektiert.

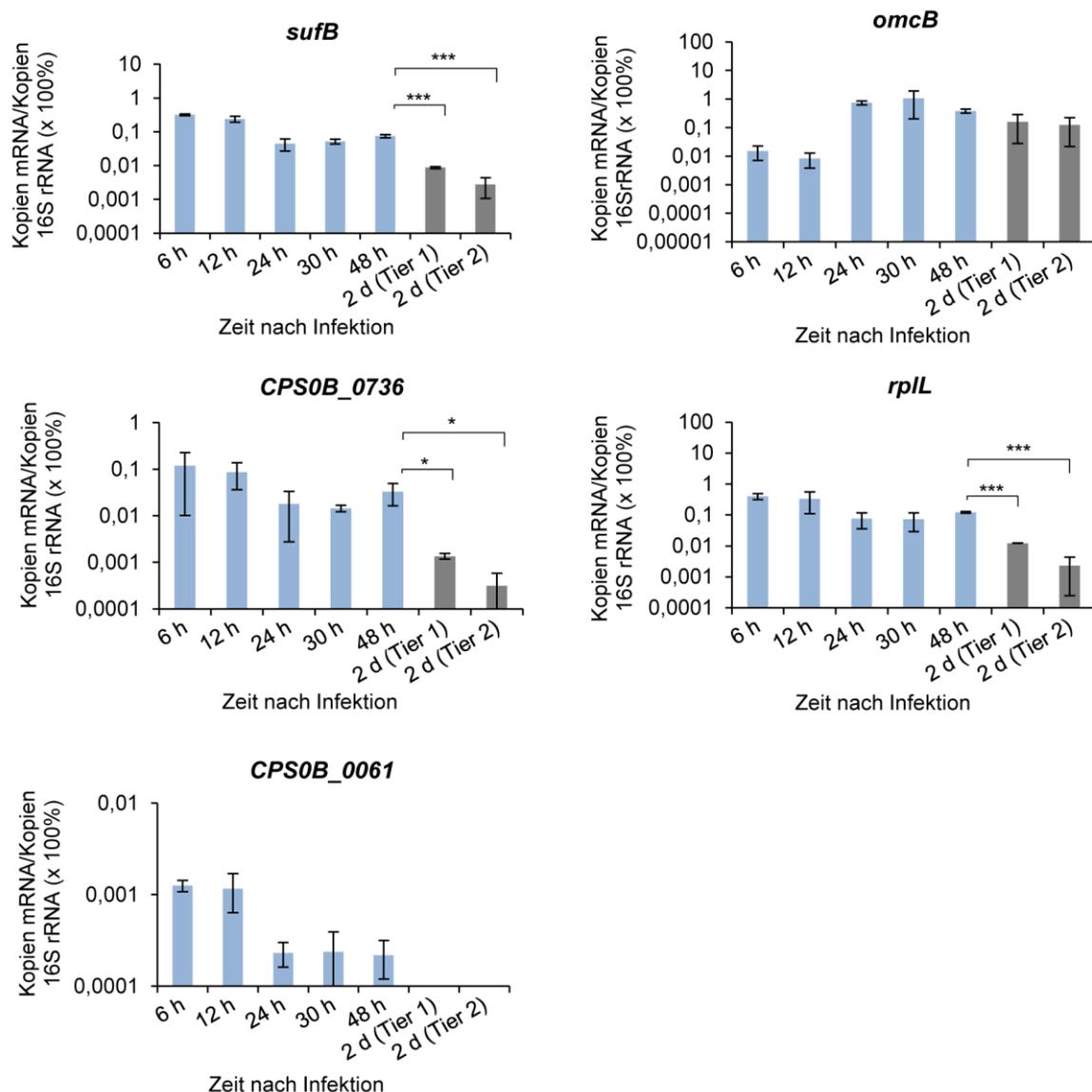


Abb. 18: Basale Expression chlamydialer Gene *in vitro* und *in vivo*. Beschreibung entspricht der in Abbildung 17.

Innerhalb der Gruppe von Genen, die größere Differenzen in den Transkriptleveln, über die Zeit betrachtet, aufweisen, konnten gegenläufige Trends beobachtet werden. Im Gegensatz zu allen anderen wurde die *omcB*-mRNA ab 24 h p. I. hochreguliert und wies ab diesem Zeitpunkt die höchsten Transkriptmengen, die relativ zu den 16S rRNA-Transkripten detektiert wurden, auf. Für *CPSOB_0736* (Untereinheit A der V-Typ ATPase), *CPSOB_0061*, *rpL* (50S ribosomales Protein L7/L12) und *sufB* wurden die höchsten Transkriptmengen 6 h und 12 h p. I. nachgewiesen. In dieser Studie wurde für das Gen des putativen Penicillin-Bindeproteins (*CPSOB_0061*) das geringste Expressionsniveau ermittelt.

Vergleiche der 16S rRNA-normalisierten *In-vivo*-Daten der verschiedenen Gene mit dem entsprechenden Zeitpunkt *in vitro*, brachten relevante, d. h. signifikante Unterschiede hervor. Die Transkriptmengen von *CPSOB_0736*, *CPSOB_0653*, *CPSOB_0253*, *rpL* und *sufB* waren in beiden untersuchten Tieren in der Lunge 2 d p. I. signifikant herunterreguliert. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Transkripte von *CPSOB_0592*, *CPSOB_0061*, *CPSIT_p4*, *groEL* und *omcB* nicht wesentlich von der Transkriptmenge *in vitro* 48 h p. I., entsprechend der ANOVA-Analyse. Die relative Quantifizierung der Genexpressions-Daten *in vivo* vs. *in vitro* erfolgte über die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode und über das *relative expression software tool* (REST©; Pfaffl et al., 2002). Letztere beinhaltet zusätzlich sowohl eine Effizienzkorrektur als auch eine statistische Auswertung der Ratios (Abb. 19). Dabei wurde mit Hilfe eines Randomisierungstest die Wahrscheinlichkeit berechnet, die die Differenz zwischen Probe- und Kontroll-Gruppe als ein rein zufälliges Ereignis einstufte (sogenannte alternative Hypothese) (Pfaffl et al., 2002). Mit diesem Wert und der zuvor berechneten *Ratio* wurde ein Ergebnis als hoch- oder herunterreguliert definiert. Im Rind 1 waren entsprechend REST, bis auf *CPSOB_0253*, alle untersuchten chlamydialen Gene im Vergleich zu den Levels *in vitro* (48 h p. I.) herunterreguliert. Mit Ausnahme von *CPSOB_0592*, *groEL*, *omcB* und *rpL* wurden ebenfalls im Rind 2 alle untersuchten Gene *in vivo* als signifikant herunterreguliert eingestuft. Auch mittels der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode konnten keine Gene identifiziert werden, die *in vivo* hochreguliert (> 2) waren (Tab. 14). Da *CPSOB_0061* nur in den infizierten Zellen nachweisbar war und nicht in dem Lungengewebe der infizierten Rinder, wurden für die Berechnung mit REST C_T -Werte von 40 angenommen, die ein negatives Ergebnis der qRT-PCR nachahmen sollen.

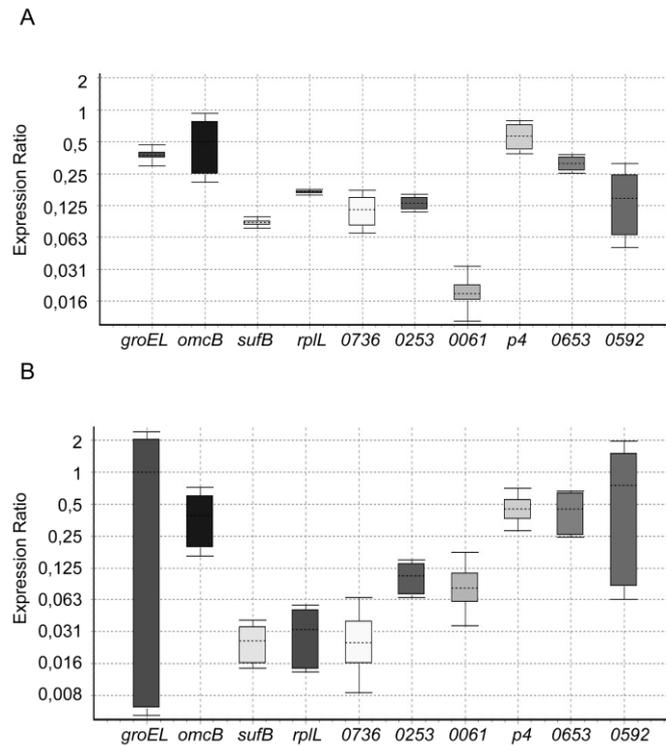


Abb. 19: Relative Expression von *C. psittaci* Genen in der Rinderlunge, bestimmt mit REST. Die experimentelle Beschreibung entspricht der in Abbildung 17. Dargestellt ist die *Ratio* bzw. der *fold change in vivo* im Vergleich zu *in vitro* relativ zur 16S rRNA im Box-Whisker-Plot. Angabe der Mediane, Quartile und Extremwerte (Whiskers). **(A)** Rind 1; **(B)** Rind 2.

Tab. 14: Relative Expression verschiedener chlamydialer Gene in der Lunge von infizierten Kälbern. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung der prozentualen Genexpression des Testgens zur 16S rRNA *in vitro* (48 h p. I.) bzw. *in vivo* (2 d p. I.) aus zwei unabhängigen Experimenten (*in vitro*) bzw. RNA Isolationen (*in vivo*) (Kokab et al., 2010; modifiziert). Die entsprechenden Werte wurden zur vereinfachten Darstellung mit dem Faktor 10^3 multipliziert. Der *fold change in vivo* relativ zur 16S rRNA wurde nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode berechnet (Livak und Schmittgen, 2001). *Berechnung basiert auf nur einer Probe, da die 2. Probe keine detektierbare CPSOB_0653-cDNA aufwies.

Gen	<i>in vitro</i> ($\times 10^3$)	<i>in vivo</i> ($\times 10^3$) (Tier 1)	<i>in vivo</i> ($\times 10^3$) (Tier 2)	<i>fold change</i> (Tier 1)	<i>fold change</i> (Tier 2)
<i>groEL</i>	3,11 \pm 0,44	1,27 \pm 0,23	3,92 \pm 5,52	0,411 \pm 0,073	1,268 \pm 1,784
<i>omcB</i>	378,13 \pm 59,91	157,74 \pm 129,63	123,29 \pm 101,59	0,543 \pm 0,436	0,427 \pm 0,344
<i>sufB</i>	74,46 \pm 7,94	8,74 \pm 0,62	2,74 \pm 1,66	0,095 \pm 0,068	0,029 \pm 0,018
<i>rplL</i>	122,3 \pm 7,53	12,32 \pm 0,16	2,31 \pm 2,06	0,182 \pm 0,002	0,038 \pm 0,032
<i>CPSOB_0736</i>	32,81 \pm 16,57	1,35 \pm 0,19	0,31 \pm 0,27	0,095 \pm 0,013	0,023 \pm 0,019
<i>CPSOB_0253</i>	74,43 \pm 3,33	10,32 \pm 2,32	8,34 \pm 4,27	0,135 \pm 0,031	0,109 \pm 0,056
<i>CPSOB_0061</i>	0,22 \pm 0,098	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<i>CPSIT_p4</i>	21,69 \pm 8,86	23,01 \pm 1,39	19,40 \pm 3,77	0,558 \pm 0,038	0,46 \pm 0,102
<i>CPSOB_0653</i>	17,85 \pm 0,54	2,01 \pm 0,56	1,55 *	0,315 \pm 0,08	0,249 *
<i>CPSOB_0592</i>	3,94 \pm 0,97	0,37 \pm 0,33	1,64 \pm 2,10	0,069 \pm 0,067	0,401 \pm 0,533

4 Diskussion

Mit unikalen Mechanismen sichern Chlamydien ihr Überleben in der Wirtszelle um einen spezifischen Entwicklungszyklus durchlaufen zu können. Die Etablierung einer intrazellulären Nische, der Inklusion, die Interaktion mit der Wirtszelle und gleichzeitig die Umgehung der Wirtsabwehr stehen dabei im Vordergrund. Eine vergleichsweise hohe Anzahl latenter Infektionen bei Rindern spiegelt dabei das Potential des Pathogens wider und deutet zudem auf eine hohe Tendenz von subklinischen oder persistenten Infektionsverläufen mit erheblichen Beeinträchtigungen von infizierten Tieren (Reinhold et al., 2011). Darüber hinaus stellen diese Tiere eine Infektionsquelle für den Menschen dar (Ostermann et al., 2013a). Mit Hilfe des respiratorischen *C. psittaci* Infektionsmodells an Kälbern wurden die pathologischen Veränderungen und pathophysiologischen Folgen einer akuten Infektion sowie die *C. psittaci* bedingte Symptomatik und das zoonotische Potential des Erregers untersucht (Knittler et al., 2014). Spezifische chlamydiale Proteine, die diesen beobachteten Prozessen zu Grunde liegen bzw. die mit der Wirtszelle interagieren, wurden bei diesen Untersuchungen jedoch nicht im Detail hervorgehoben. In der vorliegenden Arbeit wurden chlamydiale Proteine, die *in vivo* d. h. im Kalb induziert und von dem humoralen Immunsystem des Wirtes erkannt werden, mit IVIAT identifiziert. Durch die Verwendung des Serums infizierter Kälber können Rückschlüsse auf die während der Infektion exprimierten Proteine von *C. psittaci* gezogen werden. Zudem wurden ausgewählte Gene nach der Subklonierung erneut auf ihre Immunreaktivität hin analysiert. Des Weiteren wurden *In-vitro*- und *In-vivo*-Daten aus Genexpressionsanalysen chlamydialer Gene miteinander verglichen. Diese Arbeit enthüllt ein breites Spektrum Infektions-assoziiierter chlamydialer Antigene, die zum größten Teil noch nie mit einer chlamydialen Infektion *in vivo* in Zusammenhang gebracht wurden.

4.1 Die Bedeutung der humoralen Immunantwort gegen *C. psittaci* im bovinen respiratorischen Infektionsmodell

Chlamydiale Infektionen in Rindern sind endemisch, sehr oft mit klinisch unauffälligen Verläufen verbunden, dafür aber mit chronischen Entzündungsreaktionen im Gewebe. Die ökonomischen Folgen solcher subklinischen bzw. persistenten Infektionen sind vermutlich bedeutsamer als die selteneren klinisch akuten Verläufe (Jaeger et al., 2007; Poudel et al., 2012; Reinhold et al., 2011). Fallen Infektionen mit gewissen epidemiologischen Risikofaktoren zusammen, wird zudem eine klinische Manifestation begünstigt (Reinhold et al., 2011). Die hohe Seroprävalenz in Rinderherden d. h. eine 45-100% Seropositivität lässt die

Vermutung zu, dass Infektionen mit Chlamydien weltweit vorkommen. Speziell in Deutschland wurde *C. psittaci* am häufigsten nachgewiesen, gefolgt von *C. abortus* und *C. pecorum* (Kemmerling et al., 2009). Der Vergleich von gepaarten, aber verhältnismäßig niedrigen Antikörpertitern in Kombination mit PCR-Ergebnissen deutet an, dass bei chlamydialen Infektionen die Zell-vermittelte Immunität gegenüber der humoralen dominiert (Stephens, 2003) und eine Korrelation zwischen Serologie und PCR nicht existiert (Kauffold et al., 2007; Reinhold et al., 2008). In dem aktuellen Kälbermodell, in dem der Infektionsverlauf längstens über einen Zeitraum von 35 Tagen kontrolliert wurde, konnte die einsetzende humorale Immunantwort ab 7 d p. I. detektiert werden (Ostermann et al., 2013a; Reinhold et al., 2012), was auch die Immunblots in dieser Arbeit präsentieren. Nur 2/3 der infizierten Tiere entwickelten eine spezifische, sehr schwache Antikörperantwort gegen *C. psittaci* (Ostermann et al., 2013a). Auch in dem vorliegenden ELISA, der die erfolgreiche Adsorption des gepoolten Serums gegen *C. psittaci* anzeigt, spiegelt sich die geringe *C. psittaci*-spezifische Antikörperreaktion in dem unbehandelten, gepoolten Serum wider. Darüber hinaus verdeutlichen die Antikörperprofile in den Immunblots, dass mit steigendem Alter der (infizierten) Tiere ein erhöhter Antikörpertiter vorliegt. Ähnliche Beobachtungen beschrieben auch Vogel und Mitautoren und wiesen parallel dazu die Abnahme PCR-positiver Proben nach (Vogel et al., 2006). Zunächst wurde die Reduktion der chlamydialen DNA im Lungengewebe bis 7 d p. I. mit RT-PCR gemessen (Reinhold et al., 2012), was auf eine negative Korrelation zwischen PCR und Serologie hindeutete – zumindest im experimentellen Infektionsszenario. Aus nasalen, rektalen und okularen Abstrichen konnte kein Erregernachweis erbracht werden (Reinhold et al., 2012). Dies wurde jedoch in der folgenden Langzeitstudie aus den Rektalabstrichen erfolgreich bis 21 bzw. 22 d p. I. an den infizierten Tieren (5,3%) sowie an Sentinels (21,7%) demonstriert (Ostermann et al., 2013a). Während der 35-tägigen Studie wurde bis zum Schluss chlamydiale DNA im peripheren Blut nachgewiesen, was den Tieren als ständige Überträger der Bakterien eine große Beachtung schenkt (Knittler et al., 2014; Ostermann et al., 2013a). Die Diskrepanzen hinsichtlich möglicher Zusammenhänge zwischen dem PCR-Nachweis der Chlamydien und der entsprechenden Serologie bleiben auch im Rahmen dieser Versuche weiterhin ungeklärt. Gründe dafür können in den existierenden Nachweismethoden und dem charakteristischen, aber sehr individuellen Lebenszyklus der Chlamydien gefunden werden. Generell sind serologische Nachweismethoden wie z. B. Immunfluoreszenz, Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) oder Enzym-Immunoassays bei chlamydialen Infektionen nur bedingt geeignet, da die Antikörpertiter der Wirte oft sehr niedrig sind, wie bereits dargelegt wurde. *Chlamydiaceae*-spezifische Antikörper gegen das

chlamydiale LPS/LOS werden in kommerziell erhältlichen Assays für die Diagnose eingesetzt. Kreuzreaktionen mit Gram-negativen Bakterien sind dabei jedoch nicht die Ausnahme und führen oft zu falsch positiven Ergebnissen. Vor allem die Immunblots der individuellen Seren von nicht experimentell infizierten Tieren als auch der *E. coli* ELISA legen offenkundig dar, dass Kreuzreaktionen mit homologen Proteinen anderer Bakterien als auch humanen Ursprungs (Brunham und Peeling, 1994) sehr ausgeprägt sind. Die immunreaktiven Proteine, die sehr wahrscheinlich das *groEL* kodierte HSP60 bzw. das Cystein-reiche Membranprotein OmcB und LPS repräsentieren, üben dabei die stärksten unspezifischen Reaktionen aus (Bavoil et al., 1990; Caldwell und Hitchcock, 1984; Fu et al., 1992). Chlamydiales HSP60 fungiert als Hitzeschock-Protein bzw. Chaperon unter Stressbedingungen (unter anderem bei oxidativen Stress) und vermittelt die korrekte Faltung von Proteinen (Bavoil et al., 1990; Zügel und Kaufmann, 1999). Antikörper gegen das *C. trachomatis* HSP60 kreuzreagieren mit dem humanen Homolog, wodurch die Gefahr einer Autoimmunreaktion gegeben ist und somit die Schädigung des Wirtsgewebes einhergeht (Brunham und Peeling, 1994; Cappello et al., 2009). Bei Kälbern bzw. Rindern, die chronisch mit *C. psittaci* infiziert sind, können sich dementsprechende Komplikationen einschleichen (Cappello et al., 2009; Jaeger et al., 2007) wie z. B. die hohe Reaktivität des Serums gegen das potentielle chlamydiale HSP60 vermuten lässt. *In ovo* wurde die erhöhte Expressionsrate des *C. psittaci groEL* im embryonierten Hühnerei nachgewiesen, was mit einem Makrophageneinstrom und damit einer Induktion der Immunreaktion einher geht (Braukmann et al., 2012). Im Lungengewebe der infizierten Rinder konnte 2 d p. i. keine signifikante Hochregulation von *groEL* gegenüber *in vitro* festgestellt werden. Gründe dafür können sowohl die spezifischen *In-vivo*-Bedingungen, z. B. die Mediatoren des bovinen Immunsystems, als auch der vergleichsweise späte Zeitpunkt der Gewebeentnahme sein. Die 60 kDa Bande könnte außerdem dem chlamydialen OmcB entsprechen, das zusammen mit MOMP und weiteren Proteinen an der Ausbildung des *Outer Membrane Complex* (COMC) beteiligt ist (siehe 4.3.5 Membranproteine).

Ähnlich dem chlamydialen HSP60 wird auch für das chlamydiale LPS/LOS (Lipooligosaccharid) eine Beteiligung bei der Entzündungsreaktion angenommen (Jaeger et al., 2007). LPS kommt bei allen Gram-negativen Bakterien in der äußeren Membran vor und weist strukturelle Ähnlichkeiten innerhalb der verschiedenen Spezies auf. Chlamydiales LOS weicht von den generellen LPS Bestandteilen d. h. O-Antigen, Kernpolysaccharid und Lipid A, dahingehend ab, indem es ausschließlich aus KDO (2-Keto-3-deoxy-octonat)-Trisaccharid, das unter anderem ein Genus-spezifisches Epitop repräsentiert, bzw. bei *C. psittaci* zusätzlich das KDO-

Tetrasaccharid und Pentaacyl-Lipid A besteht (Fu et al., 1992; Heine et al., 2003; Müller-Loennies et al., 2006; Rund et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass eine Hemmung der Lipid A Biosynthese in einer Blockade der LOS Synthese und damit einer Akkumulation der RBs in der Inklusion resultiert (Nguyen et al., 2011). Die Expression von OmcB, die, wie in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt, spät im Entwicklungszyklus der Chlamydien verstärkt einsetzt, war während der Gabe des Inhibitors stark eingeschränkt (Nguyen et al., 2011). Die Autoren postulieren eine Blockade der Umwandlung der RBs in EBs, die möglicherweise einem Morphogenese-gekoppelten Kontrollpunkt für die Proteinexpression unterliegt und sicher ein essentieller Schritt in der chlamydialen Pathogenese ist (Nguyen et al., 2011). Da in dem Großtierversuch Ko-infektionen mit Rinder-relevanten Viren, als auch Bakterien (z. B. *Salmonella*, *Mycoplasma*, *Mannheimia spp.*), exklusive *E. coli*, ausgeschlossen wurden (Ostermann et al., 2013a; Reinhold et al., 2012), war zu erwarten, dass auch zirkulierende *E. coli* in den Tieren in einer Immunität des Wirtes resultieren. Das LPS bzw. LOS von *C. psittaci* und *E. coli* wird gleichermaßen von Antikörpern erkannt, die gegen den KDO-Dissaccharidanteil gerichtet sind (Brade et al., 1990). Zudem wird bei weiblichen Rindern der Transfer von Immunoglobulinen auf ihre geborenen Kälber über die Biestmilch (Kolostrum) gewährleistet (Smith und Holm, 1948), die damit unter anderem Schutz vor Virus- und *E. coli* Infektionen bietet. Die Immunblots der ein Monat alten Kälber repräsentieren solche kolostralen Antikörper, die sehr wahrscheinlich das LPS von *E. coli* erkennen. Bei den 1-jährigen Tieren ist das Immunsystem voll entwickelt und die eigene Infektionsabwehr spiegelt sich in den Blots wider.

Neben dem serologischen Nachweis von Chlamydien und auch der kulturellen Anzucht werden vor allem Methoden, die auf der Detektion chlamydialer DNA oder RNA basieren, eingesetzt. PCR und/oder Mikroarray gestützte Verfahren, wie auch die RT-PCR, (Kaltenboeck et al., 1991; Pantchev et al., 2009a,b; Sachse und Hotzel, 2003; Sachse et al., 2005, 2008, 2009) weisen eine höhere Sensitivität, dafür aber auch Anfälligkeit für Kontaminationen und damit falsch-positiven Ergebnissen auf. Das geeignete Probenmaterial und der Entnahmezeitpunkt sind weiterhin die Voraussetzung für eine Nachweisbarkeit *C. psittaci*, da das Pathogen zeitweise unter anderem fäkal ausgeschieden wird (Ostermann et al., 2013a). Die Spezifität serologischer Tests könnte durch die Verwendung monoklonaler Antikörper, die gegen ausgewählte Epitope Infektions-assoziiertes Proteine gerichtet sind, verbessert werden. Die Kombination von Serologie und dem unmittelbaren Nachweis von *C. psittaci* auf DNA/RNA Ebene ermöglicht es Aussagen zur Kausalität zu treffen. So wäre eine

Diskriminierung von aktiven *C. psittaci* Carriern und einer überstandenen vorangegangenen Infektion basierend auf einer serologischen Untersuchung allein kaum möglich (Longbottom und Coulter, 2003). Auch um die Prävalenz chlamydialer Infektionen reduzieren zu können, werden effektive Vakzine benötigt (Knittler et al., 2014). Diese stehen bisher nicht zur Verfügung. Im Folgenden werden die Infektions-assoziierten chlamydialen Proteine, die im Laufe dieser Arbeit identifiziert wurden, als putative Kandidaten für die erwähnten Bestrebungen genauer beleuchtet.

4.2 Infektions-assoziierte immunreaktive Proteine von *C. psittaci*

Mit dieser Arbeit fand IVIAT erstmals erfolgreich Anwendung bei einem obligat intrazellulären Pathogen. Nach der Optimierung der Parameter für das Screening, eingeschlossen sämtlicher Kontrollen, wurden *in vivo*-induzierte (ivi) Proteine von *C. psittaci* identifiziert, die verschiedenen Funktionen zugeordnet werden können. Werden alle Klone betrachtet, die immunreaktive Proteine exprimieren (siehe Tabelle 17 im Anhang), wird deutlich, dass die Antigene ein breites Repertoire an Funktionen repräsentieren und nicht nur in eine oder wenige spezifische Protein-Klassen eingeordnet werden können. Zusätzlich zu den Sequenzanalysen wurde die erfolgreiche Expression der rekombinanten Proteine mit Hilfe von Western Blot-Analysen kontrolliert. Dabei konnte ein Teil der gefundenen immunreaktiven Klone verifiziert werden. Mehrere Ursachen können in Erwägung gezogen werden, die erklären, warum nicht alle Klone mit Western Blots bestätigt werden konnten bzw. mit RT-PCR Analysen eine Induktion ausgewählter Gene *in vivo* nachgewiesen werden konnte. Zum einen wird für einen großen Teil der nicht detektierbaren Expressionsprodukte angenommen, dass die entsprechenden immunreaktiven Klone kleine Zufallspeptide exprimierten, die von dem adsorbierten Serum erkannt wurden. Dies gilt erst recht, wenn die inserierte chlamydiale DNA nicht im Vektor-vorgegebenen Expressionsrahmen vorlag und alternative Ribosomenbindestellen bzw. Startcodons nicht gegeben waren. Auf der Basis der putativen Aminosäuresequenz ist es dennoch möglich mit Hilfe computergestützter Programme Vorhersagen zu linearen bzw. diskontinuierlichen Epitopen zu machen und über BLAST-Analysen chlamydiale Proteine mit ähnlichen Aminosäuresequenzen zu identifizieren. Damit lässt sich die Immunreaktivität von sogenannten *out of frame* Klonen erklären. Desweiteren bestimmten die den Western Blots vorrausgehenden Kultivierungs- und Expressionsbedingungen im 96-Deep-Well-Format den Erfolg der heterologen Expression eines Proteins. Zudem waren die gewählten denaturierenden Bedingungen in den Western Blots ausschlaggebend für die Nachweisbarkeit eines spezifischen Epitops. Fortführende

bioinformatische Analysen aller immunreaktiven Klone, funktionelle Tests und auch Strukturaufklärungen der Zufallspeptide könnten genauere Aussagen über spezifische Epitope treffen, die wiederum für Vakzinierungsansätze entscheidend sind. Die Untersuchungen der Expression von chlamydialen Gene *in vivo* verglichen mit der *in vitro* erfolgte in einem sehr stringenten Ansatz, der durch die obligat intrazelluläre Lebensweise des Pathogens bestimmt war und eine Kultivierung in humanen Zellen erforderte (*in vitro*). So wurde in allen bisher publizierten Arbeiten, die eine Induktion *in vivo* erfolgreich nachweisen konnten, immer *in vitro* die Möglichkeit der Anzucht in einer Zell-freien Umgebung, z. B. LB-Medium, genutzt – auch bei fakultativ intrazellulären Bakterien (Alam et al., 2013; Harris et al., 2006). Es kann vermutet werden, dass mit RNA aus infiziertem Gewebe, was zu einem früheren Zeitpunkt entnommen wird, mittels RT-PCR Analysen auch die Induktion eines spezifischen chlamydialen Gens *in vivo* relativ zur Expression *in vitro* nachgewiesen werden kann – und zwar vor der Etablierung der angeborenen Immunantwort und der damit einsetzenden Eindämmung des Pathogens. So konnten Reinhold und Kollegen (2012) zeigen, dass bereits 3 d p. I. von ursprünglich verabreichten 10^8 EBes/Rind die Anzahl der detektierbaren Kopien von *C. psittaci* pro mg Lungengewebe auf 4×10^5 (äquivalent zu EBes) gesunken ist. 7 d p. I. konnten nur noch 1×10^4 Kopien von *C. psittaci* in 1 mg Lungengewebe gemessen werden, was die erfolgreiche Abwehr des Wirtes andeutet. In einer weiterführenden Studie wurde chlamydiale DNA im peripheren Blut der Tiere bis 35 d p. I. nachgewiesen, weshalb ebenfalls Blut als eine alternative Probe für die Isolation von chlamydialer RNA in Betracht gezogen werden könnte (Ostermann et al., 2013a). Dazu wird vor allem die chlamydiale Infektion von peripheren Blutmonozyten und Makrophagen diskutiert, die der Verbreitung des Pathogens in weitere Organe dient (Moazed et al., 1998; Ostermann et al., 2013a). Für *C. pneumoniae* wurde vornehmlich die Degradation von chlamydialen EBs in Monozyten sowie Makrophagen und die Persistenz einiger chlamydialer Antigene beschrieben (Wolf et al., 2005). Dies unterstützt einerseits die Tatsache, dass eine Immunantwort auch nach der Degradation weiterhin getriggert werden kann, jedoch chlamydiale, transkriptionelle Prozesse stark eingeschränkt sind oder auch ganz ausbleiben. Außerdem wird bereits 3 d p. I. eine Persistenz der Chlamydien in Monozyten *in vitro* stimuliert, die sich transkriptionell von der aktiven Infektion sowie weiteren Persistenz-Modellen unterscheidet (Klos et al., 2009). Die Replikation von *C. psittaci* in Monozyten bzw. Makrophagen wurde *in vitro* bestätigt (Manor und Sarov, 1986). Ob *C. psittaci* sich entsprechend in Monozyten bzw. Makrophagen *in vivo* verhält und chlamydiale RNA aus dem Blut gewonnen werden kann, bleibt zu klären. In Anlehnung an Braukmann und Kollegen (2012), die die Expressionsveränderung eines

chlamydialen Gens *in ovo* relativ zum verwendeten Inokulum ermittelten, könnte ebenfalls die Induktion der in dieser Studie untersuchten Gene *in vivo* angezeigt werden. Da im Rahmen von IVIAT jedoch die Induktion eines Gens *in vivo* relativ zu der *in vitro* betrachtet wird, liefert die vorgeschlagene Art der Analyse keine klare Aussage. Entgegen der relativen Stabilität von rRNAs besitzen bakterielle mRNAs nur eine geringe Halbwertszeit, was ein wichtiger Regulationsprozess der Genexpression ist. Zweifellos zeigt die Expression von 16S rRNA bis 7 d p. I. in der Rinderlunge eine aktive Infektion an. Ob die detektierte mRNA auch direkt mit dem exprimierten Protein korreliert, bleibt zu klären.

Durch die Inkubation des Serums mit dem Expressionswirt *E. coli* im Vorfeld der Screenings wurden auch kreuzreagierende Antikörper, die sowohl Proteine von *C. psittaci* als auch *E. coli* erkennen, abgereichert. Damit lässt sich erklären, dass sich z. B. immunreaktives HSP60 in diesen Untersuchungen nicht als ivi-Protein nachweisen ließ. Nachfolgend wird sich nun genauer mit den verifizierten chlamydialen Proteinen auseinandergesetzt.

4.2.1 Transport und oxidative Stressantwort

Vier der hier gefundenen chlamydialen *in vivo*-induzierten (ivi) Proteine, das *FeS assembly Protein* SufB (CPSOB_0063), das *extracellular solute-binding protein* (CPSOB_0164) und die *ABC transporter ATP-binding proteins* (CPSOB_0593, CPSOB_0636), gehören zu den ABC (*ATP-binding cassette*)-Transportsystemen. ABC-Transportsysteme kommen in allen Organismen vor und bilden eine große Proteinfamilie (Protein-Superfamilie), die bei Bakterien unter anderem den Transport von Zuckern und Peptiden vermittelt, aber auch bei der Signaltransduktion beteiligt ist (Garmory und Titball, 2004; Tam und Saier, 1993). Die ABC-Transporter der Bakterien spielen zudem eine große Rolle für das Überleben einer Zelle, z. B. durch den Export von toxisch-wirkenden Molekülen, sowie für die Pathogenität und die Virulenz, z. B. durch die Sekretion von Siderophoren (Davidson et al., 2008; Klein und Lewinson, 2011; Tam und Saier, 1993). ABC-Importer, die die Aufnahme von Nährstoffen in Prokaryoten regulieren (Davidson et al., 2008), bestehen ebenso wie ABC-Exporter aus zwei integralen Membranproteinen und zwei zytoplasmatischen ATP-bindenden Proteindomänen, sind jedoch zusätzlich mit Substratbindepoteinen im Periplasma bzw. bei Gram-positiven Bakterien mit Lipoproteinen assoziiert (Davidson et al., 2008). Die Immunogenität von den periplasmatischen- und integralen Membranproteinen der ABC-Transporter wurde bei einer Vielzahl von Bakterien, inklusive *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia abortus*, gezeigt (Forsbach-Birk et al., 2013; Garmory und Titball, 2004). Als Bestandteile von verschiedenen

Transportsystemen sind drei der vier *ivi*-Proteine am Import von Dipeptiden (CPS0B_0164) (Detmers et al., 2001; Hiles and Higgins, 1986), polaren Aminosäuren (CPS0B_0593) (Hosie and Poole, 2001; Tam and Saier, 1993) und Nitrat/Sulfonat/Bicarbonat (CPS0B_0636) (Kertesz, 1999; Tam and Saier, 1993) beteiligt. SufB dagegen wird als zytoplasmatische Komponente eines unkonventionellen ABC-Transportsystems bei der Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern ([Fe-S] Clustern) benötigt (Nachin et al., 2003; Outten et al., 2003). Dementgegen repräsentiert das *extracellular solute-binding protein* (CPS0B_0164) ein Importer-typisches Substratbindeprotein aus dem Periplasma. Die ATPase-Komponenten der Transporter für polare Aminosäuren bzw. für anorganische Ionen sind membranständig, zum Zytoplasma gerichtet und für die Bereitstellung der Energie zur Translokation von Substraten essentiell (Holland und Blight, 1999). Verschiedene zelluläre Prozesse und Funktionen sind mit der Aufnahme von Dipeptiden, Aminosäuren oder anorganischen Ionen bzw. der Bildung von [Fe-S] Clustern sichergestellt, die sehr wahrscheinlich in der Etablierung einer intrazellulären Nische für *C. psittaci* münden. So stellen Dipeptide nicht nur eine Quelle für Stickstoff oder Energie dar, sondern spielen auch bei Signalübertragungen eine große Rolle und informieren die Zelle über die vorherrschenden Umgebungsbedingungen (Detmers et al., 2001). Aminosäuren bilden einerseits die Bausteine für Proteine und sind andererseits auch bei der Gewinnung von Energie, der Zellwandsynthese und dem Stickstoffmetabolismus involviert. Schwefel wiederum ist ein Bestandteil der Aminosäuren Cystein und Methionin. Zudem ist er essentiell für verschiedene Enzym-Kofaktoren und [Fe-S] Cluster (Kertesz, 1999). Die Existenz und die *In-vivo*-Induktion des Transporterproteins für anorganische Ionen (CPS0B_0636) lassen vermuten, dass *C. psittaci* in der Lage ist Sulfonat als eine alternative Schwefelquelle zu nutzen. Die Funktionalität eines kompletten ABC-Transportsystems für Sulfonat wurde bisher für *C. psittaci* nicht gezeigt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die gefundenen ATP-bindenden Proteine die Energie für Transport-unabhängige Prozesse bereitstellen (Davidson et al., 2008). Unabhängig davon wird Schwefel für die Bildung von [Fe-S] Clustern benötigt. Mit den drei verschiedenen komplexen Systemen NIF (*nitrogen fixation*), ISC (*iron-sulfur cluster*) und SUF (*mobilization of sulfur*) kann die Biogenese von [Fe-S] Clustern in Bakterien bewerkstelligt werden (Frazzon und Dean, 2003; Takahashi und Tokumoto, 2002). Neben dem *ivi*-Protein SufB sind im Genom von *C. psittaci* weitere Homologe des SUF-Systems von *E. coli* kodiert. Die entsprechenden Gene sind bei *C. psittaci* in einem *sufBCDS* Cluster und einem scheinbar unabhängigen *sufE* (CPS0B_0755) organisiert. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass das *suf*-Operon im Gegensatz zum *Housekeeping* System ISC speziell bei oxidativen Stress und Eisen-Mangel induziert wird (Outten et al., 2003,

2004). Es wird angenommen, dass mit dem Suf-System die Verfügbarkeit von Eisen und Schwefel für die [Fe-S] Cluster Bildung unter den genannten Stressbedingungen aufrechterhalten werden kann (Outten et al., 2004). SufB zusammen mit SufC, einem ABC Transporter ATP-Bindeprotein, und SufD bilden einen Komplex, der bei Anwesenheit von SufE die Aktivität der Cystein Desulfurase SufS auf das 32fache erhöht und damit die Mobilisierung des Schwefels für die Bildung von essentiellen [Fe-S] Clustern ermöglicht (Outten et al., 2003). Da nur vereinzelt orthologe Gene des NIF- und ISC-Systems für *C. psittaci* annotiert sind (CPS0B_0438, CPS0B_0968, CPS0B_0969), ist die Existenz des SUF-Systems als einziges funktionelles [Fe-S] Cluster Assemblierungs System spekulativ. Dementsprechend wurde für *Mycobacterium tuberculosis* ausschließlich das SUF-System mit den konservierten SufB-, SufD-, SufC- und SufS-ähnlichen Proteinen beschrieben (Huet et al., 2005). Das mykobakterielle SUF-System ist ein unvollständiges ABC Transportsystem (Huet et al., 2005). Die Autoren konnten zeigen, dass das SufB-kodierende *pps1* durch die Sequenz eines Inteins ergänzt ist und die Hemmung des Protein-Splittings ein effektiver Weg zur Bekämpfung der Tuberkulose darstellen könnte (Huet et al., 2005). Mit IVIAT und Genexpressionsanalysen wurde die erhöhte Expression eines putativen Transkriptionsregulators des *suf* Operons (Rv1460) bei Patienten mit einer Lungentuberkulose bewiesen (Kumar et al., 2011). Die Ergebnisse von *M. tuberculosis* und *C. psittaci* deuten an, dass das SUF-System bei einer Infektion der Lunge nicht nur eine wichtige Rolle bei der Bewältigung von oxidativen Stress (Jaeger et al., 2007) spielt, sondern sehr wahrscheinlich zur Pathogenität beiträgt.

Für Mutanten des dem chlamydialen Transporter Protein für polare Aminosäuren (CPS0B_0593) entsprechenden Proteins in Streptokokken der Gruppe B, dem Homolog des *E. coli* GlnQ, wurde sowohl eine abgeschwächte Adhärenz an Fibronectin und A549-Epithelzellen sowie eine verminderte Virulenz *in vivo* nachgewiesen (Tamura et al., 2002). Der durch den gehemmten Transport einhergehende Mangel an Glutamin soll der erniedrigten Adhärenzfähigkeit an Fibronectin zu Grunde liegen (Tamura et al., 2002). Es wird angenommen, dass eine Regulation der Expression von Fibronectin Adhesinen auf posttranskriptionaler Ebene erfolgt (Tamura et al., 2002; Kloosterman et al., 2006). Auch Mäuse, die mit *gln Knockout* Stämmen von *Streptococcus pneumoniae* infiziert wurden, überlebten signifikant länger (Härtel et al., 2011). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die metabolischen Prozesse eines Bakteriums direkt mit der Pathogenität gekoppelt werden können (Rohmer et al., 2011). Da in *C. psittaci*-infizierten HeLa-Zellen neben ATP auch die Synthese von Glutamat stimuliert wird (Ojcius et al., 1998) und die Induktion des chlamydialen GlnQ-ähnlichen Proteins hier gezeigt wurde, ist eine Beteiligung

des Glutamin/Glutamat-Transportsystems bei der Etablierung der Infektion *in vivo* sehr wahrscheinlich. Zudem trägt der GadC-vermittelte Transport von Glutamat bei *Francisella* zur Neutralisation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Phagosom bei (Ramond et al., 2014). Da Oxoglutarat ein Intermediat des Tricarbonsäure-Zyklus ist, das auch aus Glutamat gebildet werden kann und für seine antioxidativen Eigenschaften bekannt ist, wird ein Zusammenhang zwischen der Bewältigung von oxidativem Stress, funktionellem Glutamat-Transportsystem und Metabolismus sowie Virulenz vorgeschlagen (Ramond et al., 2014).

Die Produktion von ROS stellt eine Verteidigungsstrategie von Zellen gegen Bakterien und Viren dar, die auch bei Chlamydien-infizierten Zellen zu beobachten ist (Boncompain et al., 2010; Prusty et al., 2012). ROS kann in den Phagozyten durch die Aktivität der NADPH Oxidase sowie in den Mitochondrien und Peroxisomen als ein Nebenprodukt gebildet werden (Bedard und Krause, 2007). Durch das Entziehen von Rac, einer regulatorischen Unterheit der NADPH Oxidase, ist *C. trachomatis* in der Lage die Aktivität des ROS-produzierenden Enzym-Komplexes zu unterbinden (Boncompain et al., 2010). In dieser Arbeit wurde das Thioredoxin (TrxA) von *C. psittaci* als ein Infektions-assoziiertes *ivi*-Protein identifiziert. Entsprechend der generellen Funktionen dieses ubiquitär vorkommenden Proteins, d. h. die Redox-Regulation und die Abwehr von oxidativen Stress z. B. durch die Reduktion von H₂O₂, als Radikalfänger oder durch die Beeinflussung der Expression von weiteren Genen (Koháryová and Kolárová, 2008; Zeller und Klug, 2006), wird dem chlamydialen TrxA eine Funktion bei der Regulation des oxidativen Stress *in vivo* zugewiesen. Im Rahmen der angeborenen Immunantwort der infizierten Kälber konnten in den Lungengewebe alveoläre Makrophagen nachgewiesen werden (Reinhold et al., 2012), die eine Produktion von ROS und damit den oxidativen Stress unterstützen (Bedard und Krause, 2007; Jaeger et al., 2007). Zudem war das Lungengewebe hypoxisch, d. h. nur mangelhaft mit Sauerstoff versorgt (Ostermann et al., 2013b), wodurch ebenfalls die Produktion von ROS stimuliert wird (Araneda und Tuesta, 2012). Der Einfluss von Thioredoxin auf die Virulenz von Bakterien wurde mehrfach gezeigt (Anwar et al., 2013; Bjur et al., 2006; Missall and Lodge, 2005; Negrea et al., 2009; Rocha et al., 2007). So wird Thioredoxin 1 bei *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium zur Aktivität bzw. Induktion des auf der Virulenz-assoziierten Pathogenitätinsel 2 (SPI2) kodierten Typ III Sekretion-Systems benötigt (Negrea et al., 2009). Für das chlamydiale T3SS wurde außerdem eine Korrelation des Redoxstatus der äußeren Komponenten des Typ III Sekretions Apparates mit dem Entwicklungszyklus vorgeschlagen (Betts-Hampikian und Fields, 2011). Eine Beteiligung des chlamydialen TrxA wäre zu prüfen.

4.2.2 Häm- und Folat Biosynthese

Drei der chlamydialen *ivi*-Proteine, HemN, FolaA und FolC2, sind bei der Biosynthese der Cofaktoren Häm bzw. Tetrahydrofolsäure beteiligt. Erst kürzlich wurde für *C. psittaci* und andere Chlamydien-Spezies aufgeklärt, dass diese *de novo* Folate synthetisieren können, indem sie Enzyme aus anderen Biosynthesewegen rekrutieren (Adams et al., 2014). Eine Ausnahme stellt *C. pecorum* dar, bei dem der komplette Folat-Gen Cluster fehlt (Adams et al., 2014; Sait et al., 2014). Außerdem sind im Genom von *C. psittaci* alle Proteine kodiert, die für die Synthese von Häm benötigt werden (z. B. CPS0B_0208/GltX, CPS0B_0034/HemA, CPS0B_0682/HemL, CPS0B_0001/HemB, CPS0B_0934/HemN, CPS0B_0935/HemG). Häm ist ein Protoporphyrin-IX-Ringsystem mit einem zentralen Eisenatom, das als prosthetische Gruppe unter anderem bei Peroxidasen, Katalasen oder Cytochromen vorkommt und Redox-Vorgänge vermittelt (Heinemann et al., 2008). Als Bestandteil von Cytochromen trägt es damit zur Gewinnung von Energie über die Atmungskette bei. Engström und Kollegen selektierten spontan mutierte Stämme von *C. trachomatis*, die gegen den Inhibitor Salicyliden-Azylhydrazid eine Resistenz entwickelt hatten und fanden Mutationen im *hemG*, das die Protoporphyrinogen-Oxidase kodiert (Engström et al., 2013). Daher wurde für das HemG bzw. den Häm-Metabolismus von *C. trachomatis* eine zentrale Bedeutung für die Infektivität geschlossen (Engström et al., 2013). Das im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit gefundene HemN von *C. psittaci* ist eine sauerstoffunabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase, die die oxidative Decarboxylierung von Coproporphyrinogen III zu Protoporphyrinogen IX katalysiert, dem HemG vorgeschalteten Schritt. Im Gegensatz zur Funktion von HemG bei der Häm-Biosynthese, wandelt die Dihydrofolat Reduktase (FolaA) Dihydrofolat in 5,6,7,8-Tetrahydrofolat im Rahmen der Folat-Biosynthese bei Chlamydien um (Fan et al., 1992). Die putative Folylglutamat-Synthase (FolC2) von *C. psittaci* ist ein Homolog von CofE der Archaea und vermittelt im Folat-Biosyntheseweg die analoge Reaktion zur CofE-abhängigen Glutamylierung des Cofaktors F₄₂₀ (Adams et al., 2014; de Crécy-Lagard et al., 2007). Tetrahydrofolat wird als Cofaktor vor allem bei der Synthese von DNA und Aminosäuren benötigt (Hartman et al., 1993). In Tiermodellen und Makrophagen wurden für die Protozoen Leishmanien bzw. das Gram-negative Bakterium *Francisella tularensis* gezeigt, dass der Verlust von Enzymen des Folat-Biosynthesewegs in einer Abschwächung bis hin zum Ausbleiben der Virulenz resultiert (Ulland et al., 2013; Vickers und Beverley, 2011). Zudem entwickelten Mäuse, wenn sie mit lebenden *C. muridarum* EBs immunisiert wurden, Antikörper gegen das orthologe FolC2 (Cruz-Fisher et al., 2011). Auch mit einem stark

reduzierten Genom besitzt *C. psittaci* die Fähigkeit essentielles Folat und Häm zu synthetisieren, was dem Pathogen ermöglicht, in seiner intrazellulären Nische wichtige Prozesse aufrechtzuerhalten, ohne auf den Wirt angewiesen zu sein. Neben der Existenz in Pflanzen, Pilzen, und einigen Protozoen kommt der Folat-Biosyntheseweg ausschließlich in Bakterien vor und bietet damit einen optimalen Angriffspunkt für den Kampf gegen pathogene Bakterien. Der Einsatz von Sulfonamiden als kompetitiver Antagonist der para-Aminobenzoesäure (pABA), die für die *de novo* Synthese von Folat erforderlich ist, zeigte jedoch bei *C. psittaci* nur eine eingeschränkte Wirkung (Fan et al., 1992). Die aktuellen und wegweisenden Erkenntnisse zu den Enzymen des chlamydialen Folat-Biosynthesewegs in Kombination mit den in dieser Arbeit gezeigten Infektions-assoziierten Proteinen eröffnen neue Möglichkeiten für Therapieansätze und Vakzine (Adams et al., 2014). Zudem ist eine Relevanz des im chlamydialen Häm gebundenen Eisens nicht zu vernachlässigen, da sowohl das Pathogen als auch der Wirt generell um diesen Nährstoff konkurrieren (Beard, 2001; Wilks und Burkhard, 2007).

4.2.3 DNA Replikation, Rekombination und Reparatur

Die Vervielfältigung der genomischen DNA und die Aufrechterhaltung intakter DNA sind grundlegende Vorgänge für das Überleben sowie die Vermehrung einer Zelle und werden im Rahmen der DNA Replikation, Rekombination und Reparatur gewährleistet (Jacob et al., 1963; Lohman und Bjornson, 1996). Diesbezüglich konnte die Induktion des *transcription-repair coupling factor* (TRCF) und einer putativen DNA Helikase (CPS0B_0996) mit IVIAT gezeigt werden. Ein drittes Protein, die Tyrosin-Rekombinase XerD wurde im 1D-Immunblot von dem adsorbierten Serum erkannt, konnte jedoch im Kolonie-Screening nicht bestätigt werden. Sowohl TRCF als auch die putative Helikase gehören zur Superfamilie II der Helikasen und haben die Helikase Superfamilie II C-terminale Domäne gemeinsam (Beyer et al., 2013; Bork und Koonin, 1993). Der bakterielle TRCF erkennt und initiiert unter Energieaufwendung die Entfernung von RNA Polymerasen, die an beschädigter DNA einen Stopp der Transkription verursachen. Durch den TRCF wird zudem die Rekrutierung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur an die beschädigte Stelle stimuliert (Deaconescu et al., 2006; Selby und Sancar, 1993). Da diese TRCF-bedingte Termination sehr schnell in aktiv transkribierten Genen abläuft, kann vermutet werden, dass bei der Vermehrung von *C. psittaci* im Kalb die Induktion des TRCF die Produktion der chlamydialen mRNA und damit den Progress der Infektion im Rahmen der oft begrenzten und zur Verfügung stehenden Ressourcen gewährleistet. Warner und Kollegen

beschrieben ebenfalls die Bedeutung der TRC und anderer DNA Reparatur-Mechanismen für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität bei obligat intrazellulären Pathogenen, gerade auch bei persistenten Infektionsverläufen (Warner et al., 2013). Die bei Chlamydien beobachtete Dekondensation der DNA während der Differenzierung der EBs in die RBs, könnte durch die Funktion der putativen DNA Helikase von *C. psittaci* unterstützt werden (Smith und Peterson, 2005). Es wurde herausgefunden, dass die Interaktion der DNA mit dem Histon H1-ähnlichen Protein durch einen Metabolit des chlamydialen Methylerythritol-Phosphat-Wegs zerstört wird (Grieshaber et al., 2004). Neben diesem eher ungewöhnlichen Weg der Dekondensation des chlamydialen Nukleoids könnte durch die Chromatin Remodeling-Funktion der Snf2-Helikase die DNA für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich gemacht werden (Byrd und Raney, 2012; Smith und Peterson, 2005; Stephens et al., 1998). Diese Beeinflussung der transkriptionellen Regulation durch die Snf2-Helikase sowie durch chlamydiale Histon Methyltransferasen (HMT), die charakteristische SET-Domänen enthalten, ähnelt mechanistisch den Chromatin-Remodeling Prozessen der Eukaryoten (Bierne et al., 2012; Stephens et al., 1998). Für die HMTs wurde *in vitro* sowohl die Methylierung der Wirts-Histone als auch die der chlamydialen Histone beschrieben (Murata et al., 2007; Pennini et al., 2010). Die XPB DNA Helikase von *Mycobacterium tuberculosis* zählt entsprechend der Snf2-Helikase von *C. psittaci* zur Superfamilie II. Die Entdeckung, dass XPB nicht nur die Entwindung dsDNA katalysiert, sondern auch ein ATP-unabhängiges Annealing komplementärer DNA Stränge triggert, erweitert den funktionellen Rahmen dieser Helikase mit einer über die DNA Reparatur hinausgehenden Bedeutung, wahrscheinlich auch im Zusammenhang mit der Pathogenität von *M. tuberculosis* (Balasingham et al., 2012).

Die im Immunblot mit dem adsorbierten Serum detektierte chlamydiale Tyrosin-Rekombinase XerD deutet an, dass dieses Enzym *in vivo* an Sequenz-spezifischen DNA Umlagerungen beteiligt ist, die das Ziel einer Veränderung der Genexpression haben oder im Rahmen von Zellteilungsprozessen auftreten (Esposito und Scocca, 1997). Tyrosin Rekombinasen spalten DNA und verknüpfen diese im Anschluss neu, wobei kovalente Zwischen-Verknüpfungen mit der DNA eingegangen werden. Bei *Mycoplasma* resultieren solche DNA Inversionen, vor allem von Promotoren, in der Generierung neuer Variationen von Oberflächen-Antigenen und damit in der Immunevasion (Horino et al., 2008). Diese Variabilität der Genexpression ist auch für *C. psittaci* denkbar und wird durch bisherige Untersuchungen gestützt, die darlegen, dass eine langsam reifende adaptive Immunantwort auf spezifische chlamydiale Proteine die verzögerte Eindämmung der chlamydialen Infektion bedingt und nicht auf einer Antigen-Drift gründet (Kari et al., 2013). Zusammenfassend vertiefen die Ergebnisse die Bedeutung der

Aufrechterhaltung der genomischen Integrität, der Regulation der replikativen und transkriptionellen Prozesse sowie möglicher Antigen- und/oder Phasen-Variationen (siehe 4.3.6; van der Woude und Bäumler, 2004) von *C. psittaci* bei der Etablierung der Infektion.

4.2.4 Hypothetische Proteine und Proteine mit unbekannter Funktion

Die Funktion vieler Proteine von *C. psittaci* ist bisher nicht beschrieben. Dazu zählen die drei *in vivo*-induzierten Proteine, die durch *CPSOB_0426*, *CPSOB_0689* und *CPSOB_1025*, dem *pGP6-D-like protein*, kodiert sind. Für das Genprodukt von *CPSOB_0426* wurde vorhergesagt, dass es über das T3SS transloziert wird (Voigt et al., 2012). Dagegen scheint das durch *CPSOB_0689* kodierte Antigen mit der inneren Membran der Chlamydien assoziiert zu sein (PSORTb). Das chromosomal kodierte *pGP6-D-like protein* lässt sich zusammen mit dem Plasmid Protein pGP6-D in die Familie der uncharakterisierten Proteine UPF0137 einordnen. Die Software MP3 (<http://metagenomics.iiserb.ac.in/mp3/index.php>) wurde genutzt, um die Pathogenität der gegebenen Proteine zu bestimmen (Gupta et al., 2014). Dabei vereint MP3 das mathematische Verfahren der Mustererkennung durch eine *Support Vector Machine* (SVM) mit dem stochastischen Modell nach Hidden Markov (HMM). In diesem Zusammenhang wird die Pathogenität von AEG87390 (*CPSOB_0426*) und AEG87625 (*CPSOB_0689*) bestätigt. Da HMM auf den Domänen der Datenbank Pfam aufbaut (Punta et al., 2011) und für alle drei *in vivo*-Proteine keine definierten bzw. charakterisierten Domänen zugewiesen werden können, beruht die generelle Vorhersage von MP3 in diesem Fall nur auf der SVM-Analyse. Ein gegensätzliches Ergebnis würde zugunsten der HMM Analyse verschoben und daher bleibt die Aussagekraft vor allem des negativen Ergebnisses vom *pGP6-D-like protein* zweifelhaft. Das hypothetische Protein, das von *CPSOB_0426* kodiert wird, entspricht dem orthologen Genprodukt von *C. muridarum TC_0381*, für das im Maus Modell ebenfalls eine Immunodominanz nachgewiesen werden konnte (Cruz-Fisher et al., 2011). Die Induktion der humoralen sowie der T-Zell-vermittelten Immunreaktion in Patienten mit genitaler *C. trachomatis* Infektion wurde für das *C. trachomatis* Ortholog des *pGP6-D-like protein* gezeigt (Olsen et al., 2007; Wang et al., 2010). Auf Aminosäureebene weisen das *pGP6-D-like protein* und das pGP6-D von *C. psittaci* eine 33%ige Übereinstimmung bei einer 75%igen Abdeckung auf. Ob sie ähnliche Funktionen ausüben, ist unklar. Zumindest wurde für das Plasmid-kodierte pGP6-D von *C. trachomatis* gezeigt, dass es für die Erhaltung des Plasmids essentiell ist, dem wiederum als transkriptionellen Regulator putativer Virulenzfaktoren eine Rolle bei der Pathogenese zugedacht wird (Gong et al., 2013; Song et

al., 2013). Andererseits wurde mit dem Mausmodell aufgeklärt, dass SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) und nicht die An- bzw. Abwesenheit des Plasmides der Virulenz *C. psittaci* zu Grunde liegen (Miyari et al., 2011). Unabhängig davon deutet die Induktion des *pGP6-D-like protein in vivo* auf ein Infektions-assoziiertes Protein hin. Im Vergleich mit den homologen Proteinen anderer Chlamydien Spezies fällt auf, dass von den 3 hypothetischen bzw. uncharakterisierten Proteinen das *pGP6-D-like protein* auf Aminosäuresequenzebene am meisten mit den entsprechenden Proteinen der anderen Spezies innerhalb der *Chlamydiaceae* übereinstimmt. Mit einer Abdeckung (*Query Coverage*) von 100% liegen z. B. die Aminosäuresequenzidentitäten des *C. psittaci pGP6-D-like protein* mit den homologen Proteinen von *C. abortus*, *C. felis* und *C. caviae* bei 98%, 94% bzw. 91% (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Dem gegenüber ist das Genprodukt von *CPSOB_0689* nur zu 84% über die gesamte Länge des homologen Proteins von *C. abortus* identisch, gefolgt vom *C. caviae* Homolog (95% *Query Coverage*, 44% *Identity*). Die geringsten Übereinstimmungen auf Aminosäuresequenzebene sind für die homologen Proteine des *CPSOB_0426* kodierten Proteins zu finden, mit der größten Ähnlichkeit zum *C. caviae* Homolog (92% *Query Coverage*, 50% *Identity*). Diese Werte zeigen, dass die Genprodukte von *CPSOB_0426* und auch von *CPSOB_0689* vergleichsweise individuellere Aminosäuresequenzen haben als das *pGP6-D-like protein* und deuten damit an, dass sie *C. psittaci*-spezifische Proteindomänen enthalten – putative Targets für die Vakzineentwicklung. Alle drei Proteine repräsentieren die engen phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse der Chlamydien innerhalb der *psittaci group* (Voigt et al., 2012).

4.2.5 Membranproteine

Das chlamydiale MOMP wurde aufgrund der oft beschriebenen immunogenen Wirkung und dem Potential die Bildung neutralisierender Antikörper zu stimulieren (Kari et al., 2009; Murdin et al., 1993; Peterson et al., 1991; Vanrompay et al., 1999; Zhang et al., 1987,1989) in dieser Studie als Positivkontrolle mitgeführt. Neben diesem Membranprotein wurde in den Screenings außerdem das polymorphe Membranprotein Pmp17G und das Inklusionsmembranprotein Inca als chlamydiale Antigene bestätigt. Inca wurde bereits 1995 von Rockey und Kollegen während dem Immunoscreening einer *C. psittaci* Expressionsbank identifiziert (Rockey et al., 1995). Das 39 kDa große Protein besitzt zwei Transmembranhelices (Beeckman et al., 2008; Rockey et al., 2000) und ist in der Inklusionsmembran lokalisiert und dabei zum Wirtszellzytosol exponiert (Rockey et al., 1997). Dagegen sind

MOMP, das aus 4 variablen (VDI-IV) und 5 konstanten Domänen besteht (Stephens et al., 1986,1987; Vanrompay et al., 1998), und Pmp17G Proteine der äußeren chlamydialen Membran (Caldwell et al., 1981; Byrne, 2010; Tan et al., 2009). Da diese drei Membranproteine auch zum Wirtszellzytosol gerichtet sind, stellen sie optimale Angriffspunkte für das Immunsystem des Wirtes dar. So wurde in weiteren Studien, die ebenfalls in einem genomweiten Maßstab durchgeführt wurden, auch MOMP, Pmps und InCA als immundominante Proteine innerhalb der verschiedenen *Chlamydiae* beschrieben (Cruz-Fisher et al., 2011; Forsbach-Birk et al., 2013; Wang et al., 2010).

MOMP ist mit einem Anteil von etwa 60% das dominante Protein der äußeren Membran von Chlamydien und bildet über Disulfidbindungen vor allem zusammen mit OmcA, OmcB und PmpG den sogenannten *chlamydial outer membrane complex* (COMC), eine Grundlage für die strukturelle Integrität von EBs (Bavoil et al., 1984; Caldwell et al., 1981; Everett und Hatch, 1991; Liu et al., 2010; Saka et al., 2011). MOMP fungiert als ein Porin-ähnlicher Ionenkanal (Findlay et al., 2005; Wyllie et al., 1998) und vermittelt zudem u. a. die Zelladhärenz an Heparansulfat-Rezeptoren, weshalb MOMP eine Beteiligung in der chlamydialen Pathogenese zugeordnet wird (Gutiérrez-Martin et al., 1997; Su et al., 1990,1996). Auch für Pmps wurde gezeigt, dass sie essentiell für die Adhäsion von EBs an humane Zellen sind (Becker und Hegemann, 2014; Mölleken et al., 2010). Pmps sind auf Sequenzebene sehr heterogen d. h. genetisch divers, aber sie haben alle einen vergleichbaren generellen Aufbau, bestehend aus einer C-terminalen Autotransporter-ähnlichen Domäne (Henderson und Lam, 2001), einer zentralen Pmp Mitteldomäne sowie einer variablen Anzahl kurzer repetitiver GGA(I, L, V) und FxxN Motife im N-terminalen Bereich des Proteins (Grimwood und Stephens, 1999; Voigt et al., 2012). Innerhalb der C-terminalen Domäne besitzen Pmps entsprechende Motife von Autotransportern des Typ V Sekretionssystems d. h. eine N-terminale Signalsequenz für die *sec*-abhängige Sekretion, eine *Passenger* Domäne und eine C-terminale β -Faltblatt-reiche Translokationsdomäne (β -*Barrel*) für den Transport der *Passenger* Domäne durch die Membran (Grimwood und Stephens, 1999; Henderson und Lam, 2001; Tan et al., 2010). Analog zu Autotransportern werden viele Pmps posttranslational prozessiert (Saka et al., 2011). Für *C. psittaci* sind 21 putative Pmps beschrieben, 14 davon gehören allein der Subfamilie PmpG/I an (Voigt et al., 2012). Sequenzanalysen der immunreaktiven Klone führten zur Identifizierung der Autotransporter-ähnlichen Domäne von Pmp17G. Blastp-Analysen des hier gefundenen *in vivo*-induzierten und immunreaktiven Pmp17G zeigen, dass es nur mit dem homologen Protein von *C. abortus*, über die gesamte Länge betrachtet, eine 88%ige Aminosäuresequenzidentität teilt. Damit scheint das Pmp17G von *C. psittaci*, neben

dem von *C. abortus*, einzigartig in seiner Aminosäurezusammensetzung und auch seiner putativen Funktion zu sein. Neueste Untersuchungen mit *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* konnten darlegen, dass für jedes Pmp ein individuelles Adhäsions-Profil unter der Verwendung verschiedener Zellen bzw. Zelltypen beobachtet werden konnte. So könnte über die positive Selektion mehrerer Pmps die Adaptation der Chlamydien an eine gegebene Nische unterstützt werden (Becker und Hegemann, 2014). Neben den Hinweisen einer Pmp-vermittelten Gewebsspezifität (Gomes et al., 2006; Nunes et al., 2007) wurde die Spezies-spezifische Funktion der Pmps nachgewiesen (Becker und Hegemann, 2014). Sehr wahrscheinlich ist, dass Pmps einen wichtigen Beitrag bei der Immunevasion leisten (Abdelsamed et al., 2013). So spiegelt sich das Gen-Repertoire und die variable Expression der Pmps in einer Variation der Antigene und damit unterschiedlichen Antikörper-Profilen von Patienten wider (Tan et al., 2009). Auch wenn die Funktion/en der Pmps immer noch nicht komplett geklärt ist/sind, wird postuliert, dass Pmps eine wichtige Rolle bei der chlamydialen Virulenz spielen (Becker und Hegemann, 2014).

Die chlamydiale Inklusion wird durch eine Vielzahl von Typ III sekretierten Effektorproteinen, den *Inclusion membrane proteins* (Incs), modifiziert und übt eine zentrale Funktion bei der Interaktion zwischen Chlamydien und Wirtszelle aus (Dehoux et al., 2011). IncA von *C. psittaci* gehört zu der Familie der *Inclusion membrane proteins*, deren Kennzeichen eine *bilobale* hydrophobe Domäne ist. Diese Domäne sorgt vermutlich für die Verankerung des Proteins in der Inklusionsmembran (Mital et al., 2013; Rockey et al., 2000). *C. psittaci* IncA kann daher sowohl in Assoziation mit der Inklusion als auch in sekretierter Form mit Hilfe der Immunfluoreszenz visuell dargestellt werden (Beekman et al., 2008; Rockey et al., 1995). Über die Exposition von Incs zum Zytosol wird sehr wahrscheinlich die Interaktion zwischen dem Pathogen und dem Wirt vermittelt. Dementsprechend konnte gerade der Bereich von IncA (aa122-336), der eine BIN/Amphiphysin/Rvs (BAR) Domäne (aa129-283) bzw. tSNARE Domäne enthält (aa254-318) und exklusive der transmembranalen Regionen ist (Beekman et al., 2008), als immunreaktiv nachgewiesen werden. Chlamydien nutzen SNARE-ähnliche Proteine, um die Fusion später Endosomen mit Lysosomen zu unterbinden mit dem Ziel ihre intrazelluläre Nische zu schützen (Ronzone und Paumet, 2013). Zudem wird speziell bei *C. trachomatis* die homotypische Fusion von Inklusionen über diese IncA-Motive gesteuert (Ronzone und Paumet, 2013). Die Manipulation von intrazellulären Vesikelfusionen kann auch durch BAR-Domänen in Folge deren Dimerisierung vermittelt werden. Zudem hemmt die Rekrutierung des BAR-Proteins Amphiphysin II_m, das ebenso an Rezeptor-vermittelter Endozytose, Exozytose sowie intrazellulären Vesikel *trafficking* beteiligt ist, an das

C. pneumoniae-enthaltene Phagosom vermutlich die Reifung des Makrophagen Phagosoms und damit die Bildung eines reifen Phagolysosoms (Gold et al., 2004). Auf diese Weise ahmt *C. psittaci* Proteine der Wirtszelle nach und umgeht der Degradation durch den Wirt. Bisher sind orthologe Proteine der Incs nicht bekannt (Rockey et al., 2002), weshalb ihnen entsprechend den Pmps eine einzigartige Rolle in dem Phylum *Chlamydiae* zu Teil wird.

Sowohl die Sequenz-diversen Incs und Pmps als auch das polymorphe MOMP tragen in hohem Maße zur Variabilität der Chlamydien bei und ermöglichen so dem Pathogen der Immunantwort des Wirtes zu entgehen (Abdelsamed et al., 2013; Fitch et al., 1993).

4.2.6 Sekretionsapparate und Effektorproteine

Neben den bereits erwähnten Typ V Sekretionssystem (TVSS), nutzen Chlamydien weitere Sekretionssysteme um Proteine, bzw. das T3SS-betreffend sogenannte Effektorproteine, über die innere und äußere bakterielle Membran (z. B. T2SS) als auch über die/zu der Inklusionsmembran (z. B. T3SS) transferieren zu können. Die drei immunreaktiven Proteine *cytoplasmic II/IV secretion system family protein* (CPSOB_1012), *typ III secretory flagellar biosynthesis protein* (CPSOB_0971) und *type III secretion system ATPase* (CPSOB_0972) sind direkte Bestandteile der Sekretionsapparate des Typs II bzw. III. Das Typ II Sekretionssystem umfasst den *Sec*-abhängigen Export von Proteinen in das Periplasma mit anschließendem Transport durch die äußere Membran. *CPSOB_1012* kodiert dabei für die ATPase des Transportkomplexes, die die Energie für die Sekretion liefert und dem *general secretion pathway protein E* entspricht (Beeckman und Vanrompay, 2010). Untersuchungen mit Glykogen-Sekretions-defekten *C. trachomatis* legen nahe, dass die Substitution G425E von GspE in einem Funktionsverlust des Proteins und damit einer gestörten Sekretion der Glykogen Hydrolase resultieren, was zur Akkumulation von Glykogen in der Inklusion führt. Zudem war das Wachstum der Mutante stark eingeschränkt (Nguyen und Valdivia, 2012). Zusammengenommen mit diesen Ergebnissen verstärkt die Induktion des *CPSOB_1012* kodierten GspE *in vivo* die Relevanz des chlamydialen T2SS für die Virulenz.

Chlamydien sind nicht-motile Bakterien, die neben dem sogenannten *non-flagellar* T3SS (NF-T3SS) oder *injectisome* aber auch für homologe Proteine der Flagella kodieren. Dabei deuten Analysen an, dass das NF-T3SS aus der Flagella entstanden ist (Abby und Rocha, 2012). Das *typ III secretory flagellar biosynthesis protein* und die *type III secretion system ATPase* repräsentieren die flagellaren Proteine FliH und FliI bzw. sind Paraloge des SctL/CdsL und SctN/CdsN des NF-T3SS (Beeckman und Vanrompay, 2010; Betts-Hampikian und Fields,

2010; Stone et al., 2008). Im Gegensatz zu den kompletten und funktionalen NF-T3SS, sind bei Chlamydien nur die basalen Komponenten des flagellaren T3S-Apparates der inneren Membran vorhanden, d. h. chlamydiales FliI, FliH, FliN, FliF und FliA (Betts-Hampikian und Fields, 2010). Die spezifischen Interaktionen der orthologen Flagella-Proteine untereinander und deren Kreuz-Reaktion mit dem T3SS *in vitro* weisen darauf hin, dass die flagellaren Proteine mit den Komponenten des T3S-*injectisome* Hybridapparate formen können (Betts-Hampikian und Fields, 2010; Stone et al., 2010). Damit wäre eine funktionelle Variabilität der Sekretionsmaschinerie gegeben, die mit dem chlamydialen Entwicklungszyklus in Zusammenhang gebracht werden kann (Beeckman und Vanrompay, 2010; Betts-Hampikian und Fields, 2010). Die „flagellaren“ *ivi*-Proteine hätten auf diese Weise einen direkten Einfluss auf die Sekretion chlamydialer Effektorproteine und damit auf die Pathogenese. *C. psittaci* FliH zählt außerdem zu den putativen Effektorproteinen des T3SS, die basierend auf einer *In-silico*-Analyse für *C. psittaci* vorhergesagt wurden (Voigt et al., 2012). Von allen in dieser Arbeit diskutierten *ivi*-Proteinen gehören neben dem chlamydialen FliH sowohl IncA, Pmp17G, HemN, SufB, *ABC transporter ATP-binding protein* (CPS0B_0593), TRCF und das hypothetische CPS0B_0426 kodierte Protein zu den putativen bzw. validierten (IncA) Effektorproteinen. Das entspricht etwa der Hälfte der *in vivo*-induzierten und immunreaktiven Proteine. Die Sekretion von Effektorproteinen, die in der Manipulation von zellulären Prozessen des Wirtes resultiert sowie die T3SS-vermittelte Immunstimulation tragen zur chlamydialen Pathogenese bei (Betts-Hampikian und Fields, 2010; Wang et al., 2010). Für Chlamydien ist das T3SS essentiell für den Entwicklungszyklus (Betts-Hampikian und Fields, 2010) und trägt zusammen mit den assoziierten Effektorproteinen zur Vermehrung des Pathogens im Wirt bei. Über die Interaktionen mit den Signalwegen des Wirtes ist es dem Pathogen möglich der Wirtsabwehr zu entgehen (Cocchiario und Valdivia, 2009).

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Kontrolle der Psittakose beim Menschen geht mit der Kontrolle der Infektionskrankheit beim befallenen Vogel bzw. Wirt einher (Longbottom und Coulter, 2003). Der Link von humaner und tierischer Gesundheit bzw. Humanmedizin und Veterinärmedizin wird aktuell im Rahmen interdisziplinärer Betrachtungen im sogenannten *One health* Konzept berücksichtigt, mit dem Ziel das Leben von Mensch und Tier zu verbessern. Gerade die Kontrolle zoonotischer Infektionen sowie die Entwicklung neuer diagnostischer Methoden und Vakzine stehen dabei im Fokus von *One health* (Yamada et al., 2014). In Hinblick dieser Motivation wurden in der hier vorliegenden Arbeit *in vivo*-induzierte chlamydiale Antigene identifiziert, die zur Aufklärung der Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen *in vivo* beitragen. Die Wirts-spezifische Immunreaktion gegen *C. psittaci* konnte dazu mit Hilfe des Serums infizierter Rinder nachvollzogen werden. Viele der gefundenen chlamydialen Proteine wurden durch diese Arbeit erstmalig in einen Infektions-relevanten Bezug gebracht. In zukünftigen Studien könnten die subzelluläre Lokalisation der putativen chlamydialen Virulenzfaktoren, z. B. durch die Herstellung monoklonaler Antikörper im Tiermodell, charakterisiert werden sowie direkte Protein-Protein-Interaktionen mit dem Wirt untersucht werden, um die Wirkmechanismen besser verstehen zu können. Auch die Konstruktion von Deletionsmutanten der entsprechenden *ivi*-Proteine der Chlamydien wird basierend auf der beschriebenen genetischen Manipulierbarkeit des Pathogens bald möglich sein (Wang et al., 2011). Die in der Diskussion erwähnten weiterführenden Arbeiten betreffen vor allem die immunreaktiven Expressionsprodukte, die bisher noch nicht eindeutig bestätigt werden konnten. Die Strukturanalyse von Epitopen ist dabei grundlegend für die Etablierung von monoklonalen Antikörpern, die sowohl in der Forschung und Diagnostik von großer Bedeutung sind, aber auch in der Therapie eingesetzt werden. Zudem sind die identifizierten Proteine als putative protektive Antigene bzw. Vakzinekandidaten von Interesse. Eine denkbare Eignung als diagnostische Markerproteine erfordert ebenfalls weitere Untersuchungen zur Charakterisierung eines gegebenen chlamydialen Proteins. Ein großes Potential für die aufgeführten Bestrebungen ist in den Proteinen bzw. Biosynthesewegen zu sehen, die ausschließlich in Mikroorganismen bzw. Chlamydien vorkommen, z. B. die ABC-Importer, Pmp und alle weiteren putativen Effektorproteine des chlamydialen Typ III Sekretionssystem sowie die Proteine des mehr oder weniger unkonventionellen Folat-Biosynthesewegs.

Literaturverzeichnis

- Abby, S.S., Rocha, E.P., 2012. The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems. *PLoS Genet.* 8, e1002983.
- Abdelsamed, H., Peters, J., Byrne, G.I., 2013. Genetic variation in *Chlamydia trachomatis* and their hosts: impact on disease severity and tissue tropism. *Future Microbiol.* 8, 1129-1146.
- Adams, N.E., Thiaville, J.J., Proestos, J., Juárez-Vázquez, A.L., McCoy, A.J., Barona-Gómez, F., 2014. Promiscuous and adaptable enzymes fill "holes" in the tetrahydrofolate pathway in *Chlamydia* species. *mBio* 5, e01378-14.
- Alam, M.M., Tsai, L.L., Rollins, S.M., Sheikh, A., Khanam, F., Bufano, M.K., Yu, Y., Wu-Freeman, Y., Kalsy A., Sultana, T., Sayeed, M.A., Jahan, N., LaRocque, R.C., Harris, J.B., Leung, D.T., Brooks, W.A., Calderwood, S.B., Charles, R.C., Qadri, F., Ryan, E.T., 2013. Identification of *in vivo*-induced bacterial proteins during human infection with *Salmonella enterica* serotype Paratyphi A. *Clin. Vaccine Immunol.* 20, 712-719.
- Amerizadeh, A., Idris, Z.M., Khoo, B.Y., Kotresha, D., Yunus, M.H., Abdul Karim, I.Z., Saadatnia, G., Teh, A.Y., Noordin, R., 2013a. Identification of *Toxoplasma gondii in-vivo* induced antigens by cDNA library immunoscreening with chronic toxoplasmosis sera. *Microbial. Pathog.* 54, 60-66.
- Amerizadeh, A., Khoo, B.Y., Teh, A.Y., Golkar, M., Abdul Karim, I.Z., Osman, S., Yunus, M.H., Noordin, R., 2013b. Identification and real-time expression analysis of selected *Toxoplasma gondii in-vivo* induced antigens recognized by IgG and IgM in sera of acute toxoplasmosis patients. *BMC Infect. Dis.* 13, 287.
- Andersen, A.A., Vanrompay, D., 2000. Avian chlamydiosis. *Rev. Sci. Tech.* 19, 396-404.
- Angelichio, M., Camilli, A., 2002. In vivo expression technology. *Infect. Immun.* 70, 6518-6523.
- Anwar, N., Sem, X.H., Rhen, M., 2013. Oxidoreductase that act as conditional virulence suppressors in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS ONE* 8, e64948.
- Araneda, O.F., Tuesta, M., 2012. Lung oxidative damage by hypoxia. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 856918.
- Balasingham, S.V., Zegeye, E.D., Homberset, H., Rossi, M.L., Laerdahl, J.K., Bohr, V.A., Tønjum, T., 2012. Enzymatic activities and DNA substrate specificity of *Mycobacterium tuberculosis* DNA helicase XPB. *PLoS ONE* 7, e36960.
- Balsara, Z.R., Starnbach, M.N., 2007. CD8⁺ T cell recognition of cells infected with *Chlamydia*. In: Bavoil, P.M., Wyrick, P.B. (Eds.), *Chlamydia: Genomics, Pathogenesis and implications for control*, Horizon Scientific Press, Norfolk, UK, 318-412.
- Bastidas, R.J., Elwell, C.A., Engel, J.N., Valdivia, R.H., 2013. Chlamydial intracellular survival strategies. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3, a010256.
- Bavoil, P.M., Hsia, R., Ojcius, D.M., 2000. Closing in on *Chlamydia* and its intracellular bag of tricks. *Microbiology* 146, 2723-2731.
- Bavoil, P., Ohlin, A., Schachter, J., 1984. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 44, 479-485.
- Bavoil, P., Stephens, R.S., Falkow, S., 1990. A soluble 60 kilo Dalton antigen of *Chlamydia* spp. is a homologue of *Escherichia coli* GroEL. *Mol. Microbiol.* 4, 461-469.

- Beard, J.L., 2001. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J. Nutr.* 131, 568S-580S.
- Beatty, W.L., 2006. Trafficking from CD63-positive late endocytic multivesicular bodies is essential for intracellular development of *Chlamydia trachomatis*. *J. Cell Sci.* 119, 350-359.
- Beatty, W.L., Belanger, T.A., Desai, A.A., Morrison, R.P., Byrne, G.I., 1994. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect. Immun.* 62, 3705-3711.
- Becker, E., Hegemann, J.H., 2014. All subtypes of the Pmp adhesin family are implicated in chlamydial virulence and show species-specific function. *Microbiologyopen* 3, 544-556.
- Bedard, K., Krause, K.H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245-313.
- Beekman, D.S., Geens, T., Timmermans, J.P., Van Oostveldt, P., Vanrompay, D.C., 2008. Identification and characterization of type III secretion system in *Chlamydophila psittaci*. *Vet. Res.* 39, 27.
- Beekman, D.S., Vanrompay, D.C., 2010. Bacterial secretion systems with an emphasis on the chlamydial Type III secretion system. *Curr. Issues Mol. Biol.* 12, 17-41.
- Betts, H.J., Wolf, K., Fields, K.A., 2009. Effector protein modulation of host cells: examples in the *Chlamydia* spp. arsenal. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 81-87.
- Betts-Hampikian, H.J., Fields, K.A., 2010. The chlamydial type III secretion mechanism: revealing cracks in a tough nut. *Front. Microbiol.* 1, 114.
- Betts-Hampikian, H.J., Fields, K.A., 2011. Disulfide bonding within components of the *Chlamydia* type III secretion apparatus correlates with development. *J. Bacteriol.* 193, 6950-6959.
- Beyer, D.C., Ghoneim, M.K., Spies, M., 2013. Structure and mechanism of SF2 DNA helicases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 767, 47-73.
- Bierne, H., Hamon, M., Cossart, P., 2012. Epigenetics and bacterial infections. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a010272.
- Bina, J., Zhu, J., Dziejman, M., Faruque, S., Calderwood, S., Mekalanos, J., 2003. ToxR regulon of *Vibrio cholerae* and its expression in vibrios shed by cholera patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2801-2806.
- Binet, R., Maurelli, A.T., 2005. Fitness cost due to mutations in the 16S rRNA associated with Spectinomycin resistance in *Chlamydia psittaci* 6BC. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4455-4464.
- Bjur, E., Eriksson-Ygberg, S., Aslund, F., Rhen, M., 2006. Thioredoxin 1 promotes intracellular replication and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* 74, 5140-5051.
- Böcker, S., Heurich, A., Franke, C., Monajembashi, S., Sachse, K., Saluz, H.P., Hänel, F., 2014. *Chlamydia psittaci* inclusion membrane protein IncB associates with host protein Snapin. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 542-553.
- Boncompain, G., Schneider, B., Delevoye, C., Kellermann, O., Dautry-Varsat, A., Subtil, A., 2010. Production of reactive oxygen species is turned on and rapidly shut down in epithelial cells infected with *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 78, 80-87.
- Bork, P., Koonin, E.V., 1993. An expanding family of helicases within the 'DEAD/H' superfamily. *Nucleic Acids Res.* 21, 751-752.

- Brade, L., Holst, O., Kosma, P., Zhang, Y.X., Paulsen, H., Krause, R., Brade, H., 1990. Characterization of murine monoclonal and murine, rabbit, and human polyclonal antibodies against chlamydial lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 58, 205-213.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Braukmann, M., Sachse, K., Jacobsen, I.D., Westermann, M., Menge, C., Saluz, H.P., Berndt, A., 2012. Distinct intensity of host-pathogen interactions in *Chlamydia psittaci*- and *Chlamydia abortus*-infected chicken embryos. *Infect. Immun.* 80, 2976-2988.
- Brunham, R.C., Peeling, R.W., 1994. *Chlamydia trachomatis* antigens: role in immunity and pathogenesis. *Infect. Agents Dis.* 3, 218-233.
- Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Karashi, H., Michelsen, K.S., Equils, O., Morrison, S.G., Morrison, R.P., Ardit, M., 2002. Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J. Immunol.* 168, 1435-1440.
- Bulut, Y., Shimada, K., Wong, M.H., Chen, S., Gray, P., Alsabeh, R., Doherty, T.M., Crother, T.M., Ardit, M., 2009. Chlamydial heat shock protein 60 induces acute pulmonary inflammation in mice via the toll-like receptor 4- and MyD88-dependent pathway. *Infect. Immun.* 77, 2683-2690.
- Byrd, A.K., Raney, K.D., 2012. Superfamily 2 helicases. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 17, 2070-2088.
- Byrne, G.I., 2010. *Chlamydia trachomatis* strains and virulence: rethinking links to infection prevalence and disease severity. *J. Infect. Dis.* 201, S126-S133.
- Byrne, G.I., Ojcius, D.M., 2004. *Chlamydia* and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 802-808.
- Caldwell, H.D., Hitchcock, P.J., 1984. Monoclonal antibody against a genus-specific antigen of *Chlamydia* species: location of the epitope on chlamydial lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 44, 306-314.
- Caldwell, H.D., Judd, R.C., 1982. Structural analysis of chlamydial major outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 38, 960-968.
- Caldwell, H.D., Kromhout, J., Schachter, J., 1981. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 31, 1161-1176.
- Cappello, F., Conway de Macario, E., Di Felice, V., Zummo, G., Macario, A.J., 2009. *Chlamydia trachomatis* infection and anti-Hsp60 immunity: two sides of the coin. *PLoS Pathog.* 5, e1000552.
- Capmany, A., Damiani, M.T., 2010. *Chlamydia trachomatis* intercepts Golgi-derived sphingolipids through a Rab14-mediated transport required for bacterial development and replication. *PLoS ONE* 22, e14084.
- Chen, A.L., Johnson, K.A., Lee, J.K., Sütterlin, C., Tan, M., 2012. CPAF: a chlamydial protease in search of an authentic substrate. *PLoS Pathog.* 8, e1002842.
- Chen, B., Stuet, R., Campbell, W.F., 1996. Nitric oxide production: a mechanism of *Chlamydia trachomatis* inhibition in interferon-gamma-treated RAW264.7 cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 14, 109-120.
- Cheng, S., Clancy, C.J., Checkley, M.A., Handfield, M., Hillman, J.D., Progulske-Fox, A., Lewin, A.S., Fidel, P.L., Nguyen, M.H., 2003. Identification of *Candida albicans* genes induced during thrush offers insight into pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 48, 1275-1288.

- Christian, J., Vier, J., Paschen, S.A., Häcker, G., 2010. Cleavage of the NF- κ B family protein p65/RelA by the chlamydial protease-like activity factor (CPAF) impairs proinflammatory signaling in cells infected with *Chlamydiae*. *J. Biol. Chem.* 285, 41320-41327.
- Clarke, L., Carbon, J., 1976. A colony bank containing synthetic Col EI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9, 91-99.
- Clifton, D.R., Dooley, C.A., Grieshaber, S.S., Carabeo, R.A., Fields, K.A., Hackstadt, T., 2005. Tyrosine phosphorylation of the chlamydial effector protein Tarp is species specific and not required for recruitment of actin. *Infect. Immun.* 73, 3860-3868.
- Cocchiario, J.L., Valdivia, R.H., 2009. New insights into *Chlamydia* intracellular survival mechanisms. *Cell. Microbiol.* 11, 1571-1578.
- Crosse, B.A., 1990. Psittacosis: A clinical review. *J. Infect.* 21, 251-259.
- Cruz-Fisher, M.I., Cheng, C., Sun, G., Pal, S., Teng, A., Molina, D.M., Kayala, M.A., Vigil, A., Baldi, P., Felgner, P.L., Liang, X., de la Maza, L.M., 2011. Identification of immunodominant antigens by probing a whole *Chlamydia trachomatis* open reading frame proteome microarray using sera from immunized mice. *Infect. Immun.* 79, 246-257.
- Cunha, B.A., 2006. The atypical pneumonias: clinical diagnosis and importance. *Clin. Microbiol. Infect.* 12 Suppl. 3, 12-24.
- D'Autréaux, B., Toledano, M.B., 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 813-824.
- Dautry-Varsat, A., Subtil, A., Hackstadt, T., 2005. Recent insights into the mechanisms of *Chlamydia* entry. *Cell. Microbiol.* 7, 1714-1722.
- Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., Chen, J., 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 317-364.
- Deaconescu, A.M., Chambers, A.L., Smith, A.J., Nickels, B.E., Hochschild, A., Savery, N.J., Darst, S.A., 2006. Structural basis for bacterial transcription-coupled DNA repair. *Cell* 124, 507-520.
- Deb, D.K., Dahiya, P., Srivastava, K.K., Srivastava, R., Srivastava, B.S., 2002. Selective identification of new therapeutic targets of *Mycobacterium tuberculosis* by IVIAT approach. *Tuberculosis (Edinb)*. 82, 175-182.
- de Crécy-Lagard, V., El Yacoubi, B., de la Garza, R.D., Noiriél, A., Hanson, A.D., 2007. Comparative genomics of bacterial and plant folate synthesis and salvage: predictions and validations. *BMC Genomics* 8, 245.
- Dehoux, P., Flores, R., Dauga, C., Zhong, G., Subtil, A., 2011. Multi-genome identification and characterization of chlamydiae-specific type III secretion substrates: the Inc proteins. *BMC Genomics* 12, 109.
- Delevoeye, C., Nilges, M., Dehoux, P., Paumet, F., Perrinet, S., Dautry-Varsat, A., Subtil, A., 2008. SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium. *PLoS Pathog.* 4, e1000022.
- Derré, I., Pypaert, M., Dautry-Varsat, A., Agaisse, H., 2007. RNAi screen in *Drosophila* cells reveals the involvement of the Tom complex in *Chlamydia* infection. *PLoS Pathog.* 3, e155.
- Dessus-Babus, S., Darville, T.L., Cuozzo, F.P., Wyrick, P.B., 2002. Differences in innate immune responses (in vitro) to HeLa cells infected with nondisseminating serovar E and disseminating serovar L2 of *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 70, 3234-3248.

- Detmers, F.J.M., Lanfermeijer, F.C., Poolman, B., 2001. Peptides and ATP binding cassette peptide transporters. *Res. Microbiol.* 152, 245-258.
- Dong, F., Zhong, Y., Arulanandam, B., Zhong, G., 2005. Production of a proteolytically active protein, chlamydial protease/proteasom-like activity factor, by five different *Chlamydia* species. *Infect. Immun.* 73, 186-1872.
- Dumrese, C., Maurus, C.F., Gygi, D., Schneider, M.K., Walch, M., Groscurth, P., Ziegler, U., 2005. *Chlamydia pneumoniae* induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *BMC Microbiol.* 5, 2.
- Dutow, P., Fehlhaber, B., Bode, J., Laudeley, R., Rheinheimer, C., Glage, S., Wetsel, R.A., Pabst, O., Klos, A., 2014. The complement C3a receptor is critical in defense against *Chlamydia psittaci* in mouse lung infection and required for antibody and optimal T cell response. *J. Infect. Dis.* 209, 1269-1278.
- Eissenberg, L.G., Wyrick, P.B., Davis, C.H., Rump, J.W., 1983. *Chlamydia psittaci* elementary body envelopes: ingestion and inhibition of phagolysosome fusion. *Infect. Immun.* 40, 741-751.
- Ellis, K.E., Clough, B., Saldanha, J.W., Wilson, R.J., 2001. Nifs and Sufs in malaria. *Mol. Microbiol.* 41, 973-981.
- Elwell, C.A., Jiang, S., Kim, J.H., Lee, A., Wittmann, T., Hanada, K., Melancon, P., Engel, J.N., 2011. *Chlamydia trachomatis* coopts GBF1 and CERT to acquire host sphingomyelin for distinct roles during intracellular development. *PLoS Pathog.* 7, e1002198.
- Engström, P., Nguyen, B.D., Normark, J., Nilsson, I., Bastidas, R.J., Gylfe, A., Elofsson, M., Fields, K.A., Valdivia, R.H., Watz, H.W., Bergström, S., 2013. Mutations in *hemG* mediate resistance to salicylidene acylhydrazides, demonstrating a novel link between protoporphyrinogen oxidase (HemG) and *Chlamydia trachomatis* infectivity. *J. Bacteriol.* 195, 4221-4230.
- Eposito, D., Scocca, J.J., 1997. The integrase family of tyrosine recombinases: evolution of a conserved active site domain. *Nucleic Acids Res.* 25, 3605-3614.
- Essig, A., Simnacher, U., Susa, M., Marre, R., 1999. Analysis of the humoral immune response to *Chlamydia pneumoniae* by immunoblotting and immunoprecipitation. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 819-825.
- Everett, K.D., Bush, R.M., Andersen A.A., 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 415-440.
- Everett, K.D., Hatch, T.P., 1991. Architecture of the cell envelope of *Chlamydia psittaci* 6BC. *J. Bacteriol.* 177, 877-882.
- Fadel, S., Eley, A., 2007. *Chlamydia trachomatis* OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin. *J. Med. Microbiol.* 56, 15-22.
- Fan, H., Brunham, R.C., McClarty, G., 1992. Acquisition and synthesis of folates by obligate intracellular bacteria of the genus *Chlamydia*. *J. Clin. Invest.* 90, 1803-1811.
- Fan, T., Lu, H., Hu, H., Shi, L., McClarty, G.A., Nance, D.M., Greenberg, A.H., Zhong, G., 1998. Inhibition of apoptosis in *Chlamydia*-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J. Exp. Med.* 16, 487-496.
- Fiegl, D., Kägebein, D., Liebler-Tenorio, E.M., Weisser, T., Sens, M., Gutjahr, M., Knittler, M.R., 2013. Amphisomal route of MHC class I cross-presentation in bacteria-infected dendritic cells. *J. Immunol.* 190, 2791-2806.

- Fields, K.A., Hackstadt, T., 2002. The chlamydial inclusion: escape from the endocytotic pathway. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 18, 221-245.
- Finlay, B.B., Cossart, P., 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276, 718-725.
- Findlay, H.E., McClafferty, H., Ashley, R.H., 2005. Surface expression, single-channel analysis and membrane topology of recombinant *Chlamydia trachomatis* Major Outer Membrane Protein. *BMC Microbiol.* 5,5.
- Fischer, S.F., Schwarz, C., Vier, J., Häcker, G., 2001. Characterization of antiapoptotic activities of *Chlamydia pneumoniae* in human cells. *Infect. Immun.* 69, 7121-7129.
- Fitch, W.M., Peterson, E.M., de la Maza, L.M., 1993. Phylogenetic analysis of the outer-membrane-protein genes of *Chlamydiae*, and its implication for vaccine development. *Mol. Biol. Evol.* 10, 892-913.
- Follmann, F., Olsen, A.W., Jensen, K.T., Hansen, P.R., Andersen, P., Theisen, M., 2008. Antigenic profiling of a *Chlamydia trachomatis* gene-expression library. *J. Infect. Dis.* 197, 897-905.
- Fong, I.W., 2002. Infections and their role in atherosclerotic vascular disease. *J. Am. Dent. Assoc.* 133 Suppl: 7S-13S.
- Forsbach-Birk, V., Foddis, C., Simnacher, U., Wilkat, M., Longbottom, D., Walder, G., Benesch, C., Ganter, M., Sachse, K., Essig, A., 2013. Profiling antibody responses to infections by *Chlamydia abortus* enables identification of potential virulence factors and candidates for serodiagnosis. *PLoS ONE* 8, e80310.
- Forsbach-Birk, V., Simnacher, U., Pfrepper, K.I., Soutschek, E., Kiselev, A.O., Lampe, M.F., Meyer, T., Straube, E., Essig, A., 2010. Identification and evaluation of a combination of chlamydial antigens to support the diagnosis of severe and invasive *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1237-1244.
- Frazzon, J., Dean, D.R., 2003. Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: An emerging field in bioinorganic chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 166-173.
- Fu, Y., Baumann, M., Kosma, P., Brade, L., Brade, H., 1992. A synthetic glycoconjugate representing the genus-specific epitope of chlamydial lipopolysaccharide exhibits the same specificity as its natural counterpart. *Infect. Immun.* 60, 1314-1321.
- Gabel, B.R., Elwell, C., van Ijzendoorn, S.C., Engel, J.N., 2004. Lipid raft-mediated entry is not required for *Chlamydia trachomatis* infection of cultured epithelial cells. *Infect. Immun.* 72, 7367-7373.
- Garmory, H.S., Titball, R.W., 2004. ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. *Infect. Immun.* 72, 6757-6763.
- Goellner, S., Schubert, E., Liebler-Tenorio, E., Hotzel, H., Saluz, H.P., Sachse, K., 2006. Transcriptional response patterns of *Chlamydophila psittaci* in different *in vitro* models of persistent infection. *Infect. Immun.* 74, 4801-4808.
- Gold, E.S., Simmons, R.M., Peterson, T.W., Campbell, L.A., Kuo, C.C., Aderem, A., 2004. Amphiphysin II is required for survival of *Chlamydia pneumoniae* in macrophages. *J. Exp. Med.* 200, 581-586.
- Gomes, J.P., Nunes, A., Bruno, W.J., Borrego, M.J., Florindo, C., Dean, D., 2006. Polymorphisms in the nine polymorphic membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* across all serovars: evidence for serovar Da recombination and correlation with tissue tropism. *J. Bacteriol.* 188, 275-286.

- Gong, S., Yang, Z., Lei, L., Shen, L., Zhong, G., 2013. Characterization of *Chlamydia trachomatis* plasmid-encoded open reading frames. J. Bacteriol. 195, 3819-3826.
- Grieshaber, N.A., Fischer, E.R., Mead, D.J., Dooley, C.A., Hackstadt, T., 2004. Chlamydial histone-DNA interactions are disrupted by a metabolite in the methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 7451-7456.
- Grimwood, J., Stephens, R.S., 1999. Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. Microb. Comp. Genomics 4, 187-201.
- Gu, H., Zhu, H., Lu, C., 2009. Use of *in vivo*-induced antigen technology (IVIAT) for the identification of *Streptococcus suis* serotype 2 *in vivo*-induced bacterial protein antigens. BMC Microbiol. 9, 201.
- Gupta, A., Kapil, R., Dhakan, D.B., Sharma, V.K., 2014. MP3: a software tool for the prediction of pathogenic proteins in genomic and metagenomic data. PLoS ONE 9, e93907.
- Gutiérrez-Martin, C.B., Ojcius, D.M., Hsia, R., Hellio, R., Bavoil, P.M., Dautry-Varsat, A., 1997. Heparin-mediated inhibition of *Chlamydia psittaci* adherence to HeLa cells. Microb. Pathog. 22, 47-57.
- Hackstadt, T., Rockey, D.D., Heinzen, R.A., Scidmore, M.A., 1996. *Chlamydia trachomatis* interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. EMBO J. 15, 964-977.
- Hackstadt, T., Todd, W.J., Caldwell, H.D., 1985. Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae? J. Bacteriol. 161, 25-31.
- Halberstädter, L., von Prowazek, S., 1907. Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom. Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, Berlin. 26, 44-47.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557-580.
- Hang, L., John, M., Asaduzzaman, M., Bridges, E.A., Vanderspurt, C., Kirn, T.J., Taylor, R.K., Hillmann, J.D., Progulsk-Fox, A., Handfield, M., Ryan, E.T., 2003. Use of *in vivo*-induced antigen technology (IVIAT) to identify genes uniquely expressed during human infection with *Vibrio cholerae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 8508-8513.
- Harkinezhad, T., Greens, T., Vanrompay, D., 2009. *Chlamydophila psittaci* infections in birds: A review with emphasis on zoonotic consequences. Vet. Microbiol. 135, 86-77.
- Harris, J.B., Baresch-Bernal, A., Rollins, S.M., Alam, A., LaRocque, R.C., Bikowski, M., Peppercorn, A.F., Handfield, M., Hillman, J.D., Qadri, F., Calderwood, S.B., Hohmann, E., Breiman, R.F., Brooks, W.A., Ryan, E.T., 2006. Identification of *in vivo*-induced bacterial protein antigens during human infection with *Salmonella enterica* serovar Typhi. Infect. Immun. 74, 5161-5168.
- Härtel, T., Klein, M., Koedel, U., Rohde, M., Petruschka, L., Hammerschmidt, S., 2011. Impact of glutamine transporters on pneumococcal fitness under infection-related conditions. Infect. Immun. 79, 44-58.
- Hartman, P.G., 1993. Molecular aspects and mechanism of action of dihydrofolate reductase inhibitors. J. Chemother. 5, 369-376.
- Hatch, T.P., Allan, I., Pearce, J.H., 1984. Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of *Chlamydia* spp. J. Bacteriol. 157, 13-20.

- Heine, H., Müller-Loennies, S., Brade, L., Lindner, B., Brade, H., 2003. Endotoxic activity and chemical structure of lipopolysaccharides from *Chlamydia trachomatis* serotypes E and L₂ and *Chlamydophila psittaci* 6BC. Eur. J. Biochem. 270, 440-450.
- Heinemann, I.U., Jahn, M., Jahn, D., 2008. The biochemistry of heme biosynthesis. Arch. Biochem. Biophys. 474, 238-251.
- Henderson, I.R., Lam, A.C., 2001. Polymorphic proteins of *Chlamydia* spp. - autotransporters beyond the Proteobacteria. Trends Microbiol. 9, 573-578.
- Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E., Holden, D.W., 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. Science 269, 400-403.
- Heuer, D., Rejman Lipinski, A., Machuy, N., Karlas, A., Wehrens, A., Siedler, F., Brinkmann, V., Meyer, T.F., 2009. *Chlamydia* causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction. Nature 457, 731-735.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Waston, R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (N. Y.) 11, 1026-1030.
- Hiles, I.D., Higgins, C.F., 1986. Peptide uptake by *Salmonella typhimurium*. Eur. J. Biochem. 158, 561-567.
- Hogan, R.J., Mathews, S.A., Mukhopadhyay, S., Summersgill, J.T., Timms, P., 2004. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. Infect. Immun. 72, 1843-1855.
- Holland, I.B., Blight, M.A., 1999. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. J. Mol. Biol. 293, 381-399.
- Horino, A., Sasaki, Y., Sasaki, T., Keni, T., 2008. Multiple promoter inversions generate surface antigenic variation in *Mycoplasma penetrans*. J. Bacteriol. 185, 231-242.
- Hosie, A.H., Poole, P.S., 2001. Bacterial ABC transporters of amino acids. Res. Microbiol. 152, 259-270.
- Huet, G., Daffé, M., Saves, I., 2005. Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* SUF machinery as the exclusive mycobacterial system of [Fe-S] cluster assembly: evidence for its implication in the pathogen's survival. J. Bacteriol. 187, 6137-6146.
- Hutagalung, A.H., Novick, P.J., 2011. Role of GTPases in membrane traffic and cell physiology. Physiol. Rev. 91, 119-149.
- Hybiske, K., Stephens, R.S., 2007. Mechanisms of *Chlamydia trachomatis* entry into nonphagocytic cells. Inf. Immun. 75, 3925-3934.
- Igietseme, J.U., 1996. Molecular mechanism of T-cell control of Chlamydia in mice: role of nitric oxide. Immunology 87, 1-5.
- Iijima, Y., Miyashita, N., Kishimoto, T., Kanamoto, Y., Soejima, R., Matsumoto, A., 1994. Characterization of *Chlamydia pneumoniae* species-specific proteins immunodominant in humans. J. Clin. Microbiol. 32, 583-588.
- Ilardi, J.M., Mochida, S., Sheng, Z.H., 1999. Snapin: a SNARE-associated protein implicated in synaptic transmission. Nat. Neurosci. 2, 119-124.
- Jacob, F., Brenner, S., Cuzin, F., 1963. On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 28, 329-348.

- Jaeger, J., Liebler-Tenorio, E., Kirschvink, N., Sachse, K., Reinhold, P., 2007. A clinically silent respiratory infection with *Chlamydophila* spp. in calves is associated with airway obstruction and pulmonary inflammation. *Vet. Res.* 38, 711-728.
- Jewett, T.J., Fisher, E.R., Mead, D.J., Hackstadt, T. 2006. Chlamydial TARP is a bacterial nucleator of actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15599-15604.
- Jewett, T.J., Miller, N.J., Dooley, C.A., Hackstadt, T., 2010. The conserved Tarp actin binding domain is important for chlamydial invasion. *PLoS Pathog.* 6, e1000997.
- John, M., Kudva, I.T., Griffin, R.W., Dodson, A.W., McManus, B., Krastins, B., Sarracino, D., Progulsk-Fox, A., Hillman, J.D., Handfield, M., Tarr, P.I., Calderwood, S.B., 2005. Use of in vivo-induced antigen technology for identification of *Escherichia coli* O157:H7 proteins expressed during human infection. *Infect. Immun.* 73, 2665-2679.
- Jutras, I., Abrami, L., Dautry-Varsat, A., 2003. Entry of the lymphogranuloma venereum strain of *Chlamydia trachomatis* into host cells involves cholesterol-rich membrane domains. *Infect. Immun.* 71, 260-266.
- Kägebein, D., Gutjahr, M., Grosse, C., Vogel, A.B., Rodel, J., Knittler, M.R., 2014. *Chlamydia*-infected epithelial cells and fibroblasts retain the ability to express surface-presented MHC class I molecules. *Infect. Immun.* 82, 993-1006.
- Kaletka, E.F., Taday, E.M., 2003. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol.* 32, 435-461.
- Kaltenboeck, B., Heard, D., DeGraves, F.J., Schmeer, N., 1997. Use of synthetic antigens improves detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies against abortigenic *Chlamydia psittaci* in ruminants. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2293-2298.
- Kaltenboeck, B., Kousoulas, K.G., Storz, J., 1991. Detection and strain differentiation of *Chlamydia psittaci* mediated by a two-step polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29, 1969-1975.
- Kari, L., Bakios, L.E., Goheen, M.M., Bess, L.N., Watkins, H.S., Southern, T.R., Song, L., Whitmire, W.M., Olivares-Zavaleta, N., Caldwell, H.D., 2013. Antibody signature of spontaneous clearance of *Chlamydia trachomatis* ocular infection and partial resistance against re-challenge in a nonhuman primate trachoma model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2248.
- Kari, L., Whitmire, W.M., Crane, D.D., Reveneau, N., Carlson, J.H., Goheen, M.M., Peterson, E.M., Pal, S., de la Maza, L.M., Caldwell, H.D., 2009. *Chlamydia trachomatis* native outer membrane protein induces partial protection in nonhuman primates: implication for a trachoma transmission-blocking vaccine. *J. Immunol.* 182, 8063-8070.
- Kauffold, J., Henning, K., Bachmann, R., Hotzel, H., Melzer, F., 2007. The prevalence of chlamydiae in bulls from six bull studs in Germany. *Anim. Reprod. Sci.* 102, 111-121.
- Kemmerling, K., Müller, U., Mielenz, M., Sauerwein, H., 2009. *Chlamydophila* species in dairy farms: polymerase chain reaction prevalence, disease association, and risk factors identified in a cross-sectional study in western Germany. *J. Dairy Sci.* 92, 4347-4354.
- Kertesz, M.A., 1999. Riding the sulfur cycle - metabolism of sulfonates and sulfate esters in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 135-175.
- Kim, Y.R., Lee, S.E., Kim, C.M., Kim, S.Y., Shin, E.K., Shin, D.H., Chung, S.S., Choy, H.E., Progulsk-Fox, A., Hillman, J.D., Handfield, M., Rhee, J.H., 2003. Characterization and pathogenic significance of *Vibrio vulnificus* antigens preferentially expressed in septicemic patients. *Infect. Immun.* 71, 5461-5471.

- Kima, P.E., Bonilla, J.A., Cho, E., Ndjamen, B., Canton, J., Leal, N., Handfield, M., 2010. Identification of *Leishmania* proteins preferentially released in infected cells using change mediated antigen technology (CMAT). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e842.
- Kloosterman, T.G., Hendriksen, W.T., Bijlsma, J.J., Bootsma, H.J., van Hijum, S.A., Kok, J., Hermans, P.W., Kuipers, O.P., 2006. Regulation of glutamine and glutamate metabolism by GlnR and GlnA in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 281, 25097-25109.
- Klos, A., Thalmann, J., Peters, J., Gérard, H.C., Hudson, A.P., 2009. The transcript profile of persistent *Chlamydia (Chlamydia) pneumoniae in vitro* depends on the means by which persistence is induced. *FEMS Microbiol. Lett.* 291, 120-126.
- Knittler, M.R., Berndt, A., Böcker, S., Dutow, P., Hänel, F., Heuer, D., Kägebein, D., Klos, A., Koch, S., Liebler-Tenorio, E., Ostermann, C., Reinhold, P., Saluz, H.P., Schöfl, G., Sehnert, P., Sachse, K., 2014. *Chlamydia psittaci*: New insights into genomic diversity, clinical pathology, host-pathogen interaction and anti-bacterial immunity. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 877-893 .
- Koháryová, M., Kolárová, M., 2008. Oxidative stress and thioredoxin system. *Gen. Physiol. Biophys.* 27, 71-84.
- Kokab, A., Jennings, R., Eley, A., Pacey, A.A., Cross, N.A., 2010. Analysis of modulated gene expression in a model of Interferon-gamma-induced persistence of *Chlamydia trachomatis* in HEp-2 cells. *Microb. Pathog.* 49, 217-225.
- Krieg, N.R., Staley, J.T., Brown, D.R., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Ward, N.L., Ludwig, W., Whitman, W.B., eds, 2011. *Bergey's manual of systematic bacteriology, second ed., Vol. four, The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes.* Springer Verlag.
- Kumar, Y., Cocchiario, J., Valdivia, R.H., 2006. The obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* targets host lipid droplets. *Curr. Biol.* 16, 1646-1651.
- Kumar, M., Khan, F.G., Sharma, S., Kumar, R., Faujdar, J., Sharma, R., Chauhan, D.S., Singh, R., Magotra, S.K., Khan, I.A., 2011. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* genes preferentially expressed during human infection. *Microb. Pathog.* 50, 31-38.
- Kuo, C.C., Stephens, R.S., Bavoil, P.M., Kaltenboeck, B., 2011. Genus I. *Chlamydia* Jones, Rake and Stearns 1945, 55. In: Krieg, N.R., Staley, J.T., Brown, D.R., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Ward, N.L., Ludwig, W., Whitman, W.B., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology, second ed., Vol. four.* New York, Springer Verlag, 846-865.
- Lad, S.P., Li, J., da Silva Correia, J., Pan, Q., Gadwal, S., Ulevitch, R.J., Li, E., 2007b. Cleavage of p65/RelA of the NF- κ B pathway by *Chlamydia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 2933-2938.
- Lad, S.P., Yang, G., Scott, D.A., Wang, G., Nair, P., Mathison, J., Reddy, V.S., Li, E., 2007a. Chlamydial CT441 is a PDZ domain-containing tail-specific protease that interferes with the NF- κ B pathway of immune-response. *J. Bacteriol.* 189, 6619-6625.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lane, B.J., Mutchler, C., Al Khodor, S., Grieshaber, S.S., Carabeo, R.A., 2008. Chlamydial entry involves TARP binding of nucleotide exchange factors. *PLoS Pathog.* 4, e1000014.

- Layer, G., Reichelt, J., Jahn, D., Heinz, D.W., 2010. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Sci.* 19, 1137-1161.
- Le Negrate, G., Krieg, A., Faustin, B., Loeffler, M., Godzik, A., Krajewski, S., Reed, C., 2008. *ChlA*Dub1 of *Chlamydia trachomatis* suppresses NF- κ B activation and inhibits I κ B α ubiquitination and degradation. *Cell. Microbiol.* 10, 1879-1892.
- Liu, X., Afrane, M., Clemmer, D.E., Zhong, G., Nelson, D.E., 2010. Identification of *Chlamydia trachomatis* outer membrane complex proteins by differential proteomics. *J. Bacteriol.* 192, 2852-2860.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lohman, T.M., Bjornson, K.P., 1996. Mechanism of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 169-214.
- Longbottom, D., Coulter, L.J., 2003. Avian chlamydiosis and zoonotic implications. *J. Comp. Path.* 128, 217-244.
- Lowry, J.E., Goodridge, L., Vernati, G., Fluegel, A.M., Edwards, W.H., Andrews, G.P., 2010. Identification of *Brucella abortus* genes in elk (*Cervus elaphus*) using in vivo-induced antigen technology (IVIAT) reveals novel markers of infection. *Vet. Microbiol.* 142, 367-372.
- Mahan, M.J., Slauch, J.M., Mekalanos, J.J., 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissue. *Science* 259, 686-688.
- Manor, E., Sarov, I., 1986. Fate of *Chlamydia trachomatis* in human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* 54, 90-95.
- Matsumoto, A., Bessho, H., Uehira, K., Suda, T., 1991. Morphological studies of the association of mitochondria with chlamydial inclusions and the fusion of chlamydial inclusions. *J. Electron. Microsc.* (Tokyo) 40, 356-363.
- Menzio, F.D., Pethe, K., Bifani, P., Soncin, F., Brennan, M.J., Loch, C., 2002. Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans. *Mol. Microbiol.* 43, 1379-1386.
- Mestas, J., Hugges, C.C., 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* 172, 2731-2738.
- Misaghi, S., Balsara, Z.R., Catic, A., Spooner, E., Ploegh, H.L., Starnbach, M.N., 2006. *Chlamydia trachomatis*-derived deubiquitinating enzymes in mammalian cells during infection. *Mol. Microbiol.* 61, 142-150.
- Missall, T.A., Lodge, J.K., 2005. Function of the thioredoxin proteins in *Cryptococcus neoformans* during stress or virulence and regulation by putative transcriptional modulators. *Mol. Microbiol.* 57, 847-858.
- Mital, J., Miller, N.J., Dorward, D.W., Dooley, C.A., Hackstadt, T., 2013. Role for chlamydial inclusion membrane proteins in inclusion membrane structure and biogenesis. *PLoS ONE* 8, e63426.
- Miyari, I., Byrne, G.I., 2006. *Chlamydia* and programmed cell death. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 102-208.
- Miyari, I., Laxton, J.D., Wang, X., Obert, C.A., Arva Tatireddigari, V.R., van Rooijen, N., Hatch, T.P., Byrne, G.I., 2011. *Chlamydia psittaci* genetic variants differ in virulence by modulation of host immunity. *J. Infect. Dis.* 204, 654-663.
- Moazed, T.C., Kuo, C.C., Grayston, J.T., Campbell, L.A., 1998. Evidence of systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* via macrophages in the mouse. *J. Infect. Dis.* 177, 1322-1325.

- Mölleken, K., Schmidt, E., Hegemann, J.H., 2010. Members of the Pmp family of *Chlamydia pneumoniae* mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs. *Mol. Microbiol.* 78, 1004-1017.
- Moulder, J.W., 1966. The relation of the psittacosis group (Chlamydiae) to bacteria and viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 20, 107-130.
- Müller-Loennies, S., Gronow, S., Brade, L., MacKenzie, R., Kosma, P., Brade, H., 2006. A monoclonal antibody against a carbohydrate epitope in lipopolysaccharide differentiates *Chlamydophila psittaci* from *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila pneumoniae*, and *Chlamydia trachomatis*. *Glycobiology.* 16, 184-196.
- Murata, M., Azuma, Y., Miura, K., Rahman, M.A., Matsutani, M., Aoyama, M., Suzuki, H., Sugi, K., Shirai, M., 2007. Chlamydial SET domain protein functions as a histone methyltransferase. *Microbiology* 153, 585-592.
- Murdin, A.D., Su, H., Manning, D.S., Klein, M.H., Parnell, M.J., Caldwell, H.D., 1993. A poliovirus hybrid expressing a neutralization epitope from the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* is highly immunogenic. *Infect. Immun.* 61, 4406-4414.
- Nachin, L., Loiseau, L., Expert, D., Barras, F., 2003. SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. *EMBO J.* 22, 427-437.
- Negrea, A., Bjur, E., Puiac, S., Ygberg, S.E., Aslund, F., Rhen, M., 2009. Thioredoxin 1 participates in the activity of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 2 type III secretion system. *J. Bacteriol.* 191, 6918-6927.
- Nguyen, B.D., Cunningham, D., Liang, X., Chen, X., Toone, E.J., Raetz, C.R., Zhou, P., Valdivia, R.H., 2011. Lipooligosaccharide is required for the generation of infectious elementary bodies in *Chlamydia trachomatis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 10284-10289.
- Nguyen, B.D., Valdivia, R.H., 2012. Virulence determinants in the obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* revealed by forward genetic approaches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 1263-1268.
- Norkin, L.C., Wolfrom, S.A., Stuart, E.S., 2011. Association of caveolin with *Chlamydia trachomatis* inclusions at early and late stages of infection. *Exp. Cell Res.* 266, 229-238.
- Nunes, A., Gomes, J.P., Mead, S., Florindo, C., Correia, H., Borrego, M.J., Dean, D., 2007. Comparative expression profiling of the *Chlamydia trachomatis* pmp Gene family for clinical and reference strains. *PLoS ONE* 2, e878.
- Ojcius, D.M., Degani, H., Mispelster, J., Dautry-Varsat, A., 1998. Enhancement of ATP levels and glucose metabolism during an infection by *Chlamydia*. NMR studies of living cells. *J. Biol. Chem.* 273, 7052-7058.
- Olsen, A.W., Follmann, F., Højrup, P., Leah, R., Sand, C., Andersen, P., Theisen, M., 2007. Identification of human T cell targets recognized during *Chlamydia trachomatis* genital infection. *J. Infect. Dis.* 196, 1546-1552.
- Ostermann, C., Linde, S., Siegling-Vlitakis, C., Reinhold, P., 2014. Evaluation of pulmonary dysfunctions and acid-base imbalances induced by *Chlamydia psittaci* in a bovine model of respiratory infection. *Multidiscip. Respir. Med.* 9, 10.
- Ostermann, C., Rüttger, A., Schubert, E., Schrödl, W., Sachse, K., Reinhold, P., 2013a. Infection, disease, and transmission dynamics in calves after experimental and natural challenge with a bovine *Chlamydia psittaci* isolate. *PLoS ONE* 8, e64066.

- Ostermann, C., Schroedl, W., Schubert, E., Sachse, K., Reinhold, P., 2013b. Dose-dependent effects of *Chlamydia psittaci* infection on pulmonary gas exchange, innate immunity and acute-phase reaction in a bovine respiratory model. *Vet. J.* 196, 351-359.
- Ouellette, S.P., Carabeo, R.A., 2010. A functional slow recycling pathway of transferrin is required for growth of *Chlamydophila pneumoniae*. *Front. Microbiol.* 1, 112.
- Ouellette, S.P., Dorsey, F.C., Moshich, S., Cleveland, J.L., Carabeo, R.A., 2011. *Chlamydia* species-dependent differences in the growth requirements for lysosomes. *PLoS ONE* 6, e16783.
- Outten, F.W., Djaman, O., Storz, G., 2004. A *suf* operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 52, 861-872.
- Outten, F.W., Wood, M.J., Muñoz, F.M., Storz, G., 2003. The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 278, 45713-45719.
- Page, L.A., 1966. Revision of the family *Chlamydiaceae* Rake (*Rickettsiales*): unification of the psittacosis-lymphogranuloma venerum-trachoma group of organisms in the genus *Chlamydia* Jones, Rake and Stearns, 1945. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16, 223-252.
- Page, L.A., 1968. Proposal for the recognition of the two species in the genus *Chlamydia* Jones, Rake, and Stearns, 1945. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 18, 51-66.
- Pandeli, V., Ernest, D., 2006. A case of fulminant psittacosis. *Crit. Care Resusc.* 8,40-42.
- Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J., Sachse, K., 2009a. Detection of all *Chlamydophila* and *Chlamydia* spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assay. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 473-484.
- Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J., Sachse, K., 2009b. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. *Vet. J.* 181, 145-150.
- Paumet, F., Wesolowski, J., Garcia-Diaz, A., Delevoye, C., Aulner, N., Shuman, H.A., Subtil, A., 2009. Intracellular bacteria encode inhibitory SNARE-like proteins. *PLoS ONE* 4, e7375.
- Pennini, M.E., Perrinet, S., Dautry-Varsat, A., Subtil, A., 2010. Histone methylation by NUE, a novel nuclear effector of the intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis*. *PLoS Pathog.* 6, e1000995.
- Perez-Martinez, J.A., Schmeer, N., Storz, J., 1986. Bovine chlamydial abortion: serodiagnosis by modified complement-fixation and indirect inclusion fluorescence tests and enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 47, 1501-1506.
- Perfettini, J.L., Reed, J.C., Israël, N., Martinou, J.C., Dautry-Varsat, A., Ojcius, D.M., 2002. Role of Bcl-2 family members in caspase-independent apoptosis during *Chlamydia* infection. *Infect. Immun.* 70, 55-61.
- Peterson, E.M., Cheng, X., Markoff, B.A., Fielder, T.J., de la Maza, L.M., 1991. Functional and structural mapping of *Chlamydia trachomatis* species-specific major outer membrane protein epitopes by use of neutralizing monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 59, 4147-4153.
- Petrovay, F., Balla, E., 2008. Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydophila psittaci*. *J. Med. Microbiol.* 57, 1296-1298.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.

- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36.
- Pirbhai, M., Dong, F., Zhong, Y., Pan, K.Z., Zhong, G., 2006. The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *J. Biol. Chem.* 281, 31495-31501.
- Poudel, A., Elsasser, T.H., Rahman, Kh.S., Chowdhury, E.U., Kaltenboeck, B., 2012. Asymptomatic endemic *Chlamydia pecorum* infections reduce growth rates in calves by up to 48 percent. *PLoS ONE* 7, e44961.
- Prebeck, S., Kirschning, C., Dürr, S., da Costa, C., Donath, B., Brand, K., Redecke, V., Wagner, H., Miethke, T., 2001. Predominant role of toll-like receptor 2 versus 4 in *Chlamydia pneumoniae*-induced activation of dendritic cells. *J. Immunol.* 167, 3316-3323.
- Prusty, B.K., Böhme, L., Bergmann, B., Siegl, C., Krause, E., Mehlitz, A., Rudel, T., 2012. Imbalanced oxidative stress causes chlamydial persistence during non-productive human herpes virus co-infection. *PLoS ONE* 7, e47427.
- Punta, M., Coggill, P.C., Eberhardt, R.Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K., Ceric, G., Clements, J., Heger, A., Holm, L., Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R., Bateman, A., Finn, R.D., 2011. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 40, D290-301.
- Ramachandran, N., Hainsworth, E., Bhullar, B., Eisenstein, S., Rosen, B., Lau, A.Y., Walter, J.C., LaBaer, J., 2004. *Science* 305, 86-90.
- Ramachandran, N., Raphael, J.V., Hainsworth, E., Demirkan, G., Fuentes, M.G., Rolfs, A., Hu, Y., LaBaer, J., 2008. Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays. *Nat. Methods* 5, 535-538.
- Ramond, E., Gesbert, G., Rigard, M., Dairou, J., Dupuis, M., Dubail, I., Meibom, K., Henry, T., Bareil, M., Charbit, A., 2014. Glutamate utilization couples oxidative stress defense and the tricarboxylic acid cycle in *Francisella* phagosomal escape. *PLoS Pathog.* 10, e1003893.
- Rasmussen, S.J., Eckmann, L., Quayle, A.J., Shen, L., Zhang, Y.X., Anderson, D.J., Frierer, J., Stephens, R.S., Kagnoff, M.F., 1997. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 99, 77-87.
- Reinhold, P., 1997. Grundlagen und Besonderheiten der Lungenfunktion beim Rind. *Tierärztliche Umschau* 52, 584-592.
- Reinhold, P., Jaeger, J., Liebler-Tenorio, E., Berndt, A., Bachmann, R., Schubert, E., Melzer, F., Elschner, M., Sachse, K., 2008. Impact of latent infections with *Chlamydophila* species in young cattle. *Vet. J.* 175, 202-211.
- Reinhold, P., Ostermann, C., Liebler-Tenorio, E., Berndt, A., Vogel, A., Lambertz, J., Rothe, M., Rüttger, A., Schubert, E., Sachse, K., 2012. A bovine model of respiratory *Chlamydia psittaci* infection: challenge dose titration. *PLoS ONE* 7, e30125.
- Reinhold, P., Sachse, K., Kaltenboeck, B., 2011. *Chlamydiaceae* in cattle: commensals, trigger organisms, or pathogens? *Vet. J.* 189, 257-267.

- Rejman Lipinski, A., Heymann, J., Meissner, C., Karlas, A., Brinkmann, V., Meyer, T.F., Heuer, D., 2009. Rab6 and Rab 11 regulate *Chlamydia trachomatis* development and golgin-84-dependent Golgi fragmentation. *PLoS Pathog.* 5, e1000615.
- Roan, N.R., Starnbach, M.N., 2008. Immune-mediated control of *Chlamydia* infection. *Cell. Microbiol.* 10, 9-19.
- Rocha, E.R., Tzianabos, A.O., Smith, C.J., 2007. Thioredoxin reductase is essential for thiol/disulfide redox control and oxidative stress survival of the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* 189, 8015-8023.
- Rockey, D.D., Chesebro, B.B., Heinzen, R.A., Hackstadt, T., 1996a. A 28 kDa major immunogen of *Chlamydia psittaci* shares identity with Mip proteins of *Legionella* spp. and *Chlamydia trachomatis* - cloning and characterization of the *C. psittaci* mip-like gene. *Microbiology* 142, 945-953.
- Rockey, D.D., Fischer, E.R., Hackstadt, T., 1996b. Temporal analysis of the developing *Chlamydia psittaci* inclusion by use of fluorescence and electron microscopy. *Infect. Immun.* 64, 4269-4278.
- Rockey, D.D., Grosenbach, D., Hruby, D.E., Peacock, M.G., Heinzen, R.A., Hackstadt, T., 1997. *Chlamydia psittaci* IncA is phosphorylated by the host cell and is exposed on the cytoplasmic face of the developing inclusion. *Mol. Microbiol.* 24, 217-228.
- Rockey, D.D., Heinzen, R.A., Hackstadt, T., 1995. Cloning and characterization of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. *Mol. Microbiol.* 15, 617-626.
- Rockey, D.D., Lenart, J., Stephens, R.S., 2000. Genome sequencing and our understanding of chlamydiae. *Infect. Immun.* 68, 5473-5479.
- Rockey, D.D., Viratyosin, W., Bannantine, J.P., Suchland, R.J., Stamm, W.E., 2002. Diversity within inc genes of clinical *Chlamydia trachomatis* variant isolates that occupy non-fusogenic inclusions. *Microbiology* 148, 2497-2505.
- Rödel, J., Große, C., Yu, H., Wolf, K., Otto, G.P., Liebler-Tenorio, E., Forsbach-Birk, V., Straube, E., 2012. Persistent *Chlamydia trachomatis* infection of HeLa cells mediates apoptosis resistance through a *Chlamydia* protease-like activity factor-independent mechanism and induces high mobility group box 1 release. *Infect. Immun.* 80, 195-205.
- Rohmer, L., Hocquet, D., Miller, S.I., 2011. Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis. *Trends Microbiol.* 19, 341-348.
- Rollins, S.M., Peppercorn, A., Hang, L., Hillman, J.D., Calderwood, S.B., Handfield, M., Ryan, E.T., 2005. *In vivo* induced antigen technology (IVIAT). *Cell. Microbiol.* 7, 1-9.
- Rollins, S.M., Peppercorn, A., Young, J.S., Drysdale, M., Baresch, A., Bikowski, M.V., Ashford, D.A., Quinn, C.P., Handfield, M., Hillman, J.D., Lyons, R., Koehler, T.M., Calderwood, S.B., Ryan, E.T., 2008. Application of in vivo induced antigen technology (IVIAT) to *Bacillus anthracis*. *PLoS ONE* 3, e1824.
- Ronzzone, E., Paumet, F., 2013. Two coiled-coil domains of *Chlamydia trachomatis* IncA affect membrane fusion events during infection. *PLoS ONE* 8, e69769.
- Rund, S., Lindner, B., Brade, H., Holst, O., 2000. Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Chlamydothrix psittaci* strain 6BC. *Eur. J. Biochem.* 267, 5717-5726.
- Rzomp, K.A., Scholtes, L.D., Briggs, B.J., Whittaker, G.R., Scidmore, M.A., 2003. Rab GTPases are recruited to the chlamydial inclusion in both a species-dependent and species-independent manner. *Infect. Immun.* 71, 5855-5870.

- Sachse, K., Hotzel, H., 2003. Detection and differentiation of Chlamydiae by nested PCR. *Methods Mol. Biol.* 216, 123-136.
- Sachse, K., Hotzel, H., Slickers, P., Ellinger, T., Ehricht, R., 2005. DNA microarray based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila*. *Mol. Cell. Probes* 19, 41-50.
- Sachse, K., Laroucau, K., Hotzel, H., Schubert, E., Ehricht, E., Slickers, P., 2008. Genotyping of *Chlamydophila psittaci* using new DNA microarray assay based on sequence analysis of *ompA* genes. *BMC Microbiol.* 8, 63.
- Sachse, K., Laroucau, K., Riege, K., Wehner, S., Dilcher, M., Creasy, H.H., Weidmann, M., Myers, G., Vorimore, F., Vicari, N., Magnino, S., Liebler-Tenorio, E., Rüttger, A., Bavoil, P.M., Hufert, F.T., Rosselló-Móra, R., Marz, M., 2014. Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 79-88.
- Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A., Longbottom, D., 2009. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Vet. Microbiol.* 135, 2-21.
- Sait, M., Livingstone, M., Clark, E.M., Wheelhouse, N., Spalding, L., Markey, B., Magnino, S., Lainson, F.A., Myers, G.S., Longbottom, D., 2014. Genome sequencing and comparative analysis of three *Chlamydia pecorum* strains associated with different pathogenic outcomes. *BMC Genomics* 15, 23.
- Saka, H.A., Thompson, J.W., Chen, Y.S., Kumar, Y., Dubois, L.G., Moseley, M.A., Valdivia, R.H., 2011. Quantitative proteomics reveals metabolic and pathogenic properties of *Chlamydia trachomatis* developmental forms. *Mol. Microbiol.* 82, 1185-1203.
- Salim, K.Y., Cvitkovitch, D.G., Chang, P., Bast, D.J., Handfield, M., Hillman, J.D., de Azavedo, J.C.S., 2005. Identification of group A *Streptococcus* antigenic determinants upregulated in vivo. *Infect. Immun.* 73, 6026-6038.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schöfl, G., Voigt, A., Litsche, K., Sachse, K., Saluz, H.P., 2011. Complete genome sequences of four mammalian isolates of *Chlamydophila psittaci*. *J. Bacteriol.* 193, 4258.
- Scidmore, M.A., 2011. Recent advances in *Chlamydia* subversion of host cytoskeletal and membrane trafficking pathways. *Microbes Infect.* 13, 527-535.
- Scidmore, M.A., Hackstadt, T., 2001. Mammalian 14-3-3 β associates with the *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane via its interaction with IncG. *Mol. Microbiol.* 39, 1638-1650.
- Selby, C.P., Sancar, A., 1993. Molecular mechanism of transcription-repair coupling. *Science* 260, 53-58.
- Sharma, J., Zhong, Y., Dong, F., Piper, J.M., Wang, G., Zhong, G., 2006. Profiling of human antibody response to *Chlamydia trachomatis* urogenital tract infection using microplates arrayed with 156 chlamydial fusion proteins. *Infect. Immun.* 74, 1490-1499.
- Smith, E.L., Holm, A., 1948. The transfer of immunity to the new-born calf from colostrum. *J. Biol. Chem.* 175, 349-357.
- Smith, C.L., Peterson, C.L., 2005. A conserved Swi/Snf2 ATPase motif couples ATP hydrolysis to chromatin remodeling. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5880-5892.

- Song, L., Carlson, J.H., Whitmire, W.M., Kari, L., Virtaneva, K., Sturdevant, D.E., Watkins, H., Zhou, B., Sturdevant, G.L., Porcella, S.F., McClarty, G., Caldwell, H.D., 2013. *Chlamydia trachomatis* plasmid-encoded Pgp4 is a transcriptional regulator of virulence-associated genes. *Infect. Immun.* 81, 636-644.
- Song, Y.H., Kozarov, E.V., Walters, S.M., Cao, S.L., Handfield, M., Hillman, J.D., Progulske-Fox, A., 2002. Genes of periodontopathogens expressed during human disease. *Ann. Periodontol.* 7, 38-42.
- Springer, P.S., 2000. Gene traps. *Plant cell* 12, 1007-1020.
- Starnbach, M.N., Bevan, M.J., Lampe, M.F., 1994. Protective cytotoxic T lymphocytes are induced during murine infection with *Chlamydia trachomatis*. *J. Immunol.* 153, 5183-5189.
- Steele, L.N., Balsara, Z.R., Starnbach, M.N., 2004. Hematopoietic cells are required to initiate a *Chlamydia trachomatis*-specific CD8⁺ T cell response. *J. Immunol.* 173, 6327-6337.
- Stenner-Liewen, F., Liewen, H., Zapata, J.M., Pawlowski, K., Godzik, A., Reed, J.C., 2002. CADD, a *Chlamydia* protein that interacts with dead receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 9633-9636.
- Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., Koonin, E.V., Davis, R.W., 1998. Genome sequencing of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 282, 754-759.
- Stephens, R.S., Mullenbach, G., Sanchez-Pescador, R., Agabian, N., 1986. Sequence analysis of the major outer membrane protein gene from *Chlamydia trachomatis* serovar L2. *J. Bacteriol.* 168, 1277-1282.
- Stephens, R.S., Sanchez-Pescador, R., Wagar, E.A., Inouye, C., Urdea, M.S., 1987. Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *J. Bacteriol.* 169, 3879-3885.
- Stephens, R.S., 2003. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends Microbiol.* 11, 44-51.
- Stone, C.B., Bulir, D.C., Gilchrist, J.D., Toor, R.K., Mahony, J.B., 2010. Interactions between flagellar and type III secretion proteins in *Chlamydia pneumoniae*. *BMC Microbiol.* 10, 18.
- Stone, C.B., Johnson, D.L., Bulir, D.C., Gilchrist, J.D., Mahony, J.B., 2008. Characterization of the putative type III secretion ATPase CdsN (Cpn0707) of *Chlamydia pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 190, 6580-6588.
- Su, H., Raymond, L., Rockey, D.D., Fisher, E., Hackstadt, T., Caldwell, H.D., 1996. A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11143-11148.
- Su, H., Watkins, N.G., Zhang, Y.X., Caldwell, H.D., 1990. *Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. *Infect. Immun.* 58, 1017-1025.
- Takahashi, Y., Tokumoto, U., 2002. A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J. Biol. Chem.* 277, 28380-28383.
- Tam, R., Saier, M. H., 1993. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57, 320-346.
- Tamura, G.S., Nittayajarn, A., Schoentag, D.L., 2002. A glutamine transport gene, *glnQ*, is required for fibronectin adherence and virulence of group B streptococci. *Infect. Immun.* 70, 2877-2885.
- Tan, C., Hsia, R.C., Shou, H., Carrasco, J.A., Rank, R.G., Bavoil, P.M., 2010. Variable expression of surface-exposed polymorphic membrane proteins in *in vitro* grown *Chlamydia trachomatis*. *Cell. Microbiol.* 12, 174-187.

- Tan, C., Hsia, R., Shou, H., Haggerty, C.L., Ness, R.B., Gaydos, C.A., Dean, D., Scurlock, A.M., Bavoil, P.M., 2009. *Chlamydia trachomatis*-infected patients display variable antibody profiles against the nine-member polymorphic membrane protein family. *Infect. Immun.* 77, 3218-3226.
- Taylor, B.D., Darville, T., Tan, C., Bavoil, P., Ness, R.B., Haggerty, C.L., 2011. The role of *Chlamydia trachomatis* polymorphic membrane proteins in inflammation and sequelae among women with pelvic inflammatory disease. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2011, 989762.
- Thacker, R.I., Janssen, E.M., 2012. Cross-presentation of cell-associated antigens by mouse splenic dendritic cell populations. *Front. Immunol.* 3, 41.
- Ulland, T.K., Janowski, A.M., Buchan, B.W., Faron, M., Cassel, S.L., Jones, B.D., Sutterwala, F.S., 2013. *Francisella tularensis* live vaccine strain folate metabolism and pseudouridine synthase gene mutants modulate macrophage caspase-1 activation. *Infect. Immun.* 81, 201-208.
- Vabulas, R.M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C.J., Häcker, H., Wagner, H., 2001. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.* 276, 31332-31339.
- van der Woude, M.W., Bäuml, A.J., 2004. Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 581-611.
- Vanrompay, D., Cox, E., Mast, J., Goddeeris, B., Volckaert, G., 1998. High-level expression of *Chlamydia psittaci* major outer membrane protein in COS cells and in skeletal muscles of turkeys. *Infect. Immun.* 66, 549-5500.
- Vanrompay, D., Cox, E., Volckaert, G., Goddeeris, B., 1999. Turkeys are protected from infection with *Chlamydia psittaci* by plasmid DNA vaccination against the major outer membrane protein. *Clin. Exp. Immunol.* 118, 49-55.
- Vickers, T.J., Beverley, S.M., 2011. Folate metabolic pathways in *Leishmania*. *Essays Biochem.* 51, 63-80.
- Vigil, P.D., Alteri, C.J., Mobley, H.L.T., 2011. Identification of *in vivo*-induced antigens including an RTX family exoprotein required for uropathogenic *Escherichia coli* virulence. *Infect. Immun.* 79, 2335-2344.
- Vogel, M., Jaeger, J., Winkelmann, J., Sachse, K., 2006. Chlamydien in Rinderbeständen - Ergebnisse eines Monitorings. 6. Berlin-Brandenburgischer Rindertag, Berlin, 06.10.2006.
- Voigt, A., Schöfl, G., Saluz, H.P., 2012. The *Chlamydia psittaci* genome: a comparative analysis of intracellular pathogens. *PLoS ONE* 7, e35097.
- Wang, J., Chen, L., Chen, F., Zhang, X., Zhang, Y., Baseman, J., Perdue, S., Yeh, I.T., Shain, R., Holland, M., Bailey, R., Mabey, D., Yu, P., Zhong, G., 2009. A chlamydial type III-secreted effector protein (TARP) is predominantly recognized by antibodies from humans infected with *Chlamydia trachomatis* and induces protective immunity against upper genital tract pathologies in mice. *Vaccine* 27, 2967-2980.
- Wang, Y., Kahane, S., Cutcliffe, L.T., Skilton, R.J., Lambden, P.R., Clarke, I.N., 2011. Development of a transformation system for *Chlamydia trachomatis*. Restoration of glycogen biosynthesis by acquisition of a plasmid-shuttle vector. *PLoS Pathog.* 7, e1002258.
- Wang, J., Zhang, Y., Lu, C., Lei, L., Yu, P., Zhong, G., 2010. A genome-wide profiling of the humoral immune response to *Chlamydia trachomatis* infection reveals vaccine candidate antigens expressed in humans. *J. Immunol.* 185, 1670-1680.
- Warner, D.F., Tønnum, T., Mizrahi, V., 2013. DNA metabolism in mycobacterial pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 374, 27-51.

- Watson, M.W., Lambden, P.R., Everson, J.S., Clarke, I.N., 1994. Immunoreactivity of the 60 kDa cysteine-rich proteins of *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. *Microbiology* 140, 2003-2011.
- Wheelhouse, N., Longbottom, D., 2012. Endemic and emerging chlamydial infections of animals and their zoonotic implications. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 283-291.
- Wilhelm, J., Pingoud, A., 2003. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem.* 4, 1120-1128.
- Wilks, A., Burkhard, K.A., 2007. Heme and virulence: how bacterial pathogens regulate, transport and utilize heme. *Nat. Prod. Rep.* 24, 511-522.
- Wolf, K., Fischer, E., Hackstadt, T., 2005. Degradation of *Chlamydia pneumoniae* by peripheral blood monocytic cells. *Infect. Immun.* 73, 4560-4570.
- Wuppermann, F.N., Hegemann, J.H., Jantos, C.A., 2001. Heparan sulfate-like glycosaminoglycan is a cellular receptor for *Chlamydia pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 184, 181-187.
- Wyllie, S., Ashley, R.H., Longbottom, D., Herring, A.J., 1998. The major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* functions as a porin-like ion channel. *Infect. Immun.* 66, 5202-5207.
- Wyrick, P.B., 2010. *Chlamydia trachomatis* persistence in vitro - an overview. *J. Infect. Dis.* 201, S88-S95.
- Yamada, A., Kahn, L.H., Kaplan, B., Monath, T.P., Woodall, J., Conti, L. (Eds.), 2014. Confronting emerging zoonoses (The One Health Paradigm). Springer VIII, 254p.
- Ying, S., Pettengill, M., Ojcius, D.M., Häcker, G., 2007. Host-cell survival and death during *Chlamydia* infection. *Curr. Immunol. Rev.* 3, 31-40.
- Ying, S., Seiffert, B.M., Häcker, G., Fischer, S.F., 2005. Broad degradation of proapoptotic proteins with the conserved Bcl-2 homology domain 3 during infection with *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 73, 1399-1403.
- Yoo, J.Y., Kim, H.C., Zhu, W., Kim, S.M., Sabet, M., Handfield, M., Hillman, J., Progulsk-Fox, A., Lee, S.W., 2007. Identification of *Tannerella forsythia* antigens specifically expressed in patients with periodontal disease. *FEMS Microbiol. Lett.* 275, 344-352.
- Young, J., Holland, I.B., 1999. ABC transporters: Bacterial exporters-revisited five years on. *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 177-200.
- Zeller, T., Klug, G., 2006. Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *Naturwissenschaften* 93, 259-266.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., Korsmeyer, S.J., 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 15, 619-628.
- Zhang, Y.X., Stewart, S.J., Caldwell, H.D., 1989. Protective monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis* serovar- and serogroup-specific major outer membrane protein determinants. *Infect. Immun.* 57, 636-638.
- Zhang, Y.X., Stewart, S., Taylor, H.R., Caldwell, H.D., 1987. Protective monoclonal antibodies recognize epitopes located on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J. Immunol.* 138, 575-581.
- Zügel, U., Kaufmann, S.H., 1999. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 19-39.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Chlamydialer Lebenszyklus und mögliche Interventionen des Immunsystems der Wirtszelle.....	6
Abb. 2: IVIAT	16
Abb. 3: Immunblots der Seren <i>C. psittaci</i> -infizierter Rinder und nicht infizierter Kontrolltiere....	44
Abb. 4: Die Abreicherung des gepoolten Serums von <i>E. coli</i> -spezifischen Antikörpern.....	46
Abb. 5: Die Abreicherung des gepoolten Serums von <i>C. psittaci</i> -spezifischen Antikörpern	48
Abb. 6: Restriktionsanalyse von zufällig gewählten Klonen der genomischen Expressionsbank ..	49
Abb. 7: Sequenzierung der Plasmid-DNA von 96 zufällig gewählten Klonen der genomischen Expressionsbank	50
Abb. 8: Einfluss der Temperatur und Induktions-Dauer auf das Expressionsverhalten der Genbank sowie die Auswirkungen verschiedener Behandlungslängen mit Chloroform.....	52
Abb. 9: Untersuchung verschiedener Kombinationen von gepoolten Serum und HRP-gekoppelten Protein G	54
Abb. 10: Klonierung und Expressionskontrolle von <i>C. psittaci</i> MOMP	55
Abb. 11: Subklonierung und Expression ausgewählter chlamydialer Gene.....	58
Abb. 12: Expression der rekombinanten Proteine der immunreaktiven Klone	59
Abb. 13: Kolonie Immunblots der Klone mit subklonierten Genen oder Genfragmenten	61
Abb. 14: Kolonie Immunblots der selektierten Klone	62
Abb. 15: Klassifikation aller identifizierten Gene der immunreaktiven Klone	65
Abb. 16: Detektion von <i>C. psittaci</i> 16S rRNA im Lungengewebe infizierter Kälber	67
Abb. 17: Basale Expression chlamydialer Gene <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	68
Abb. 18: Basale Expression chlamydialer Gene <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	69
Abb. 19: Relative Expression von <i>C. psittaci</i> Genen in der Rinderlunge, bestimmt mit REST ...	71
Abb. 20: Überprüfung der Effizienzen der Primer für die qRT-PCR	XV

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Technische Geräte und Hilfsmittel	21
Tab. 2: Verbrauchsmaterialien	23
Tab. 3: Kommerziell erwerbbaare Kits	24
Tab. 4: DNA- und Protein-Größenstandards	24
Tab. 5: Puffer, Lösungen und deren Zusammensetzung.....	25
Tab. 6: Antikörper.....	27
Tab. 7: Rinderseren	28
Tab. 8: Zelllinien	28
Tab. 9: Stämme von <i>Chlamydia psittaci</i> und <i>Escherichia coli</i>	28
Tab. 10: Vektoren und Plasmidkonstrukte.....	29
Tab. 11: Software und Datenbanken.....	29
Tab. 12: IVIAT.....	62
Tab. 13: Gruppierung aller identifizierten chlamydialen Gene der immunreaktiven Klone entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu einem <i>Cluster of orthologous groups</i> (COGs)	64
Tab. 14: Relative Expression verschiedener chlamydialer Gene in der Lunge von infizierten Kälbern	71
Tab. 15: Primer für die Klonierung	XIV
Tab. 16: Primer für die <i>real-time</i> PCR.....	XIV
Tab. 17: Alle <i>C. psittaci</i> Gene, die im Rahmen von IVIAT detektiert wurden.....	XVI

Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name Julia Kästner
Geburtstag 21.11.1984
Geburtsort Jena

PROMOTION

2009-2015 Promotion
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie –
Hans-Knöll-Institut, Jena
Abteilung Zell- und Molekularbiologie
Prof. Dr. Hans Peter Saluz

Titel: „Identifizierung von immunreaktiven Proteinen in *Chlamydia psittaci*-infizierten Rindern.“

STUDIUM

2007-2008 Diplomarbeit
Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Jena
Prof. Dr. Andreas Henke

Titel: „Charakterisierung der Wirkung von Pyrithion und Hinokitilol gegen Coxsackievirus B3.“

2003-2008 Studium der Biologie (Diplom)
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Mikrobiologie, Medizinische Mikrobiologie, Genetik

SCHULBILDUNG

2003 Abitur
Marie-Curie-Gymnasium Bad-Berka-Blankenhain
Leistungskurse: Biologie, Mathematik

1995-2003 Marie-Curie-Gymnasium Bad-Berka-Blankenhain

1991-1995 Grundschule Magdala

Publikation und Präsentationen

Teile dieser Dissertation wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Kästner, J., Saluz, H.P., Hänel, F., 2014. Identification of *in vivo*-induced bacterial protein antigens during calf infection with *Chlamydia psittaci*. Int. J. Med. Microbiol. (in press: doi: 10.1016/j.ijmm.2014.12.022).

Teile dieser Dissertation wurden auf folgenden wissenschaftlichen Konferenzen präsentiert:

Kästner, J., Sachse, K., Saluz, H.P., 2013. **Poster**

Identification of antigens in calfs induced by *Chlamydia psittaci* infection.
EMBO workshop, Liverpool, England

Kästner, J., Sachse, K., Saluz, H.P., 2013. **Poster, Young Scientist Presentation Award**

Identification of antigens in calfs induced by *Chlamydia psittaci* infection.
Second European Meeting on Animal Chlamydiosis and Zoonotic Implications (EMAC-2), Jena, Deutschland

Unterstützung

Die Versuche für diese Arbeit wurden in der Abteilung Zell- und Molekularbiologie des Leibniz-Instituts für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut in Jena durchgeführt. Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanziert: Grant no. 01KI1011D: Verbundprojekt: Zoonotische Chlamydien: Wechselwirkung von zoonotischen Chlamydien mit ihren Wirtszellen (Teilprojekt 4).

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hans Peter Saluz für die Bereitstellung des spannenden Themas sowie für die Betreuung und Unterstützung bei der Umsetzung dieser Arbeit danken. Die zahlreichen Diskussionen mit ihm haben maßgeblich zum Erfolg der Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Frank Hänel danke ich vor allem für das viele Korrekturlesen, das der Erstellung des Papers und der hier vorliegenden Arbeit vorraus ging. Außerdem möchte ich mich herzlich für alle Tipps und Ratschläge bedanken.

Den Kooperationspartnern Herrn Dr. K. Sachse und Frau Prof. Dr. Dr. Reinhold sowie Frau PD Dr. Angela Berndt vom Friedrich-Loeffler-Institut danke ich für die Bereitstellung der Seren und der Gewebe der Rinder. Zudem gilt Frau PD Dr. Angela Berndt der Dank für ihre freundliche fachliche Unterstützung.

Mein Dank gilt zudem allen Kollegen der Abteilung Zell- und Molekularbiologie für die Hilfsbereitschaft in allen wissenschaftlichen Belangen und die nette Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank gebührt den lieben Kollegen aus Raum B105 für unzählige gemeinsame Stunden mit nicht nur wissenschaftlichen Gesprächen. Allen (auch ehemaligen) Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Chlamydien“, speziell Anja Voigt und Katrin Litsche, danke ich für die Einführung in die infektionsbiologischen Grundlagen.

Ebenso möchte ich allen Mitarbeitern des Biotechnikums für die stets freundliche Hilfe und Unterstützung danken. Besonderer Dank gilt Karin Perlet und Karin Martin sowie Heike, Jana, Micha und Emmi!

Vielen lieben Dank an Antje für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Bernd und Ina Kästner, meinen Geschwistern Anne und Paul und meinem Freund Ronald für die großartige Unterstützung, das Verständnis, die Geduld und Motivation bedanken.

Ehrenwörtliche Erklärung

Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität ist mir bekannt.

Ich habe die Dissertation selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials hat mich außer der in der Danksagung genannten Personen niemand unterstützt.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich versichere, dass ich die Arbeit oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Arbeit bei keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe. Ferner habe ich nicht versucht, die vorliegende Dissertation als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung einzureichen.

Jena, den 05.01.2015

.....
Julia Kästner

Anhang

Tab. 15: Primer für die Klonierung.

Locus Tag*	Primer (<i>Restriktions-</i> <i>schnittstelle</i>)	Sequenz 5'-3' (<i>Restriktionsschnittstelle</i>)	Amplikon (bp)
CPSOB_0059	MOMP- <i>Bam</i> HI-F MOMP- <i>Xho</i> I-R	CGG GAT CCA TGA AAA AAC TCT TGA AAT CG CGC TCG AGT TAG AAT CTG AAT TGA GC	1219
CPSOB_0061	0061- <i>Nde</i> I-F 0061- <i>Xho</i> I-R	GGA ATT CCA TAT GAC AAA CAG GCT ATT G CGC TCG AGT ATA CCC ACC TTC	753
CPSOB_0063	0063- <i>Nde</i> I-F 0063- <i>Xho</i> I-R	GGA ATT CCA TAT GAG CCA ATC TAT AGA AG CGC TCG AGC CCC ACG CTA T	1408
CPSOB_0094	0094- <i>Nde</i> I-F 0094- <i>Xho</i> I-R	GGA ATT CCA TAT GGT CAA AGT TGT ATC C CGC TCG AGA GAG TGC TGA TTA ATC	312
CPSOB_0417	714- <i>Nde</i> I-F 714- <i>Xho</i> I-R	GGA ATT CCA TAT GGG TTT TTC TTT GC CGC TCG AGA GGG TCA TAG ATG	1011
CPSOB_0736	736- <i>Nde</i> I-F 736- <i>Xho</i> I-R	GGG AAT TCA TAT GCA TAG GAC ATG C CGC TCG AGC GCT GTT TGT AC	894
CPSOB_0790	790- <i>Nde</i> I-F 790- <i>Xho</i> I-R	GGA ATT CAT ATG ACC TCA GCC CAG CGC TCG AGG GAG AGA TTT CTC	666
CPSOB_1013	1013- <i>Nde</i> I-F 1013- <i>Xho</i> I-R	CGC ATA TGC ACG ATG TGT TC GCT CGA GTT CAT GGC GTT C	960
CPSOB_1025	1025- <i>Nde</i> I-F 1025- <i>Xho</i> I-R	GGA ATT CCA TAT GGG AAA TCT AAA AAC G CGC TCG AGG ACC TTT GTA TTG	756
CPSIT_p2	CPSIT-2- <i>Nde</i> I-F CPSIT-2- <i>Xho</i> I-R	CGC ATA TGA GTA AAT TAA CTA AAG CGC TCG AGT CAG CAT CTG	747

* entsprechend *Accession* Nr. CP002806 und CP002550

Tab. 16: Primer für die *real-time* PCR.

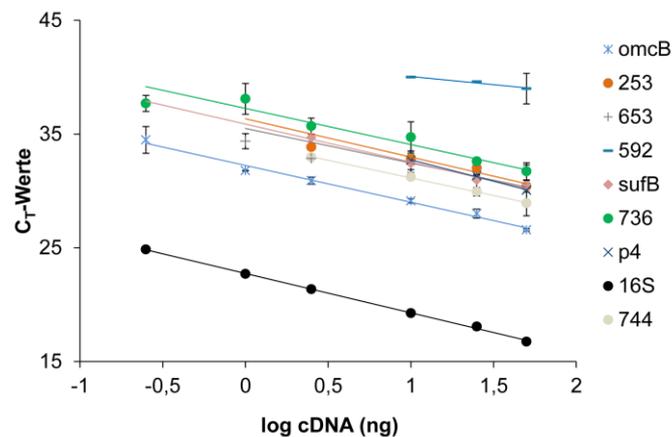
Locus Tag*	Primer (<i>For/Rev</i>)	Sequenz 5'-3'	Amplikon (bp)
CPSOB_0061	CPSOB_0061-F CPSOB_0061-R	AGATGTAGCGTATAATCGTTTCG CTCTTACCATTCCATTCTCC	160
CPSOB_0063	CPSOB_0063-F CPSOB_0063-R	GTACAGCTCCATCGTATTCTTC TTCCACCCTTACCAGTCTTC	135
CPSOB_0210	CPSOB_0210-F CPSOB_0210-R	ATTTGCCAGCGGGAAGATAG GTGTAGCGTCTACTGGTTGG	224
CPSOB_0253	CPSOB_0253-F CPSOB_0253-R	CACTCCGCATTCTCGTATC CCCCGTAGCCTCTAAATAAAC	142
CPSOB_0592	CPSOB_0592-F CPSOB_0592-R	CAATGACATCGCGTTATTTTCC AGCAATTAATCCCGCCATTAAG	167
CPSOB_0653	CPSOB_0653-F CPSOB_0653-R	ATATCAGCGACCACAGCAG CGCCATCATAATAAGAGCACC	138
CPSOB_0736	CPSOB_0736-F CPSOB_0736-R	TCCATGCGTTTGCCAATTC AGTAGTGGGTGCCTTTTGTG	210

Locus Tag	Primer (For/Rev)	Sequenz 5'-3'	Amplikon (bp)
CPS0B_0744	<i>rplL</i> -F <i>rplL</i> -R	CCTGCTGAGTCTACAGAATTTG GGCAAGCCTTCTGTCAATTC	134
CPS0B_0946	16S-F** 16S-R**	ACCCTAAGTGTGGCAACTAAC TTTCCGCAAGGACAGATACAC	117
CPS0B_1048	<i>groEL</i> -F <i>groEL</i> -R	ACA GGG GCA ACT GTY GTA GG CCC WCC AAC AAA YCT GGC TA	240
CPSIT_p4	CPSIT_p4-F CPSIT_p4-R	CCCAAATATTCTTCAAGGTGC CACCAACCCTTTTCTTTCCC	197

* entsprechend *Accession* Nr. CP002806 und CP002550

**modifiziert nach Binet und Maurelli (2005)

A



B

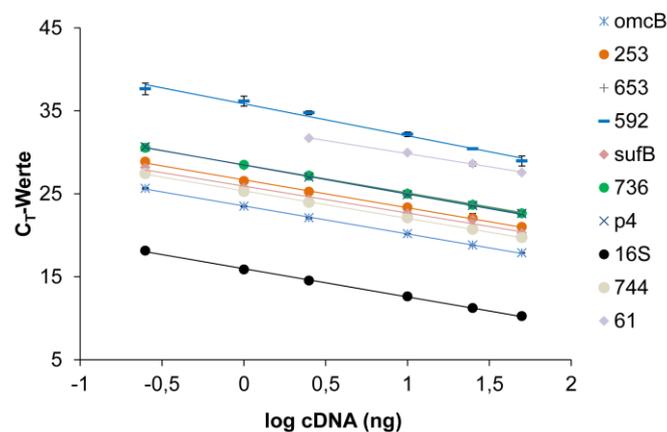


Abb. 20: Überprüfung der Effizienzen der Primer für die qRT-PCR. Eine serielle cDNA-Verdünnungsreihe basierend (A) auf der isolierten chlamydialen RNA aus dem infizierten bovinen Lungenewebe bzw. (B) auf der RNA infizierter HEp-2-Zellen wurde mit *real-time* PCR und den entsprechenden Primern gemessen. Die C_T -Werte wurden gegen den Logarithmus der cDNA-Konzentrationen aufgetragen und eine Regressionsgerade erstellt. Aus dem Anstieg der Regressionsgeraden wurde die Effizienz (E) wie folgt berechnet: $E = 10^{-1/\text{Anstieg}}$ (Pfaffl, 2001).

Tab. 17: Alle *C. psittaci* Gene, die im Rahmen von IVIAT detektiert wurden. Locus Tags beruhen auf *Accession* Nr. CP002806 bzw. CP002550 (Plasmid).

Locus Tag (Gen)	Funktion des Genproduktes	genomische Lokalisation (Start-Stop)
CPSOB_0045	secretion and cellular translocation protein Q	47541-48184
CPSOB_0046	putative serine/threonine protein kinase	
CPSOB_0059*	major outer membrane porin	59385-58177
CPSOB_0061	putative penicillin-binding protein	60626-60038
CPSOB_0061	putative penicillin-binding protein	<62850- >62755
CPSOB_0061	putative penicillin-binding protein	62643-63535
CPSOB_0062	hypothetical protein	
CPSOB_0063 (<i>sufB</i>)	FeS assembly protein SufB	64730-64129
CPSOB_0062	hypothetical protein	
CPSOB_0063 (<i>sufB</i>)	FeS assembly protein SufB	64914-64191
CPSOB_0062	hypothetical protein	
CPSOB_0063 (<i>sufB</i>)	FeS assembly protein SufB	65363- >64665
CPSOB_0063 (<i>sufB</i>)*	FeS assembly protein SufB	64671-66072
CPSOB_0094 (<i>trxA</i>)*	Thioredoxin	98621-98316
CPSOB_0096	hypothetical protein	
CPSOB_0095	tRNA-Leu	99094-98536
CPSOB_0094 (<i>trxA</i>)	Thioredoxin	
CPSOB_0120	50S ribosomal protein L5	
CPSOB_0121	30S ribosomal protein S8	114436-115127
CPSOB_0122 (<i>rplF</i>)	50S ribosomal protein L6	
CPSOB_0133	tRNA-Leu	122832-123561
CPSOB_0134	hypothetical protein	
CPSOB_0164*	extracellular solute-binding protein	149125-149649
CPSOB_0210	large cysteine-rich periplasmic protein omcB	200039- >200797
CPSOB_0254 (<i>dapF</i>)	diaminopimelate epimerase	
CPSOB_0253	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	243756- >243004
CPSOB_0269 (<i>dnaK</i>)	molecular chaperone protein Dank	256410-255798
CPSOB_0268	putative vacB/Rnb family exoribonuclease	
CPSOB_0293 (<i>hflX</i>)	GTP-binding protein	284243-285159
CPSOB_0319 (<i>pmp17G</i>)*	polymorphic outer membrane protein G family protein	333767-333157
CPSOB_0368 (<i>dnaX</i>)	DNA polymerase III subunits gamma and tau	385560-386239
CPSOB_0389	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	407525-408399
CPSOB_0415	hypothetical protein	
CPSOB_0416 (<i>accA</i>)	acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit alpha	429526-430183

Locus Tag (Gen)	Funktion des Genproduktes	genomische Lokalisation (Start-Stop)
CPSOB_0417	ABC transporter ATP-binding protein	431153-431800
CPSOB_0426*	hypothetical protein	440218->440987
CPSOB_0471	type III secretion system protein	483064-482426
CPSOB_0459 (<i>sucA</i>)	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	471024-470261
CPSOB_0458	hypothetical protein	
CPSOB_0500	putative type III secretion chaperone	515698-516442
CPSOB_0501	secretion and cellular translocation protein W	
CPSOB_0502	putative type III secretion inner membrane protein	517792-518617
CPSOB_0504	GTP-dependent nucleic acid-binding protein	520993-520246
CPSOB_0503	type III secretion system protein	
CPSOB_0520	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	<540235- >540589
CPSOB_0577	ABC transporter, ATP-binding protein LolD-like protein	599068- >599866
CPSOB_0578	hypothetical protein	
CPSOB_0589	extracellular solute-binding protein	609731- >608910
CPSOB_0588 (<i>zwf</i>)	glucose-6-phosphate dehydrogenase	
CPSOB_0592	amino ABC transporter, permease protein	613228-613865
CPSOB_0593*	ABC transporter ATP-binding protein	
CPSOB_0598*	inclusion membrane protein A	622039-621392
CPSOB_0598	inclusion membrane protein A	621410- >620601
CPSOB_0597	Methyltransferase	
CPSOB_0611	adherence factor	644900- >644125
CPSOB_0632	putative disulfide formation protein	663630-662779
CPSOB_0631	hypothetical protein	
CPSOB_0636*	ABC transporter ATP-binding protein	667137-666483
CPSOB_0635	hypothetical protein	
CPSOB_0654	diphosphate--fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase	684052- >684839
CPSOB_0653	putative sodium:sulfate symporter	
CPSOB_0654	diphosphate--fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase	683505-684156
CPSOB_0689*	hypothetical protein	726863-726217
CPSOB_0688	hypothetical protein	
CPSOB_0704 (<i>gmk</i>)	guanylate kinase	<744569-744181
CPSOB_0703	hypothetical protein	
CPSOB_0735	V-type ATP synthase subunit B	787933-788654
CPSOB_0736	V-type ATP synthase subunit A	
CPSOB_0736	V-type ATP synthase subunit A	788366- >789086
CPSOB_0736	V-type ATP synthase subunit A	789102-789697

Locus Tag (Gen)	Funktion des Genproduktes	genomische Lokalisation (Start-Stop)
CPSOB_0784	arginine/ornithine antiporter	837494-836903
CPSOB_0790 (<i>xerD</i>)	site-specific tyrosine recombinase <i>xerD</i>	
CPSOB_0791	Lipoprotein	844326-844979
CPSOB_0792	tRNA-Leu	
CPSOB_0792	tRNA-Leu	
CPSOB_0791	Lipoprotein	844810-844241
CPSOB_0790 (<i>xerD</i>)	site-specific tyrosine recombinase <i>xerD</i>	
CPSOB_0790 (<i>xerD</i>)	site-specific tyrosine recombinase <i>xerD</i>	
CPSOB_0789	glucose-6-phosphate isomerase	843840-843092
CPSOB_0800	putative Na ⁺ /H ⁺ antiporter	
CPSOB_0799	peptidase S41 family protein	853528- >854209
CPSOB_0843	putative membrane transport protein	
CPSOB_0842 (<i>ftsY</i>)	putative cell division protein	900593- >899836
CPSOB_0868	putative insulinase metalloprotease	937323-936762
CPSOB_0868	putative insulinase metalloprotease	936797- >936668
CPSOB_0881 (<i>glyQ</i>)	glycyl-tRNA synthetase	
CPSOB_0879	CDP-alcohol phosphatidyltransferase	947155-946334
CPSOB_0881 (<i>glyQ</i>)	glycyl-tRNA synthetase	949127-948388
CPSOB_0930 (<i>tkt</i>)	Transketolase	999885-1000508
CPSOB_0891 (<i>rpmJ</i>)	50S ribosomal protein L36	
CPSOB_0890	30S ribosomal protein S14	960815-960063
CPSOB_0903	inorganic pyrophosphatase	
CPSOB_0904	mutT/Nudix family protein	975861-976543
CPSOB_0905 (<i>fabF</i>)	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase 2	
CPSOB_0930 (<i>tkt</i>)	Transketolase	999385- >1000124
CPSOB_0932 (<i>mfd</i>)*	transcription-repair coupling factor	
CPSOB_0933	uroporphyrinogen decarboxylase	1006509-1007488
CPSOB_0934 (<i>hemN</i>)*	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	1008529-1009088
CPSOB_0942	hypothetical protein	
CPSOB_0941 (<i>nqrF</i>)	Na(+)-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit F	1017238-1016674
CPSOB_0954	putative lipoprotein	
CPSOB_0953 (<i>agcS</i>)	sodium/alanine symporter family protein	1031761-1031021
CPSOB_0960 (<i>serS</i>)	seryl-tRNA synthetase	
CPSOB_0961	hypothetical protein	1037460- >1038102
CPSOB_0971*	type III secretory flagellar biosynthesis	
CPSOB_0972	type III secretion system ATPase	<1047913-1048311
CPSOB_0971	type III secretory flagellar biosynthesis	
CPSOB_0972*	type III secretion system ATPase	1047805-1048413
CPSOB_0987	poly(A) polymerase	1068219-1067471

Locus Tag (Gen)	Funktion des Genproduktes	genomische Lokalisation (Start-Stop)
CPSOB_0992 (<i>psD</i>)	phosphatidylserine decarboxylase	1075739-1076559
CPSOB_0993 (<i>trmE</i>)	tRNA modification GTPase	
CPSOB_0997	hypothetical protein	1083600-1082981
CPSOB_0996	putative DNA helicase	
CPSOB_0996	putative DNA helicase	1082455-1083054
CPSOB_0997	hypothetical protein	
CPSOB_0996*	putative DNA helicase	1082569-1081990
CPSOB_1012*	type II/IV secretion system family protein	1096107-1096831
CPSOB_1013	bacterial type II and III secretion system family protein	
CPSOB_1025*	virulence protein pGP6-D-like protein	960815-960063
CPSOB_1025	virulence protein pGP6-D-like protein	1111565-1112179
CPSOB_1026	hypothetical protein	
CPSOB_1035 (<i>sdhA</i>)	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	1125984-1126760
CPSOB_1065	hypothetical protein	1156756-1157338
CPSOB_1066*	dihydrofolate reductase	1157745-1156914
CPSOB_1065*	hypothetical protein	
CPSIT_p2	hypothetical protein	854-1549
CPSIT_p3	phage integrase family protein	
CPSIT_p3	phage integrase family protein	1910-2487
CPSIT_p4	phage integrase family protein	

*Expression mit SDS PAGE und/oder Western Blot verifiziert