

Aus dem Institut für Biochemie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. Rolf Hilgenfeld

---

# **Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Protease CT441 aus *Chlamydia trachomatis***

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
– Aus der Sektion Naturwissenschaften –

vorgelegt von  
Friedrich Kohlmann  
aus Berlin

Lübeck 2015

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Rolf Hilgenfeld

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Ulrich Schaible

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 26.10.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Abstract.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>5</b>
2.1. Vorkommen und Taxonomie.....	6
2.2. Epidemiologie der Chlamydien.....	7
2.3. Pathogenese von <i>C. trachomatis</i> .....	9
2.4. Spezielle Aspekte der chlamydialen Proteasen im Infektionsprozess.....	14
2.5. Die Protease CT441.....	15
2.5.1. Der modulare Aufbau von CT441.....	15
2.5.2. Zelluläre Interaktionspartner von CT441.....	17
2.6. Aufgaben und Zielstellung dieser Arbeit.....	19
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
3.1. Material.....	20
3.1.1. Verwendete Bakterienstämme und Zellkulturlinien.....	20
3.1.2. Verwendete Plasmide.....	21
3.1.3. Verwendete Oligonukleotide.....	21
3.1.4. Antikörper und Chemikalien.....	22
3.1.5. Verwendete Geräte.....	23
3.1.6. Verbrauchsmaterialien.....	24
3.2. Methoden.....	26
3.2.1. Klonierung der CT441-Expressionskonstrukte.....	26
3.2.1.1. DNA-Isolation aus <i>C. trachomatis</i> .....	26
3.2.1.2. Amplifikation der DNA zur Klonierung der CT441-Vollängen- und Domänenkonstrukte mittels PCR-Oligonukleotiden.....	27
3.2.1.3. Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese.....	28
3.2.1.4. Herstellung des CT441-Konstruktes.....	28
3.2.1.4.1. Ligation des <i>ct441</i> -PCR-Amplifikates in den pGEM®-T Easy Vektor.....	28
3.2.1.4.2. Transformation des Ligationsproduktes in <i>E. coli</i> DH5α.....	29
3.2.1.4.3. Plasmidpräparation.....	30
3.2.1.4.4. Restriktionsverdau des pGEM®-T Easy( <i>ct441</i> )-Vektors und des pQE30 PrI-Expressionsvektors.....	30

3.2.1.5. Herstellung der CT441-Domänen-Konstrukte.....	31
3.2.1.6. PCR-Mutagenese zur Inaktivierung der Proteaseaktivität und zur Modifikation des GIGV-Loops der PDZ-Domäne.....	31
3.2.2. Rekombinante Herstellung und Aufreinigung von CT441 sowie der Domänenkonstrukte und CT441-Mutanten.....	32
3.2.2.1. Anzucht in <i>E. coli</i> .....	32
3.2.2.2. Bakterienaufschluss und Aufreinigung mittels Affinitäts- und Größenausschluss-Chromatographie.....	33
3.2.3. Charakterisierung der löslichen CT441-Proteine.....	35
3.2.3.1. Reinheitsüberprüfung mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35
3.2.3.2. Überprüfung der Homogenität mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS).....	36
3.2.4. Kristallisation der CT441-Domänen-Varianten.....	37
3.2.4.1. Identifikation initialer Kristallisationsbedingungen.....	37
3.2.4.2. Optimierung der Kristallisationsbedingungen.....	37
3.2.5. Probenvorbereitung und Aufnahme der Diffraktionsdaten.....	38
3.2.5.1. Probenvorbereitung für röntgenkristallographische Messungen.....	38
3.2.5.2. Aufnahme der Diffraktionsdaten.....	38
3.2.6. Strukturaufklärung und Verfeinerung.....	39
3.2.7. Herstellung von SRAP1 in <i>E. coli</i> .....	39
3.2.7.1. Klonierung des <i>sra1</i> -Gens.....	39
3.2.7.2. Aufreinigung von SRAP1.....	40
3.2.8. Analyse des Einflusses von <i>C. trachomatis</i> bzw. CT441 auf SRAP1.....	40
3.2.8.1. Spaltung von rekombinantem SRAP1 durch Zelllysate.....	40
3.2.8.2. Spaltung von rekombinantem SRAP1 durch CT441.....	41
3.2.8.3. Spaltung von transient produziertem SRAP1 durch CT441.....	42
3.2.8.4. Analyse der SRAP1:CT441 Interaktion in zellulärer Umgebung.....	42
3.2.9. Immunfluoreszenzfärbungen zur Analyse der CT441:SRAP1- Lokalisation.....	43
3.2.9.1. Zellanzucht, Transfektion und Infektion für Immunfluoreszenz- Färbungen.....	43
3.2.9.2. Fixierung von Zellen für Immunfluoreszenzfärbungen.....	43



3.2.9.3. Immunfluoreszenzfärbungen und Mikroskopie.....	43
3.2.10. Western Blots zur Analyse der Interaktion zwischen SRAP1 und <i>C. trachomatis</i> bzw. CT441.....	45
3.2.11. Chaperon-Assay (modifiziert nach Buchner et al.).....	47
3.2.12. Fluoreszenzbasierter Aktivitätstest zur Identifizierung eines geeigneten Substratpeptids und zur Bestimmung der CT441- Proteaseaktivität.....	49
3.2.12.1. Bestimmung des pH-Optimums.....	49
3.2.12.2. Ermittlung des RFU/AMC Korrelationsfaktors.....	50
3.2.12.3. Identifizierung eines geeigneten Substratpeptids.....	51
3.2.12.4. Test verschiedener CT441-Varianten im Protease- Aktivitäts-Test.....	52
3.2.13. Analyse der <i>C. trachomatis</i> -induzierten Zytotoxizität mittels LDH- Test.....	52
<b>4. Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>54</b>
4.1. CT441-Strukturaufklärung und Analyse der proteolytischen Aktivität.....	54
4.1.1. Proteinaufreinigung und Qualitätskontrolle von CT441°.....	54
4.1.2. Identifikation initialer Kristallisationsbedingungen und Optimierung für CT441°.....	56
4.1.3. Strukturbestimmung von CT441°.....	58
4.1.3.1. Erstellung des CT441°-Modell.....	58
4.1.3.2. Verfeinerung und Validierung des CT441°-Modells.....	60
4.1.4. Allgemeine Aspekte des finalen CT441-Modells.....	61
4.1.5. Dimerisierung von CT441.....	65
4.1.6. Verwendete Strukturen.....	68
4.1.7. Das aktive Zentrum von CT441.....	74
4.1.8. Proteolytische Aktivität von CT441.....	78
4.1.8.1. Identifizierung eines geeigneten Substratpeptids für CT441.....	78
4.1.8.2. Analyse strukturbasierter CT441-Mutanten und des Deletions- konstruktes CT441 $\Delta$ DUF3340.....	79
4.2. Analyse der SRAP1-Interaktion mit <i>C. trachomatis</i> und CT441.....	81
4.2.1. Einfluss von <i>C. trachomatis</i> auf SRAP1.....	81
4.2.2. Analyse der SRAP1-Interaktion mit CT441.....	82
4.2.3. Inkubation von transient produziertem SRAP1 mit CT441.....	84

4.2.4. Charakterisierung der SRAP1:CT441 Interaktion in humanen Zellen.....	85
4.2.5. Detektion von CT441 in <i>C. trachomatis</i> -infizierten HEK293-Zellen.....	87
4.2.6. Analyse der Wirtszell-Viabilität mittels Lactat-Dehydrogenase- Zytotoxizitätstest.....	88
4.3. Untersuchung der Lokalisation von CT441 und SRAP1 in infizierten HEK293-Zellen.....	90
4.4. Identifikation der Chaperonaktivität von CT441.....	93
4.5. Zusammenfassende Betrachtungen zur CT441°-Struktur, der CT441:SRAP1-Interaktion und der Chaperonaktivität.....	96
<b>5. Anhang.....</b>	<b>106</b>
<b>6. Referenzen.....</b>	<b>115</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>128</b>
<b>8. Sonstiges.....</b>	<b>131</b>
8.1. Wissenschaftliche Publikation.....	131
8.2. Lebenslauf.....	132
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>133</b>

# 1. Zusammenfassung

Das Gram-negative, obligat-intrazelluläre Bakterium *Chlamydia trachomatis* ist der Haupterreger bakteriell verursachter, vermeidbarer Erblindungserkrankungen, sowie der Infektion des Urogenitaltraktes. Chlamydien durchlaufen während der Infektion der Wirtszelle einen komplexen Infektionszyklus, wobei bisher nicht alle molekularen Details verstanden sind. Es ist bekannt, dass für die Etablierung und Manifestierung der Infektion chlamydiale Effektorproteine, die in das Zytoplasma der Wirtszelle sekretiert werden, eine wichtige Rolle einnehmen.

Im Fokus dieser Arbeit stand die Serinprotease CT441 aus *Chlamydia trachomatis*, eine sogenannte *tail specific protease* (Tsp), für die eine mögliche Beteiligung an der Modulation der Immunantwort des Wirtes und hormoneller Signalwege vermutet wird. Da bisher nur unzureichende Informationen bezüglich der molekularen Funktion von CT441 verfügbar sind und keine Proteinstruktur verfügbar war, stellte die Aufklärung der drei-dimensionalen Proteinstruktur mit Hilfe der Röntgenkristallographie ein primäres Ziel dieser Arbeit dar.

Die Analyse gewonnener Diffraktionsdaten ermöglichte erstmals die nahezu vollständige Bestimmung der dreidimensionalen Struktur und zeigt, dass CT441 aus drei Domänen aufgebaut ist.

CT441 weist N-terminal eine bisher einzigartige Domäne (NTD) auf. Ein Sekundärstruktur-Alignment der NTD mit Tsp's anderer Gram-negativer Pathogene weist auf eine neue, womöglich weit verbreitete, bisher jedoch nicht beschriebene Domäne hin. Erste Hinweise auf eine mögliche Funktion der NTD liefern die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse. Es konnte die Vermittlung der Löslichkeit des Gesamtproteins während der Proteinherstellung sowie eine mögliche Beteiligung an der erstmals identifizierten Chaperonaktivität von CT441 beobachtet werden. Die detaillierte Analyse der CT441-Struktur führte zudem zur Identifikation einer, in der C-terminalen Domäne (CTD) lokalisierten, katalytischen Triade im aktiven Zentrum. Bisher wurde davon ausgegangen, dass CT441 eine katalytische Diade, bestehend aus den Aminosäureresten S455 und K481, in der CTD besitzt. Proteinaktivitätstests unter Verwendung strukturbasierter CT441-Mutanten führten zur Identifikation von Q485 als zusätzlichen essentiellen Aminosäurerest für die proteolytische Aktivität. Struktur- und Sequenzvergleiche mit Tsp's aus Prokaryoten und Eukaryoten bestätigten zudem die in dieser Arbeit beschriebene katalytische Ser/Lys/Gln-Triade

als weit verbreitetes Charakteristikum der Tsps. Biochemische Analysen führten außerdem zur Entdeckung einer von der Proteasefunktion unabhängigen Chaperonaktivität, die eine mögliche bisher unbekannte zusätzliche Funktion von CT441 in der bakteriellen Proteinqualitätskontrolle vermuten lässt.

Ein weiterer Aspekt dieser interdisziplinären Arbeit war die Analyse der Interaktion von CT441 mit SRAP1, einem zellulären Co-Aktivatoren des Östrogenrezeptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) im Kontext der Infektion humaner Zellen. Hierbei zeigte sich, dass im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Daten *in vitro* eine Spaltung von SRAP1 durch CT441 hervorgerufen wird. Biochemische Untersuchungen und visuelle Analysen mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie zeigten, dass in Infektionsexperimenten mittels Zellkultur eine Interaktion von CT441 und SRAP1 vermutlich erst nach der Lyse der chlamydialen Inklusion in der späten Phase des Infektionszyklus auftritt. Es konnte keine aktive Translokation von CT441 in das Wirtszell-Zytoplasma im Verlauf der Infektion vor der Lyse der Inklusionsmembran beobachtet werden. Daher ist basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Daten, *in vivo* eine Beteiligung von CT441 an der Modulation zellulärer Signalwege nicht eindeutig verifizierbar.

Die erstmalig in dieser Arbeit bestimmte Proteinstruktur von CT441, einschließlich der begonnenen funktionellen Charakterisierung, kann als Basis für vielfältige zukünftige Studien zur Entwicklung neuer, strukturbasierter antichlamydialer Verbindungen und zur Charakterisierung der in anderen bakteriellen Pathogenen vorkommenden Tsps dienen.

# 1. Abstract

*Chlamydia trachomatis* is a Gram-negative obligate intracellular bacteria causing the majority of preventable blindness and urogenital infections. The underlying complex pathogenic cycle still lacks a detailed characterization of the molecular interactions. Further insights into these mechanisms might foster an improved therapeutic strategy for chlamydial infections.

This work focused on the molecular characterization of the serine protease CT441. It is a tail specific protease from *Chlamydia trachomatis* and is considered to be a key enzyme of the infection cycle due to modulation of host's immune response and hormone signaling pathways.

To gain more insights about the molecular function of CT441, this work primely aimed to solve the three-dimensional structure using x-ray crystallography. The next steps included functional characterization of the identified domains by proteomics and infection experiments (using selectively depleted mutants and substrates). Three domains could be identified.

The unique N-terminal domain (NTD) of CT441 indicates by alignments with Tsp's of several Gram-negative pathogens a new common domain. Its crucial function for the solubility of the entire molecule during protein purification could be demonstrated. Further experiments indicated an involvement of the NTD in an unknown chaperone activity of CT441. This protease-independent function seems to play an important role in the bacterial protein quality control. Further analysis revealed a catalytic triade in the active site located in the C-terminal domain (CTD). Due to experimental results of this work, the previously suggested catalytic dyad of CT441 (amino acid residues S455 and K481) needs to be extended by Q485 as additional essential residue for the proteolytic activity. The identified catalytic Ser/Lys/Gln-triad could be confirmed as a common feature in a broad spectrum of procaryotic and eucaryotic Tsp's. There remains only uncertainty about the PDZ domain, since it is a flexible domain and scatters insufficiently for successful structural characterization. Nevertheless, this domain was supposed by characterization experiments to be involved in substrate recognition and binding.

Going forward for enzyme-substrate interaction as secondary target of this thesis, the interaction between CT441 and the cellular co-activator of the estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) SRAP1 during infection was investigated. Based on biochemical analysis and

confocal fluorescence microscopy of CT441-SRAP1 interaction in cell culture infection experiments, a contribution of CT441 on the modulation of cellular signal pathways *in vivo* could not be clarified. In contrast to these previously published data SRAP1 was demonstrated to become cleaved by CT441 *in vitro*.

This work resolved the CT441 structure for the first time and supplies an initial functional characterization of its three essential domains. Even though it revealed different results as previously described in the literature, this work comprises essential insights for further investigations on CT441 and related bacterial Tsps as well as for the development of structure based antichlamydial compounds.

## 2. Einleitung

Die erste wissenschaftliche Erwähnung von Chlamydien geht auf die Arbeit von Ludwig Halberstädter und Stanislaus von Prowazek im Jahr 1907 zurück. Beide hielten sich mit Albert Neisser im Rahmen einer Expedition zur Untersuchung der Syphilis auf der Insel Java auf und untersuchten die dort häufig auftretenden Trachome der einheimischen Bevölkerung. Sie entnahmen Bindehautabstriche aus Trachoma-Patienten und infizierten damit Orang-Utans, bei denen sie dann anschließend konjunktivale Zelleinschlüsse beobachteten. Sie bezeichneten diese als Trachomkörperchen (Abb. 1) und benannten die auslösenden Erreger als „Chlamydozoen“ (Halberstaedter & Prowazek, 1907; Mehlhorn & Grüntzig, 2005).

In den Jahren 1929/30 traten in Europa und den USA vermehrt schwere Pneumonien vor allem bei Familienmitgliedern auf, die engen Kontakt zu infizierten Papageien hatten. Dies wurde durch die Medien zu einer Pandemie stilisiert. Aufgrund einer daraus resultierenden stark geförderten Forschungstätigkeit gelang die Entdeckung von filtrierbaren kleinen Körperchen in infizierten Vögeln und Menschen durch Levinthal, Coles und Lillie, die ihre Ergebnisse unabhängig voneinander publizierten (Pospischil, 2009). 1932 wurde erstmals der biphasische Entwicklungszyklus der Chlamydien von Bedson und Bland beschrieben (Bedson & Bland, 1932). Aufgrund der geringen Größe der Chlamydien wurde 1957 das für die Ausbildung des Trachoms verantwortliche Agens als „Trachoma-Virus“ bezeichnet (Wang, 1999). Erst ab 1965 ermöglichten die sich entwickelnde Zellkulturtechnik und die Elektronenmikroskopie eine eindeutige Identifizierung von Ribosomen und Zellwänden und somit eine Zuordnung zu den Prokaryoten, was in der Etablierung der taxonomischen Ordnung *Chlamydiales* resultierte (Storz & Page, 1971). Die Entwicklung molekularbiologischer Methoden wie der Sequenzierung führte um 1990 zur Entdeckung weiterer Chlamydienspezies und letztendlich zu der seit 1999 bestehenden Klassifizierung nach Everett (Everett et al., 1999; Abb. 2).

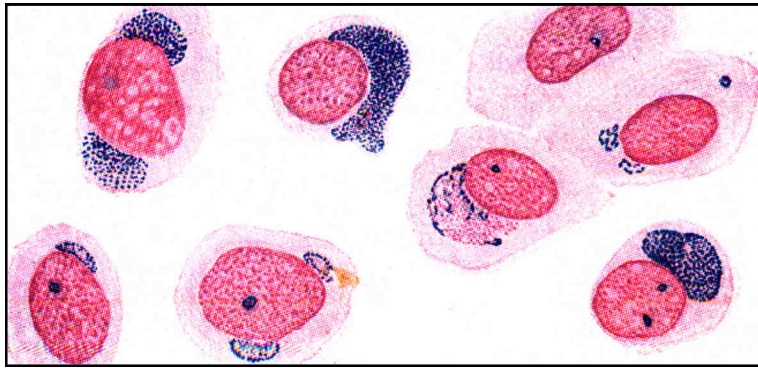


Abb. 1: Historische Aufnahme von Trachomkörperchen (blau), die kappenförmig auf den Zellkernen aufsitzen. (Aufnahme von 1923 aus Mehlhorn & Grüntzig, 2005).

## 2.1. Vorkommen und Taxonomie

Die Gram-negativen, obligat intrazellulären Chlamydien zeichnen sich durch eine hohe Anpassungsfähigkeit an ein breites Spektrum von Kalt- und Warmblütern als Wirtsorganismen aus. Dazu zählen Amphibien, Reptilien und Säugetiere, wobei neben dem Menschen vor allem zahlreiche Wildtiere und landwirtschaftliche Nutztiere als Hauptreservoir anzusehen sind. Chlamydien-assoziierte Infektionen sind vor allem bei diversen Vogelarten, Nagetieren, Koalas, Katzen, Rindern, Schafen und Pferden beschrieben (Regan et al., 1979; Vanrompay et al., 1993; Augustine, 1998; Longbottom et al., 1998; Berger et al., 1999; Soldati et al., 2004; Cisláková et al., 2004; Borel et al., 2006; Theegarten et al., 2008). Selten kann eine Übertragung von Tier-spezifischen chlamydialen Erregern auf den Menschen vorkommen, die dann als Zoonose bezeichnet wird. Die im Falle von *C. psittaci* auftretende Psittakose wird hauptsächlich durch das Einatmen von Kotpartikeln domestizierter Vögel verursacht. In einzelnen Fällen kann diese Ornithose sogar einen tödlichen Verlauf nehmen (Petrovay & Balla, 2008). Für *C. abortus* sind ebenfalls Erkrankungen des Menschen beschrieben, die intensiven Kontakt zu den Nutztieren hatten (Baud & Greub, 2011).

Phylogenetisch gehören Chlamydien zur Ordnung der *Chlamydiales*, die in die vier Familien der *Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* und *Simkaniaceae* unterteilt wird (Abb. 2). Vertreter der drei letztgenannten Familien sind sowohl in



Amöben als auch in Reptilien, Insekten, Fischen, Mollusken, Nutz- und Haustieren und mit Ausnahme der *Waddliaceae*, im Menschen nachgewiesen worden.

Hier werden sie vor allem mit respiratorischen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Corsaro & Greub, 2006).

Innerhalb der *Chlamydiaceae* erfolgt die Einteilung in die zwei Gattungen *Chlamydophila* und *Chlamydia*, in denen die jeweiligen Tier- und Human-pathogenen Spezies erfasst werden. Diese können teilweise weiter in Biovare und Serovare subklassifiziert werden.

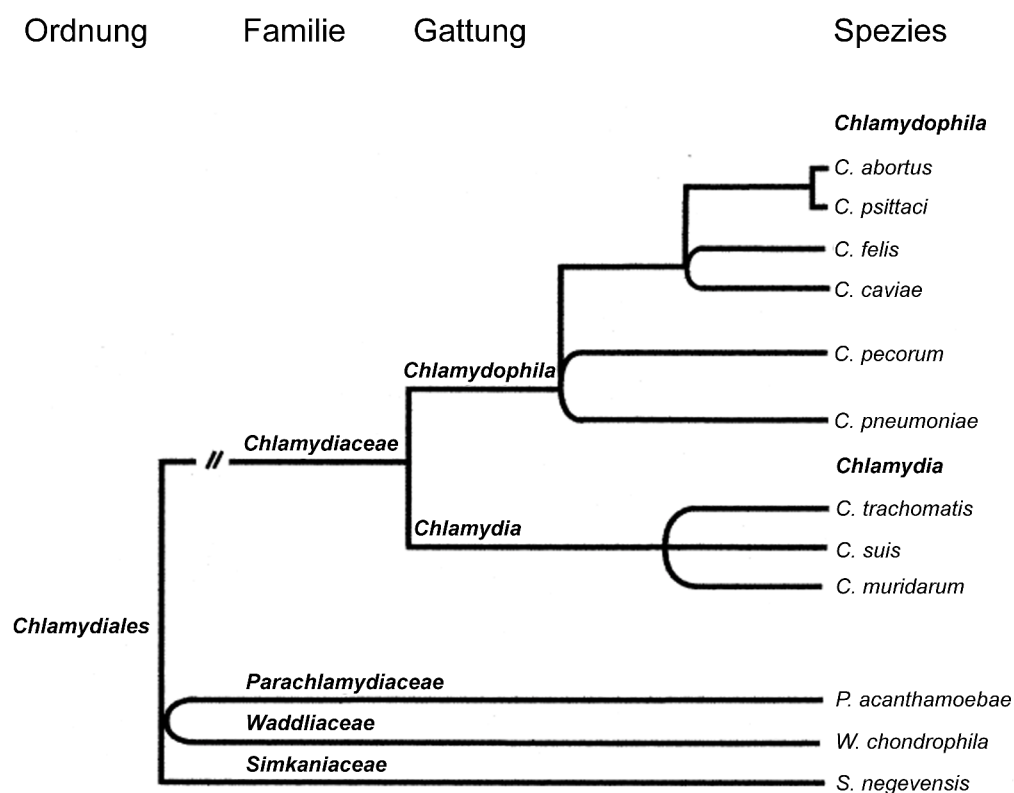


Abb. 2: Schematische Darstellung der taxonomischen Einteilung der Chlamydien (modifiziert nach Bush & Everett, 2001).

## 2.2. Epidemiologie der Chlamydien

Die häufigsten Chlamydien-assoziierten Erkrankungen des Menschen werden von den Erregern *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* verursacht. *C. pneumoniae* gelangt als Aerosol in die Bronchien und kann Pneumonien sowie chronische Erkrankungen

wie Asthma, aber auch Arteriosklerose und Alzheimer hervorrufen (Belland et al., 2004; Gérard et al., 2006; Cosentini et al., 2008).

*C. trachomatis* wiederum wurde anhand der klassischen Serologie in ca. 20 Serovare unterteilt, wobei der Nachweis des Oberflächenproteins MOMP (*major outer membrane protein*) mittels monoklonaler und polyklonaler Antikörper erfolgte (Schaeffer & Henrich, 2008). Die modernen molekularbiologischen Methoden der Sequenzierung, PCR und der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse) erlauben mittlerweile eine distinkte Typisierung bzw. klare Abgrenzung einzelner Serovare und bilden somit einen wichtigen zusätzlichen Baustein für die epidemiologische Betrachtung human-assoziiertes *C. trachomatis* Infektionen (Hsu et al., 2006).

Die Infektion mit *C. trachomatis* Serovar A-C verursacht okuläre Erkrankungen, die unbehandelt, unter Ausbildung eines Trachoms, bis zur völligen Erblindung durch die Vernarbung der Binde- und Hornhaut führen können. Dies ist die weltweit häufigste Ursache für eine eigentlich vermeidbare Erblindung und tritt vorwiegend in den Entwicklungsländern aufgrund mangelhafter sanitärer Einrichtungen, unzureichender Hygiene und fehlender Behandlung mit Antibiotika auf (Mabey et al., 2003).

Die Serovare D-K verursachen Infektionen des Urogenitaltraktes und stellen die weltweit am häufigsten sexuell übertragenen bakteriellen Krankheitserreger dar. In Europa wurden im Jahr 2009 ca. 344.000 Infektionsfälle registriert, wobei aufgrund unterschiedlicher Gesetzgebungen und Verordnungen in einzelnen Staaten keine flächendeckende Erfassung erfolgt, sodass von einer weitaus höheren Prävalenz ausgegangen werden muss (European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) Surveillance Report, 2012). Die weltweite Bedeutung dieser Infektion illustrieren die Zahlen der Weltgesundheitsorganisation (WHO), laut deren Erfassung im Jahr 1999 weltweit ca. 92 Millionen Neuinfektionen auftraten (World Health Organization Report, 2001). Betroffen sind Menschen beiderlei Geschlechts vorwiegend im zweiten und dritten Lebensjahrzehnt, das oft die höchste sexuelle Aktivität aufweist. Die Infektion verläuft größtenteils symptomlos, kann jedoch unbehandelt bei Männern zu Urethritis, Epididymitis und Prostatitis führen. Vor allem bei Frauen können bei einer unbehandelten Infektion im fortgeschrittenen Stadium schwerwiegende Krankheitsverläufe auftreten. Dies zeigt sich u.a. in einer entzündlichen Beckenerkrankung (PID, *pelvic inflammatory disease*), chronischen

Beckenschmerzen, einer ektopischen Schwangerschaft oder einer Frühgeburt bei einer vorliegenden Schwangerschaft (Low & Egger, 2002; Weir, 2004).

Die Vertreter der Serovare L1, L2a, L2b und L3 werden ebenfalls sexuell übertragen und führen zum Krankheitsbild *Lymphogranuloma venerum*, einer schweren invasiven Infektion des Lymphgewebes (Schaeffer & Henrich, 2008). Betroffen sind in den Industrienationen vorwiegend homosexuelle Männer und die Erkrankung kann koinzidiert mit weiteren sexuell übertragenen Erkrankungen (STD, *sexually transmitted diseases*) wie Syphilis, Gonorrhoe und HIV-Infektionen bzw. AIDS vorliegen. Die Zahl der *C. trachomatis* Serovar L-assoziierten Infektionen nimmt in den letzten Jahren weltweit ab, gleichzeitig kommen Infektionen in Asien, Afrika, Südamerika und in Teilen der Karibik jedoch auch endemisch vor. (Robert Koch-Institut, 2001). Die Infektion ist begrenzt auf die Lymphknoten der Leistengegend bzw. den Genitalbereich und kann zu lokalen Nekrosen und im fortschreitenden unbehandelten Verlauf durch den Verschluss von Lymphbahnen zu einer Elephantiasis führen. (Mabey et al., 2003; Robert Koch-Institut, 2001).

### **2.3. Pathogenese von *C. trachomatis***

Die Infektion des Wirtsorganismus durch Vertreter der *Chlamydiaceae* ist von einem komplexen bi-phasischen Zyklus gekennzeichnet, der hier am Beispiel eines der wichtigsten humanpathogenen Vertreter, *C. trachomatis*, verdeutlicht werden soll. Während der akuten Infektion treten unter optimalen (produktiven) Bedingungen zwei morphologisch und funktionell distinkte Formen der Chlamydien auf. Zum Einen die extrazellulären, metabolisch inaktiven, hoch-infektiösen Elementarkörper (*elementary body*, EB, Größe 0,2-0,5 µm) und zum Anderen die intrazellulären, metabolisch aktiven, nicht-infektiösen Retikularkörper (*reticular body*, RB, Größe 0,6-1,5 µm) (Storz & Page, 1971; Cocchiario & Valdivia, 2009).

Grundlegend besteht der Zyklus aus folgenden Phasen (Cocchiario & Valdivia, 2009).:

1. Anheftung der EBs und Internalisierung in die Wirtszelle,
2. Ausbildung der Chlamydien-haltigen Vakuole (Inklusion) und Differenzierung der EBs zu RBs,

3. bakterielle Replikation und Reifung der Inklusion,
4. Expansion der Inklusion und Redifferenzierung der RBs zu EBs,
5. Freisetzung der Chlamydien aus der Wirtszelle und Infektion neuer Zielzellen.

Die Dauer von der Anheftung bis zur abschließenden Freisetzung der hochinfektiösen Elementarkörper beträgt, abhängig vom Zelltyp und der Chlamydien-Spezies, ca. 48 bis 72 Stunden (Abb. 3).

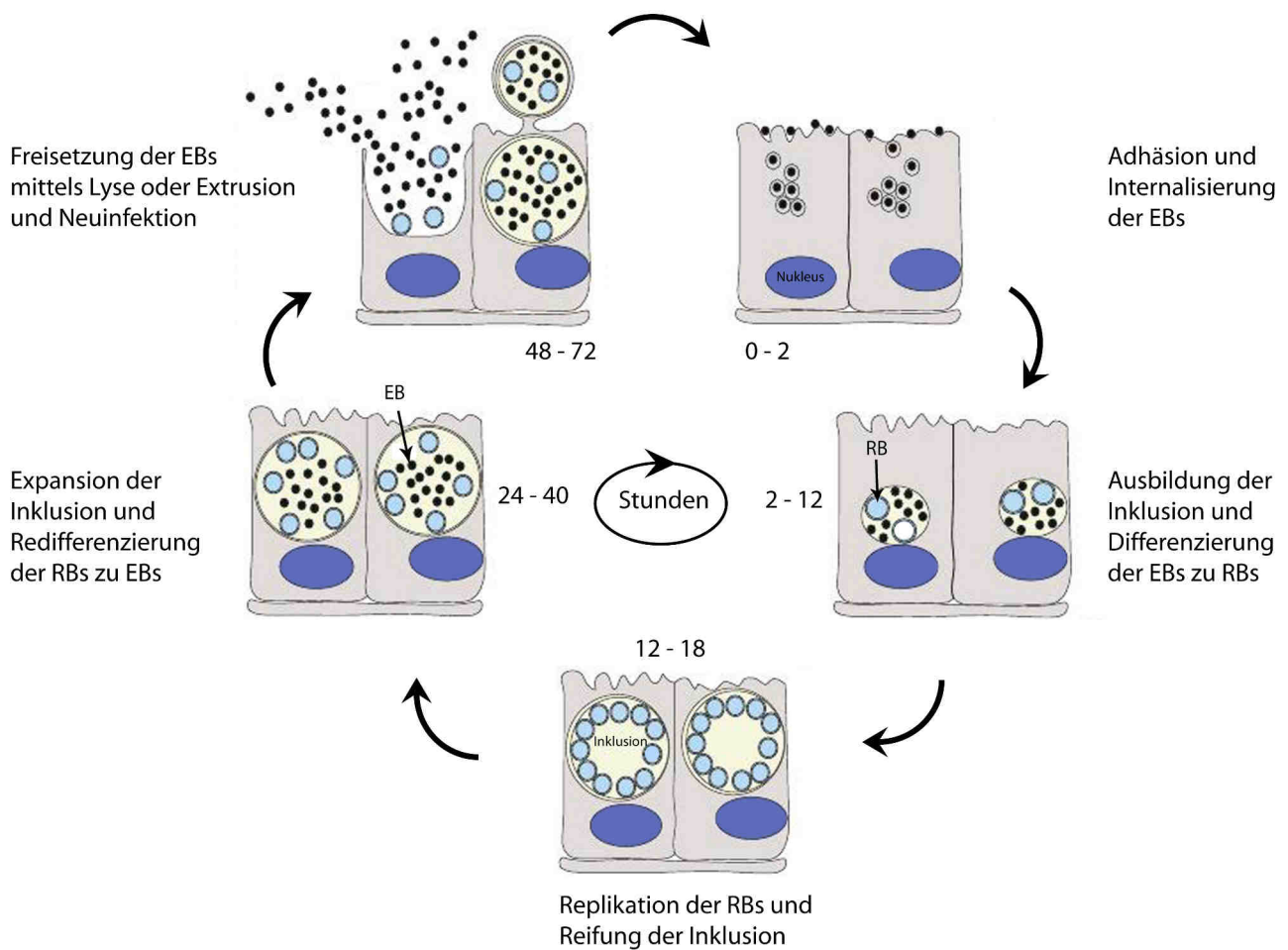


Abb. 3: Schematische Abbildung des chlamydialen Infektionszyklus unter optimalen Infektionsbedingungen, modifiziert nach Bastidas et al., 2013).

Die Anheftung der Elementarkörper an die Wirtszelle erfolgt über unterschiedlichste Adhäsine und Liganden der äußeren chlamydialen Zellmembran. Die für Rezeptor-Interaktionen vermuteten Adhäsine bzw. Liganden umfassen z.B. Glycosaminglykane, das *major outer membrane protein* (MOMP), sowie weitere Proteine der äußeren Zellwand (Su et al., 1996; Menozzi et al., 2002; Fadel & Eley,

2007; Cocchiaro & Valdivia, 2009; Swanson et al., 2009). Als Interaktionspartner dienen, abhängig vom Zelltyp, verschiedene Rezeptoren in der Wirtszell-Plasmamembran (Dautry-Varsat & Wyplosz, 2004; Cocchiaro & Valdivia, 2009). Dazu zählen z.B. der Heparansulfat-Rezeptor, der Mannose-Rezeptor und der Mannose-6-phosphat-Rezeptor. Des Weiteren dient die in der Plasmamembran befindliche Variante des Östrogen-Rezeptors als Interaktionspartner (Cocchiaro & Valdivia, 2009).

Die Internalisierung der Elementarkörper in nicht phagozytierende Zellen zu Beginn des Infektionszyklus wird durch die Remodellierung des Aktin-Zytoskeletts an den Anheftungsstellen initialisiert. Hierbei werden mindestens zwei alternative (oder eventuell synergistische) Wege in der Literatur diskutiert. Neben der Aktivierung sogenannter Rac-GTPasen dient das in dieser frühen Infektionsphase in die Wirtszelle sekretierte Effektorprotein TARP der Modulation des Aktin-Zytoskeletts (Abb. 4) (Carabeo et al., 2004, 2007). Daneben wird CT694, das in die Wirtszelle transloziert wird und mit dem zellulären AHNAK (ein mit der Plasmamembran assoziiertes Aktin-Bindeprotein) interagiert, ebenfalls eine Funktion im Internalisierungsprozess zugesprochen (Hower et al., 2009). Außerdem wird eine Beteiligung von Chlathrin als wichtigen Interaktionspartner während der Internalisierung vermutet (Hybiske & Stephens, 2007a).

Direkt im Anschluss befinden sich die Elementarkörper in einem als Inklusion bezeichneten Membran-umhüllten Kompartiment, welches zunächst noch mit der Plasmamembran assoziiert ist. Nach der Ablösung von der Innenseite der Plasmamembran beginnt die Transformation der Elementarkörper in die replikativen Retikularkörper mit der Dekondensation des Nukleoids und die rasante Vervielfältigung des Erregers durch binäre Teilungen setzt ein (Cocchiaro & Valdivia, 2009). Gleichzeitig werden in dieser frühen Phase des Infektionszyklus chlamydiale Inc-Proteine wie IncA, IncG oder auch CT229 in die Inklusionsmembran integriert und dadurch die Bildung einer intrazellulären Nische für die Replikation initiiert (Cocchiaro & Valdivia, 2009; Bastidas et al., 2013). Die Inc-Proteine interagieren u.a. mit zellulären GTPasen die in die Regulation der Organellenidentität und der Bewegung der Organellen innerhalb der Zelle involviert sind. Letztendlich dient diese Interaktion zum Einen der Maskierung der Inklusion um der Fusion mit zellulären Lysosomen zu entgehen. Zum Anderen wird die Bewegung der Inklusion entlang der Mikrotubuli in die Nähe des Zellkerns und des Golgi-Apparates sichergestellt. (Fields

& Hackstadt, 2002; Bastidas et al., 2013). Die gleichzeitig stattfindende Interaktion der Inc-Proteine mit zellulären Rab-Proteinen dient der Fusion mit Vesikeln, die essentielle Nährstoffe wie Lipide und Eisen enthalten. Daneben ist bekannt, dass Chlamydien Aminosäuren aufnehmen können, die für die Proteinsynthese nötig sind (Karayiannis & Hobson, 1981; Bastidas et al., 2013).

In der mittleren bis späten Phase des Infektionszyklus versucht *C. trachomatis*, durch die Modulation zellulärer Signalwege, der Immunantwort des Wirtes zu entgehen. So ist die Modulation des NF $\kappa$ B-Signalweges ein probates Mittel zur Umgehung der Immunantwort. Hierbei wird z.B. durch die chlamydiale Protease ChlaDub1 die Aktivierung der Genexpression von Interleukinen unterdrückt, die eine Entzündung als primäre Immunantwort hervorrufen (Le Negrate et al., 2008; Cocchiario & Valdivia, 2009). Gleichzeitig nimmt die Inklusion den Großteil des zytoplasmatischen Raumes der Wirtszelle ein. In der expandierten Inklusion erfolgt, basierend auf einem bisher unverstandenen Mechanismus, die Re-Differenzierung der Retikularkörper in die infektiösen Elementarkörper. Den Abschluss des Infektionszyklus markiert dann die Freisetzung der infektiösen Elementarkörper in den extrazellulären Raum. Hierfür werden zwei sich klar unterscheidende Mechanismen als wahrscheinlich diskutiert: Zum Einen die Zellyse, die durch eine sequenzielle Zerstörung der Inklusionsmembran und der Plasmamembran durch Cysteinproteasen charakterisiert ist (Cocchiario & Valdivia, 2009). Zum Anderen wird alternativ vermutet, dass die Inklusion an die Plasmamembran bindet und dann, in einem als Extrusion bezeichnetem Mechanismus, ausgestoßen wird. Dabei scheint die Wirtszelle im Gegensatz zur Zellyse intakt zu bleiben (Hybiske & Stephens, 2007b; Cocchiario & Valdivia, 2009).



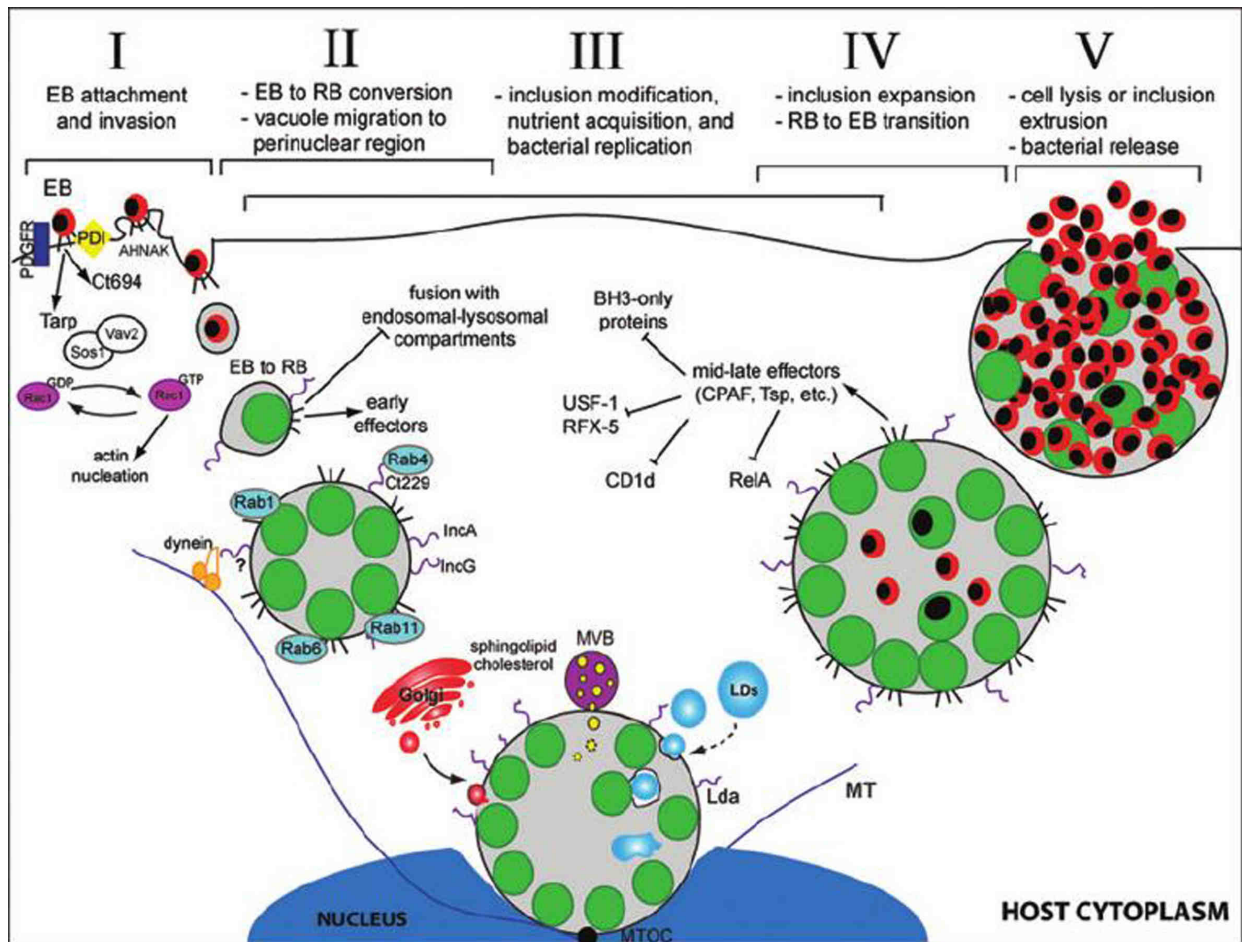


Abb. 4: Chlamydialer Infektionszyklus unter Berücksichtigung der molekularen Interaktionen (nach Cocchiario & Valdivia, 2009).

Erwähnt sei, dass Chlamydien während der Infektion der Wirtszelle in das Stadium der Persistenz eintreten können. Es wird vermutet, dass die Persistenz *in vivo* durch einen Mangel an essentiellen Nährstoffen wie Aminosäuren, Glukose oder Lipiden oder durch Eisenmangel hervorgerufen wird. Zusätzlich kann sich vermutlich eine höhere Konzentration an Entzündungsmediatoren wie IFN $\gamma$  oder eine sub-bakterizide Antibiotikagabe begünstigend auf die Etablierung der Persistenz *in vivo* auswirken (Mpiga & Ravaoarino, 2006).

In diesem Stadium stoppt die binäre Teilung und eine Vergrößerung der Retikularkörper tritt auf. Diese persistente, metabolisch weitgehend inaktive Form der Retikularkörper kann über einen langen Zeitraum der zellulären Immunantwort unentdeckt bleiben und wird mit chronischen Krankheitsverläufen in Verbindung gebracht (Beatty et al., 1994; Askienazy-Elbhar & Henry-Suchet, 1999).

Der Zustand der Persistenz kann *in vitro* auch durch die Gabe von Antibiotika oder Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) induziert werden. Sobald jedoch eine Verbesserung der

Umweltbedingungen eintritt, z.B. durch die Verfügbarkeit essentieller Nährstoffe, erfolgt die Re-Differenzierung der RBs in EBs und die Chlamydien treten wieder in den normalen (produktiven) Infektionszyklus ein.

#### **2.4. Spezielle Aspekte der chlamydialen Proteasen im Infektionsprozess**

Wie für zahlreiche andere bakterielle Erreger, gehören in der Pathogenese von *C. trachomatis* Proteasen zu den wichtigsten Effektorproteinen. Hierbei zählt die Serinprotease CPAF (*chlamydial protease-like activity factor*) zu den am intensivsten studierten Effektorproteinen. CPAF werden während der Infektion zahlreiche Interaktionen mit Wirtszellproteinen zugeschrieben, wobei der Transportweg aus dem Bakterium in das Wirtszell-Zytoplasma noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte (Zhong, 2011). Zu den beschriebenen Funktionen von CPAF zählen u.a. die proteolytische Degradation der zellulären Transkriptionsfaktoren USF-1 und RFX-5 zur Herabregulierung der Antigenpräsentation durch MHC-Klasse I und II-Moleküle und die Spaltung des Faktors p65 im NfκB-Signalweg, um sowohl der angeborenen als auch der adaptierten Immunantwort zu entkommen (Zhong et al., 2000; Christian et al., 2010). Des Weiteren scheint CPAF mit den sogenannten BH3-only-Proteinen zur Inhibition der zellulären Apoptose, die den Ablauf des Infektionszyklus gefährden würde, zu interagieren (Pirbhai et al., 2006). Es wird zudem vermutet, dass die Modulation der Zytoskelett-Proteine Keratin 8 sowie Vimentin der Sicherstellung der Expansion der chlamydialen Inklusion dient, um ideale Bedingungen für die Replikation der chlamydialen DNA und der damit einhergehenden Vermehrung der Erreger zu schaffen (Dong et al., 2004; Kumar & Valdivia, 2008). Neuere Ergebnisse einer Studie von Chen et al. stellen jedoch die bisherigen Erkenntnisse zur Interaktion von CPAF mit zellulären Proteinen zum Teil in Frage. Die Autoren vermuten, dass *in vivo* andere chlamydiale Proteine für einige der beschriebenen Effekte verantwortlich sind bzw. äußern generelle Zweifel ob in der Wirtszelle die beschriebenen Effekte und Funktionen von CPAF verursacht werden (Chen et al., 2012).

Für eine zweite Protease, Tsp (*chlamydial tail-specific protease*, auch als CT441 in *C. trachomatis* bezeichnet), die Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit ist,



werden ebenfalls Interaktionen mit Wirtszellproteinen beschrieben, die im nachfolgenden Abschnitt 2.5. detailliert erörtert werden.

## **2.5. Die Protease CT441**

### **2.5.1. Der modulare Aufbau von CT441**

Im Jahr 2007 wurde von Lad et al. erstmals die chlamydiale *tail specific-protease* Tsp bzw. CT441 im Kontext der Infektion näher untersucht (Lad et al., 2007a, 2007b). CT441 ist eine 649 Aminosäurereste (AS) umfassende Serin-Protease mit einem Molekulargewicht von ca. 68 kDa. Mit der aus *E. coli* seit 1992 bekannten und am besten untersuchten *tail-specific protease* Tsp (im folgenden als Tsp<sub>EC</sub> bezeichnet) weist CT441 eine Aminosäure-Sequenz-Identität von ca. 25 %, sowie einen ähnlichen modularen Aufbau auf (Abb. 5) (Silber et al., 1992). Alle hier gemachten Angaben bezüglich des Aufbaus von CT441 und Tsp<sub>EC</sub> beziehen sich auf *in silico* Analysen der Aminosäuresequenzen, da zu Beginn der Untersuchungen in dieser Arbeit keine drei-dimensionalen Strukturen für beide Proteine in der Proteindatenbank (PDB) verfügbar waren (Berman et al., 2002; Marchler-Bauer et al., 2011; Letunic et al., 2012; Rawlings et al., 2014). Während Tsp<sub>EC</sub> im bakteriellen Periplasma lokalisiert ist, wird für CT441 eine Lokalisation sowohl im Periplasma als auch temporär im Zytoplasma der infizierten Wirtszelle vermutet (Silber et al., 1992; Lad et al., 2007a). Ähnlich wie Tsp<sub>EC</sub> (AS 1-22) enthält auch CT441 eine N-terminale Signalsequenz (AS 1-21, Abb. 5) die vermutlich für den Transport des Proteins aus dem Zytosol in das Periplasma bzw. in den extrazellulären Raum benötigt wird (Lad et al., 2007b). Es sei erwähnt, dass viele bakterielle Effektorproteine eine hydrophobe N-terminale Signalsequenz für den Sec-abhängigen Transport sowohl in den periplasmatischen als auch den extrazellulären Raum bzw. in die Wirtszelle mit Hilfe des Typ-II-Sekretionsapparates besitzen (Stephens et al., 1998; Cianciotto, 2005). An das Signalpeptid schließt sich in CT441 (AS 22-250, Abb. 5) wie in Tsp<sub>EC</sub> (AS 23-237, Abb. 5) eine N-terminale Domäne unbekannter Funktion an. Die darauf folgende sogenannte PDZ-Domäne (AS 251-335 in CT441, Abb. 5) kommt sowohl in einigen bakteriellen als auch in pflanzlichen und tierischen Proteinen vor (Ponting, 1997).

Der Begriff PDZ ist ein Akronym und setzt sich aus den ersten Buchstaben der drei folgenden Proteine zusammen in denen diese Domäne zuerst entdeckt wurde: 1. *Post synaptic density protein* (PSD95), 2. *Drosophila disc large tumor suppressor* (Dlg1) und 3. *Zonula occludens-1 protein* (zo-1).

Für Tsp<sub>EC</sub> ist bekannt, dass es eine wichtige Rolle in der Proteinqualitätskontrolle im Periplasma spielt. Zunächst werden im Periplasma vorliegende, inkorrekt gefaltete Proteine C-terminal mit einem Polypeptid (Sequenz ANDENYALAA, auch als ssrA-Tag bezeichnet) versehen (Keiler et al., 1996). Das so markierte Protein wird über den unpolaren SsrA-Tag von der Tsp<sub>EC</sub>-PDZ-Domäne (AS 238-322, Abb. 5) erkannt und gebunden und das Substratprotein anschließend durch Tsp<sub>EC</sub> proteolytisch abgebaut (Keiler et al., 1996; Spiers et al., 2002). Ein charakteristischer Bestandteil von PDZ-Domänen ist das hochkonservierte Substrat-Binde-Motiv mit der Konsensussequenz GLGF (auch als GLGF-Loop bezeichnet), das von den mehr als 100 bekannten PDZ-Domänen-haltigen Proteinen abgeleitet wurde und für die beschriebene Substraterkennung und -bindung verantwortlich ist (Beebe et al., 2000). Der korrespondierende Bereich in der PDZ-Domäne von CT441 weist abweichend die Sequenz GIGV auf.

Des Weiteren enthält CT441 eine C-terminale Domäne (CTD, AS 336-649, Abb. 5). Die CTD setzt sich aus der Protease-Domäne (AS 336-527, Abb. 5) und der DUF3340 (*domain of unknown function 3340*, AS 528-649, Abb. 5) zusammen.

Die Protease-Domäne wird der S41-Familie von Proteasen zugeordnet (MEROPS-Klassifizierung der *C-terminal processing peptidases*, Rawlings et al., 2014) und enthält das katalytische Zentrum. Dieses besteht aus einer katalytischen Diade, mit den funktionellen Resten Serin 455 als Nukleophil und Lysin 481 als generelle Base (Lad et al., 2007b). Die korrespondierenden Reste befinden sich im Tsp<sub>EC</sub> an Position 452 (Serin) und 477 (Lysin) und stellen ebenfalls die funktionellen Reste der katalytischen Diade dar (Keiler & Sauer, 1995a). Für die in der CTD von CT441 befindliche Domäne DUF3340 (AS 528-649) ist ebenfalls eine äquivalente Region in Tsp<sub>EC</sub> auffindbar (AS 532-682, Abb. 5, Annotation mit Hilfe des SMART Servers; Letunic et al., 2012), wobei bisher keinerlei Informationen bezüglich einer intra- oder intermolekularen Funktion in der Literatur beschrieben sind.

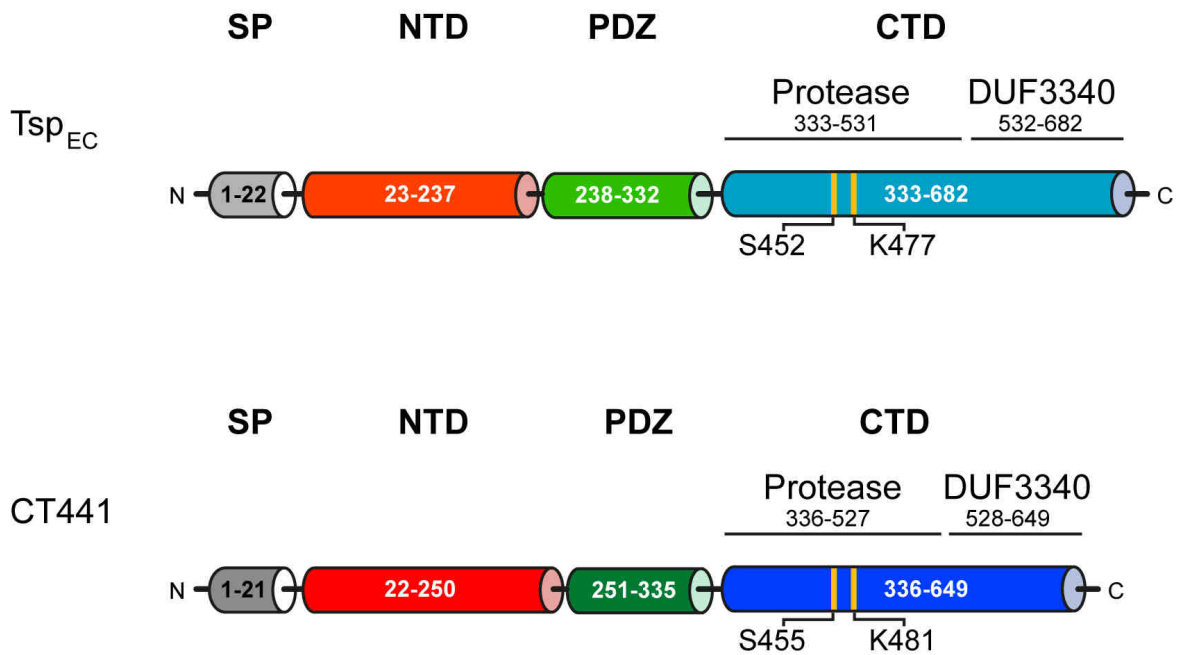


Abb. 5: Schematischer Aufbau von Tsp<sub>EC</sub> und der chlamydialen Protease CT441. Bei beiden Proteinen befindet sich im N-Terminus das Signalpeptid (SP, grau), anschließend die N-terminale Domäne unbekannter Funktion (NTD, rot), die PDZ-Domäne für die Substraterkennung und -bindung (PDZ, grün) sowie die C-terminale Domäne (CTD, blau), bestehend aus der Protease-Domäne mit den funktionellen Resten des aktiven Zentrums und der DUF3340 (AS 528-649).

## 2.5.2. Zelluläre Interaktionspartner von CT441

Bisher gibt es lediglich Publikationen zweier Arbeitsgruppen, die eine Interaktion von CT441 mit zellulären Proteinen im Kontext einer Infektion untersucht haben. Zunächst ist beschrieben, dass CT441 den cytoplasmatischen Faktor RelA (p65) spaltet, einer wichtigen Komponente der NFκB-Signalkaskade. Es wird vermutet, dass intrazelluläre Chlamydien so die Immunabwehr des Wirtes modulieren, da NFκB verschiedene Komponenten der angeborenen und adaptierten Immunabwehr reguliert (Lad et al., 2007a; Hayden & Ghosh, 2008). Die NFκB-Untereinheiten p65 und p50 bilden einen heterodimeren Komplex, der in den Zellkern transloziert wird und als Transkriptionsfaktor fungiert. CT441 spaltet p65 speziesspezifisch und unterdrückt als Konsequenz u.a. die Expression der Gene, die für die pro-inflammatorischen Interleukine IL-6 und IL-8 kodieren (Lad et al., 2007a). Somit wird die Ausbildung einer Entzündung als unmittelbare Immunantwort unterdrückt.

Die zweite beschriebene Interaktion mit einem Wirtszellprotein beruht auf den Ergebnissen von Borth et al. (2010), die eine Modulation des Östrogen-Signalweges durch CT441 beschreiben. Ein „Yeast Two-Hybrid“-Experiment zeigte, dass CT441 in

der Lage ist, mit dem humanen SRA1 Protein (*steroid receptor RNA activator protein 1*, auch als SRAP1 bezeichnet), einem Co-Aktivatoren des Östrogenrezeptors  $\alpha$  (*estrogen receptor*, ER $\alpha$ ), zu interagieren. Ursprünglich wurde *sra1* als funktionelle, nicht-kodierende RNA charakterisiert (Lanz et al., 1999). Das endogene SRA1-Protein (SRAP1) wurde dann erstmalig in Brustkrebszellen entdeckt und stellt das Produkt einer neuen Klasse funktioneller Ribonukleinsäuren dar, die gleichzeitig für ein Protein kodieren (Chooniedass-Kothari et al., 2006). Im Östrogensignalweg werden inaktive Östrogenrezeptoren, membrangebunden oder im Komplex mit Hitzeschockproteinen im Zytosol vorliegend, durch die Bindung von Östrogen aktiviert (Hall & McDonnell, 2005). Eine Konformationsänderung führt anschließend zur Dimerisierung der Rezeptoren und zur Translokation in den Zellkern, wo die Transkription von Zielgenen induziert oder auch gehemmt werden kann (Beato & Klug, 2000; Pike et al., 2000). Das in der Wirtszelle vorliegende SRAP1 aktiviert den dimerisierten Östrogenrezeptor  $\alpha$  und übt dadurch einen transkriptionsfördernden Einfluss aus (Chooniedass-Kothari et al., 2010). CT441 wiederum interagiert mit Hilfe der PDZ-Domäne mit SRAP1 und dieser Mechanismus wurde *in vitro* mittels "GST pull-down"-Experimenten und intrazellulärer Co-Lokalisationsstudien bestätigt (Borth et al., 2010). Interessanterweise wurde, im Gegensatz zur Interaktion mit p65 im NF $\kappa$ B-Signalweg, jedoch keine proteolytische Spaltung von SRAP1 durch CT441 beobachtet. Die *in vitro*-Analysen von Borth et al. (2010) zeigten zudem, dass, unabhängig davon, ob das Volllängenprotein CT441 oder nur die isolierte PDZ-Domäne eingesetzt wurde, die SRAP1-vermittelte Co-Aktivierung des Östrogenrezeptors stark eingeschränkt wird. Die Autoren vermuten, dass während einer Chlamydien-Infektion CT441 in die Wirtszelle sekretiert wird und mit Hilfe der PDZ-Domäne SRAP1 bindet und im Wirtszell-Zytoplasma zurückhält und in Folge dessen, die Co-Aktivierung des Östrogenrezeptors verhindert. Die bisher vorliegenden Studien weisen darauf hin, dass CT441 eine wichtige Rolle für *C. trachomatis* in der Manipulation der Wirts-Immunantwort als auch der Hormonsignalwege zur Etablierung und Manifestation der Infektion zu spielen scheint. Zudem verdeutlichen die klinisch relevanten Komplikationen, vor allem die durch *C. trachomatis* hervorgerufene infektiöse Infertilität, dass die Erforschung der zugrunde liegenden molekularen Ursachen von größter Wichtigkeit ist.

## 2.6. Aufgaben und Zielstellung dieser Arbeit

Die rasante Entwicklung molekularbiologischer, mikrobiologischer und biochemischer sowie biophysikalischer Methoden in den letzten Jahrzehnten ermöglicht zunehmend die Analyse bzw. Charakterisierung von Wirt-Pathogen-Interaktionen auf molekularer Ebene. Aufgrund bisher fehlender Möglichkeiten der genetischen Manipulation stellt hierbei die Arbeit mit intrazellulären Erregern wie den Chlamydien eine besondere Herausforderung dar. Es ist von großem Interesse, die einer Chlamydien-Infektion zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu entschlüsseln. Dabei rücken zunehmend vor allem im Verlauf der Infektion in die Wirtszellen sekretierte Effektorproteine in den Fokus. Bakterielle Proteasen wie die chlamydiale Protease CT441 stellen in diesem Zusammenhang aufgrund der Vorarbeit mehrerer Arbeitsgruppen wichtige Zielproteine dar.

Da CPAF die bisher einzige strukturell und funktionell gut charakterisierte Protease aus *C. trachomatis* darstellt und CT441 vermutlich ebenfalls eine wichtige Rolle im Infektionsprozess spielt, ist das primäre Ziel dieser Arbeit, die Proteinstruktur von CT441 mit Hilfe der Röntgen-Kristallographie aufzuklären. Zum Einen soll dadurch das Verständnis der Funktionweise dieser Protease vergrößert werden. Zum Anderen stellt die Proteinstruktur die Basis für die Entwicklung von alternativen struktur-basierten Wirkstoffen dar, die möglicherweise in Zukunft für eine Verbesserung der etablierten Behandlung chlamydialer Infektionen von Bedeutung sein könnten.

Im zweiten Teil der Arbeit soll vertiefend analysiert werden, welche Rolle *C. trachomatis* und speziell die Protease CT441 bei der Interaktion mit SRAP1, dem Co-Aktivatoren des Östrogenrezeptors (ER $\alpha$ ) spielt. Mit Hilfe biochemischer Analysen und der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie soll analysiert werden, ob eine Interaktion von CT441 mit SRAP1 während der Infektion möglich ist, bzw. ob eine gerichtete Translokation von CT441 in das Wirtszell-Zytoplasma stattfindet.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Verwendete Bakterienstämme und Zellkulturlinien

Expressionsstamm / Zelllinie	Beschreibung / Hersteller
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Klonierungsstamm (Invitrogen)
<i>E. coli</i> C43 (DE3)	Expressionsstamm (Lucigen)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) C+RIL	Expressionsstamm (Stratagene)
<i>C. trachomatis</i> L2/434/Bu	Quelle des <i>ct441</i> -Gens, zur Verfügung gestellt vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universität zu Lübeck
HeLa-229	ACC-57 epitheloides humanes Cervix-Karzinom, DMSZ, Braunschweig, Deutschland
HEK293T	CRL-1573, humane embryonale Nierenzellen, ATCC, Manassas, USA
HEp2	CCL-23, epidermoides humanes Larynx-Karzinom, ATCC, Manassas, USA

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Expressionsstämme bzw. Zelllinien.

### 3.1.2. Verwendete Plasmide

Plasmid	Verwendung
pQE30 PrI	Expressionsvektor zur rekombinanten Herstellung von CT441-Varianten, (Qiagen, modifiziert von R. Wrase, Universität zu Lübeck)
pETpre01	Expressionsvektor zur rekombinanten Herstellung von SRAP1 (basiert auf pET-15b von Novagen, modifiziert von G. Hansen, Universität zu Lübeck)
pCMV-Entry	<i>Homo sapiens</i> steroid receptor RNA activator 1 (SRA1)-Transfektionsvektor (OriGene TrueORF Gold) zur Herstellung von SRAP1 in HEK293-Zellen.
pGEM-T <sup>®</sup> Easy	Klonierungsvektor zur Zwischenklonierung des CT441-Vollängenkonstruktes, (Promega)

Tab. 2: Auflistung der verwendeten Expressionsvektoren zur Herstellung von CT441 und SRAP1.

### 3.1.3. Verwendete Oligonukleotide

Für die Klonierung der Expressionskonstrukte zur rekombinanten Herstellung von CT441, CT441-Domänenkonstrukten bzw. funktioneller CT441-Mutanten wurden die in der Online-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Pruitt et al., 2014) vorliegende Referenz-Nukleotidsequenz für das *ct441*-Gen (NC\_010287.1) sowie die korrespondierende Referenz-Aminosäuresequenz (YP\_001654772.1) herangezogen. Mit Hilfe der Programme ProtParam (Gasteiger et al., 2005) und SignalP (Petersen et al., 2011) wurden die einzelnen CT441-Domänen und das N-terminale Signalpeptid identifiziert und darauf basierend die PCR-Oligonukleotide zur Klonierung aller CT441-Konstrukte bzw. zur Herstellung der CT441-Mutanten (Abb. 6) abgeleitet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen und sind zusammenfassend in den Tabellen 12 bis 14 (Anhang) aufgelistet.

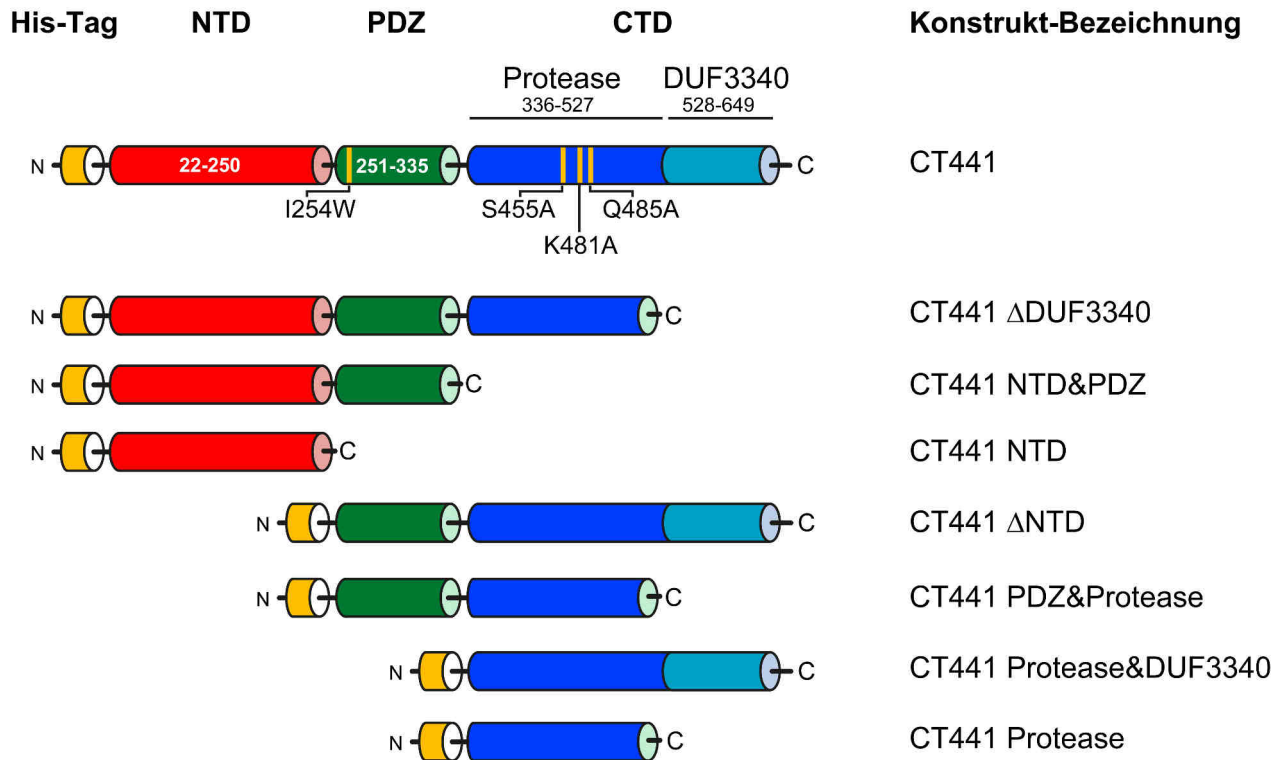


Abb. 6: Schematische Übersicht der CT441-Konstrukte und der Mutationen in CT441. Orange: N-terminaler His-Tag, rot: N-terminale Domäne (NTD, AS 22-250), grün: PDZ-Domäne (AS 251-335), blau: C-terminale Domäne (CTD, bestehend aus Protease-Domäne (AS 336-527) und DUF3340 (AS 528-649)). Gelbe vertikale Balken verdeutlichen die Lage der I254W, S455A, K481A und Q485A-Mutationen.

### 3.1.4. Antikörper und Chemikalien

Alle kommerziellen Antikörper wurden von Cell Signalling Technology, Invitrogen, Origene, Qiagen, Santa Cruz und Sigma bezogen. Eine Auflistung der eingesetzten Konzentrationen sowie zusätzliche Informationen zu nicht-kommerziellen Antikörpern erfolgt im Detail in den Abschnitten 3.2.9.3. und 3.2.10.. Die verwendeten Chemikalien stammten von BD, Fluka, Gerbu, Merck, Roth, Serva und Sigma-Aldrich.



### 3.1.5. Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
AF 20 Eismaschine	Scotsman
Äkta FPLC	GE Healthcare
Avanti J-26 XP Zentrifuge	Beckman Coulter
BioPhotometer Plus	Eppendorf
Econo Pump Rollenpumpe	Eppendorf
Electrophoresis Power Supply EPS 3500	Pharmacia Biotech
Fluorometer FLx800	BioTek
Heizblock HB130	UniTEK
IKA KS260 basic Schüttler	IKA
Innova 4230 Kulturschüttler	New Brunswick Scientific
Laboklav	SHP Steriltechnik
Laser Scanning Mikroskop LSM Meta 510	Zeiss
Laser Spectroscatter 201	RiNA
M22 Minishaker	IKA
Mikroskop SZX12	Olympus
Millipore Synergy Reinstwasseranlage	Millipore
MiniPROTEAN Tetra Cell 1D Gelelektrophorese-Kammer und Mini Trans- Blot-Apparatur	BioRad
MRHei-Mix L Magnetührer	Heidolph
NUAIRE Cleanbench	NUAIRE
Optima L-90K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
PCR T Gradient	Biometra
pH-Meter Five Easy	Mettler Toledo
Phoenix Kristallisationsroboter	Art Robbins Instruments

Pipetten	Gilson, Eppendorf
Plate Reader Infinite M200	TECAN
Powerpac 3000 Spannungsgerät	Biorad
RC-3B Refrigerated Ultracentrifuge	Sorvall Instruments
Sartorius Universalwaage	Sartorius
Semi-phor Blottingapparatur	BioRad
Sigma 3-18K Zentrifuge	Sigma
Sonifier W-250D	Branson
Thermomixer 5436	Eppendorf
UV-Spectrophotometer Cary 50 conc	Varian
Vilber Lourmat Fusion Fx7	
Chemilumineszenz- und Fluoreszenz-Imager	Vilber Lourmat
Zentrifuge 5424	Eppendorf

Tab. 3: Auflistung aller verwendeten Laborgeräte.

### 3.1.6. Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
AccuPrime Pfx DNA Polymerase	Life Technologies
Amicon Ultrafiltrations-Membranen	Millipore
Brand Fluorometer-Platten	Brand
Benzonase	Roche
CryoCaps	Molecular Dimension
Cryoschem M Kristallisationsplatten	Hampton Research
Crystal Clear Sealing Tape	Henkel

---

Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM) Zellkulturmedium	Invitrogen
DNA- und Proteinmarker	Thermo Scientific
Falcon-Probenröhrchen, Tubes	Sarstedt
Filtropur S 22 / 45 µm Filtermembranen	Sarstedt
GenJet Gel Extraction Kit	Thermo Scientific
GeneJet Plasmid Mini bzw. Midi Prep Kit	Thermo Scientific
HisTrap HP 5 ml	GE Healthcare
Intelli 96-well Kristallisationsplatten	Art Robbins Instruments
Kristallisations-Kits	Hampton Research
Kryoloops	Hampton Research
Magnetic Cryo Vials	Molecular Dimensions
NucleoSpin Tissue DNA Isolations-Kit	Macherey-Nagel
OptiMEM Transfektionsmedium	Invitrogen
pGEM-T <sup>®</sup> Easy Vector Systems	Promega
Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit	Thermo Scientific
Poly-L-Lysin	Invitrogen
PVDF-Immobilon-P Transfer Membrane	Millipore
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Scientific
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific
Restriktionsenzyme	Fermentas
Roti-NC Nitrozellulose-Blottingmembran	Carl Roth
RotiMount FluorCare	Carl Roth
RPMI-1640 Zellkulturmedium	Invitrogen
Spectropor Dialyseschläuche	Carl Roth

---

---

Superdex 75 16/60 prep grade	
Gelfiltrationssäule	GE Healthcare
Superdex 200 16/60 prep grade	
Gelfiltrationssäule	GE Healthcare
Tantalum Cluster Derivatization Kit	Jena Bioscience
Trypsin	Invitrogen
Turbofect Transfection Reagent	Thermo Scientific
Zellkulturplatten (6-well, 24-well)	VWR

---

Tab. 4: Auflistung aller verwendeten Kits, Reagenzien, Säulen und sonstiger Materialien.

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Klonierung der CT441-Expressionskonstrukte

#### 3.2.1.1. DNA-Isolation aus *C. trachomatis*

Eine Zellsuspension von HEp2-Zellen, infiziert mit *C. trachomatis* L2/434/Bu, wurde für die Isolation der genomischen DNA für die Klonierung des *ct441*-Gens vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene zur Verfügung gestellt. Zur Isolation der genomischen DNA wurde das NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Die DNA-Aufreinigung erfolgte anhand des Hersteller-Protokolls.

Die Konzentration der isolierten DNA wurde anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt und Aliquots bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.2.1.2. Amplifikation der DNA zur Klonierung der CT441-Vollängen- und Domänenkonstrukte mittels PCR-Oligonukleotiden

Zur Herstellung der Amplikons für die Klonierung der einzelnen CT441-Konstrukte wurden die jeweils korrespondierenden Oligonukleotid-Paare (Tab 12, Anhang) in der PCR-Reaktion verwendet. Der PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Accuprime Reaktions-Puffer (10x):	5 µl
Accuprime Pfx-Polymerase (2,5 Units):	1 µl
Oligonukleotide (5 pmol/µl):	1 µl
DNA ( <i>C. trachomatis</i> , ca. 50 ng/µl):	1 µl
Nuklease-freies Wasser:	41,5 µl

Die Amplifikation wurde im Gerät PCR T Gradient (Biometra) mit folgendem Programm durchgeführt:

1. Anfangsdenaturierung:	95°C, 10 min	
2. Denaturierung:	95°C, 2 min	} 30 Zyklen
3. Oligonukleotid-Anlagerung:	55°C, 30 s	
4. Elongation:	74°C, 2 min	
5. Abschlusselongation:	74°C, 10 min	
6. Abkühlung:	4°C	

Danach wurden die PCR-Amplifikate mittels präparativer Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 3.2.1.3.) und unter anschließender Verwendung des GeneJet Gel Extraction Kits (Thermo Scientific) aufgereinigt, um die an der PCR-Reaktion beteiligten Substanzen zu entfernen. Die Konzentration der gereinigten DNA wurde in einem weiteren analytischen Lauf im Agarosegel mit Hilfe eines mitgeführten Markers bekannter Konzentration abgeschätzt. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.2.1.3. Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese

Alle PCR-Amplifikate wurden zur Qualitätsüberprüfung und für die präparative Aufreinigung elektrophoretisch in einem Ethidiumbromid-haltigen 1-1,5 %igen Agarosegel in 1 x TAE-Puffer aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte für 1 h bei 70 V. Mittels UV-Licht wurden die DNA-Banden anschließend analysiert.

<i>TAE-Puffer (50 x):</i>	Tris:	242,0 g
	Eisessig:	57,1 ml
	EDTA-Lösung	100,0 ml einer 0,5 molaren EDTA-Lösung, pH 8,0 ad 1 l Aqua bidest.

<i>Ethidiumbromid:</i>	10 mg/ml Stammlösung
	1 µg/ml im Agarosegel eingesetzt

### 3.2.1.4. Herstellung des CT441-Konstruktes

#### 3.2.1.4.1. Ligation des *ct441*-PCR-Amplifikates in den pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor

Aufgrund der erschwerten, direkten Ligation des *ct441*-PCR-Amplifikates in den pQE30 Pri-Expressionsvektor, erfolgte zunächst die Zwischenklonierung unter Verwendung des pGEM<sup>®</sup>-T Easy Systems (Promega). Hierfür wurde das gereinigte PCR-Amplifikat zunächst am 3'-Ende einer Polyadenylierungsreaktion nach folgendem Protokoll unterzogen:

Taq-Polymerase 10x Reaktions-Puffer:	1 µl
dATP:	0,2 mM
Taq-Polymerase (5 Units):	1 µl
Nuklease-freies Wasser:	ad 10 µl

Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 70°C inkubiert und anschließend für die Ligation in den linearisierten pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor, der Poly-Thymidin-Überhänge aufweist, verwendet. Die Ligationsreaktion setzte sich wie folgt zusammen:

2 x Rapid Ligations-Puffer:	5 µl
pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vektor (100 ng/µl):	1 µl
<i>ct441</i> -PCR-Amplifikat:	1 µl
T4 DNA Ligase:	1 µl
Nuklease-freies Wasser:	2 µl

Die im Ansatz enthaltene T4-Ligase verknüpft das *ct441*-Gen mit dem linearisierten pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor zum zirkulären pGEM-T-Easy<sup>®</sup>(*ct441*)-Vektor. Es erfolgte eine Inkubation des Ligationsansatzes über Nacht bei 4°C.

#### **3.2.1.4.2. Transformation des Ligationsproduktes in *E. coli* DH5α**

Die Inkubation von 10 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl eines *E. coli* DH5α-Aliqots erfolgte für 20 min auf Eis. Anschließend wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben und der Gesamtansatz für 1 h 20 min bei 37°C im Thermomixer 5436 (Eppendorf) inkubiert, danach auf einer LB-Agarplatte (mit 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

<i>SOC-Medium:</i>	Hefeextrakt:	0,5% (w/v)
	Trypton:	2% (w/v)
	NaCl:	10 mM
	MgCl <sub>2</sub> :	10 mM
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O:	10 mM
	Glucose:	20 mM
	KCl:	2,5 mM
	in Aqua bidest.	

*LB-Medium:* NaCl: 10,0 g  
Trypton: 10,0 g  
Hefeextrakt: 5,0 g  
ad 1 l mit Aqua bidest.

*LB-Agarplatte:* LB-Medium: 1 l  
Agar: 15,0 g

#### **3.2.1.4.3. Plasmidpräparation**

Zur Anreicherung des pGEM-T-Easy<sup>®</sup>(*ct441*)-Vektors wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Eine Kolonie der Transformationsplatte wurde in 5 ml LB-Medium, versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin, überführt und die Suspension über Nacht unter Schütteln (M22 Minishaker, IKA) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 1,5 ml dieser Kultur als Inokulum für die Anzucht einer 100 ml-Kultur in LB-Medium verwendet, welches 100 µg/ml Ampicillin enthielt. Die Anzucht erfolgte unter Schütteln bei 120 rpm und 37°C über Nacht. Die Präparation der Plasmid-DNA wurde mit dem GeneJet Plasmid Mini Prep Kit (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration der gereinigten Plasmid-DNA wurde durch einen Lauf im Agarosegel abgeschätzt (Abschnitt 3.2.1.3.).

#### **3.2.1.4.4. Restriktionsverdau des pGEM<sup>®</sup>-T Easy(*ct441*)-Vektors und des pQE30 PrI-Expressionsvektors**

Bei der Amplifikation der DNA für das *ct441*-Vollängen-Konstrukts (Abschnitt 3.2.1.2.) wurde durch die Oligonukleotide am 5'-Ende und am 3'-Ende eine *PaeI*- bzw. *KpnI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Mit den FastDigest Restriktionsenzymen *PaeI* und *KpnI* (Thermo Scientific) wurde der pGEM-T-Easy<sup>®</sup>(*ct441*)-Vektor sowie der Expressionsvektor pQE30 PrI für 20 min bei 37°C mit folgendem Protokoll in einem präparativen Reaktionsansatz geschnitten:



Restriktions-Puffer (10x):	30 µl
Fast Digest Restriktionsenzyme:	5 µl
DNA (100 ng/µl):	10 µl
Nuklease-freies Wasser:	250 µl

Die Restriktionsansätze wurden mit Hilfe der präparativen Agarosegelelektrophorese und unter Verwendung des GeneJet Gel Extraction Kits (Thermo Scientific) aufgereinigt (Abschnitt 3.2.1.3.). Anschließend erfolgte die Ligation der ausgeschnittenen *ct441*-DNA in den linearisierten pQE30 PrI-Expressionsvektor, gefolgt von Transformation in *E. coli* DH5α und Plasmidpräparation analog zur bereits beschriebenen Methodik (Abschnitt 3.2.1.4. bis 3.2.1.6.).

Zur Überprüfung, ob das *ct441*-Gen korrekt im pQE30 PrI-Expressionsvektor vorlag, wurde ein doppelter Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen *PaeI* und *KpnI* durchgeführt und mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Konnte eine Restriktion des *ct441*-Gens aus dem Expressionsvektor beobachtet werden, erfolgte die Verifizierung der Nukleotidsequenz mittels Sequenzierung durch die Firma Eurofins MWG Operon.

### **3.2.1.5. Herstellung der CT441-Domänen-Konstrukte**

Zur Herstellung der Expressionsvektoren für die Domänenkonstrukte (Abb. 6) konnte eine direkte Ligation der jeweiligen PCR-Amplifikate in den Expressionsvektor pQE30 PrI durchgeführt werden. Die Ligation, Transformation und Plasmidpräparation erfolgte wie im Abschnitt 3.2.1.4. beschrieben. Alle Expressionskonstrukte wurden zur abschließenden Überprüfung der Nukleotidsequenz ebenfalls sequenziert.

### **3.2.1.6. PCR-Mutagenese zur Inaktivierung der Proteaseaktivität und zur Modifikation des GIGV-Loops der PDZ-Domäne**

Zusätzlich wurde in den Expressionskonstrukten zur Herstellung der modifizierten CT441-Konstrukte (Abb. 6) das Serin 455 im aktiven Zentrum gegen Alanin (S455A)

mit Hilfe des QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene) ausgetauscht. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes hierfür lautet:

10x Reaktions-Puffer:	5 $\mu$ l
Konstrukt-DNA:	1 $\mu$ l (50 ng)
Oligonukleotide (fwd und rev):	je 1 $\mu$ l (125 ng)
dNTP-Mix:	1 $\mu$ l
Nuklease-freies Wasser:	ad 50 $\mu$ l
Pfu-Polymerase:	1 $\mu$ l (2,5 U/ $\mu$ l)

PCR-Mutagenese-Parameter:

1. Anfangsdenaturierung:	95°C, 10 min	} 18 Zyklen
2. Denaturierung:	95°C, 30 s	
3. Oligonukleotid-Anlagerung:	55°C, 30 s	
4. Elongation:	68°C, 8 min	
5. Abschlusselongation:	68°C, 10 min	
6. Abkühlung:	4°C	

Zum Abbau der parentalen Konstrukt-DNA wurde 1  $\mu$ l *DpnI* zugegeben und der Amplifikationsansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in *E. coli* XL-1 Blue, gefolgt von einer Plasmidpräparation. Die mutierten Expressionsvektoren wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon zur Verifizierung der S455A-Mutation sequenziert. Die Mutationen I254W, K481A und Q485A wurden in identischer Weise generiert und anschließend verifiziert.

### **3.2.2. Rekombinante Herstellung und Aufreinigung von CT441 sowie der Domänenkonstrukte und CT441-Mutanten**

#### **3.2.2.1. Anzucht in *E. coli***

Die Expressionsvektoren wurden, wie unter Abschnitt 3.2.1.4.2. beschrieben, in den Expressionstamm *E. coli* C43 transformiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. 100

ml LB-Medium, versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin, wurde mit einer Kolonie der Transformationsplatte angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 120 rpm und 37°C inkubiert. Von dieser Kultur wurden 50 ml als Inokulum für 2 L 2TY-Medium, versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin, verwendet und die Anzuchtkultur bei 37°C und 120 rpm geschüttelt (Innova 4230 Kulturschüttler, New Brunswick Scientific). Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,0 wurde die Anzuchtkultur zur Initiation der Proteinsynthese mit IPTG (finale Konzentration 1 mM) versetzt und für 16 h bei 25°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Sedimentation der Bakterien für 30 min bei 5.000 rpm (RC-3B Refrigerated Ultracentrifuge, Sorvall Instruments).

*IPTG:* 1 M (12,5 g / 50 ml Aqua bidest.)

*2TY-Medium:* Trypton: 16 g  
Hefeextrakt: 10 g  
NaCl: 5 g  
ad 1 l mit Aqua bidest.

### **3.2.2.2. Bakterienaufschluss und Aufreinigung mittels Affinitäts- und Größenausschluss-Chromatographie**

Das Bakterienpellet von 2 x 2 Liter-Kulturen wurde in 150 ml Puffer A resuspendiert, mit 200 µl Lysozymlösung versetzt und bei RT für 30 min auf dem Magnetrührer inkubiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Zellsuspension mittels Ultraschall (Sonifier W-250D, Branson) für 30 min (30 s Pulsationsintervall, 30 s Abkühlung) im Eisbad. Zur Abtrennung von nichtlöslichen Zellbestandteilen vom Proteinextrakt wurde die Probe danach für 1 h bei 40.000 rpm bei 4°C zentrifugiert (Optima L-90K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter). Die Proteinaufreinigung erfolgte zunächst mit einer Affinitätschromatographie nach dem IMAC-Verfahren (*immobilized metal affinity chromatography*) unter Verwendung einer His Trap HP-Säule (GE Healthcare). Das rekombinant hergestellte Zielprotein enthält am N-Terminus einen His-Tag, welcher an die Ni<sup>2+</sup>-Ionen der Sepharose-Säulenmatrix bindet. Dadurch kann das Zielprotein vom löslichen Überstand des Bakterienaufschlusses spezifisch separiert werden. Hierfür wurde der Überstand mit Hilfe einer Rollenpumpe (Flussrate 1 ml/min) bei

4°C über die His Trap HP-Säule geleitet. Anschließend erfolgte die kontrollierte Ablösung des Zielproteins von der Ni<sup>2+</sup>-Sepharose-Säulenmatrix unter Verwendung eines Imidazol-haltigen Puffers B mit Hilfe von Stufengradienten am Äkta FPLC System. Die Peakfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und vereinigt.

Nur im Falle der für die Protein-Kristallisation eingesetzten CT441-Varianten erfolgte in einem separaten Zwischenschritt die Abtrennung des N-terminalen His-Tags. Hierfür wurden die von der Affinitätschromatographie stammenden Fraktionen über Nacht bei 4°C gegen 4 Liter PreScission-Puffer dialysiert und anschließend mit PreScission-Protease im Verhältnis 1:10 (1 mg PreScission-Protease spaltet ca. 10 mg Zielprotein) zur Abspaltung des N-terminalen His-Tags versetzt und für 16 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde für 4 h gegen 2 Liter Puffer A dialysiert und die Proteinprobe über eine Ni-Säule und GST-Säule geleitet, wobei ungeschnittenes Zielprotein an der His-Säule und die PreScission-Protease an der GST-Säule gebunden bleibt. Der Durchfluss wurde gesammelt und gegen 4 Liter Gelfiltrationspuffer über Nacht bei 4°C dialysiert. Es erfolgte eine Konzentrierung der dialysierten Probe mittels einer Amicon-Ultrafiltrationsmembran auf ein Volumen von ca. 4 ml.

Alle CT441-Varianten wurden mit Hilfe des Größenausschlusschromatographie-Verfahrens weiter aufgereinigt. Hierfür wurde die Gelfiltrationssäule HiLoad 200 16/60 pg (GE Healthcare) mit 2 Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer voräquilibriert und die Probe anschließend über die Säule geleitet. Die gewonnenen Fraktionen wurden auf eventuelle Verunreinigungen mittels SDS-PAGE überprüft. Saubere Fraktionen wurden vereinigt und je nach benötigter Konzentration für die Kristallisationsexperimente mit der Amicon-Ultrafiltrationsmembran aufkonzentriert. Bis zur weiteren Verwendung wurden 50 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

*LysozymbLösung:* 10 mg/ml Lysozym gelöst in Aqua bidest.

*Puffer A:* 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 5% Glycerol (v/v), pH 8,0

*Puffer B:* 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 5% Glycerol (v/v), pH 8,0

*PreScission-Puffer*: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,4

*Gelfiltrationspuffer*: 20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 7,4

*PreScission-Protease*: 10 mg/ml Stammlösung

### 3.2.3. Charakterisierung der löslichen CT441-Proteine

#### 3.2.3.1. Reinheitsüberprüfung mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse der Proteinreinheit erfolgte mittels Polyacrylamidgelelektrophorese in 12 %igen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Die zu untersuchenden Proben wurden mit 2 x Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit 1 x SDS-Puffer gefüllten Laufkammer bei 50 V für 30 min, danach bei 130 V für 80 min. Die Proteinbanden wurden mit einer Coomassie-Lösung für 30 min gefärbt, gefolgt von einer Inkubation in Entfärberlösung.

*SDS-Puffer (10 x)*:  
SDS: 20,0 g  
Tris-HCl: 60,0 g  
Glycin: 288,0 g  
ad 2 l mit Aqua bidest.

*Coomassie-Lösung*:  
0,1% (v/v) Brilliant Blue R (Sigma)  
50% (v/v) Methanol  
10% (v/v) Essigsäure  
ad 1 l mit Aqua bidest.

*Entfärber*:  
40% (v/v) Methanol  
10% (v/v) Essigsäure  
ad 1 l mit Aqua bidest.

<i>Trenngel (12%):</i>	Acrylamid/Bis:	4,0 ml
	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8:	2,35 ml
	Aqua bidest.:	2,5 ml
	SDS (10%):	100 µl
	APS (10%):	100 µl
	TEMED:	5,0 µl
<i>Sammelgel (5%):</i>	Acrylamid/Bis:	0,65 ml
	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8:	1,25 ml
	Aqua bidest.:	2,5 ml
	SDS (10%):	50 µl
	APS (10%):	50 µl
	TEMED:	6,25 µl
<i>2 x Probenpuffer:</i>	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8:	1,5 ml
	Glycerol:	2,0 ml
	SDS (10%):	2,0 ml
	BPB (1%):	200 µl
	Aqua bidest.:	3,1 ml

### **3.2.3.2. Überprüfung der Homogenität mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS)**

Die Homogenität der Proteinlösungen wurde mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung am Laser Spectroscatter 201 (RiNA) untersucht. Hierfür wurden die Proteinproben 10 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert und 14 µl für die Messung in eine Quarzküvette überführt.

Es wurden jeweils 3 x 10 Messungen pro Proteinprobe zur Bestimmung des hydrodynamischen Partikelradius durchgeführt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe der Software Photomeasure (RiNA).

### **3.2.4. Kristallisation der CT441-Domänen-Varianten**

#### **3.2.4.1. Identifikation initialer Kristallisationsbedingungen**

Die gereinigten, löslichen CT441-Proteinvarianten, die den Anforderungen an Reinheit und Homogenität entsprachen, wurden zur Identifikation initialer Kristallisationsbedingungen verwendet.

Vorbereitend wurden die Proteinproben für 10 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Kristallisation erfolgte anhand des „sitting drop“-Verfahrens in Intelli<sup>®</sup> 96-well Kristallisationsplatten (Art Robbins Instruments), welche mit Hilfe des Phoenix Kristallisationsroboter (Art Robbins Instruments) pipettiert wurden. Verwendet wurden die kommerziellen Kristallisationslösungen Pact Premier 1+2, Structure Screen (Molecular Dimensions), SaltRx 1+2, PegRx 1+2, Peg/Ion 1+2, Crystal Screen 1+2, und Index 1+2 (Hampton Research). Es wurden 100 µl einer 1,5 M NaCl-Lösung im Reservoir vorgelegt. Anschließend wurden darüber 0,3 µl der Proteinlösung mit 0,3 µl der jeweiligen Fällungsmittel-Kristallisationslösung der verwendeten Kits in einer separaten Vertiefung der Kristallisationsplatte vereinigt und die Platten mit *Crystal Clear Sealing Tape* (Hampton Research) verschlossen. Die Platten wurden bei 20°C inkubiert und regelmäßig einer Überprüfung unter dem Lichtmikroskop unterzogen.

#### **3.2.4.2. Optimierung der Kristallisationsbedingungen**

Nach eingehender visueller Inspektion der initialen Kristallisationsbedingungen wurden erste erhaltene Kristalle in 24-Well-Platten manuell optimiert. Hierfür wurde immer nur eine Variable des Kristallisationsansatzes verändert, während alle anderen Komponenten konstant blieben. Zunächst wurden verschiedene Puffer im pH-Bereich von pH 5 bis pH 9 in identischen Konzentrationen getestet. Anschließend wurden verschiedene Metallsalzlösungen sowie Fällungsmittel wie Polyethylenglycol zur Kristalloptimierung eingesetzt. Generell wurden 500 µl einer 1,5 M NaCl-Lösung im Reservoir vorgelegt, 5 µl Proteinlösung mit 5 µl der Kristallisationslösung gemischt und gegen die Reservoirlösung äquilibriert.

### 3.2.5. Probenvorbereitung und Aufnahme der Diffraktionsdaten

#### 3.2.5.1. Probenvorbereitung für röntgenkristallographische Messungen

Zur Lösung des kristallographischen Phasenproblems wurden CT441°-Kristalle in Soakingexperimenten mit Schwermetallsalzen sowie mit Natriumjodid-Lösungen versetzt. Um die fragilen Kristalle nicht mechanisch zu beschädigen, erfolgte die Inkubation direkt in der Kristallisationsplatte. Hierfür wurden CT441°-Kristalle unter Zuhilfenahme des JBS *Tantalum Cluster Derivatization Kit* (Jena Bioscience) analog zum Herstellerprotokoll mit 2 mM  $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}$  für 10 min bis 1 Tag inkubiert. Alternativ hierzu wurde eine NaI-Lösung in einer Konzentration von 500 mM eingesetzt und mit CT441°-Kristallen für den Zeitraum von 1 min bis 2 Stunden inkubiert..

Für Diffraktionsmessungen am Synchrotron wurden Kristalle in Flüssigstickstoff überführt. Zur Verhinderung der Eiskristallbildung, die eine Beschädigung des Kristalls, speziell eine Veränderung der Anordnung der Proteinmoleküle im Kristallgitter zur Folge hätte, wurde eine geeignete „Kryolösung“ identifiziert. Als geeignet erwies sich der Zusatz von 30 % (v/v) Ethylenglykol zur Kristallisationslösung.

#### 3.2.5.2. Aufnahme der Diffraktionsdaten

Zur Aufnahme der Röntgendiffraktionsdaten wurden die nativen CT441°-Kristalle sowie die mit NaI-bzw.  $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}$  getränkten Kristalle an der Beamline 14.2 der Berliner Elektronen-Speicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY) gemessen. Weitere Messungen von nativen Kristallen erfolgten an der Beamline ID29 der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, Frankreich) sowie an den Beamlines PX I und PX III der Swiss Light Source des Paul-Scherrer-Institutes (SLS, Villigen, Schweiz). Alle Messungen erfolgten im Stickstoffgasstrahl bei einer Temperatur von 100 K. Zur Bestimmung der optimalen Wellenlänge der verwendeten Schwermetalle für die *single anomalous dispersion* (SAD)-Experimente wurde ein Fluoreszenz-Scan durchgeführt. Die einzelnen Wellenlängen, einschließlich der für die Messung nativer CT441°-Kristalle, sind im Anhang (Tab. 15) aufgeführt.



### 3.2.6. Strukturaufklärung und Verfeinerung

Diffractionsdaten wurden mit Hilfe der Programme MOSFLM (Leslie & Powell, 2007) bzw. XDS (Kabsch, 2010) indiziert und anschließend mittels des Programms SCALA (Evans, 2006) skaliert.

Die kristallographische Phaseninformation, basierend auf den Messdaten der SAD-Experimente, wurde unter Verwendung der PHENIX Program Suite bestimmt (Adams et al., 2010). Anschließend wurde mit dem dort implementierten Programm AUTOBUILD (Terwilliger et al., 2008) und dem in der CCP4-Suite (Winn et al., 2011) implementierten Programm BUCCANEER (Cowtan, 2006) ein initiales Model der CT441°-Struktur erstellt. Die Vervollständigung des Modells erfolgte durch die manuelle Einpassung fehlender Aminosäurereste in die Elektronendichte mit Hilfe des Programms COOT (Emsley et al., 2010). Für die abschließende Verfeinerung der Atomkoordinaten wurde das in PHENIX enthaltene Programm phenix.refine verwendet (Afonine et al., 2012).

### 3.2.7. Herstellung von SRAP1 in *E. coli*

#### 3.2.7.1. Klonierung des *sra1*-Gens

Nukleotidsequenzvergleiche des von Borth et al. zur Verfügung gestellten SRAP1-Expressionsplasmids mit der Referenzsequenz (siehe NCBI *steroid receptor RNA activator isoform 3* [Homo sapiens], Referenzsequenz AF293026.1, Pruitt et al., 2014) zeigten Unterschiede für den C-Terminus des SRAP1-kodierenden Abschnitts (Borth et al., 2010). Daher wurde mit zwei aufeinander folgenden PCR-Reaktionen dieser Bereich an die Referenzsequenz angepasst und anschließend das *sra1*-Gen mit Hilfe der in Tabelle 14 (Anhang) aufgeführten Oligonukleotide amplifiziert. Das PCR-Produkt sowie der Expressionsvektor pETpre01 wurden mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* geschnitten und unter Verwendung des Ligation Kits (Thermo Scientific) anschließend ligiert. Der Ligationsansatz wurde darauf folgend in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und der Expressionsvektor pETpre01(*sra1*) nach erfolgter Plasmidpräparation sequenziert.

### 3.2.7.2. Aufreinigung von SRAP1

Nach Transformation von pETpre01(*sra1*) in *E. coli* BL21 (DE3) C+RIL erfolgte die rekombinante SRAP1-Herstellung analog zur bereits beschriebenen Methode (Abschnitt 3.2.2.) mit geringen Abweichungen.

Die Anzucht des Expressionsstammes erfolgte in 2TY-Medium unter Verwendung von Ampicillin (100 mg/ml) und Chloramphenicol (34 mg/ml) unter den bereits genannten Bedingungen. Weiterhin wurden die Puffer A (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 M NaCl, 20 mM Imidazol, 5 % (v/v) Glycerol, pH 8.0) und B (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 M NaCl, 500 mM Imidazol, 5 % (v/v) Glycerol, pH 8.0) für die Aufreinigung von SRAP1 verwendet. Die Größenausschlusschromatographie erfolgte mit Hilfe der Gelfiltrationssäule HiLoad 200 16/60 pg (GE Healthcare). Es wurden ca. 10 mg SRAP1 aufgereinigt und Aliquots mit einer finalen Konzentration von ca. 2,5 mg/ml bei -80°C gelagert.

### 3.2.8. Analyse des Einflusses von *C. trachomatis* bzw. CT441 auf SRAP1

#### 3.2.8.1. Spaltung von rekombinantem SRAP1 durch Zelllysate

HEK293-Zellen (4x10<sup>5</sup> Zellen/Well) wurden in Poly-L-Lysin-beschichteten 6-Well-Platten ausgesät und für 1 Tag in DMEM (5% fetales Kälberserum (FKS)) bei 37°C kultiviert. Vorbereitend für die Infektion mit *C. trachomatis* L2/Bu/434 wurde ein Medienwechsel zu RPMI-1640 (10% FKS) an Tag 2 durchgeführt, gefolgt von der Infektion mit 0,3 ifu/Zelle. Die Zellen wurden nach 8, 24, 32 oder 48 Stunden post Infektion (p.i.) geerntet. Hierfür wurden pro Well ca. 200 µl PBS zugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber vorsichtig abgelöst und das Zelllysate in vorgekühlte Eppendorf-Tubes überführt. Zur Analyse der SRAP1-Spaltung wurden die Lysate (22,5 µl) mit rekombinantem SRAP1 (6,25 µg) versetzt und 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 2x Probenpuffer erfolgte der Nachweis von SRAP1 und Spaltprodukten mit Hilfe des Western Blots (Abschnitt 3.2.10.).

In separat durchgeführten Experimenten wurden aus HEK293-Zellen gewonnene Lysate (22,5 µl) entweder mit 2 mM Lactacystin oder 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid-Hydrochlorid (Pefabloc<sup>®</sup>, Fluka) für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend mit rekombinalem SRAP1 (6,25 µg) versetzt. Damit sollte zum Einen der Einfluss der chlamydialen Protease CPAF auf die SRAP1-Degradation ausgeschlossen werden, da CPAF durch Lactacystin effektiv inhibiert wird, und zum Anderen die Spaltung durch zelluläre Proteasen minimiert werden (Huang et al., 2008). Daneben wurde dieses Experiment mit HEp2-Zellen durchgeführt, um eventuelle HEK293-Zell-spezifische Einflüsse auszuschließen.

### **3.2.8.2. Spaltung von rekombinalem SRAP1 durch CT441**

In diesem Experiment sollte untersucht werden, welchen Einfluss rekombinant hergestelltes CT441 auf SRAP1 hat. Hierfür wurde rekombinantes CT441 (5,2 µg) mit im Überschuss vorliegenden SRAP1 (6,25 µg) versetzt und für 4 h bei 37°C inkubiert. Zur zeitabhängigen Verfolgung des SRAP1-Abbaus wurden Proben nach 5, 10, 30 min sowie nach 1, 2 und 4 Stunden in 2x Probenpuffer aufgenommen und mittels Western Blot analysiert. Als Negativkontrolle fungierte CT441<sup>o</sup>, welches mit SRAP1 für 4 Stunden ebenfalls bei 37°C inkubiert wurde. In diesem Experiment wurde zudem CT441 mit Lactacystin unter identischen Bedingungen, wie in Abschnitt 3.2.8.1. beschrieben, in einer Kontrollreaktion versetzt.

<i>PBS:</i>	8 g NaCl
	0,2 g KCl
	1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	ad 1 l Aqua bidest., pH 7,4

### 3.2.8.3. Spaltung von transient produziertem SRAP1 durch CT441

HEK293 Zellen, wurden wie im Abschnitt 3.2.8.1. beschrieben, ausgesät und kultiviert. Am Tag 2 erfolgte die transiente Transfektion mit dem SRAP1-kodierenden pCMV(*sra1*)-Vektor. Für jeden Well wurde folgendes Protokoll verwendet:

Es wurden 4 µg Vektor-DNA mit 250 µl OptiMEM Transfektionsmedium sowie parallel 5 µl Turbofect Transfektionsreagenz mit 250 µl OptiMEM-Medium für 5 min in einem Eppendorf-Tube inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze zu einem Transfektionsansatz vereinigt und für 20 min bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich erfolgte der Austausch des DMEM-Zellkulturmediums in den Zellkultur-6-Well-Platten gegen 2 ml OptiMEM-Medium. Darauf folgend wurden nach Zugabe des Transfektionsansatzes zu den ausgesäten HEK293-Zellen die Zellkulturplatten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 5 Stunden wurde ein Medienwechsel gegen 5 ml RPMI-1640 (enthält 10% FKS) pro Well durchgeführt, gefolgt von einer Inkubation der Zellen über Nacht bei 37°C. Am Tag 4 wurden die Zellen in 200 µl PBS/Well geerntet und mit rekombinantem CT441 versetzt. Nach Inkubation für 4 Stunden bei 37°C wurden die Proben mit 2x Probenpuffer versetzt und mittels Western Blot analysiert.

### 3.2.8.4. Analyse der SRAP1:CT441 Interaktion in zellulärer Umgebung

Am Tag 1 wurden HEK293-Zellen (4 x 10<sup>5</sup> Zellen/Well) unter bekannten Bedingungen ausgesät und kultiviert, gefolgt von transienter Transfektion mit 1 µg Vektor/well an Tag 2. Am Tag 3 erfolgte die Infektion mit *C. trachomatis* L2/Bu/434 (0,9 ifu/Zelle), mit sich anschließender Kultivierung in RPMI-1640 (10% FKS) bei 37°C. Die Zellen wurden analog zur publizierten Prozedur von Chen et al. (2012) nach 8, 24, 32 und 48 Stunden in 200 µl einer 8 M Harnstoff/Benzonase-Lösung aufgenommen und mit 250 µl 2x Probenpuffer versetzt. Der Nachweis von SRAP1 erfolgte mittels Western Blot. Zur Kontrolle der Zell-Viabilität erfolgte die zusätzliche Detektion von β-Aktin als spezifisches Markerprotein.

*Harnstoff-Lösung (8 M):* 4,8 g Harnstoff  
ad 10 ml Aqua bidest.  
150 µl (25 U/µl) Benzonase-Nuklease (Roche)

### **3.2.9. Immunfluoreszenzfärbungen zur Analyse der CT441:SRAP1-Lokalisation**

#### **3.2.9.1. Zellanzucht, Transfektion und Infektion für Immunfluoreszenzfärbungen**

Für die Analyse der Lokalisation und Interaktion von CT441 und SRAP1 mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden humane HEK293-Zellen kultiviert, mit dem SRAP1 kodierenden pCMV(*sra1*)-Vektor transfiziert und mit *C. trachomatis* L2/434/Bu infiziert. Zunächst wurden hierfür HEK293-Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen/Well) auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen (d = 1 cm) in 6-Well-Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die transiente Transfektion erfolgte nach der bereits beschriebenen Methodik mit 4 µg Vektor/Well. Anschließend wurden die HEK293-Zellen mit *C. trachomatis* L2/434/Bu mit einer Infektionsdosis von 0,2 ifu/Zelle infiziert und unter den genannten Kultivierungsbedingungen für eine Dauer von 24 bis 48 Stunden inkubiert.

#### **3.2.9.2. Fixierung von Zellen für Immunfluoreszenzfärbungen**

Das RPMI-1640-Zellkulturmedium wurde nach 24, 32 bzw. 48 Stunden p. I. abgenommen und die auf Deckgläschen kultivierten HEK293-Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Für die Fixierung wurden die Zellen mit 1 ml Methanol überschichtet. Die Zellkultur-6-Well-Platten wurden anschließend bis zur Verwendung der Deckgläschen in der Immunfluoreszenzfärbung bei -20°C gelagert.

#### **3.2.9.3. Immunfluoreszenzfärbungen und Mikroskopie**

Die Lokalisation von CT441 und SRAP1 in mit *C. trachomatis* L2/434/Bu infizierten HEK293-Zellen wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Zunächst wurden die Deckgläschen mit fixierten HEK293-Zellen 3 x mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Blockierung mit FACS-Puffer für 1 h. Nach

dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern (Verdünnung in FACS-Puffer, siehe Tab. 5) gegen CT441 bzw. SRAP1 für 1 h.

Antikörper	eingesetzte Verdünnung	Bezugsquelle/Eigenschaft
Maus-anti-CT441	1:1000	zur Verfügung gestellt von Prof. Guangming Zhong, University of Texas, San Antonio, USA
Kaninchen-anti-SRAP1	1:250	Santa Cruz
Ziege-anti-Kaninchen	1:100	Cell Signaling, FITC gekoppelt
Affe-anti-Maus	1:250	Cell Signaling, Cy5 gekoppelt

Tab. 5 : Übersicht aller für die Immunfluoreszenz-Experimente verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen für 1 h mit den fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern (Verdünnung in FACS-Puffer, siehe Tab. 5,) im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 3 x mit PBS und 1 x mit Aqua bidest. gewaschen und die Deckgläschen auf Objektträgern in einem Tropfen RotiMount FluorCare fixiert. Bis zur Analyse der Fluoreszenzfärbung am Laser-Scanning-Mikroskop LSM Meta 510 (Zeiss) wurden die Objektträger bei 4°C dunkel gelagert. Die Auswertung der LSM-Fluoreszenzbilder erfolgte mit Hilfe der Software Axiovision LE (Zeiss).

*FACS-Puffer:*

- 500 ml PBS
- 5% (w/v) BSA
- 0,01% (v/v) NaN<sub>3</sub>
- 1% (v/v) humanes Serum oder hitze-inaktiviertes humanes Plasma (zur Verfügung gestellt vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universität zu Lübeck)

### 3.2.10. Western Blots zur Analyse der Interaktion zwischen SRAP1 und *C. trachomatis* bzw. CT441

Für die Analyse des SRAP1-Abbaus durch Zelllysate sowie der CT441-SRAP1-Interaktion wurde u.a. die Western Blot-Methode verwendet. Zunächst erfolgte hierfür eine Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.2.3.1.). Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe des semi-dry-Verfahrens auf Nitrozellose- bzw. PVDF-Membranen transferiert. Dafür wurden vorbereitend das Blot-Papier sowie die Membranen in Blot-Laufpuffer für 1 h inkubiert. Der Proteintransfer auf die Membranen erfolgte bei 75 V für 2,5 h in einer Blot-Kammer unter Verwendung von gekühltem Laufpuffer. Die Verifikation der Proteingröße erfolgte mit Hilfe eines mitgeführten Proteinmarkers. Nach Spülung der Membran mit 2 x 10 ml T-TBS wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran mit Blockierungsmilch schüttelnd (150 rpm) für 1 h bei RT blockiert. Nach erneutem Waschen der Membranen mit 2 x 10 ml T-TBS erfolgte die Inkubation der Membranen mit dem jeweiligen Primärantikörper unter Schütteln (150 rpm) bei 4°C über Nacht (Tab. 6).

Antikörper	eingesetzte Verdünnung	Bezugsquelle/Eigenschaft
Maus-anti-CT441	1:1000	hergestellt von Dr. Kensuke Shima, Universität zu Lübeck
Maus-anti-CT441	1:1000	zur Verfügung gestellt von Prof. Guangming Zhong, University of Texas, San Antonio, USA
Kaninchen-anti-SRAP1	1:2000	Santa Cruz
Kaninchen-anti-GAPDH	1:2000	Cell Signaling
Kaninchen-anti-β-Aktin	1:2000	Cell Signaling
Anti-Maus-IgG	1:2000	Cell Signaling, HRP gekoppelt
Anti-Kaninchen-IgG	1:2000	Cell Signaling, HRP gekoppelt
Anti-Maus-IgG	1:10000	Cell Signaling, AP gekoppelt
Anti-Kaninchen-IgG	1:10000	Cell Signaling, AP gekoppelt

Tab. 6: Übersicht der im Western Blot verwendeten polyklonalen Primärantikörper (gelb markiert) und kommerziellen Sekundärantikörper (blau markiert).

Nach dreimaligem Waschen mit T-TBS für jeweils 10 min wurden die Membranen mit HRP- oder AP-gekoppelten Sekundärantikörpern für 1 h bei RT inkubiert (Tab. 6). Anschließend wurden die Membranen gewaschen und mit HRP- bzw. AP-spezifischen Substratlösungen versetzt. Die durch den Substratumsatz entstehenden spezifischen Proteinbanden wurden mit dem Vilber Lourmat Fusion Fx7 Imager dokumentiert. In einigen Fällen wurden die Membranen nach dem Nachweis von CT441 bzw. SRAP1 für eine Zweitfärbung gegen GAPDH bzw.  $\beta$ -Aktin wieder verwendet. Die Ablösung der Primär- und Sekundärantikörper der Erstfärbung von der Membran erfolgte durch die Inkubation der Membranen mit 2 ml Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) für 15 min. Anschließend erfolgte die Färbung von GAPDH bzw.  $\beta$ -Aktin nach der o.g. Vorgehensweise.

<i>Blot-Laufpuffer:</i>	3 g Tris 14,4 g Glycin 200 ml Methanol ad 1 l mit Aqua bidest.
<i>TBS 10x):</i>	2,42 g Tris 80 g NaCl ad 2 l Aqua bidest., pH 7,6
<i>T-TBS:</i>	100 ml TBS (10x) 1 ml Tween-20 ad 1 l Aqua bidest.
<i>Blockierungsmilch:</i>	5 g Trockenmilch 100 ml T-TBS
<i>HRP-Substrat:</i>	Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) oder SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)
<i>AP-Substrat:</i>	33 $\mu$ l BCIP-Lösung (15 mg BCIP in DMF) 66 $\mu$ l NBT-Lösung (30 mg NBT in 70% DMF)



### 3.2.11. Chaperon-Assay (modifiziert nach Buchner et al.)

Die Analyse der Chaperonaktivität von CT441 erfolgte mit dem von Buchner et al. (1998) entwickelten Assay. Die Grundlage des Testsystems ist die Umsetzung von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat und Coenzym A, katalysiert durch das Enzym Citratsynthase. Bei einer Temperatur von 43°C wird die Citratsynthase reversibel in inaktive Intermediärzustände überführt, jedoch nicht denaturiert. Durch Zugabe eines Proteins mit Chaperonaktivität wird die aktive Citratsynthase stabilisiert und das bereits inaktive Intermediat in den aktiven Zustand zurück überführt (Abb. 7).



Abb. 7: Darstellung der thermischen Entfaltungszustände der Citratsynthase (modifiziert nach Buchner et al., 1998). N: nativer Zustand, I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub>: Intermediärzustände, A: Aggregate.

Durch das bei der Reaktion entstehende Coenzym A erfolgt zudem im Testsystem die Spaltung von DTNB, einhergehend mit einer Gelbfärbung der Reaktionslösung. Die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 412 nm wiederum dient als Messgröße für die Bestimmung der Aktivität der Citratsynthase.

Hinsichtlich der Chaperonaktivität wurden CT441, CT441°, sowie die verkürzten Konstrukte CT441° ΔDUF3340, CT441 NTD&PDZ und CT441 NTD getestet. Als Negativkontrollen diente die Verwendung von BSA, welches keine Chaperonaktivität besitzt sowie des Puffers als interne Assaykontrolle. Zunächst wurde ein Citratsynthase/Proteinmix hergestellt, der 3 µl (7,5 µM) Citratsynthase sowie 148 µl Proteinlösung (20 µM Protein in Hepespuffer) enthielt. Nach Inkubation des Citratsynthase/Proteinmixes bei 43°C wurden 15 µl entnommen, zu 740 µl Reaktionslösung (695,5 µl TE-Puffer, 15 µl Oxalacetat, 22 µl Acetyl-CoA, 7,5 µl DTNB) pipettiert und die Absorption für 1 min im Cary-Photometer (Varian) gemessen. Die Reaktionslösung für acht Messungen (0, 30, 120 210, 300, 390 und 480 s) setzte sich wie in Tab. 7 aufgelistet zusammen:

<b>Substanz</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
TE-Puffer	5564 $\mu$ l	
Oxalacetat	120 $\mu$ l	200 mM
DTNB	60 $\mu$ l	100 mM
Acetyl-CoA	176 $\mu$ l	150 mM
Citratsynthase/Protein-Mix	15 $\mu$ l	CS 3 nM/Protein 0,4 $\mu$ M

Tab. 7: Zusammensetzung der Messlösung im Chaperon-Assay.

Die Chaperonaktivität von CT441, CT441° bzw. der CT441-Domänenkonstrukte wurde in 3 unabhängigen Messungen bestimmt. Die Auswertung der Absorptionsdaten erfolgte mit dem Programm Prism5, (GraphPad Software Inc.).

<i>Trispuffer:</i>	50 mM Tris
<i>TE-Puffer:</i>	50 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 8,0
<i>Hepes-Puffer:</i>	40 mM Hepes, pH 7,5
<i>Oxalacetat:</i>	10 mM (1,32 mg/ml in Trispuffer)
<i>DTNB (Ellman´s Reagenz):</i>	10 mM (3,96 mg/ml in TE-Puffer)
<i>Acetyl-CoA:</i>	5 mM (4,05 mg/ml in TE-Puffer)
<i>Citratsynthase:</i>	7,5 $\mu$ M (verdünnt aus 60 $\mu$ M-Lsg., 2,79 mg/ml in Hepes-Puffer)

### 3.2.12. Fluoreszenzbasierter Aktivitätstest zur Identifizierung eines geeigneten Substratpeptids und zur Bestimmung der CT441-Proteaseaktivität

Zur Charakterisierung der CT441-Proteaseaktivität wurde ein fluoreszenzbasierter Protease-Aktivitätstest etabliert. Die eingesetzten Substratpeptide sind C-terminal mit 7-amino-4-methylcoumarin (AMC)-markiert (Tab. 9). Das durch die Enzymreaktion freiwerdende AMC wurde bei einer Wellenlänge von 360 nm angeregt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte in *relative fluorescence units* (RFU) bei einer Wellenlänge von 460 nm im Fluorometer FLx800 (BioTek) und entspricht einem linearen Substratumsatz (Abb. 9). Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von 37°C kontinuierlich über 35 min durchgeführt, wobei alle 10 s die Fluoreszenzintensitäten aufgezeichnet wurden.

#### 3.2.12.1. Bestimmung des pH-Optimums

Zunächst musste jedoch das pH-Optimum für den Substratumsatz durch CT441 mit Hilfe verschiedener Puffersubstanzen getestet werden. Als Testsubstrat wurde das Reporterpeptid DA3-AMC (Tab. 9) verwendet. Die Zusammensetzung des Messansatzes ist im Folgenden dargestellt:

<b>Substanz</b>	<b>Volumen/Well</b>	<b>Volumen/3-fach Ansatz</b>
CT441 (10 µM)	5,2 µl	15,6 µl
DA3-AMC (100 µM)	1,6 µl	4,8 µl
Pufferlösung (ad 80 µl)	73,2 µl	219,6 µl

Tab. 8: Zusammensetzung der Messlösung zur Identifizierung des pH-Optimums im Proteaseaktivitätstest.

Getestet wurden Puffer im Bereich pH 5-10, wobei sich die Pufferzusammensetzung mit 50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 9.0 in einem ersten Experiment als geeignet herauskristallisierte. Daraufhin wurde eine pH-Feinanalyse des Trispuffers

durchgeführt. Der optimale Messpuffer enthielt 50 mM Tri, 150 mM NaCl, pH 9,5 (Abb. 8).

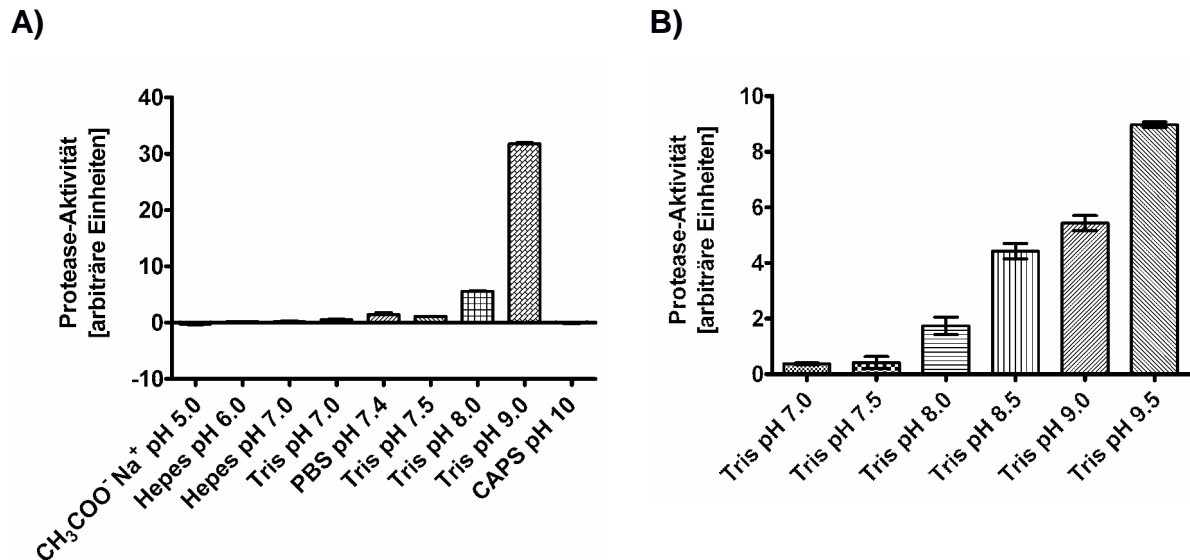


Abb. 8: Bestimmung des pH-Optimums für die Messungen der CT441-Proteaseaktivität. **(A)** Verschiedene Puffer im pH-Bereich von 5-10 wurden getestet. Tris-haltige Puffer ab pH 8 führten zur Spaltung des verwendeten Substratpeptides DA3-AMC. **(B)** Die pH-Feinanalyse führte zur Identifikation des optimalen Tris-Puffers mit pH 9,5.

### 3.2.12.2. Ermittlung des RFU/AMC-Korrelationsfaktors

Unter Verwendung von freiem AMC in verschiedenen Konzentrationen (5  $\mu$ M - 7,5 mM) und CT441 (10  $\mu$ M) wurde eine Eichmessung vorgenommen, um die Mess-Signalstärke (*relative fluorescence unit*, RFU) mit der Konzentration vom freiem AMC zu korrelieren (Abb. 9). Anhand des Anstieges konnte ermittelt werden, dass der RFU/AMC-Korrelationskoeffizient 4,79 beträgt, d.h. 1 nmol AMC führt zu einem Signal von 4,79 RFU, bzw. 1 RFU entspricht ca. 0,21 nmol freiem AMC.

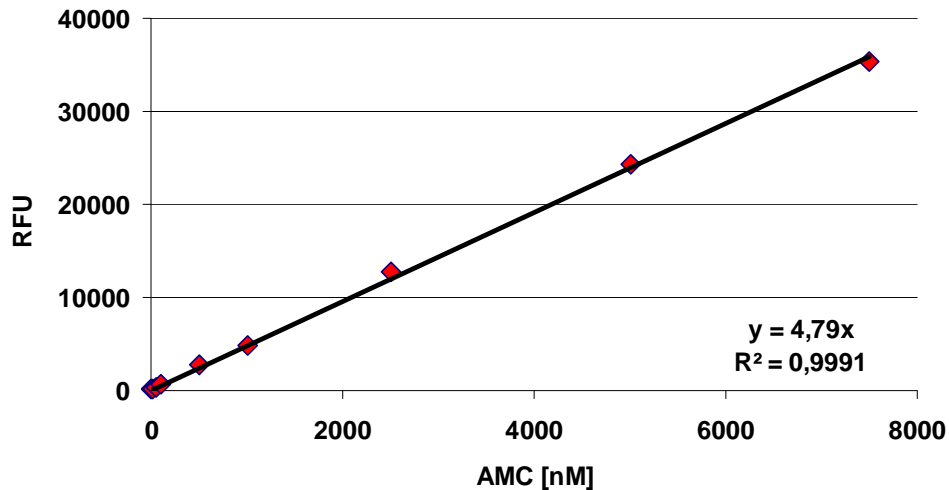


Abb. 9: Eichgerade zur Bestimmung des RFU/AMC-Korrelationskoeffizienten unter Verwendung von freiem AMC.

### 3.2.12.3. Identifizierung eines geeigneten Substratpeptids

Die Bestimmung der Substratspezifität von CT441 erfolgte für die unter Tab. 9 aufgeführten Substratpeptide im optimierten Messpuffer. Folgende Substratpeptide wurden eingesetzt:

Bezeichnung	Zusammensetzung	Molekulargewicht	Beschreibung
DF4-AMC	DTPF-AMC	697,78 g/mol	p65-Spaltstelle
DA3-AMC	DVA-AMC	460,32 g/mol	<i>E. coli</i> Tsp-Substratpeptid
DV7-AMC	DPMFKLV-AMC	1006,27 g/mol	DegP/Q Substrat

Tab. 9: Auflistung der in den Messungen verwendeten Substratpeptide.

DA3-AMC, DF4-AMC und DV7-AMC wurden im Messpuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 9,5) zu einer Konzentration von 100 µM verdünnt. CT441, CT441° und CT441 ΔDUF3340 wurden in 20 mM Tris, 250 mM NaCl, pH 7,4 verdünnt. Die finale Proteinkonzentration für die Analyse der DA3-AMC bzw. DF4-AMC-Spaltung betrug 10 µM; für die Analyse der DV7-AMC-Spaltung 5 µM. Es wurden 40 µl der Proteinlösung mit 40 µl Substratpeptid-haltiger Lösung gemischt und im Fluorometer

gemessen. Als Negativkontrolle bzw. Referenz diente die Messung des Substratpeptid-haltigen Messpuffers ohne Zugabe der Proteaselösung.

Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt und anschließend durch die Subtraktion der Referenzintensitäten sowie die Multiplikation mit dem RFU/AMC Korrelationsfaktor korrigiert.

#### **3.2.12.4. Test verschiedener CT441-Varianten im Protease-Aktivitäts-Test**

Die Analyse der Spaltungsaktivität von CT441 sowie der Konstrukte CT441°, CT441  $\Delta$ DUF3340 und der Mutanten I254W, K481A und Q485A erfolgte mit Hilfe des Substratpeptids DV7-AMC. Das Peptid wurde mit einer Konzentration von 500  $\mu$ M, die CT441-Varianten in einer Konzentration von 5  $\mu$ M eingesetzt. Die Messungen erfolgten nach o.g. Bedingungen.

#### **3.2.13. Analyse der *C. trachomatis*-induzierten Zytotoxizität mittels LDH-Test**

Der Einfluss einer *C. trachomatis*-Infektion auf die Integrität der Plasmamembran von HEK293-Zellen wurde mit Hilfe des LDH-Zytotoxizitäts-Tests untersucht. Diese kolorimetrische Methode erlaubt eine Quantifizierung der resultierenden Zytotoxizität anhand der Messung der katalytischen Aktivität der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH). Die Schädigung der Plasmamembran führt zur Freisetzung von LDH in das Zellkulturmedium und katalysiert in dem eingesetzten Test die Umsetzung von Lactat zu Pyruvat, einhergehend mit der  $\text{NAD}^+$ -Reduktion zu NADH. In einer gekoppelten Enzymreaktion wird farbloses 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (Tetrazolium) durch das Enzym Methämoglobin-Reduktase (Diaphorase) und NADH reduziert. Die reduzierte Form 1,3,5-Triphenylformazan (Formazan) kann als unlöslicher, roter Indikatorfarbstoff bei 490 nm detektiert werden. Die Formazanbildung wiederum ist direkt proportional zur Freisetzung von LDH in das Zellkulturmedium und dient als Indikator für die Zytotoxizität (Abb. 10).

## zerstörte Zelle

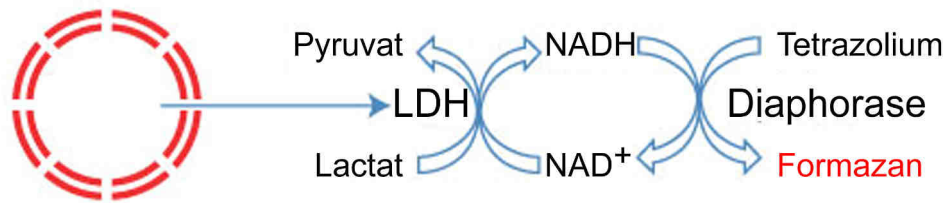


Abb. 10: Schematische Darstellung der LDH-abhängigen Umwandlung von Lactat zu Pyruvat und der gekoppelten Umwandlung von Tetrazolium zu Formazan. Die Bildung von Formazan ist direkt proportional zur LDH-Aktivität (Modifiziert nach Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit Instructions, Thermo Scientific).

Es wurden  $4 \times 10^5$  HEK293-Zellen ausgesät und analog zur bereits beschriebenen Prozedur mit dem SRAP1-kodierenden Vektor transfiziert und mock- bzw. mit *C. trachomatis* (0,9 ifu/Zelle) infiziert (Abschnitt 3.2.8.4.). Nach 0, 8, 24, 32 und 48 Stunden post Infektion (p.i.) wurden 200 µl des Zellkulturmediums abgenommen, für 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und die Überstände bis zur Messung der LDH-Aktivität bei -80°C eingefroren. Für die kolorimetrische Messung der LDH-Aktivität (für Zeitpunkte 0, 8, 24, 32, 48 h p.i., mock-infiziert bzw. *C. trachomatis*-infiziert, jeweils in Doppelmessungen) wurden pro Einzelmessung 50 µl des Überstandes mit 50 µl des Reaktionsmixes (hergestellt entsprechend dem Herstellerprotokoll) in einer 48-Well-Platte versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 µl einer Stopplösung gestoppt. Anschließend erfolgte die Messung der Platte mit Hilfe des Plate Readers Infinite M200 (TECAN) bei den Wellenlängen von 490 nm und 680 nm. Die Messung bei 680 nm diente der Ermittlung des Hintergrund-Absorptionssignals des verwendeten Messinstruments. Die Messwerte des Formazan-Absorptionsmaximums bei 490 nm wurden durch die Subtraktion des Hintergrundsignals korrigiert. Insgesamt wurden drei unabhängige HEK293-Zellansätze transfiziert und infiziert (mock bzw. *C. trachomatis*) und alle Messzeitpunkte (0, 8, 24, 32, 48 h p.i.) in Doppelmessungen analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Prism5 (GraphPad Software Inc.).



## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. CT441-Strukturaufklärung und Analyse der proteolytischen Aktivität

#### 4.1.1. Proteinaufreinigung und Qualitätskontrolle von CT441°

Voraussetzung für alle Experimente hinsichtlich der Strukturbestimmung, für die Interaktions- und Lokalisationsstudien im Zusammenhang mit dem humanen Co-Aktivatoren des Östrogenrezeptors (ER $\alpha$ ) SRAP1, sowie für die biochemischen Analysen war die Aufreinigung von CT441 bzw. der Domänenkonstrukte und CT441-Mutanten in ausreichender Qualität und Quantität. Exemplarisch soll an dieser Stelle die Aufreinigung der inaktiven S455A-Mutante (CT441°) näher beschrieben werden. Es konnte mit Hilfe der Affinitätschromatographie und einer sich anschließenden Größenausschlusschromatographie die Aufreinigung von CT441° in hochreiner Form mit einer Gesamtmenge von ca. 200 mg aus vier Litern *E. coli*-Expressionskultur etabliert werden. Der Kurvenverlauf eines repräsentativen Chromatogramms einer Größenausschlusschromatographie gibt einen ersten Hinweis auf die Reinheit des Proteins (Abb. 11).

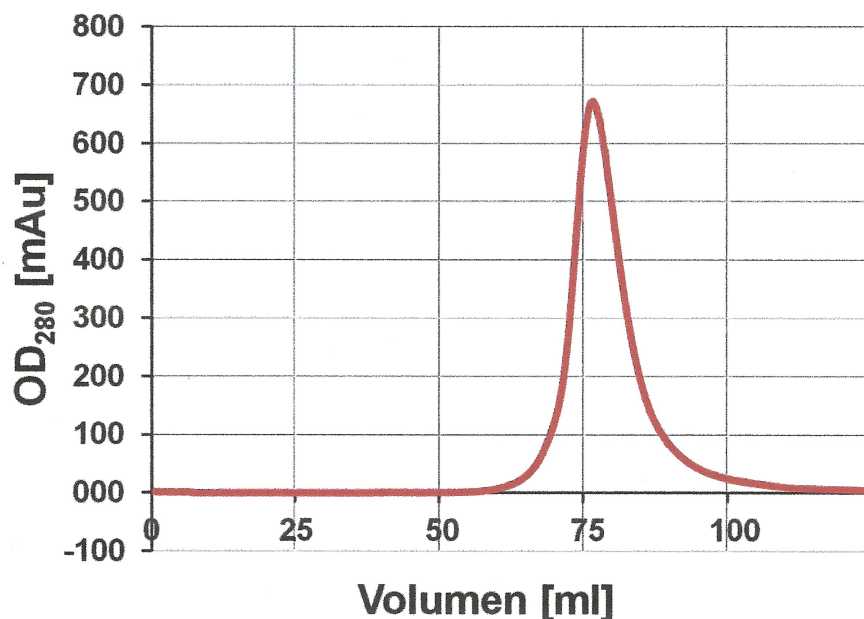


Abb. 11: Chromatogramm der Aufreinigung von CT441° mittels Größenausschluss-Chromatographie. Das Retentionsvolumen korrespondierend zum Scheitelpunkt beträgt ca. 78 ml. Dieses Volumen entspricht einem Molekulargewicht von ca. 68 kDa, basierend auf einer Eichkurve, die unter Verwendung von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht erstellt wurde.



CT441° liegt als Monomer in Lösung vor, da das Peak-Retentionsvolumen von ca. 78 ml einem Molekulargewicht von ca. 68 kDa entspricht. Zur Ermittlung des Molekulargewichts diente eine Eichkurve, die anhand einer Referenzmessung der Gelfiltrationssäule mit Eichproteinen erstellt wurde. Die hohe Reinheit bzw. Qualität des aufgereinigten Proteins spiegelt sich in der weiteren Überprüfung der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE und dynamischer Lichtstreuung (DLS, zur Bestimmung des hydrodynamischen Partikelradius) wider (Abb. 12).

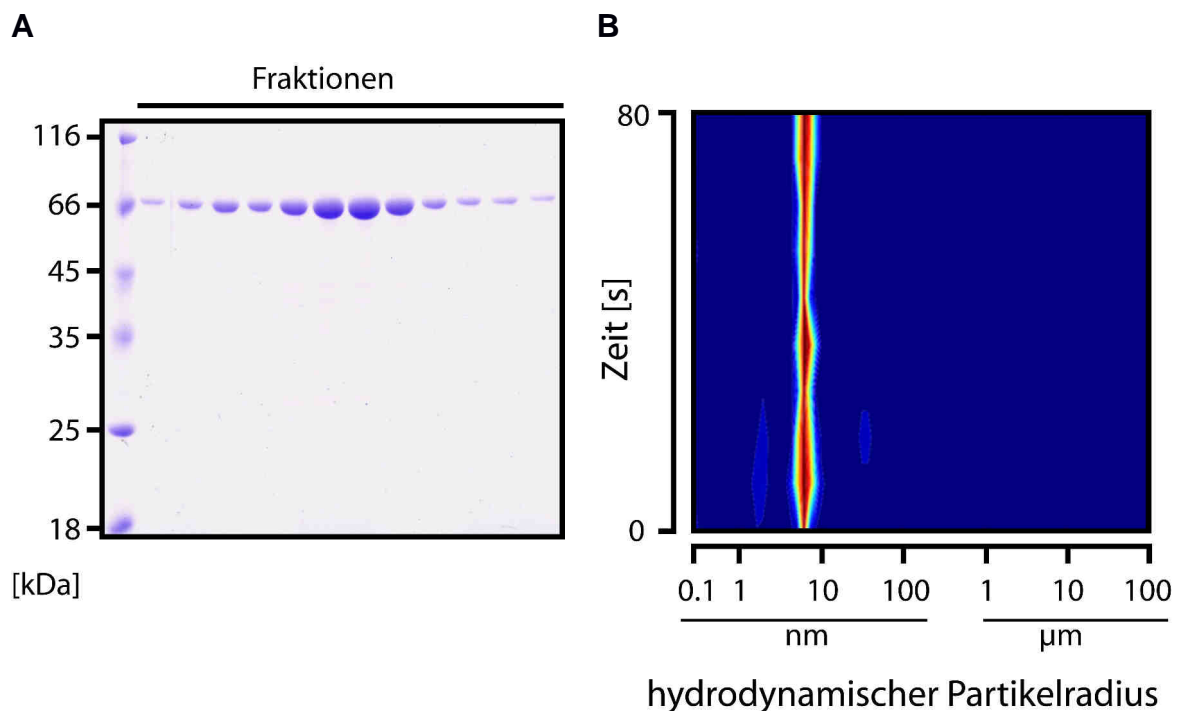


Abb. 12: Überprüfung der Proteinqualität. **(A)** SDS-PAGE der Einzelfraktionen aus der Größenausschlusschromatographie zeigt keine Verunreinigung in einzelnen Proteinfractionen. CT441° ist etwas oberhalb der 66 kDa-Markerbande eindeutig zu erkennen. **(B)** Die Messung des hydrodynamischen Partikelradius einer CT441°-Probe zeigt eine distinkte Bande (in rot) bei einem Partikelradius von ca. 10 nm.

Das gereinigte CT441° wurde auf vielfältigste Weise weiterverwendet. So wurde es u.a. für die Immunisierung von Mäusen zur Herstellung polyklonaler Antikörper verwendet, da kommerzielle anti-CT441-Antikörper nicht erhältlich waren (durchgeführt von Dr. Kensuke Shima, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität zu Lübeck). Des Weiteren wurde CT441° zur Kristallisation eingesetzt und diente als Kontrollprotein bei der Untersuchung der SRAP1:CT441 Interaktion, im Proteaseaktivitätstest und im Chaperon-Assay.

Alle weiteren CT441-Domänenkonstrukte, welche die N-terminale Domäne (NTD) enthielten (CT441, CT441  $\Delta$ DUF3340 bzw. CT441<sup>°</sup>  $\Delta$ DUF3340, CT441 NTD&PDZ, CT441 NTD, sowie die I254W-, K481A- und Q485A-Mutanten, siehe Abschnitt 3.1.3., Abb. 6), konnten ebenfalls aufgereinigt und für die Kristallisation bzw. biochemische Analysen eingesetzt werden. Hingegen erwiesen sich alle CT441-Konstrukte ohne NTD während der Aufreinigung als unlöslich. Somit scheint die NTD essentiell für die Vermittlung der Proteinlöslichkeit zu sein.

#### **4.1.2. Identifikation initialer Kristallisationsbedingungen und Optimierung für CT441<sup>°</sup>**

CT441<sup>°</sup> sowie alle löslichen CT441-Domänenkonstrukte wurden in 96-well-Intelli-Platten (Art Robbins Instruments) unter Verwendung kommerzieller Kristallisationslösungen (s. Abschnitt 3.2.4.1.) für die Kristallisation eingesetzt, wobei nur für CT441<sup>°</sup> Kristalle erhalten werden konnten. Es konnten nach zwei Wochen ca. 30 initiale Kristallisationsbedingungen im pH-Bereich 6,0 - 7,5 bei 20 °C identifiziert werden, wobei die Verwendung von Lösungen mit Polyethylenglykol (PEG) und zweiwertigen Metallsalzen die besten Resultate lieferte.

Die Optimierung der initialen Kristallisationsbedingungen in 24-well-Platten mit Hilfe der *hanging drop vapor diffusion*-Methode (wie in Abschnitt 3.2.4.2. beschrieben) führte zu Kristallen (Abb. 13) in den folgenden Bedingungen:

1. 0,1 M MES pH 6,0, 0,2 M MnSO<sub>4</sub>, 5 % (v/v) PEG 6000, 6 % (v/v) Ethylenglykol,
2. 0,1 M Citrat pH 6,0, 0,05 M ZnCl<sub>2</sub>, 5 % (v/v) PEG6000, 9 % (v/v) Ethylenglykol.

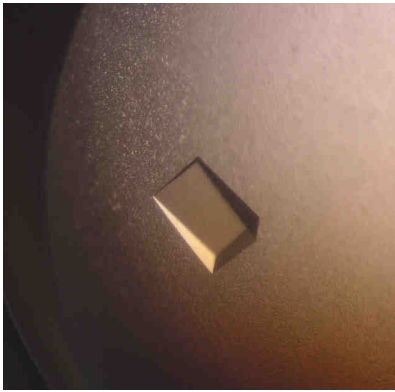
**A****B**

Abb. 13: Beispielabbildungen für CT441°-Kristalle, erhalten **A)** in der  $\text{MnSO}_4$ -Bedingung, **B)** in der  $\text{ZnCl}_2$ -Bedingung.

Hingegen konnten auch nach intensiven Bemühungen für die ebenfalls getesteten CT441-Domänenkonstrukte keine Kristalle gezüchtet werden. Folgende Parameter wurden variiert:

1. Variation der Protein- und Fällungsmittelkonzentrationen,
2. Modifikation der Reservoirolösung (verschiedene NaCl-Konzentrationen, sowie Austausch mit PEG bzw. Glycerol),
3. Impfen mit CT441°-Kristallen,
4. Variation der Temperatur ( $4^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ),
5. Variation der Kristallisationsmethode (*sitting drop vapor diffusion*, *hanging drop vapor diffusion*, Kristallisation in Glaskapillaren),

Zur Ermittlung der experimentellen Phaseninformationen wurden CT441°-Kristalle aus der  $\text{MnSO}_4$ -haltigen Kristallisationsbedingung mit Schwermetall-Lösungen versetzt (Abschnitt 3.2.5.1.). Es konnten für die Sammlung von Diffraktionsdaten  $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}$ -bzw. NaI-haltige CT441°-Kristalle erfolgreich generiert werden.

Für alle erhaltenen CT441°-Kristalle der  $\text{MnSO}_4$ -Bedingung (Abb. 13, A) mit den Dimensionen von ca.  $0.13\text{ mm} \times 0.11\text{ mm} \times 0.08\text{ mm}$  konnte nach intensiver Testung verschiedenster Substanzen (Glyzerin, Ethylenglykol, PEG 400) die folgende optimale Kryolösung durch die Zugabe von 30 % (v/v) Ethylenglykol zur Kristallisationslösung ermittelt werden: 70 mM MES (pH 6.0), 140 mM  $\text{MnSO}_4$ , 3.5% (v/v) PEG 6000, 34.5% (v/v) Ethylenglykol.

### 4.1.3. Strukturbestimmung von CT441°

#### 4.1.3.1. Erstellung des CT441°-Modell

Die für die Proteinstrukturbestimmung mittels Röntgenstrahlung optimierten nativen bzw. mit Schwermetallsalzen versetzten CT441°-Kristalle der  $\text{MnSO}_4$ -Bedingung (Abschnitt 4.1.2.) wurden an der Beamline BL14.2 des BESSY II (Berlin, Deutschland) für die Aufnahme von Diffraktionsdaten verwendet. Im Falle der nativen CT441°-Kristalle konnte ein Datensatz bei einer Wellenlänge von  $0.9184 \text{ \AA}$  bei  $100 \text{ K}$  mit einer maximalen Auflösung von  $2,95 \text{ \AA}$  gesammelt werden ( $a = 86.73 \text{ \AA}$ ,  $b = 183.99 \text{ \AA}$ ,  $c = 209.62 \text{ \AA}$ ,  $\alpha\beta\gamma = 90^\circ$ ; Abb. 14). Die für die Ermittlung der experimentellen Phaseninformation verwendeten CT441°-Kristalle, versetzt mit  $\text{NaI}$  bzw.  $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}$ , wurden bei einer Wellenlänge von  $1,5000 \text{ \AA}$  bzw.  $1,2548 \text{ \AA}$  gemessen und weisen im Vergleich zum nativen Kristall sowohl vergleichbare Maße der Einheitszelle ( $\text{NaI}$ :  $a = 84.74$ ,  $b = 185.92$ ,  $c = 209.07$ ,  $\alpha\beta\gamma = 90^\circ$ ;  $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}$ :  $a = 86.22$ ,  $b = 183.14$ ,  $c = 208.07$ ,  $\alpha\beta\gamma = 90^\circ$ ) als auch die Zugehörigkeit zur Raumgruppe  $\text{P}2_12_12_1$  auf (Tab. 15, Anhang).

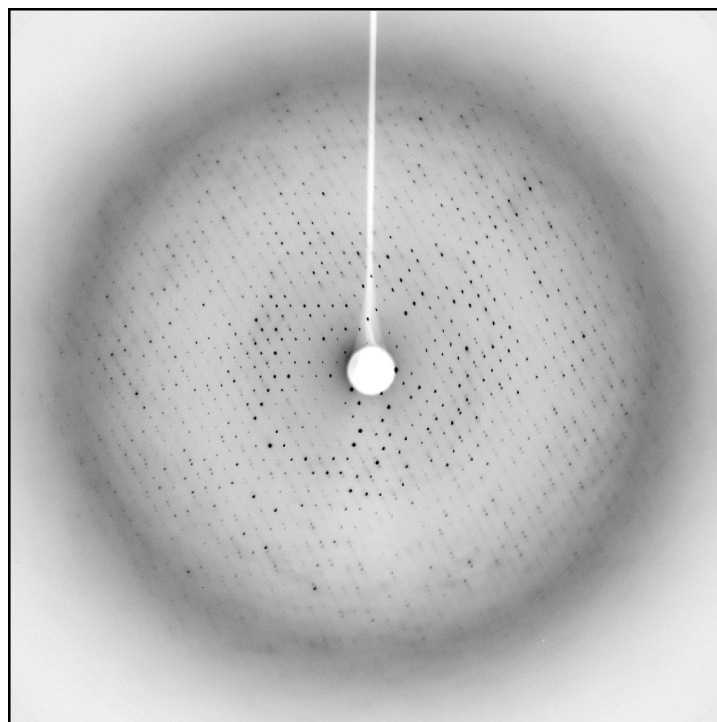


Abb. 14: Diffraktionsbild eines nativen CT441°-Kristalls mit einer maximalen Auflösung von  $2.95 \text{ \AA}$ , gemessen an der Beamline BL14.2, BESSY, Berlin.

Alle Datensätze wurden mit MOSFLM (Leslie & Powell, 2007) bzw. XDS (Kabsch, 2010) indiziert und anschließend mit SCALA (Evans, 2006) skaliert. Die Bestimmung des Matthews-Koeffizienten (Matthews, 1968) ließ vermuten, dass sich 3 bis 4 Moleküle in der asymmetrischen Einheit befanden. Die Matthews-Koeffizienten betragen  $3,96 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  bzw.  $2,97 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ , entsprechend einem geschätzten Flüssigkeitsgehalt von 69% bzw. 58,5%.

Zunächst wurden jedoch mit Hilfe des in der PHENIX Programm Suite (Adams et al., 2010) implementierten Programms AUTOSOL (Grosse-Kunstleve & Adams, 2003; McCoy et al., 2004) die experimentelle Phaseninformation des CT441°-Ta<sub>6</sub>Br<sub>12</sub>-Datensatzes ermittelt. Es konnten 8 Ta<sub>6</sub>Br<sub>12</sub>-Cluster identifiziert werden, wobei hierfür die Auflösung von 4,0 Å auf 6,0 Å reduziert wurde. Mit Hilfe der experimentellen Phasen konnte ein erstes Modell von CT441° bei einer Auflösung von 4 Å mit Hilfe des Programms Phenix AUTOBUILD (Terwilliger et al., 2008) erstellt werden. Die Inspektion dieses Modells in COOT (Emsley et al., 2010) zeigte, dass für drei Monomere erste Sekundärstrukturelemente der C-terminalen Domäne in die Elektronendichte eingepasst wurden. Zudem war die Elektronendichte einiger Helices im Bereich der N-terminalen Domäne von Monomer B erkennbar, ein manueller Einbau von Aminosäuren war jedoch nicht möglich. Daher wurde dieses initiale Modell verwendet, um die Schwermetallpositionen im CT441-Nal-Datensatz (Auflösung von 3,3 Å auf 4,5 Å reduziert) zu bestimmen. Es wurden 61 Iodid-Ion-Positionen identifiziert und mittels COOT (Emsley et al., 2010) überprüft. Die nicht-kristallographische Symmetrie (*non-crystallographic symmetry*, NCS), basierend auf den Iod-Positionen, bestätigte die Anwesenheit von drei CT441°-Monomeren in der asymmetrischen Einheit. Anschließend wurde mit den Phasen des Nal-Datensatzes erneut ein initiales Modell bei einer Auflösung von 3,3 Å unter Verwendung der Programme Phenix AUTOBUILD (Terwilliger et al., 2008) und parallel in BUCCANEER (CCP4-Suite, Cowtan, 2006) gebaut. In diesen Modellen konnten zusätzliche Sekundärstrukturelemente der C-terminalen Domäne identifiziert werden und partiell Helices der N-terminalen Domäne von Monomer B. Nach Überlagerung beider Modelle in PYMOL (DeLano, 2002) und COOT (Emsley et al., 2010) wurden Aminosäurereste entfernt, die nicht eindeutig der Elektronendichte zuzuordnen waren. Nach Überlagerung aller drei „bereinigten“ Monomere wurde das am Besten definierte Monomer B für den molekularen Ersatz mittels PHASER (McCoy et al., 2007) in den höchstauflösenden Datensatz (Auflösung 2,95 Å) verwendet.

Hierbei wurden drei Monomere durch Rotation und Translation identifiziert (Monomer 1: Z-Score der Rotationsfunktion (RFZ): 9,6; Z-Score der Translationsfunktion (TFZ): 24,1; Monomer 2: RFZ: 6,6, TFZ: 42,6; Monomer 3: RFZ: 5,4, TFZ: 28,3). Eine anschließende Verfeinerung mit dem Programm phenix.refine (Afonine et al., 2012) führte zu einer wesentlichen Verbesserung der Elektronendichte. In Zyklen, bestehend aus dem manuellen Einfügen neuer Aminosäuren in die Elektronendichte unter Verwendung des Programms COOT (Emsley et al., 2010) und anschließender Verfeinerung mit Hilfe des Programms phenix.refine (Afonine et al., 2012) konnte die NTD und CTD aller drei Monomere komplettiert werden. Als Maß der Qualität des erhaltenen Modells dienen die R-Faktoren, die sich bis zu diesem Punkt der Strukturermittlung auf  $R_{\text{cryst}} = 0,251$  und  $R_{\text{free}} = 0,303$  beliefen. Der Einbau von Aminosäureresten der PDZ-Domäne war trotz intensiver Bemühungen nicht möglich. Es wurde u.a. der molekulare Ersatz mit der PDZ-Domäne aus der Photosystem II D1-Protease (PDB: 1FC6, Liao et al., 2000) sowie verkürzten Varianten dieser PDZ-Domäne versucht. Zudem wurden Poly-Alanin-Helices im Bereich der potentiellen Lokalisation der PDZ-Domäne platziert und anschließend verfeinert. Es war jedoch nicht möglich, Elektronendichte zu erhalten, die den Einbau von Aminosäureresten erlaubte. Daher wurde auf weitere Versuche, die PDZ-Domäne in die Struktur einzupassen, aus Zeitgründen verzichtet. Eine Betrachtung der Ursachen für die fehlende Elektronendichte im Bereich der PDZ-Domäne erfolgt im Abschnitt 4.1.4..

#### 4.1.3.2. Verfeinerung und Validierung des CT441°-Modells

Die finale Verfeinerung des CT441°-Modells erfolgte mit dem Programm phenix.refine (Afonine et al., 2012) unter Berücksichtigung atomarer anisotroper Dislokationen mittels TLS-Refinement (*translation libration screw*, TLS). Hierfür wurden pro Monomer jeweils zwei TLS-Gruppen, die sich an der Domänenorganisation von CT441 orientieren, definiert. Die finalen R-Faktoren betragen  $R_{\text{cryst}} = 0,256$  und  $R_{\text{free}} = 0,281$ . Um den hohen Temperaturfaktoren (B-Faktoren) der N-terminalen Domänen der Monomere A und C Rechnung zu tragen, wurde hier ein *grouped B-Factor-Refinement* durchgeführt (Anhang, Tabelle 15).

Die stereochemische Analyse des finalen CT441°-Modells mit Hilfe des Programms PROCHECK (Laskowski et al., 1993) zeigte anhand des resultierenden

Ramachandran-Plots, dass 92,5 % der Torsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$  des Proteinrückgrades in den erlaubten, 7,3 % in den zusätzlich erlaubten und 0,2 % in den großzügig erlaubten Bereichen liegen. Lediglich die drei Aminosäurereste F80 in Monomer A, H203 in Monomer B und Y424 in Monomer C sind als „Ramachandran-Outlier definiert“ (Abb. 15).

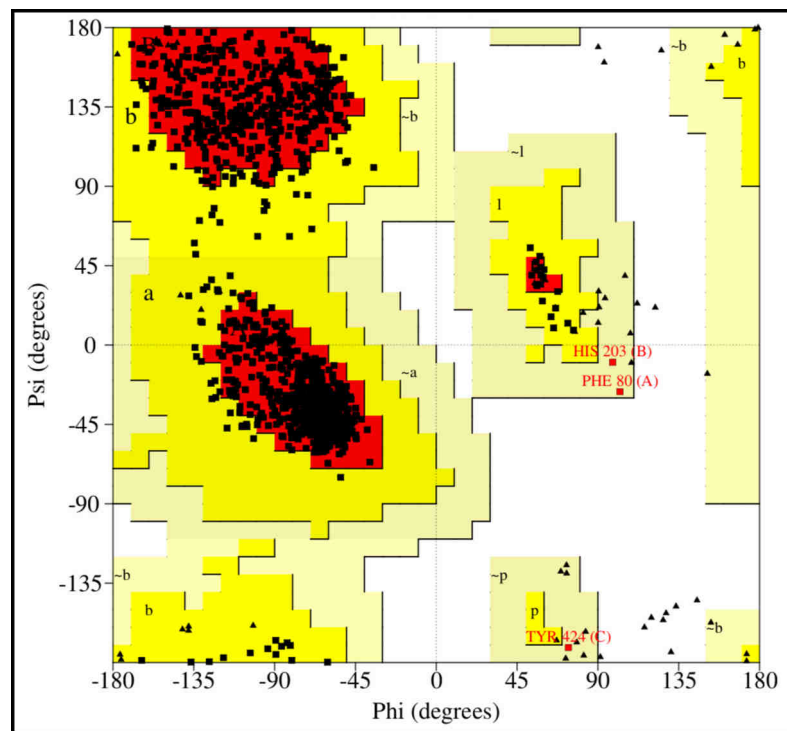


Abb. 15: Verteilung der  $\phi$  und  $\psi$ -Winkel für das CT441-Modell.

#### 4.1.4. Allgemeine Aspekte des finalen CT441-Modells

Im finalen CT441°-Modell sind in Monomer A im Vergleich zur Primärstruktur-Sequenz die Aminosäuren (AS) 133-139, 168-184, 242-341, 366-367, 489-496 sowie 644-649 nicht enthalten. In Monomer B fehlen die AS 133-139, 168-174, 243-341, 489-496 und 644-649. In Monomer C konnten die AS 132-138, 168-182, 243-341, 366-368, 489-496 und 644-649 aufgrund fehlender Elektronendichte nicht in das Modell eingefügt werden (Abb. 16). In allen Fällen, mit Ausnahme der PDZ-Domäne, handelt es sich um offensichtlich flexible Loop-Bereiche, die die in der Elektronendichte definierten Sekundärstrukturelemente verbinden.



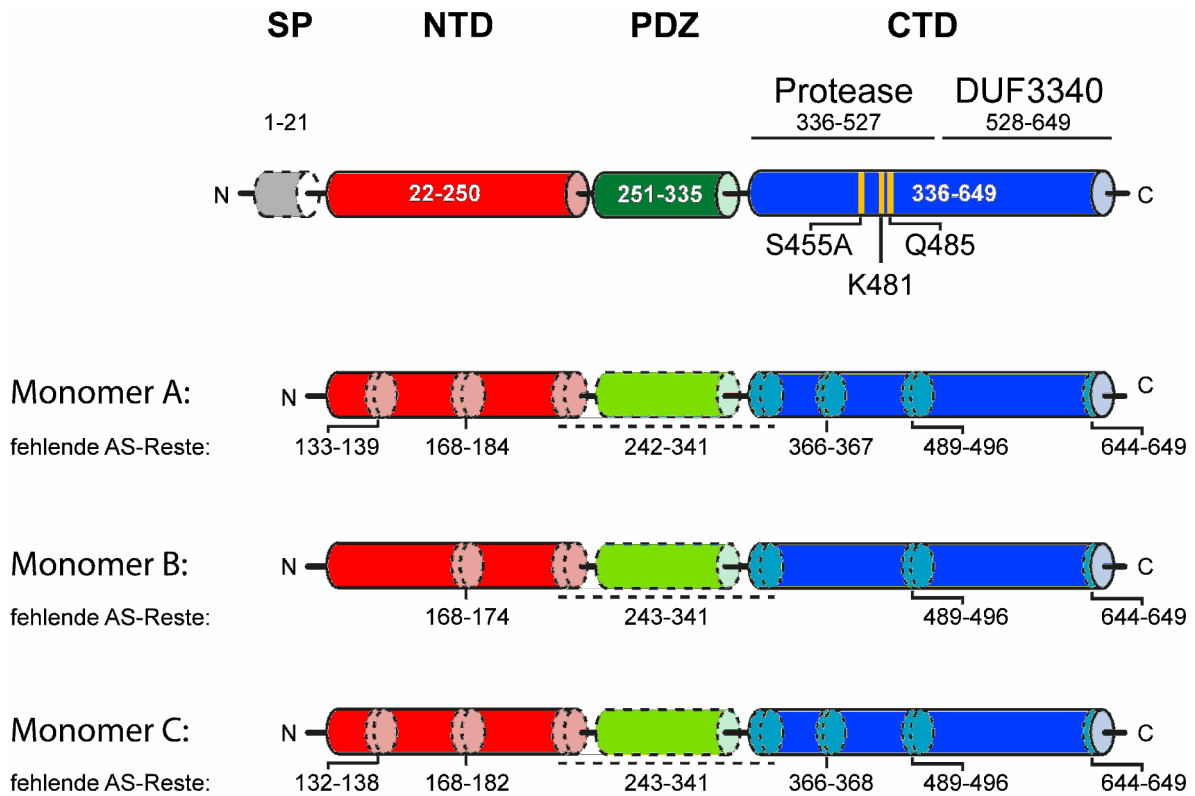


Abb.16: Schematische Darstellung der theoretischen Domänen-Organisation von CT441, ermittelt aus der Primärstruktur-Sequenz (oben) und der tatsächlichen Zusammensetzung der CT441°-Monomere des finalen CT441°-Modells (unten). Die fehlenden Aminosäurereste sind in hellen Farben unterlegt und von gestrichelten Linien begrenzt.

CT441° weist insgesamt in allen drei Monomeren der asymmetrischen Einheit hinsichtlich der Domänenorganisation einen klaren, modularen Aufbau auf. Die Organisation der Sekundärstrukturelemente soll exemplarisch anhand des Monomers B vertiefend betrachtet werden (Abb. 17).



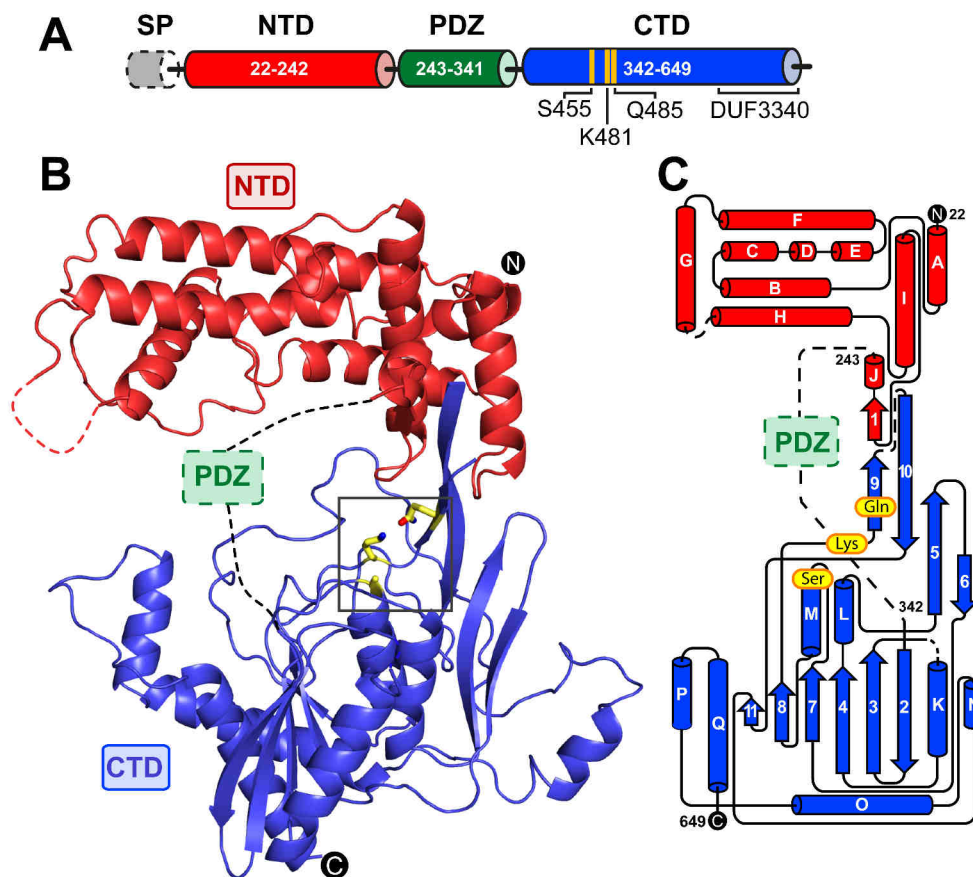


Abb. 17: **A)** Schematische Übersicht der Domänenorganisation von Monomer B der CT441°-Struktur. **B)** Übersichtsabbildung des Monomers B. **C)** Topologie des CT441°-Modells am Beispiel des Monomers B. Die im finalen CT441°-Modell nicht enthaltene PDZ-Domäne sowie die verbindenden Loops zur NTD und CTD sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet.

Die N-terminale Domäne besteht aus 10  $\alpha$ -Helices (A-J) und einem kurzen  $\beta$ -Strang (1). Die Helices B-F und H bilden eine parallele Helix-Bündel-ähnliche Struktur, die von den Helices A und I an einem Ende und von Helix G am anderen Ende begrenzt wird. Die Helix J und der  $\beta$ -Strang 1 sind im Bereich zwischen der NTD und CTD lokalisiert.

Vergleichende visuelle Inspektionen der Aminosäurekette und der korrespondierenden Elektronendichte in den drei Monomeren mittels COOT (Emsley et al., 2010) zeigte, dass in den drei Monomeren eine unterschiedliche Orientierung der NTD, relativ zur CTD, vorliegt. Die Berechnung der Abweichungen der Ca-Atompositionen der Monomere A und C im Vergleich zum Referenzmolekül Monomer B erfolgte zur Überprüfung mit Hilfe des Programms PROFIT (McLachlan, 1982) und illustriert die Mobilität der NTD (Abb. 18).

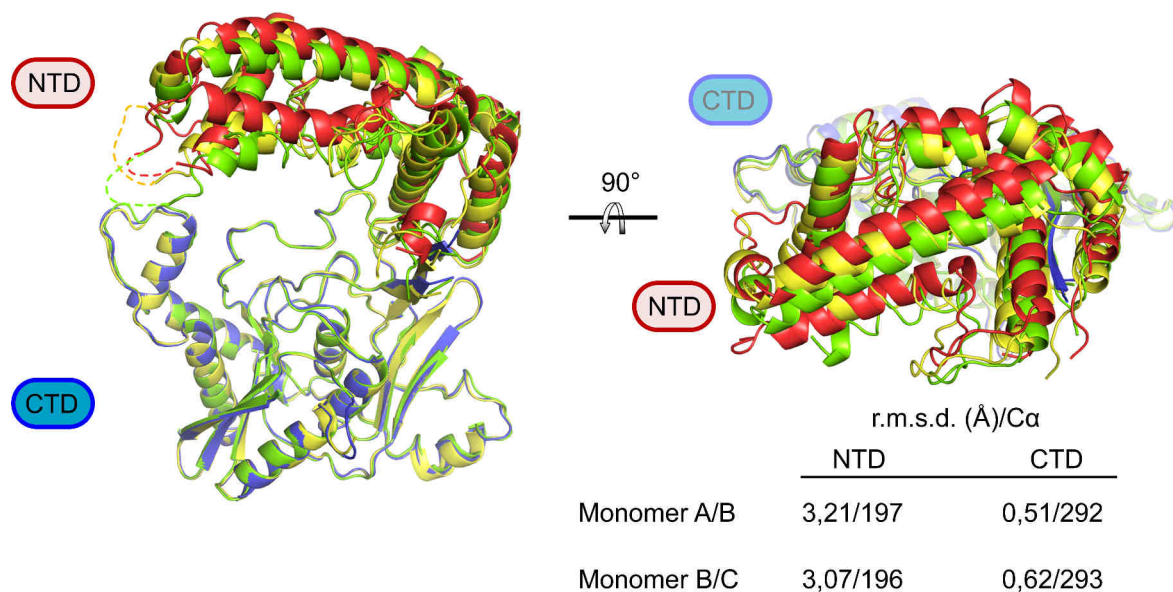


Abb. 18: Vergleichende Überlagerung der einzelnen CT441°-Monomere. Es wurden Aminosäuren der C-terminalen Domäne dreier Monomere überlagert, (CTD Monomer A, gelb; Monomer B, blau; Monomer C, grün). Es liegt eine differentielle Orientierung im Bereich der N-terminalen Domäne in allen drei Monomeren im CT441°-Proteinkristall vor (NTD Monomer A, gelb; Monomer B, rot; Monomer C, grün). Die Berechnung der Abweichungen der Cα-Atompositionen bestätigt einen wesentlich höheren Flexibilitätsgrad der NTD im Vergleich zur CTD.

Dies spiegelt sich auch in den teilweise hohen Temperaturfaktoren der Cα-Atome der NTD in Molekül A ( $117,3 \text{ \AA}^2$ ) und C ( $175,8 \text{ \AA}^2$ ) wider und deutet ebenfalls auf einen hohen Flexibilitätsgrad hin. Die NTD von Monomer B bildet Kristallkontakte zu Molekülen benachbarter Einheitszellen aus, was sich in einem niedrigeren mittleren Wert des Temperaturfaktors ( $74,7 \text{ \AA}^2$ ) niederschlägt. Diese Fixierung schränkt vermutlich die Bewegung der NTD stark ein, einhergehend mit einer im Vergleich zu Molekül A und C besseren Definition der Elektronendichte.

Für die PDZ-Domäne konnte, wie bereits erwähnt, keine interpretierbare Elektronendichte erhalten und somit keine Aminosäurereste in die Struktur eingepasst werden. Sie ist durch lange, flexible Loops mit der NTD und CTD verbunden und daher liegen im Kristallgitter vermutlich multiple Positionen der PDZ-Domäne vor. CT441°-Proteinkristalle wurden in SDS-Probenpuffer gelöst und mittels Western Blot-Analyse analysiert, um zu verifizieren, dass das Volllängenprotein im Proteinkristall vorliegt und die PDZ-Domäne eventuell nicht während der

Kristallisation abgebaut wurde. (Abb. 19). Es konnte jedoch keine Veränderung im Vergleich zum löslichen CT441<sup>o</sup>-Protein festgestellt werden.

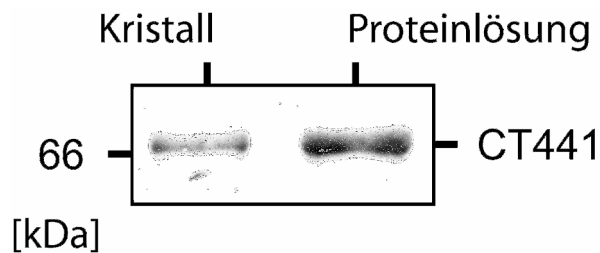


Abb. 19: Überprüfung der CT441<sup>o</sup>-Kristalle mittels Western Blot auf Anwesenheit der PDZ-Domäne. Die getesteten Kristalle weisen das identische Molekulargewicht zum löslichen Volllängenprotein von ca. 68 kDa auf.

Die CTD enthält die Protease-Domäne (341-527) sowie eine Domäne unbekannter Funktion (*domain of unknown function* DUF3340, Aminosäurereste 528-644) (Abb. 16, oben) und besteht aus 7  $\alpha$ -Helices (K-Q) und 10  $\beta$ -Strängen (2-11), die in zwei  $\beta$ -Faltblätter organisiert sind. Während ein  $\beta$ -Faltblatt (Stränge 5, 6, 10 und 9/1) eine stabile aber flexible Verbindung zur NTD darstellt, bildet das zweite  $\beta$ -Faltblatt (Stränge 2, 3, 4, 7, 8, 11) ein Gerüst, um das die Helices K, L, M, O und Q angeordnet sind (Abb. 17).

#### 4.1.5. Dimerisierung von CT441

Drei Monomere (A, B, C) liegen in der asymmetrischen Einheit vor. Monomer A und C bilden innerhalb der asymmetrischen Einheit ein Dimer. Daneben wird ein kristallsymmetrisches Dimer zwischen Monomer B einer Einheitszelle mit einem zweiten Monomer B der benachbarten Einheitszelle gebildet. Die Kontaktfläche ist in beiden Varianten durch eine größtenteils hydrophile Oberfläche in der CTD gekennzeichnet. Eine *in silico*-Analyse dieser Interaktionsregion mit Hilfe des PISA-Servers ([http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/cgi-bin/piserver](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver); Krissinel & Henrick, 2007) ergab, dass die Dimerisierung durch zahlreiche Aminosäurereste in den beteiligten Monomeren vermittelt wird, wobei die resultierende Oberfläche der Dimerisierungsregion ca. 1300 Å<sup>2</sup> pro Monomer beträgt. Die Interaktionsregion wird

größtenteils durch die Helices O und Q sowie den Loop  $\beta$ 2-3 eines Moleküls und der korrespondierenden Region des zweiten Moleküls definiert (Abb. 20).

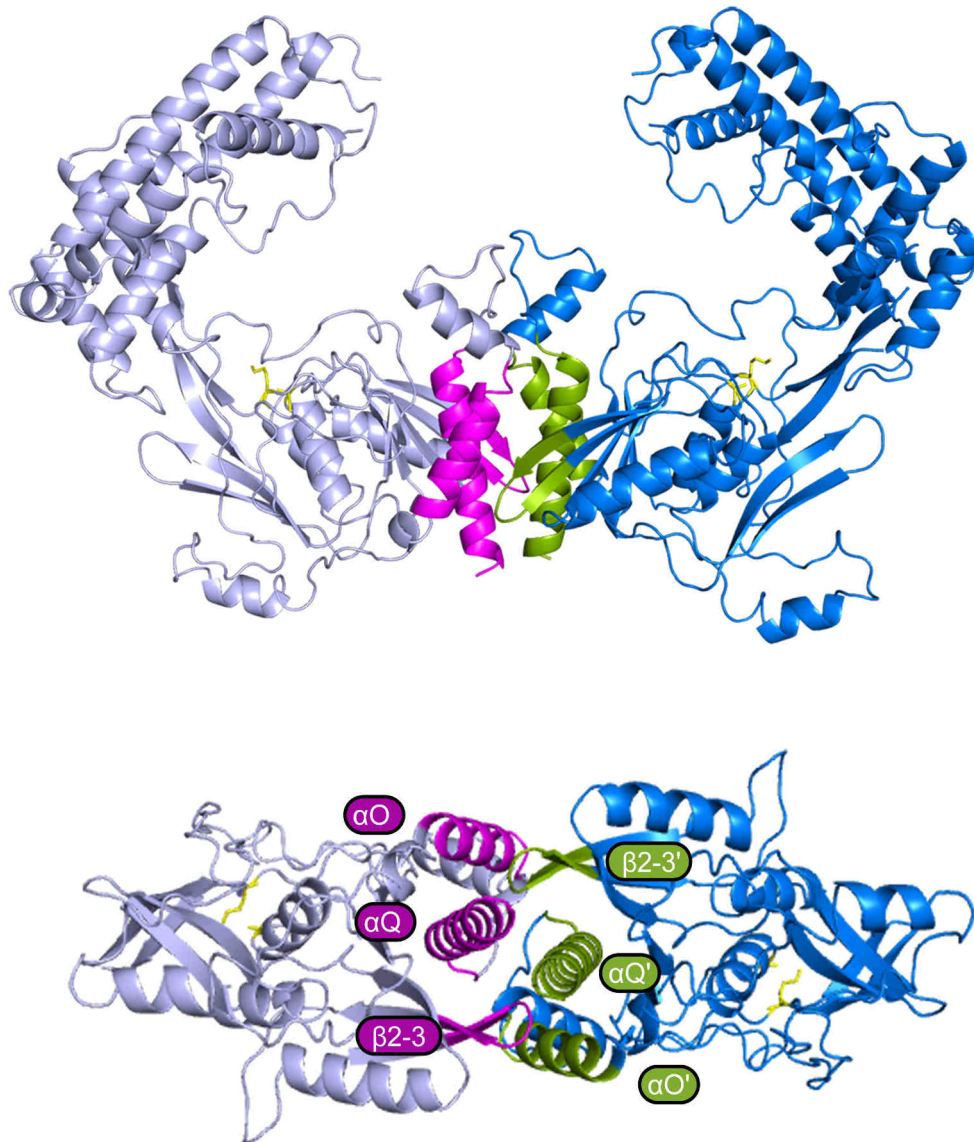


Abb. 20: CT441° bildet im Proteinkristall ein Homodimer. Die beteiligten Sekundärstrukturelemente sind in magenta und grün eingefärbt (oben). Die Grenzfläche, verantwortlich für die Dimerisierung, wird durch die Helices O und Q und den  $\beta$ 2-3-Loop in beiden Monomeren definiert (unten).

Am Beispiel des kristallsymmetrischen Dimers ist ersichtlich, dass jeweils zwischen 13 Aminosäureresten in einem Monomer (Monomer 1: Y347, P349, Y350, G351, N592, N600, K601, N602, S619, S622, N623, D636, S642) und in einem zweiten Monomer (Monomer 2: Y350, G351, N592, E595, R596, N600, K601, N602, S619,

S622, N623, N636, S642) insgesamt 21 Wasserstoffbrückenbindungen zur Stabilisierung des Homodimers ausgebildet (Tab. 10).

Monomer 1	Distanz (in Å)	Monomer 2
Y350 [OH]	2,64	Y350 [OH]
N592 [ND2]	2,75	G351 [O]
Y347 [OH]	3,04	E595 [OE1]
N623 [ND2]	2,56	N600 [OD1]
S622 [N]	2,75	N602 [OD1]
N623 [N]	2,95	N602 [OD1]
S622 [OG]	3,26	S619 [O]
K601 [N]	3,28	N623 [OD1]
N602 [N]	3,60	N623 [OD1]
G351 [N]	3,09	D636 [OD1]
S642 [OG]	2,71	S642 [OG]
P349 [O]	3,41	R596 [NH1]
G351 [O]	2,75	N592 [ND2]
N600 [OD1]	2,46	N623 [ND2]
N602 [OD1]	2,63	S622 [N]
N602 [OD1]	3,38	N623 [N]
S619 [O]	3,12	S622 [OG]
N623 [OD1]	3,21	K601 [N]
N623 [OD1]	3,35	N602 [N]
D636 [OD1]	2,75	G351 [N]
S642 [O]	3,24	S642 [OG]

Tab. 10: Auflistung der in die Dimerisierung involvierten Aminosäurereste, die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Monomeren ausbilden, inklusive der Atombezeichnung und Distanzen der Wasserstoffbrückenbindungen.

Eine identische Beobachtung der Ausbildung des Homodimers in einer zweiten Kristallform von CT441<sup>o</sup> mit der Raumgruppe C222<sub>1</sub> konnte mit Kristallen, die in der ZnCl<sub>2</sub>-haltigen Kristallisationslösung (Abschnitt 4.1.2.) wuchsen und an der ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble) vermessen wurden, gemacht werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die Ausbildung des Homodimers nicht zufällig ist und eventuell von physiologischer Relevanz für die Funktionalität von CT441 sein könnte. Auf diesen Aspekt soll im Abschnitt der Untersuchung der proteolytischen Aktivität von CT441 näher eingegangen werden (Abschnitt 4.1.8.2.).



#### 4.1.6. Verwendete Strukturen

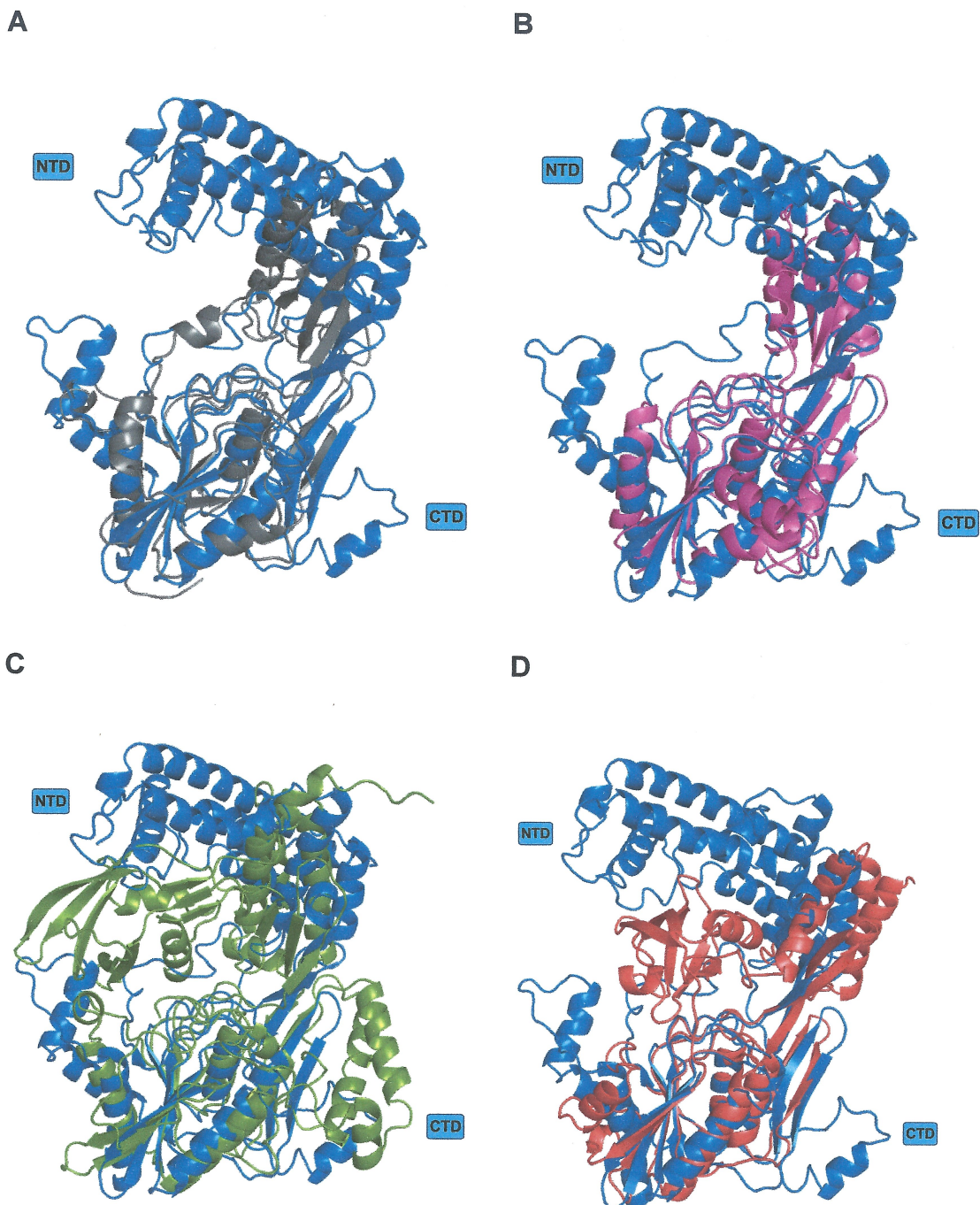
Der Vergleich der CT441°-Struktur mit bekannten Proteinstrukturen aus der Proteindatenbank (PDB) erfolgte mit Hilfe des Programms DaliLite (Holm & Park, 2000). Dabei wurden die Photosystem II D1 Protease (PDB: 1FC6, Liao et al., 2000) aus *Acutodesmus obliquus*, drei putative bakterielle Peptidasen (PDB: 4L8K aus *Parabacteroides merdae*, PDB: 3K50 aus *Bacteroides fragilis*, PDB: 4GHN aus *Bacteroides uniformis*; keine Publikation vorhanden), das Interphotorezeptor-Bindeprotein (PDB: 1J7X, Loew & Gonzalez-Fernandez, 2002) aus *Xenopus laevis* sowie die chlamydiale Protease CPAF (PDB: 3DOR, Huang et al., 2008) und die Protease CtpB (PDB: 4C2H, Mastny et al., 2013) aus *Bacillus subtilis* als nächste strukturelle Homologe identifiziert (Tab. 11).

Homologe Struktur	PDB	Sequenzidentität (%)/ Anzahl der über- lappenden C $\alpha$ -Atome	r.m.s.d. (Å)	Z-Score
Photosystem II D1 Protease (Liao et al., 2000)	1FC6	24/239	3,1	20,5
Putative Peptidase (keine Publikation)	4L8K	15/256	3,5	17,8
Putative S41 Protease (keine Publikation)	3K50	20/239	3,7	16,1
Interphotorezeptor Retinoid-Bindeprotein (Loew & Gonzalez-Fernandez, 2002)	1J7X	18/248	5,0	16,3
CPAF (Huang et al., 2008)	3DOR	14/264	3,5	15,7
CtpB (Mastny et al., 2013)	4C2H	26/218	3,4	20,3
uncharakterisierte Protease (keine Publikation)	4GHN	15/206	3,2	15,7

Tab. 11: Auflistung der zu CT441 homologen Strukturen.

Anhand der Überlagerung der ermittelten homologen Strukturen mit CT441° ist ersichtlich, dass sich die Strukturähnlichkeit im Wesentlichen auf die Kernregion der C-terminalen Domäne, speziell die Helices K, L, M, Q und der zentrale Strang der  $\beta$ -Faltblätter beschränkt (Abb. 21). Diese Kernregion scheint hoch konserviert zu sein, während die Helices N, O und P nur in CT441 vorliegen.

Im Falle der N-terminalen Domäne von CT441 sind lediglich ähnliche Orientierungen zu den Helices A und I in den ermittelten homologen Strukturen ersichtlich (Abb. 21). Mit Ausnahme der putativen Peptidase (PDB: 4L8K) und dem Interphotorezeptor Retinoid-Bindeprotein (PDB: 1J7X) weisen die analysierten Strukturen zudem Sekundärstrukturelemente im Bereich der potentiellen Lokalisation der PDZ-Domäne von CT441 auf, wobei lediglich die Photosystem II D1-Protease (PDB: 1FC6), die putative S41-Protease (PDB: 3K50) sowie CtpB eine PDZ-Domäne, orientiert zwischen der NTD und CTD, enthalten.



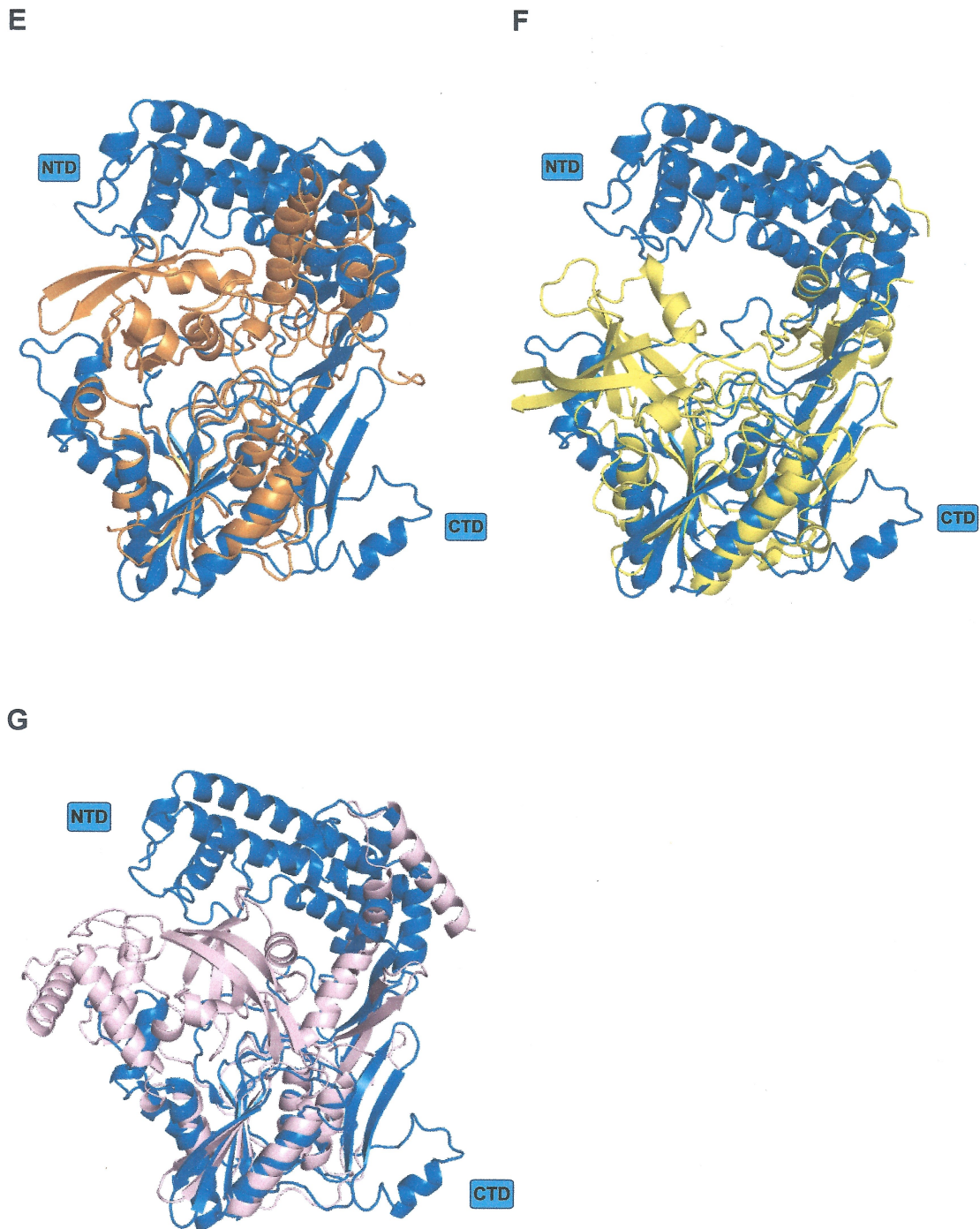


Abb. 21: Homologievergleich von CT441 mit **A)** der putativen Peptidase aus *Parabacteroides merdae* (PDB: 4L8K, keine Publikation), **B)** mit dem Interphotorezeptor Retinoid-Bindeprotein aus *Xenopus laevis* (PDB: 1J7X, Loew & Gonzalez-Fernandez, 2002), **C)** CPAF aus *Chlamydia trachomatis* (PDB: 3DOR, Huang et al., 2008), **D)** mit der Photosystem IID1 Protease aus *Acutodesmus obliquus* (PDB: 1FC6, Liao et al., 2000), **E)** der uncharakterisierten Protease aus *Bacteroides uniformis* (PDB: 4GHN, keine Publikation), **F)** mit der putativen S41 Protease aus *Bacteroides fragilis* (PDB: 3K50, keine Publikation) und **G)** CtpB aus *Bacillus subtilis* (PDB: 4C2H, Mastny et al., 2013).



Hingegen führte eine detaillierte Homologieanalyse mit der N-terminalen Domäne von CT441° (AS 22-242) zu keiner Identifizierung von homologen Proteinstrukturen bzw. Domänen in der Proteindatenbank (PDB).

Die Aminosäuresequenz der NTD der CT441°-Struktur wurde deshalb exemplarisch mit Tsps der Gram-negativen Erreger *E. coli* (Tsp<sub>EC</sub>), *Simkania negevensis*, *Protochlamydia amoebophila*, *Yersinia pestis* und *Salmonella enterica* verglichen. Hierbei wurde zusätzlich mit Hilfe des Sekundärstruktur-Vorhersage-Servers PSIPRED (Buchan et al., 2013) eine Analyse der Sekundärstrukturelemente durchgeführt. (Abb. 22). Das Ergebnis lässt vermuten, dass zumindest innerhalb der Tsps Gram-negativer Pathogene eine Ähnlichkeit hinsichtlich der Anordnung der Sekundärstrukturelemente wahrscheinlich ist.

```

CT441      -----MMRFARFCLLVLTLPQLAFSAEPLRRQDVRKTVDKLVEHHIDTQ 45
E.coli     MNFFRRLTALAGLLAIAGQTFAVEDITRADQIPVLKEETQHATVSEVTSRFRTRSHYRQF 60
Simkania   -----MKIKPLIFSILLFFICFVEAKPPE-LTPHLTRKKSEEIFKAHVTYK 46
Protochlamydia -----MNKNWLKIWFVTLMTILVSLAEAREQDLLKSSDIDRIMSQILSQHVDR 48
Yersinia   MNKFVRLAAIAGLL-LAGASYATDTTYRIDQLPQLRQEPHATVSEVTSRFRTRSHYRQF 59
Salmonella MNTFFRRLTALAGLLALAGQSFAVEDITRADQIPVLKEETQHATVSEVTSRFRTRSHYRQF 60
          :           :           :           :           :           :           :           :           :           :           :           :           :
CT441      QISPYILSRSLLEDYVRSFDSHKAYLTQDEVFSHAFS-EEATHPLFKQYQEDNFSSFKELD 104
E.coli     DLDQAFSAKIFDRYLNLLDYSHNVLLASDVEQFAKKKTELGDRLSGKLDVFDLYNLAQ 120
Simkania   KLSPELAQRILQNYLEE L DATKTYLLESEVVKWNNPSEELLNQLVSNYRKEDFVIFDEIY 106
Protochlamydia TMTSKILNSSIAIFINQDPERIYLLSEIAPYAHLTQKQLDELVEQYKQNNFEFFEQIN 108
Yersinia   ALDQAFSAKIFDRYLNLLDYSHNVLLASDVAQFADKKYSLDKELKSGQLDTPFALFNLAQ 119
Salmonella DLDEAFSAKIFDRYLNLLDYSHNVLLASDVEQFAKKKTVLGDLELRTGKLDVFDLYNLAQ 120
          :           :           :           :           :           :           :           :           :           :           :           :           :
CT441      TCIQQSISRAREW-RSSWLDPSIRVIQDAMSHTIEKKPSAWASSIEEVKQRQYDLLLLSYA 163
E.coli     KRRFFERYQYA-----LSVLEKPMDFTGNDTYNLDRSKAPWPKNEAELNA-----LWDSK 169
Simkania   ETMVKAIERR-----NRLEAEIADQQLPQTSVNEFKDLKWASTEAELKER----LLKLR 156
Protochlamydia KVFQNAIERSKKLRHEIEIKDKEALFQTRPSVQRIEERSFAKDEKELKKRLLLENLENI 168
Yersinia   KRRFFERYQYA-----LSVLDPRMVFTGNDTIDIDRAKAPWPSSEAEELNA-----LWDAK 168
Salmonella KRRFFERYQYA-----LKVLERPMDFTGNDTENLDRSKAPWPKDEAELNA-----LWDGK 169
          :           :           :           :           :           :           :           :           :           :           :           :           :
CT441      SIYLEDAAKNRYQGKEHGLVKLCIRQIENHENPYIGINDHGYRMSPEEEANSFHVRIIKS 223
E.coli     VKFDELSLKLKAGKTDKIETLTRYKFAIR-----RLAQTNSED----VFSLAMTA 217
Simkania   ALQLETAEKLD FETKQDFIQRVNKRISREQ-----EVLQDNLQDRHKQQLACFLKA 208
Protochlamydia SLYKSRHGELSTSSKKEFVLKTYENHLEFENQYLYQDDQGKPLSYAQDNLITIHILKA 228
Yersinia   VKYDQLNLKLAGKTDKIETLTRYKFAIR-----RLAQTNSED----VFQIMNA 216
Salmonella VKFDELSLKLKIGKSDKEIETLTRYKFAIR-----RLAQTNSED----VFSLAMTA 217
          :           :           :           :           :           :           :           :           :           :           :           :           :
CT441      IAHSLDAHTAYFSQEEALSMRAQLEKG 250
E.coli     FAREIDPHTNYLSPRNTEQFNTEMSLS 244
Simkania   FTSALDNHTVYFTPEANQFMIOVQQR 235
Protochlamydia LASSLDSHTTFYQTHEAYDMKVRQLQKE 255
Yersinia   FAREIDPHTNYLSPRNTEQFNTEMSLS 243
Salmonella FAREIDPHTNYLSPRNTEQFNTEMSLS 244

```

**Helix**

**Beta-Faltblatt**

Abb. 22: Sequenzalignment der CT441° NTD mit homologen Tsp's aus *E. coli*, *Simkania negevensis*, *Protochlamydia amoebophila*, *Yersinia pestis* und *Salmonella enterica*. Die Strukturelemente der NTD der CT441°-Struktur sowie die vorhergesagten Helices sind in rot und  $\beta$ -Faltblätter in cyan eingefärbt. Die Sekundärstrukturvorhersage wurde mit dem Programm PSIPRED durchgeführt (Buchan et al., 2013).

Es handelt sich somit nach derzeitigem Kenntnisstand um eine Tsp-spezifische, neuartige Domäne unbekannter Funktion. Während der Testexpressionen der verschiedenen CT441-Domänenkonstrukte fiel auf, dass NTD-defiziente Proteine nicht mit dem angewandten Prozedere aufzureinigen waren. Es konnte eine Weißfärbung der Bakterienpellets beobachtet werden, was den Verdacht nahe legt, dass diese Proteine unlöslich in *inclusion bodies* vorlagen, wobei ebenso nicht völlig auszuschließen ist, dass evtl. keine Synthese oder aber ein Abbau der NTD-

defizienten Proteine vorlag. Die NTD scheint also möglicherweise an der Sicherstellung der Löslichkeit des Gesamtproteins beteiligt zu sein. Eine zusätzliche mögliche Funktion der NTD lässt sich zudem aus den Ergebnissen des Chaperon-Assays ableiten, die in Abschnitt 4.4. eingehend diskutiert werden.

Basierend auf den C $\alpha$ -Atompositionen der CT441<sup>o</sup>-CTD konnten homologe Strukturen mit geringen Abweichungen identifiziert werden (Tab. 12). Bei den Ursprungsorganismen der identifizierten homologen Proteinstrukturen handelt es sich sowohl um Vertreter aus dem Reich der Archaeen (*Acutodesmus obliquus*), der Bakterien (*Parabacteroides merdae*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides uniformis*, *Chlamydia trachomatis*, *Bacillus subtilis*) und der Eukaryoten (*Xenopus laevis*).

Homologe Struktur	PDB	Sequenzidentität (%)/ Anzahl der über- lappenden C $\alpha$ -Atome	r.m.s.d. (Å)	Z-Score
Photosystem II D1 Protease (Liao et al., 2000)	1FC6	29 /178	2,0	19,2
Putative Peptidase (keine Publikation)	4L8K	16 /195	2,8	16,5
Putative S41 Protease (keine Publikation)	3K50	23 /192	3,2	15,7
Interphotorezeptor Retinoid-Bindeprotein (Loew & Gonzalez-Fernandez, 2002)	1J7X	20 /186	3,4	15,9
CPAF (Huang et al., 2008)	3DOR	16 /201	2,7	15,6
CtpB (Mastny et al., 2013)	4C2H	27/201	2,8	21,8
uncharakterisierte Protease (keine Publikation)	4GHN	18 /179	2,3	16,9

Tab. 12: Auflistung der zur C-terminalen Domäne von CT441 homologen Strukturen.

Neben der Protease-Domäne (AS 335-527) enthält die C-terminale Domäne auch eine Domäne unbekannter Funktion, die als DUF3340 bezeichnet wird. Diese durch die Aminosäurereste 528-649 definierte Domäne weist in der ermittelten CT441<sup>o</sup> Struktur (AS 528-644) als Sekundärstrukturelemente die Helices N, O, P und Q auf, wobei die Helices N, O und P im Vergleich zu den untersuchten homologen Strukturen nur in CT441 vorkommen. In die Dimerisierung sind, wie bereits in

Abschnitt 4.5. erwähnt, die Helices O und Q involviert. Die Vermutung liegt nahe, dass die bisher unbekannte Funktion der DUF3340 möglicherweise in der Ausbildung des Homodimers besteht. Mit Ausnahme von CPAF und CtpB bilden keine der untersuchten homologen Strukturen Homodimere aus, wobei sich die Dimerisierung von CPAF und CtpB grundsätzlich von der CT441-Dimerisierung unterscheidet (Huang et al., 2008, Mastny et al., 2013). Die Untersuchung der postulierten Dimerisierungsfunktion der DUF3340 von CT441 erfolgte in dieser Arbeit in *in vitro*-Experimenten mit Hilfe einer CT441  $\Delta$ DUF3340-Mutante (Abschnitt 4.1.8. und 4.4.).

#### 4.1.7. Das aktive Zentrum von CT441

Das sich in der CTD befindliche aktive Zentrum der Serinprotease CT441 ist in der Literatur als Ser/Lys Diade beschrieben und besteht aus dem Serinrest an Position 455 und dem Lysinrest an Position 481 (Lad et al., 2007b). Für die Kristallisation und Strukturbestimmung wurde das Serin 455 gegen Alanin ausgetauscht, um die Autoproteolyse des Proteins während der Aufreinigung zu verhindern. Das modifizierte aktive Zentrum ist in allen drei Monomeren der Kristallstruktur in der Elektronendichte sehr gut definiert und konnte ohne Probleme in das Proteinmodell eingebaut werden (Abb. 22). Die Seitenketten von A455 und K481 sind in einen Zwischenraum zwischen der NTD und CTD lokalisiert und weisen eine Distanz von ca. 4,8 Å zwischen dem C $\beta$ -Atom von A455 und K481-N $\zeta$  auf (Abb. 23, Vergrößerung).

Mit Hilfe des Programms COOT (Emsley et al., 2010) wurde im CT441<sup>o</sup>-Modell die Wildtypkonstellation des aktiven Zentrums wiederhergestellt, wobei die Orientierung der eingefügten Serin-Seitenkette unter Berücksichtigung der Position des Alanin-C $\beta$ -Atoms angepasst wurde. Das Serin 455 befindet sich oberhalb der  $\alpha$ -Helix M im Loop-Bereich zwischen dem  $\beta$ -Faltblatt 7 und der  $\alpha$ -Helix-M ( $\beta$ 7- $\alpha$ M), und das Lysin 481 im Loop zwischen dem  $\beta$ -Faltblatt 8 und  $\beta$ -Faltblatt 9 ( $\beta$ 8- $\beta$ 9).

Es ist ersichtlich, dass die Seitenketten-Position des K481-N $\zeta$  und die relative Distanz von 3,2 Å zum S455-O $\gamma$  die Aufnahme eines Protons vom S455-O $\gamma$  erlaubt. Somit kann das Lysin als generelle Base während der Katalyse fungieren.



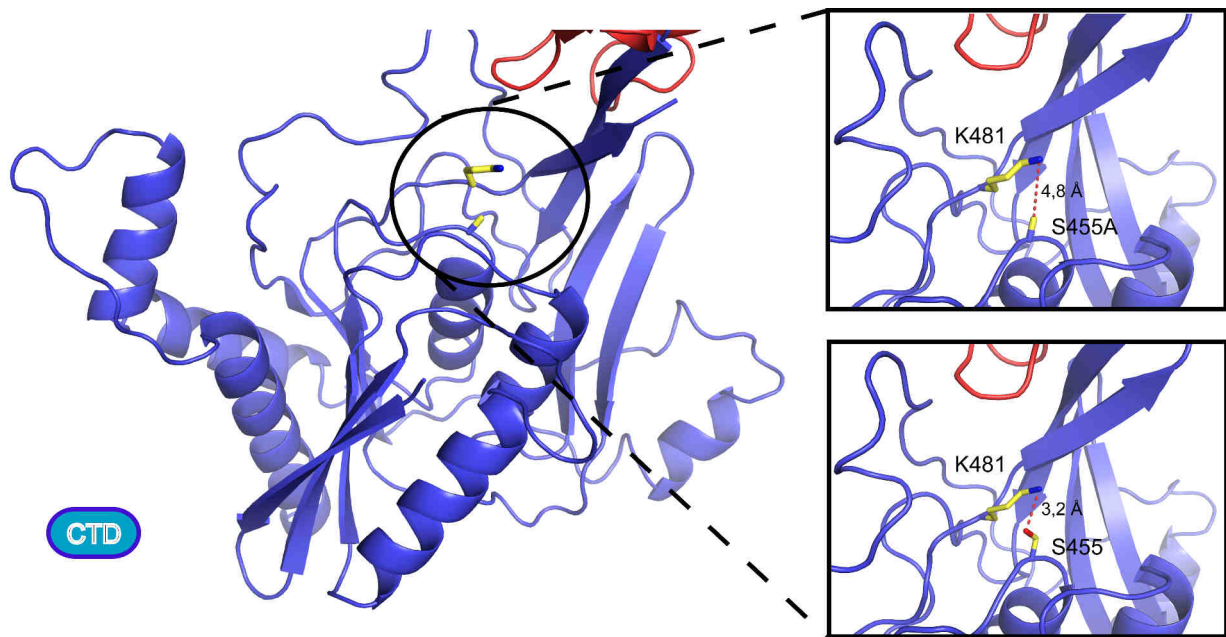
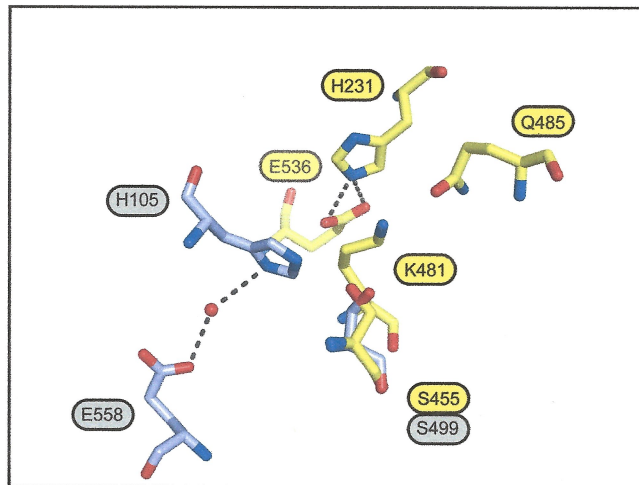


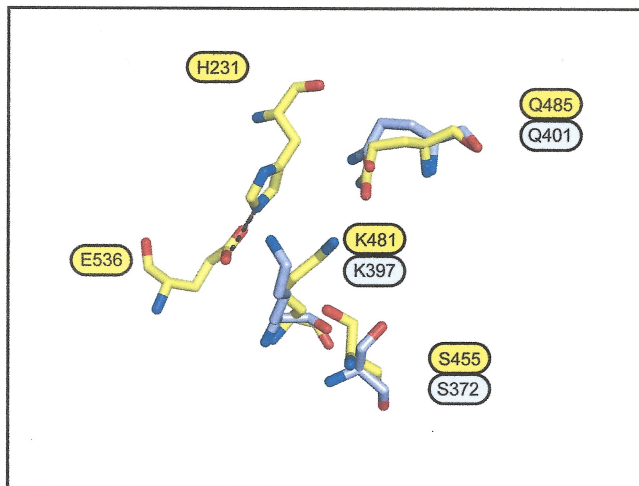
Abb. 23: Darstellung des aktiven Zentrums von CT441° bzw. CT441. In der oberen Vergrößerung ist das Lysin 481 sowie die Mutation des Serin 455 zu Alanin zu erkennen. In der unteren vergrößerten Abbildung sind das Lysin 481 und das modellierte Serin 455 des aktiven Zentrums dargestellt.

Der Vergleich des aktiven Zentrums mit CPAF, das eine katalytische Triade mit den Resten H105, S499 und E558 besitzt, zeigt eine ähnliche Position im Raum im Falle der generellen Basen K481 (CT441) und H105 (CPAF) (Abb. 24). Erwähnenswert sei die Beobachtung, dass sich in CT441 die Aminosäurereste H231 (im Loop  $\alpha$ - $\beta$ 1) und E536 (Loop  $\beta$ 11- $\alpha$ N) ebenfalls in der Nähe des aktiven Zentrums befinden. Die Distanz von mehr als 8 Å zwischen dem H231 und dem modellierten S455 spricht jedoch nicht für die Beteiligung dieser Reste an einer katalytischen Reaktion. Vielmehr ist eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carboxylgruppe des E536 mit der N $\epsilon$ 2-Gruppe des H231 mit einer Distanz von ca. 3,3 Å ausgebildet. Aufgrund der fehlenden PDZ-Domäne in CT441-Struktur können nur Vermutungen zu dieser Interaktion angestellt werden. Möglicherweise werden durch diese Interaktion der zur NTD gehörende Loop  $\alpha$ - $\beta$ 1 und der zur CTD gehörende Loop  $\beta$ 11- $\alpha$ N fixiert und somit ggf. der Zugang der PDZ-Domäne mit dem gebundenen Substratmolekül zum aktiven Zentrum gewährleistet.

A



B



C

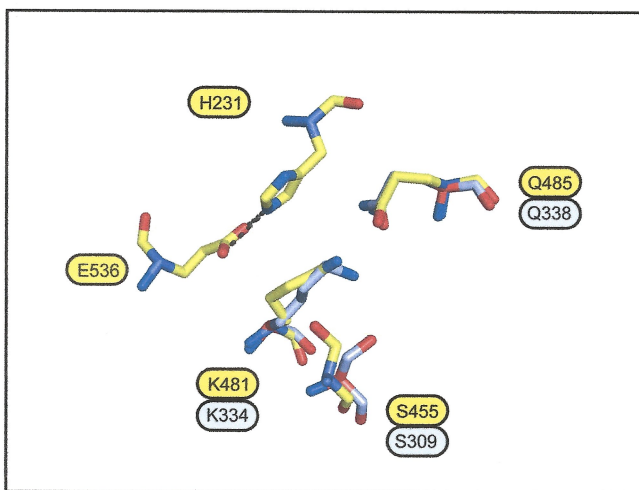


Abb. 24: Vergleich des aktiven Zentrums von CT441 mit den homologen Serin-Proteasen CPAF, PIID1 und CtpB. **A**) Dargestellt sind die Reste des aktiven Zentrums von CPAF (grau) sowie von CT441 (gelb) sowie die Reste in der Nähe des aktiven Zentrums. **B**) Vergleich des aktiven Zentrums der Photosystem II D1-Protease (grau) und von CT441 (gelb) **C**) Vergleich des aktiven Zentrums von CT441 (gelb) und CtpB (grau).

Die Aminosäurereste der katalytischen Ser/Lys-Diade der homologen Photosystem II D1-Protease (PIID1) weisen im Vergleich zu CT441 eine ähnliche Orientierung auf (Abb. 23). Sowohl das Nukleophil S372 als auch die generelle Base K397 sind an ähnlichen Positionen zu finden. Eine Distanz von 6,5 Å zwischen S372-O $\gamma$  und K397-N $\zeta$  lässt vermuten, dass die PIID1-Protease in einer inaktiven Konformation vorliegt (Liao et al., 2000). Die Autoren postulieren einen „induced-fit“ Mechanismus, bei dem es zu einer Reorientierung der Seitenketten bei der Bindung eines Substratmoleküls kommt und somit eine Konformationsänderung zur aktiven Form führt.

Interessanterweise ist in CT441 der Rest Q485 im  $\beta$ 9-Strang in räumlicher Nähe zum K481. Eine vergleichende detaillierte Analyse der aktiven Zentren von CT441 und der PIID1-Protease zeigt, dass in der PIID1-Protease ebenfalls ein Glutaminrest (Q401) an fast identischer Position vorliegt, wobei die Distanz zwischen K481 und Q485 mit 2,8 Å in CT441 wesentlich geringer ist als zwischen Q401 und K397 mit 6,5 Å in der PIID1-Protease.

Frühere Studien beschreiben, dass einige der Ser/Lys-Proteasen einen dritten Aminosäurerest mit einer nicht nukleophilen Carboxylgruppe für die Positionierung der generellen Base besitzen und dies möglicherweise ein Charakteristikum von Serinproteasen mit einer Ser/Lys-Diade ist (Paetzel et al., 2002; Ekici et al., 2008). Im Falle von CT441 bildet Q485 eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der  $\zeta$ -Aminogruppe des Lysins und der Carbonylgruppe des Glutamins aus und führt somit zur optimalen Positionierung des K481 relativ zum S455. Dies lässt den Schluss zu, dass in CT441 eine katalytische Triade bestehend aus S455, K481 und Q485 vorliegt. Untermuert wird dies durch die kürzlich von Mastny et al. (2013) bestimmte Proteinstruktur von CtpB die vor allem im Bereich der CTD eine Homologie zu CT441 aufweist. Die katalytische Triade des aktiven Zentrums von CtpB ist durch die Aminosäurereste S309, K334 und Q338 definiert. CtpB liegt in der aktiven Konformation vor, wobei eine mit CT441 vergleichbare Distanz zwischen der generellen Base und dem Glutamin-Rest beobachtet wurde (CT441: K481:Q485, 2,8 Å; CtpB: K334:Q338, 2,5 Å).

#### 4.1.8. Proteolytische Aktivität von CT441

##### 4.1.8.1. Identifizierung eines geeigneten Substratpeptids für CT441

Für die Analyse der proteolytischen Aktivität von CT441 war es zunächst notwendig ein geeignetes synthetisches Substratpeptid zu identifizieren. Hierfür wurden Peptide verwendet, die sich aus früheren Untersuchungen von CT441 bzw. Tsp<sub>EC</sub> und dem bakteriellen HtrA-Protein DegP aus *E. coli* ableiten (Keiler et al., 1995; Lad et al., 2007a; Hauske et al., 2009).

Das im Fluoreszenz-basierten Aktivitätstest verwendete Peptid DTPF4-AMC (DF4-AMC) leitet sich aus der Spaltstelle des Faktors p65 des NF $\kappa$ B-Signalweges ab, der von Lad et al. (2007a) als erstes zelluläres Substrat für CT441 beschrieben wurde. Es zeigte sich, dass keine Spaltung des Peptids DF4-AMC durch CT441 erfolgt (Abb. 25). Zwar widerspricht das mit CT441 erzielte Ergebnis zunächst den publizierten Ergebnissen von Lad et al., jedoch wurde später gezeigt, dass die Spaltung von p65 vornehmlich durch die Protease CPAF hervorgerufen werden kann, wobei die Rolle von CPAF in der Modulation zellulärer Signalwege mittlerweile kritisch zu betrachten ist (Christian et al., 2010, Chen et al., 2012). Basierend auf dem in Abb. 25 gezeigtem Ergebnis ist jedoch davon auszugehen, dass CT441 möglicherweise tatsächlich nicht für die Inaktivierung von p65 im NF $\kappa$ B-Signalweg verantwortlich ist und somit als Konsequenz nicht die Expression der Gene, die für Entzündungsmediatoren IL-6 und IL-8 kodieren, unterdrückt. Um letzte Zweifel hinsichtlich der Funktionalität des eingesetzten DF4-AMC auszuräumen, wurde dieses in einer Kontrollreaktion mit bovinem Chymotrypsin versetzt und im fluoreszenz-basierten Proteaseassay analysiert, da Chymotrypsin u.a. Substrate mit einem Phenylalanin in der P1-Position spalten kann. Dabei konnte eine Spaltung von DTPF4-AMC beobachtet werden, sodass von einem funktionellen Substratpeptid auszugehen ist (Daten nicht gezeigt). Hingegen wird DVA3-AMC (DA3-AMC), ein Substratpeptid der homologen Protease Tsp<sub>EC</sub> (*tail specific-protease* aus *E. coli*) auch von CT441 gespalten (Abb. 25). Für Tsp<sub>EC</sub> ist bekannt, dass eine Präferenz für kleine Aminosäurereste wie Alanin oder neutrale Aminosäurereste wie Valin bzw. Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten in der P1-Position besteht (Keiler et al., 1995). Wesentlich besser wird das Peptid DPMFKLV7-AMC (DV7-AMC) gespalten, dass ein intensiv eingesetztes Peptid in der Analyse der *E. coli* HtrAs wie DegP



darstellt und ebenfalls ein Valin in P1-Position aufweist (Abb. 25, Hauske et al., 2009).

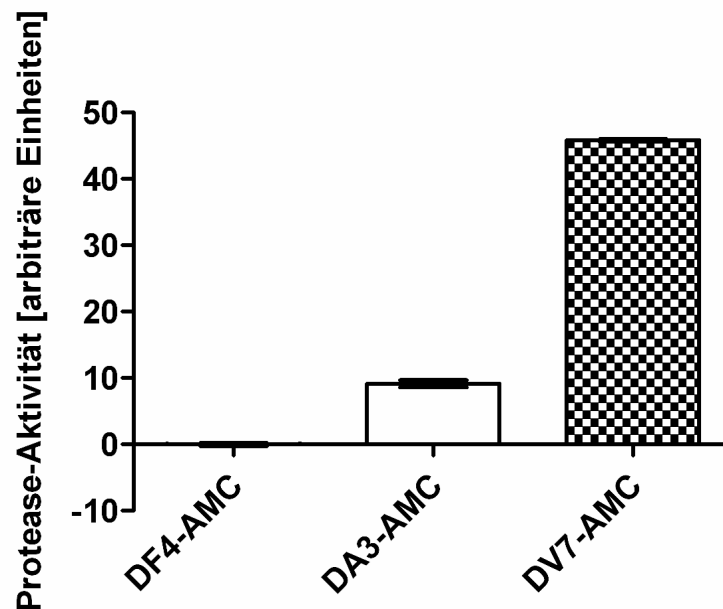


Abb. 25: Untersuchung der Substratspezifität von CT441. Es erfolgt keine Spaltung des vom Transkriptionsfaktor p65 abgeleiteten Substratpeptids. Im Gegensatz dazu erfolgt eine moderate Spaltung des *E. coli* Tsp Substratpeptids. Eine höhere Aktivität kann für das *E. coli* DegP Substratpeptid festgestellt werden.

#### 4.1.8.2. Analyse strukturbasierter CT441-Mutanten und des Deletionskonstruktes CT441 $\Delta$ DUF3340

Die Testung der verschiedenen CT441-Mutanten wurde mit dem Substratpeptid DPMFKLV7-AMC durchgeführt. Der Austausch von S455 und K481 gegen einen Alaninrest führte erwartungsgemäß zur Inaktivierung von CT441, da beide Reste als Bestandteile des aktiven Zentrums bekannt sind (Lad et al., 2007b).

Da Q485 nach Inspektion der Struktur möglicherweise ein essentieller Bestandteil für die optimale Positionierung der generellen Base K481 zu sein scheint, wurde dieser Rest ebenfalls ausgetauscht. Hierbei bestätigten die Ergebnisse des Protease-Aktivitätstests diese Annahme, da keinerlei Aktivität der Q485A-Mutante gemessen werden konnte (Abb. 26).

Die Deletion der DUF3340 in der CTD führt ebenfalls zum Funktionsverlust von CT441. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Dimerisierung der Protease durch diese Deletion verhindert wird (Abschnitt 4.5.) und demnach die Ausbildung des Dimers funktionell mit der proteolytischen Aktivität verknüpft sein könnte.

Es ist zudem möglich, dass die in der CT441<sup>o</sup>-Struktur fehlende PDZ-Domäne in die Substratbindung involviert ist. PDZ-Domänen besitzen ein aus den Aminosäuren GLGF bestehendes konserviertes Motiv (GLGF-Loop), das für die Substraterkennung und -bindung verantwortlich ist (Beebe et al., 2000, Ye & Zhang, 2013). Um zu analysieren, ob das in CT441 vorliegende Motiv <sup>253</sup>GIGV<sup>256</sup> eine ähnliche Funktion besitzt, wurde der Isoleucinrest 254 gegen einen Tryptophanrest ausgetauscht. Diese Mutation führt dazu, dass das Substratpeptid DPMFKLV7-AMC nicht gespalten wird. Möglicherweise blockiert das Tryptophan die Substratbindetasche in der PDZ-Domäne und verhindert somit die Bindung des Substratpeptids. Es ist außerdem nicht auszuschließen, dass aufgrund der hohen Flexibilität der PDZ-Domäne der Tryptophanrest in das aktive Zentrum ragt und es blockiert.

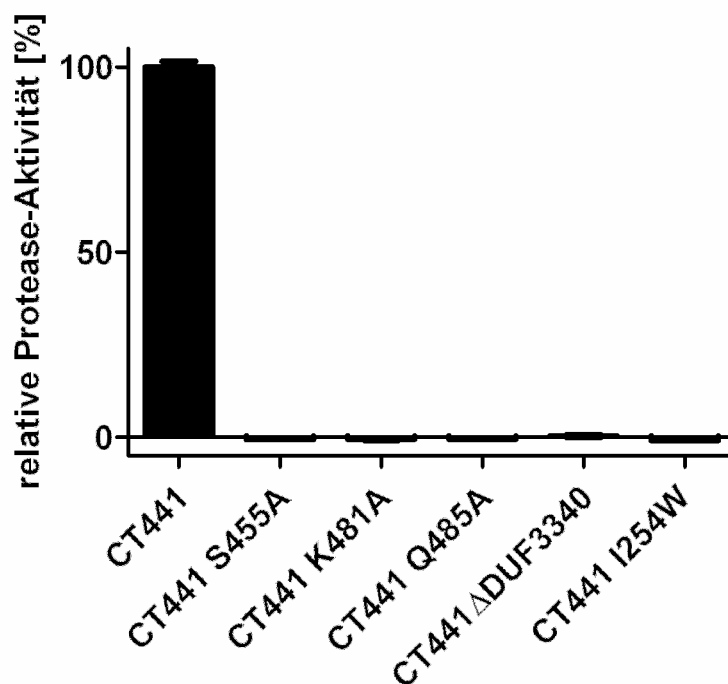


Abb. 26: Untersuchung der proteolytischen Aktivität von CT441-Varianten. Die Quantifizierung der proteolytischen Aktivität zeigt, dass die Mutation der Reste des aktiven Zentrums S455, K481 und Q485, sowie des I254 im GIGV-Loop der PDZ-Domäne, zum vollständigen Verlust der proteolytischen Aktivität führt. Die Deletion der C-terminalen DUF3340 führt ebenfalls zum Funktionsverlust der Protease.

## 4.2. Analyse der SRAP1-Interaktion mit *C. trachomatis* und CT441

### 4.2.1. Einfluss von *C. trachomatis* auf SRAP1

Die spezifische Untersuchung der Interaktion von CT441 mit SRAP1 ist ein weiterer wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit. Zunächst sollte analysiert werden, welchen Einfluss *C. trachomatis* auf rekombinant hergestelltes SRAP1 im Allgemeinen hat. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit *C. trachomatis* infiziert und die Zelllysate nach 8, 24, 32 und 48 Stunden post Infektion (p.i.) geerntet. Die Zeitpunkte berücksichtigen die frühe (8 h), mittlere (24 h) und die späte (32 h, 48 h) Phase des Infektionszyklus von *C. trachomatis*. Als Negativkontrolle dienten nicht-infizierte HEK293-Zelllysate (im Folgenden als mock-infiziert bezeichnet), die zu identischen Zeitpunkten geerntet wurden. Rekombinant in *E. coli* hergestelltes SRAP1 wurde anschließend mit den Zelllysaten für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und mittels Western Blot analysiert (Abb. 28).

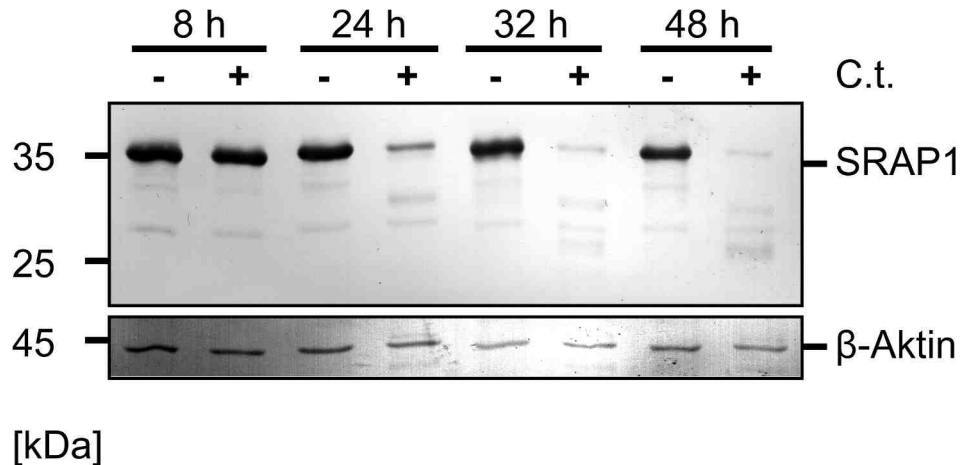


Abb. 28: Western Blot der Inkubation von rekombinant hergestelltem SRAP1 mit Lysaten mock bzw. *C. trachomatis* (C.t.)-infizierter HEK293-Zellen. Ab 24 h p.i. weisen die mit *C. trachomatis* infizierten Zelllysate mit zunehmender Infektionsdauer einen Abbau von SRAP1 mit gleichzeitiger Zunahme von Banden potentieller Spaltprodukte auf. Vollständig ungespaltenes SRAP1 (theoretisches Molekulargewicht 25 kDa) konnte bei ca. 35 kDa in allen mit mock-infizierten Zelllysaten versetzten Proben und der C.t. 8 h p.i.-Probe nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle diente die Färbung gegen  $\beta$ -Aktin.

Es ist festzustellen, dass SRAP1 von *C. trachomatis*-infizierten Zelllysaten ab 24 h p.i. proteolytisch abgebaut wird. Damit einhergehend sind mit zunehmender

Infektionsdauer unterhalb der SRAP1-Bande (35 kDa) verstärkt zusätzliche Banden kleineren Molekulargewichtes sichtbar, die auf proteolytische Abbauprodukte hinweisen. Keine Spaltung von SRAP1 erfolgt in den Proben mock-infizierter HEK293-Zelllysate sowie in den Proben, die mit Zelllysaten der frühen Infektionsphase (8 h p.i.) versetzt wurden. Der Nachweis von  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle, die aufzeigt, dass äquivalente Volumina analysiert wurden.

In weiteren Versuchen wurden die Zelllysate vor der Inkubation mit rekombinantem SRAP1 mit 2 mM Lactacystin bzw. 4-(2-Aminoethyl)-benzoesulfonylfluorid inkubiert. Lactacystin in der verwendeten Konzentration ist in der Lage die chlamydiale Protease CPAF effektiv zu inhibieren (Liao et al., 2008). Es konnte keine Inhibition des SRAP1-Abbaus beobachtet werden, sodass davon auszugehen ist, dass CPAF nicht für die Degradation verantwortlich ist. Um eventuell zellspezifische Einflüsse auszuschließen, wurde das Experiment unter Verwendung von Lactacystin und HEp2-Zellen wiederholt, was zu einem identischen Ergebnis führte (Abb. 38, Anhang).

Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen ist anzunehmen, dass SRAP1 unter dem Einfluss einer *C. trachomatis* Infektion gespalten wird. Verantwortlich hierfür können chlamydiale Proteasen zu sein, die in der mittleren bis späten Phase des Infektionszyklus (ab ca. 24 h p.i.) aktiv sind. Welche Protease(n) hierfür im Detail verantwortlich sein könnte(n) war zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen unklar. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die chlamydiale Infektion die Synthese und Aktivierung zellulärer Proteasen initiiert und somit die SRAP1-Spaltung hervorgerufen wird. Aufgrund der Vorarbeiten von Borth et al. (2010) zur Interaktion von SRAP1 mit der chlamydialen Protease CT441 wurden weitere *in vitro*-Experimente durchgeführt, die diese SRAP1:CT441-Interaktion im Folgenden besonders beleuchten sollen.

#### **4.2.2. Analyse der SRAP1-Interaktion mit CT441**

Basierend auf den im Abschnitt 4.2.1. beschriebenen Ergebnissen sollte untersucht werden, ob CT441 für die in Abb. 28 beobachtete Degradation von SRAP1 verantwortlich sein könnte. Das für humanes SRAP1 kodierende *sra1*-Gen wurde

heterolog in *E. coli* exprimiert und das resultierende Protein wie im Abschnitt 3.2.7. beschrieben, aufgereinigt.

Anschließend wurde SRAP1 mit rekombinant hergestelltem CT441 in einer zeitabhängigen Inkubation über 4 Stunden bei 37°C versetzt und mittels Western Blot analysiert (Abb. 29).

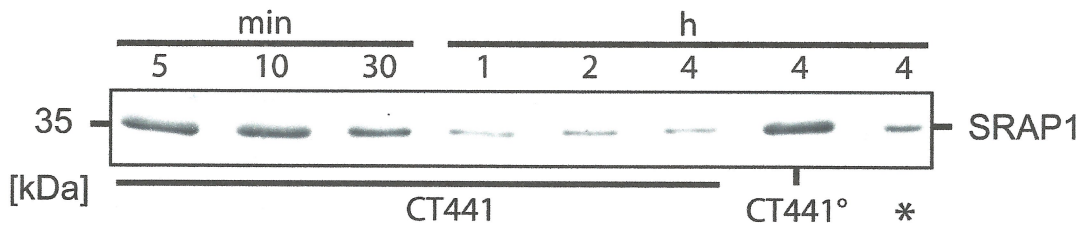


Abb. 29: Zeitabhängige Inkubation von rekombinantem SRAP1 mit CT441 bei 37°C. Die SRAP1-Degradation beginnt nach 30 min und nimmt graduell bis zum Inkubationszeitpunkt von 4 h zu. Keine Degradation erfolgt bei der Inkubation mit CT441°. \*: Die Vorinkubation von CT441 mit Lactacystin (finale Konzentration 2 mM) verhindert die SRAP1-Degradation nicht.

Eine Degradation von SRAP1 durch CT441 beginnt ca. 30 min nach dem Versuchsstart und nimmt kontinuierlich über den gesamten Zeitraum von 4 Stunden zu. Im Gegensatz dazu ist kein Abbau im Kontrollansatz mit der inaktiven CT441° Mutante im gleichen Zeitraum zu beobachten. In einem weiteren Versuchsansatz wurde zunächst CT441 mit dem Serinprotease-Inhibitor Lactacystin in einer finalen Konzentration von 2 mM für 30 min bei 4°C vorinkubiert und anschließend ebenfalls über 4 h bei 37°C mit SRAP1 inkubiert. Anhand des hier vorliegenden Resultates konnte keine effektive Inhibierung von CT441 durch Lactacystin festgestellt werden. Die Degradation von heterolog in *E. coli* synthetisiertem SRAP1 durch CT441 spiegelt jedoch nicht die Bedingungen einer potentiellen Infektionssituation in humanen Wirtszellen wider, da in diesem Experiment SRAP1 z.B. keine, für in eukaryotischen Zellen synthetisierten Proteine typischen, posttranslationalen Modifikationen erfährt.

#### 4.2.3. Inkubation von transient produziertem SRAP1 mit CT441

Um die Synthese von SRAP1 in eukaryotischen Zellen sicherzustellen und die mögliche Spaltung durch CT441 anschließend zu verifizieren, wurde zunächst die SRAP1-Synthese in humanen HEK293-Zellen etabliert.

Hierfür wurde das auf einem Expressionsvektor SRAP1-kodierende *sra1*-Gen mittels transients Transfektion in humane HEK293-Zellen eingebracht und exprimiert. Lysate transient transfizierter HEK293-Zellen wurden anschließend mit CT441 bzw. CT441° versetzt, für 4 Stunden bei 37°C inkubiert und die Proben mittels Western Blot analysiert (Abb. 30).

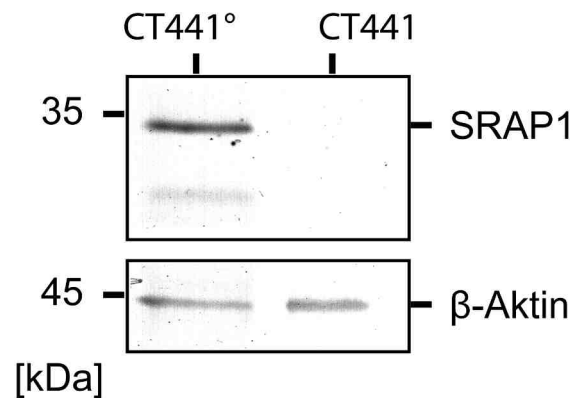


Abb. 30: Analyse der Spaltung von homolog in HEK293-Zellen synthetisiertem SRAP1 durch CT441. Die Inkubation mit der inaktiven Mutante CT441° führt zu keiner Degradation von SRAP1, während die Zugabe von CT441 zur vollständigen SRAP1-Degradation führt. Der Nachweis von  $\beta$ -Aktin dient der Sicherstellung der Analyse äquivalenter Probenvolumina.

Es erfolgt keine Spaltung von SRAP1 in Anwesenheit der Mutante CT441°, während CT441 eine vollständige Degradation von SRAP1 verursacht. Unter Berücksichtigung des Resultates der zeitabhängigen Degradation des in *E. coli* synthetisierten SRAP1 (Abschnitt 4.2.2.) kann festgehalten werden, dass die chlamydiale Protease CT441 in der Lage ist, SRAP1 (unabhängig von homologer bzw. heterologer Synthese) zu spalten.

#### 4.2.4. Charakterisierung der SRAP1:CT441 Interaktion in humanen Zellen

Die bisherigen *in vitro*-Experimente zeigen, dass SRAP1 zum Einen durch Proteasen aus *C. trachomatis* bzw. eventuell durch die Infektion aktivierte zelluläre Proteasen (Abschnitt 4.2.1.) abgebaut werden könnte. Zum Anderen wird das durch homologe und heterologe Expression synthetisierte SRAP1 durch rekombinant hergestelltes CT441 (Abschnitt 4.2.2. und 4.2.3.) abgebaut.

Der bisher verwendete Versuchsaufbau entspricht jedoch nicht der tatsächlich vorliegenden zellulären Umgebung einer Infektionssituation, da er voraussetzt, dass sich beide Interaktionspartner im identischen Zellkompartiment befinden.

Nach aktuellem Stand der Literatur liegt SRAP1 vorwiegend im Zellkern und im Zytoplasma der Wirtszelle vor. Für CT441 wird aufgrund des N-terminalen Signalpeptids jedoch eine Lokalisation im Periplasma vermutet (Lad et al., 2007a).

Um eine mögliche Interaktion von CT441 mit SRAP1 in einer zellulären Umgebung zu analysieren, wurden HEK293-Zellen mit einem das *sra1*-Gen tragenden Expressionsvektor transfiziert, da die zur Verfügung stehende Zelllinie HEK293 kein nachweisbares endogenes SRAP1 aufweist. Anschließend wurden die Zellen mit *C. trachomatis* infiziert und nach 8, 24, 32 und 48 Stunden p.i. mit einer 8 M Harnstoff/Benzonase-Lösung versetzt. Somit ist die sofortige Denaturierung aller zellulären und bakteriellen Proteine gewährleistet. Da bei der Zellernte sowohl die Inklusionsmembran als auch die zelluläre Plasmamembran mechanisch zerstört werden können und vormals in räumlich getrennten Kompartimenten vorliegende Proteine nun miteinander interagieren könnten, kann durch die Denaturierung eine artifiziell herbeigeführte Interaktion verhindert werden.

Als Kontrollproben dienten transient *sra1*-transfizierte, mock-infizierte HEK293-Zellen, die unter identischen Bedingungen gewonnen wurden. Die Analyse der Zellysatproben erfolgte mittels Western Blot unter Verwendung von anti-SRAP1-Antikörpern (Abb. 31).



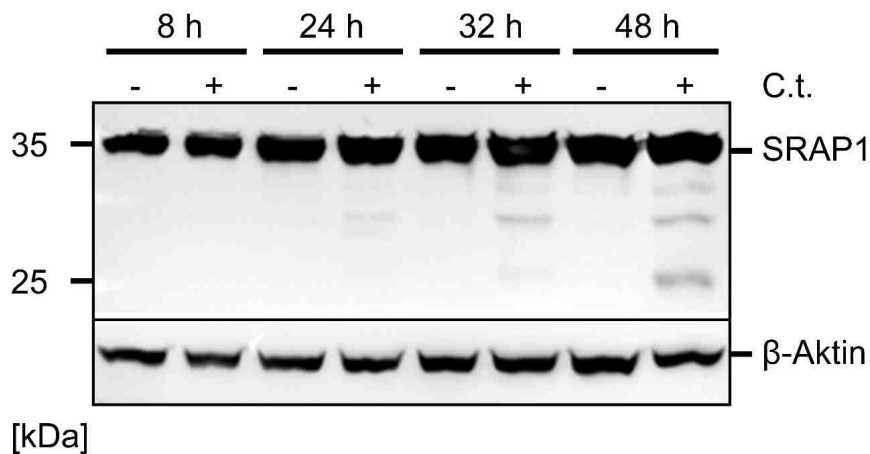


Abb. 31: Analyse der Degradation von homolog synthetisiertem SRAP1 in humanen HEK293-Zellen in der frühen (8 h p.l.), mittleren (24, 32 h p.l.) und späten (48 h p.l.) Phase des Infektionszyklus. Keine SRAP1-Degradation erfolgt in den mock-infizierten und der C.t.-infizierten 8 h p.l.-HEK293-Zelllysate-Probe. SRAP1-Degradationsbanden können in ihrer Intensität zunehmend, beginnend ab 24 h p.l., in den C.t.-infizierten HEK293-Zellen detektiert werden. Der Nachweis von  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

Kein Abbau von transient synthetisiertem SRAP1 kann in mit *C. trachomatis* infizierten HEK293-Zellen 8 h p.l. beobachtet werden, im Gegensatz zum Zeitpunkt 24 h p.l., wo vereinzelte, schwache Degradationsbanden niedrigeren Molekulargewichtes beobachtet werden können. Die Intensität dieser Degradationsbanden nimmt über die Infektionsdauer zwar etwas zu, jedoch wird die Majorität des SRAP1 nicht durch eine *C. trachomatis*-Infektion abgebaut. Keine Degradation findet in allen mock-infizierten HEK293-Zelllysate-Proben über den gesamten Versuchszeitraum statt. Um sicherzustellen, dass die in Abb. 31 festgestellten Degradationsbanden nicht aus der unspezifischen Bindung des anti-SRAP1-Antikörper an Proteine aus *C. trachomatis* resultieren, wurden in einem zusätzlich durchgeführten Kontrollexperiment nicht-transfizierte, mock bzw. mit *C. trachomatis* infizierte HEK293-Zellen, die kein SRAP1 synthetisieren, unter identischen Versuchsbedingungen kultiviert und analysiert (Anhang, Abb. 39). Es konnten keine unspezifischen Banden im Größenbereich der Abbauprodukte im Vergleich zur Abbildung 31 detektiert werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass homolog in HEK293-Zellen synthetisiertes SRAP1 durch eine *C. trachomatis*-Infektion nicht signifikant proteolytisch abgebaut wird. Zwar sind vereinzelte schwache Degradationsbanden zu sehen, ob jedoch CT441 hierfür verantwortlich ist, soll in den folgenden Experimenten näher beleuchtet werden.



#### 4.2.5. Detektion von CT441 in *C. trachomatis*-infizierten HEK293-Zellen

Es stellte sich zwangsläufig die Frage, ob CT441 zu den Zeitpunkten des Infektionszyklus, an denen eine sehr geringe SRAP1-Degradation festgestellt wurde (Abb. 30), in ausreichender Menge von *C. trachomatis* synthetisiert wird.

Um dies zu überprüfen, wurden HEK293-Zellen nach 48 h Kultivierung mock- bzw. mit *C. trachomatis* infiziert und nach 8, 24, 32 und 48 h p.i. in PBS aufgenommen. Die Detektion von CT441 erfolgte mit Hilfe des polyklonalen anti-CT441-Antikörpers (hergestellt durch Dr. Kensuke Shima, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universität zu Lübeck) im Western Blot (Abb. 32). Für die Verifizierung des CT441-Nachweises in den Zelllysaten, wurde rekombinant hergestelltes CT441 als Positivkontrolle in Spur 1 mitgeführt. Der Nachweis des zellulären Proteins GAPDH diente als Kontrolle, um sicherzustellen, dass identische Probenvolumina analysiert wurden.

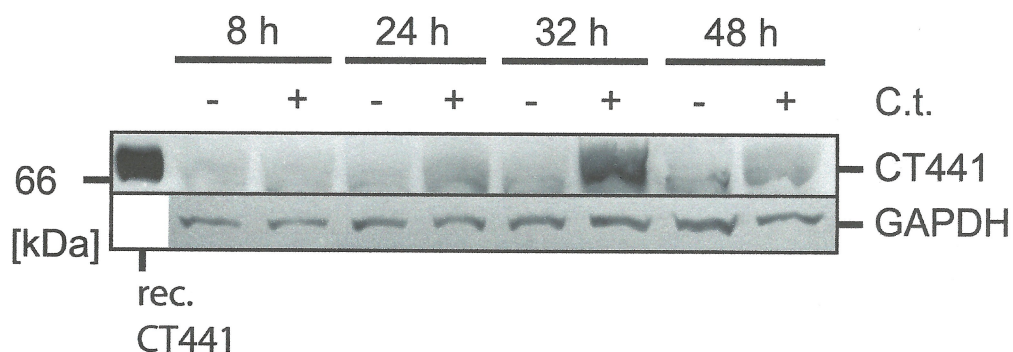


Abb. 32: Detektion von CT441 in *C.t.*-infizierten HEK293-Zellen. Als Positivkontrolle wurde rekombinant in *E. coli* synthetisiertes CT441 (rec. CT441) zur korrekten Abschätzung des Molekulargewichtes mitgeführt. Eine Detektion von CT441 ist in der frühen Phase des Infektionszyklus (8 h p.i.) nicht möglich, während eine leichte Schattierung in der *C.t.*-infizierten 24 h p.i.-Probe auf die beginnende CT441-Bildung hinweist. Der Nachweis von CT441 ist 32 h und 48 h p.i., im Vergleich zu den äquivalenten mock-infizierten Proben, möglich. Die Detektion von GAPDH als Ladekontrolle dient der Abschätzung äquivalenter Probenvolumina.

Eine Detektion von CT441 ist in der *C. trachomatis*-infizierten 8 h p.i.-Probe, sowie in allen mock-infizierten-Proben, nicht möglich. 24 h p.i. könnte eine schwache Schattierung in der *C. trachomatis*-infizierten Probe, im Vergleich zur mock-infizierten Probe, auf eine geringe Menge von CT441 hinweisen. In der *C. trachomatis*-infizierten 32 h p.i.-Probe kann eindeutig CT441 mit einem vergleichbaren Molekulargewicht zum rekombinant hergestellten Kontrollprotein gefunden werden. In

der *C. trachomatis*-infizierten 48 h p.i.-Probe kann CT441 hingegen nur schwach nachgewiesen werden. Hierbei ist jedoch festzuhalten, dass der Nachweis des Ladekontrollproteins GAPDH in dieser Probe ebenfalls schwächer als in der mock-infizierten 48 h p.i.-Probe ist, sodass die in dieser Phase massiv einsetzende Zellyse zum Ausschwemmen des Zielproteins in das Zellkulturmedium geführt haben könnte. Der Nachweis von CT441 in infizierten HEK-Zellen in der späten Phase (32 bzw. 48 h p.i.) des chlamydialen Infektionszyklus schließt weiterhin nicht aus, dass CT441 an der schwach detektierbaren Degradation von SRAP1 (Abb. 31) nach wie vor beteiligt sein könnte. Ein Nachweis von CT441 zu diesen Zeitpunkten der Infektion konnte zudem in HEp2- und HeLa-Zellen reproduziert werden, und scheint somit nicht ein auf *C. trachomatis*-infizierte HEK293-Zellen beschränktes Einzelphänomen (Anhang, Abb. 40) zu sein.

#### **4.2.6. Analyse der Wirtszell-Viabilität mittels Lactat-Dehydrogenase-Zytotoxizitätstest**

Da in den bisherigen Versuchen vor allem in der sehr späten Phase der Infektion (48 h p.i.) die Ladekontrollbanden des  $\beta$ -Aktin bzw. GAPDH (Abb. 31 und 32) im Vergleich zur mock-infizierten Probe schwächer ausgeprägt sind, stellte sich die Frage, ob die *C. trachomatis*-Infektion zu einer reduzierten Wirtszell-Viabilität führt. Mit Hilfe des kommerziellen Lactat-Dehydrogenase-Zytotoxizitäts-Tests kann die Integrität zellulärer Plasmamembranen näher untersucht werden. Aufgrund der fortschreitenden *C. trachomatis*-Infektion wird neben der Inklusionsmembran auch die zelluläre Plasmamembran der Wirtszelle in Mitleidenschaft gezogen. Dadurch werden zytoplasmatische Proteine wie die Lactatdehydrogenase (LDH) in das Zellkulturmedium freigesetzt. Die eingesetzte kolorimetrische, quantitative Methode erlaubt Rückschlüsse auf den Grad der Zellschädigung in einem zeitabhängigen Infektionsexperiment. HEK293-Zellen wurden mit dem *sra1*-haltigen Expressionsvektor transfiziert, kultiviert, anschließend mock- bzw. mit *C. trachomatis*-infiziert und die Zellkultur-Überstände 0 h, 8 h, 24 h, 32 h und 48 h p.i. für die Analyse verwendet (Abb. 33).

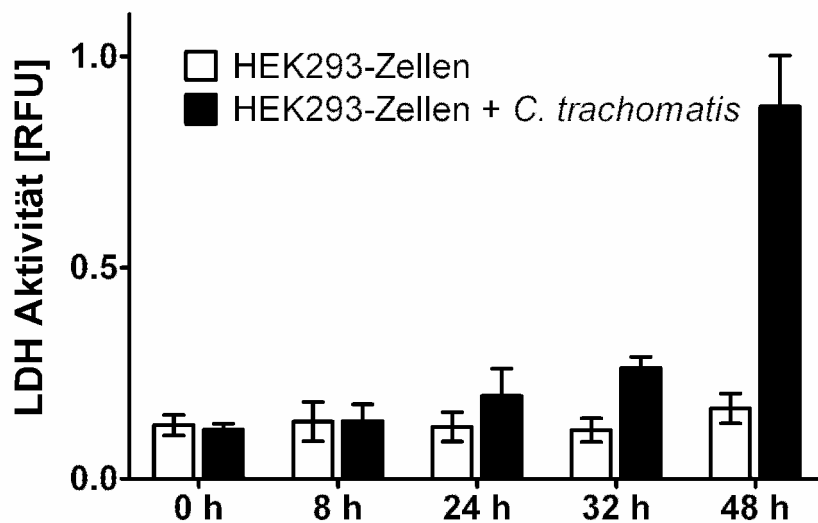


Abb. 33: Kolorimetrische Analyse der Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivität *C. trachomatis*-infizierter HEK293-Zellen während des Infektionszyklus. Im Vergleich zu mock-infizierten Zellen kann keine signifikante LDH-Aktivität bis zum Zeitpunkt 24 h p.i. in den Überständen *C.t.*-infizierter HEK293-Zellen festgestellt werden. Die LDH-Aktivität nimmt nach 32 h signifikant zu und erreicht ihr Maximum in der späten Phase der Infektion (48 h p.i.). Als Positivkontrolle dient die rekombinant hergestellte LDH des Analysekits.

Als Kontrollprobe dienen die Zellkulturüberstände zum Zeitpunkt 0 h, in denen keine LDH-Aktivität nachweisbar ist. Im Verlauf des Infektionszeitraums von 8 bis 24 h p.i. ist ebenfalls keine signifikant gesteigerte LDH-Aktivität in den *C. trachomatis*-infizierten Proben im Vergleich zu den jeweiligen mock-infizierten Proben zu beobachten. Im Gegensatz dazu ist 32 h p.i. eine leicht erhöhte und 48 h p.i. eine um ca. 4 bis 5-fach erhöhte LDH-Aktivität im Vergleich zu den jeweiligen nicht-infizierten Proben zu verzeichnen. Die statistische Auswertung mittels einer 2-way-ANOVA-Analyse unter Zuhilfenahme des Programms Prism5 zeigt eine signifikante LDH-Aktivität in den *C. trachomatis*-infizierten Zellen zum Zeitpunkt 32 und 48 h p.i. (Statistik siehe Anhang, Tab. 22). Somit ist festzustellen, dass die erhöhte LDH-Aktivität 32 h p.i. und 48 h p.i. offensichtlich auf eine Schädigung der Wirtszell-Plasmamembran, hervorgerufen durch die Infektion mit *C. trachomatis*, zurückzuführen ist. Dies korreliert mit den reduzierten  $\beta$ -Aktin- bzw. GAPDH-Banden in den anfangs erwähnten Western-Blot-Untersuchungen zum Nachweis der SRAP1-Degradation durch *C. trachomatis* bzw. zur Detektion von CT441 in infizierten HEK293-Zellen.

### **4.3. Untersuchung der Lokalisation von CT441 und SRAP1 in infizierten HEK293-Zellen**

Da eine Beteiligung von CT441 an der SRAP1-Degradation in der späten Phase des Infektionszyklus aufgrund der bisher gefundenen Hinweise nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, wurden zeitabhängige Lokalisationsstudien für CT441 sowie SRAP1 mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie in HEK293-Zellen durchgeführt. Dabei sollte zudem eruiert werden, ob CT441 in das Zytoplasma der Wirtszelle transloziert wird und auf diesem Wege für eine eventuelle SRAP1-Degradation verantwortlich ist. Die Synthese von SRAP1 wurde durch die transiente Transfektion in HEK293-Zellen induziert und eine Infektion mit *C. trachomatis* etabliert. Polyklonale Primärantikörper, gerichtet gegen SRAP1 und CT441, wurden verwendet, um die zu untersuchenden Zielproteine zu markieren. Die anschließend gebundenen fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper (Cy5-Maus-anti-CT441, FITC-Kaninchen-anti-SRAP1) ermöglichen die spezifische Detektion von CT441 und SRAP1 mittels der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM).

Eine verlässliche Detektion von CT441 und SRAP1 ist zum Zeitpunkt 24 h p.i. nicht möglich und auf eine damit verbundene vertiefende Optimierung des Immunfluoreszenz-Färbeprotokolls musste aus Zeitgründen verzichtet werden.

Für die späteren Zeitpunkte 32 und 48 h p.i. konnte jedoch ein reproduzierbares Färbeprotokoll etabliert werden. Alle Färbungen wurden mehrfach durchgeführt. Für die Ergebnisbetrachtung und Diskussion werden die im Folgenden dargestellten Abbildungen exemplarisch herangezogen.

Zum Infektionszeitpunkt 32 h p.i. ist SRAP1 prominent im Zytoplasma der Wirtszelle detektierbar (Abb. 34, links). CT441 kann in der chlamydialen Inklusion nachgewiesen werden, wobei jedoch unklar bleibt, ob sich CT441 innerhalb der Chlamydien oder im Inklusionslumen befindet. Ein Nachweis einer Translokation von CT441 in das Wirtszell-Zytosol ist hingegen nicht möglich. Zusätzlich sei angemerkt, dass für eine bessere „Orientierung“ die zelluläre und chlamydiale DNA mit DAPI angefärbt wurde.

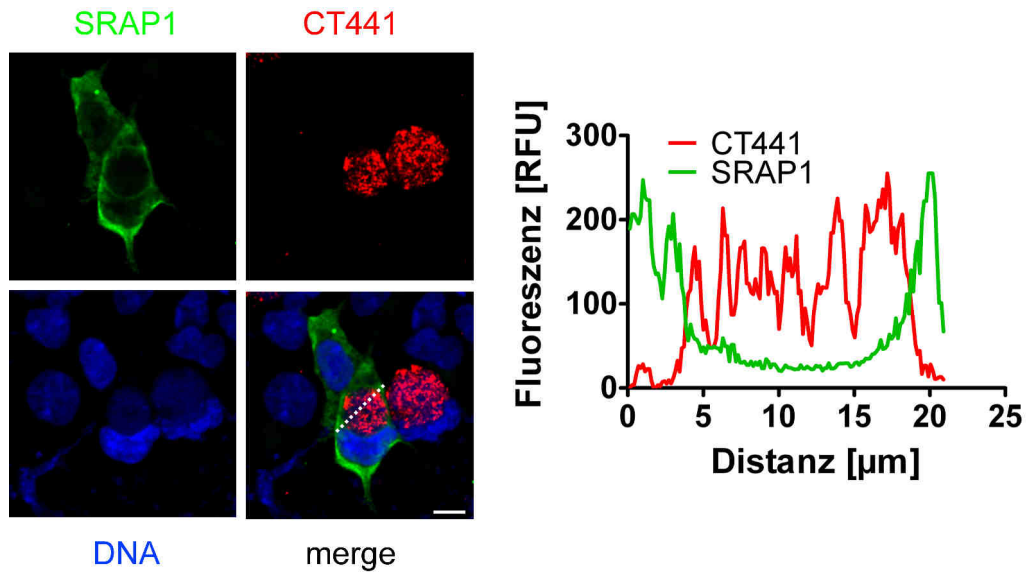


Abb. 34: Immunfluoreszenzfärbung von SRAP1 und CT441 in HEK293-Zellen 32 h p.i. mit intakter Inklusionsmembran. **A)** Die Einzelabbildungen zeigen die zytosolische Lokalisation von SRAP1 (grün), die Detektion von CT441 in der chlamydialen Inklusion (rot), den Nachweis der zellulären und chlamydialen DNA (blau) sowie die Überlagerung der Fluoreszenzkanäle (merge) mit Messbalken (5 µm). Die weiß-gestrichelte Linie entspricht der Messachse zur Analyse der Fluoreszenzsignalstärke. **B)** Verteilung der Fluoreszenzsignalstärke entlang der Messachse zeigt eine distinkte Verteilung von CT441 und SRAP1.

Um eine mögliche Co-Lokalisation von CT441 und SRAP1 genauer zu analysieren, wurde mit Hilfe des Programms Axiovision LE (Zeiss) die Fluoreszenzsignalstärke der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe entlang einer über die Inklusionsmembran gelegten Achse gemessen und ausgewertet (Abb. 34, rechts). Anhand der distinkten Verteilung des Fluoreszenzsignals für CT441 und SRAP1 ist festzustellen, dass eine Co-Lokalisation und damit einhergehend eine Translokation von CT441 in das Wirtszell-Zytoplasma oder eine Schädigung der Inklusionsmembran ausgeschlossen werden kann.

Zum Zeitpunkt 32 h p.i. kann jedoch auch in einigen Fällen ein beginnender Verlust der Stabilität bzw. Integrität der Inklusionsmembran beobachtet werden (Abb. 35).



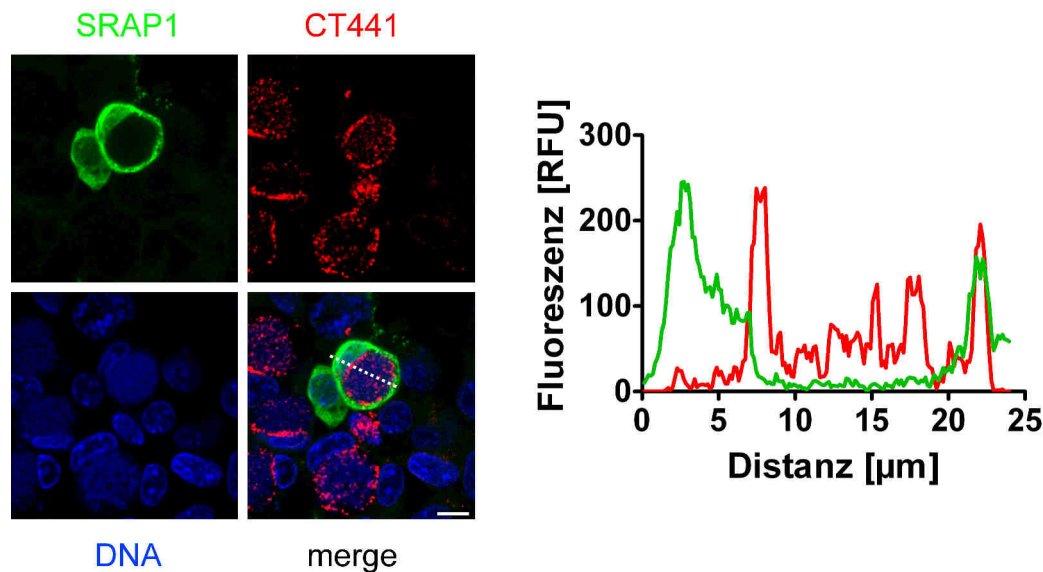


Abb. 35: Immunfluoreszenzfärbung von SRAP1 und CT441 in HEK293-Zellen 32 h p.l. mit beginnendem Verlust der Inklusionsmembran-Integrität. **A)** Die Einzelabbildungen zeigen die zytosolische Lokalisation von SRAP1 (grün), die vorwiegend ringförmige Konzentration von CT441 im Bereich der Inklusionsmembran (rot), den Nachweis der zellulären und chlamydialen DNA (blau) sowie die Überlagerung der Fluoreszenzkanäle (merge) mit Messbalken (5 µm). Die weiß-gestrichelte Linie entspricht der Messachse zur Analyse der Fluoreszenzsignalstärke. **B)** Verteilung der Fluoreszenzsignalstärke entlang der Messachse zeigt im linken Bereich eine distinkte Verteilung von CT441 und SRAP1, während die Überlappung der Fluoreszenzsignale von CT441 und SRAP1 im rechten Bereich auf den Verlust der Inklusionsmembran hinweist.

Charakteristisch ist die Konzentration von CT441 im Bereich der Inklusionsmembran, sichtbar in Form eines nahezu geschlossenen roten Ringes im Fluoreszenzbild der CT441-Färbung. Die Analyse der Fluoreszenzintensitäten für CT441 und SRAP1 entlang der Analyseachse (Abb. 35, rechts) zeigt im linken Bereich des Diagramms eine klare distinkte Verteilung. Dies entspricht der Situation einer intakten Inklusionsmembran, die eine Co-Lokalisation beider Zielproteine verhindert. Im Gegensatz dazu ist im rechten Bereich des Diagramms eine überlappende Verteilung beider Fluoreszenzsignale zu beobachten, was eventuell auf eine zerstörte Inklusionsmembran hinweist, einhergehend mit einer Co-Lokalisation von CT441 und SRAP1.

Die zum Zeitpunkt 32 h p.l. vermutlich beginnende Disruption der Inklusionsmembran setzt sich im Infektionsverlauf fort und betrifft 48 h p.l., dem Ende des Infektionszyklus entsprechend, nahezu jede infizierte Zelle (Abb. 36).

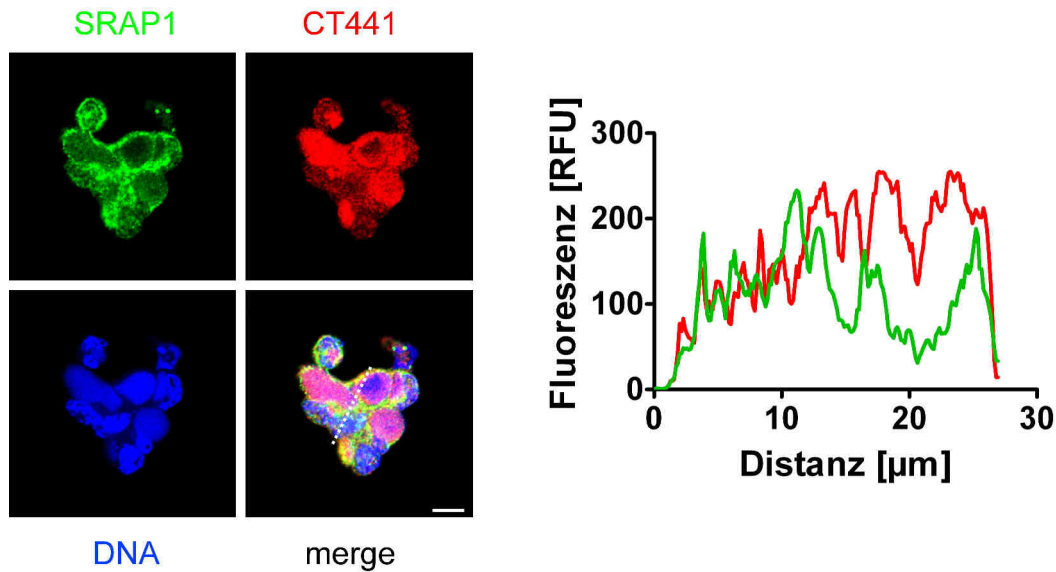


Abb. 36: Immunfluoreszenzfärbung von SRAP1 und CT441 in HEK293-Zellen 48 h p.i. mit nahezu vollständiger Auflösung der zellulären Membranen und der Inklusions-Membran. **A)** Die Einzelabbildungen zeigen die großflächige, zellübergreifende Lokalisation von SRAP1 (grün) und CT441 (rot), den Nachweis der zellulären und chlamydialen DNA (blau) sowie die Überlagerung der Fluoreszenzkanäle (merge) mit Messbalken (5 µm). Die weiß-gestrichelte Linie entspricht der Messachse zur Analyse der Fluoreszenzsignalstärke. **B)** Verteilung der Fluoreszenzsignalstärke entlang der Messachse zeigt eine nahezu vollständige Überlagerung der analysierten Fluoreszenzen von CT441 und SRAP1.

Zudem liegt eine stark fortgeschrittene Lyse der infizierten Wirtszellen vor. Daraus resultierend ist eine umfassende Co-Lokalisation von CT441 und SRAP1 zu beobachten, wie auch in der Verteilung der entsprechenden Fluoreszenzsignale ersichtlich ist.

#### 4.4. Identifikation der Chaperonaktivität von CT441

Aufgrund des Nachweises von CT441 in Lysaten infizierter Zellen in der mittleren und späten Phase des Infektionszyklus einerseits (32 h und 48 h p.i., siehe Abb. 32) und der andererseits nach wie vor spekulativen Funktion als sekretierter Pathogenitätsfaktor stellte sich die Frage, ob CT441 womöglich andere Funktionen im Rahmen der chlamydialen Infektion besitzt. So weist CT441 aufgrund seiner Domänenorganisation Ähnlichkeiten zu bereits bekannten bakteriellen Serinproteasen der HtrA-Familie auf (*high temperature requirement A*). Diese enthalten ebenfalls mindestens eine PDZ-Domäne und spielen, sowohl durch ihre proteolytische Aktivität als auch durch ihre Funktion als Faltungshelfer (Chaperon),

eine wichtige Rolle in der intrabakteriellen Proteinqualitätskontrolle. Daher wurde CT441 hinsichtlich einer möglichen Chaperonfunktion in einem Chaperonaktivitätstest untersucht. In diesem zeitabhängigen Test wird die bei 43°C hitze-inaktivierte Citratsynthase (CS) mit CT441, CT441° sowie verkürzten CT441-Varianten versetzt und die durch eine möglicherweise vorhandene Chaperonfunktion vermittelte Restaktivität von CS bei der CS-abhängigen Umsetzung von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat und Coenzym A photometrisch bestimmt (Abb. 37).

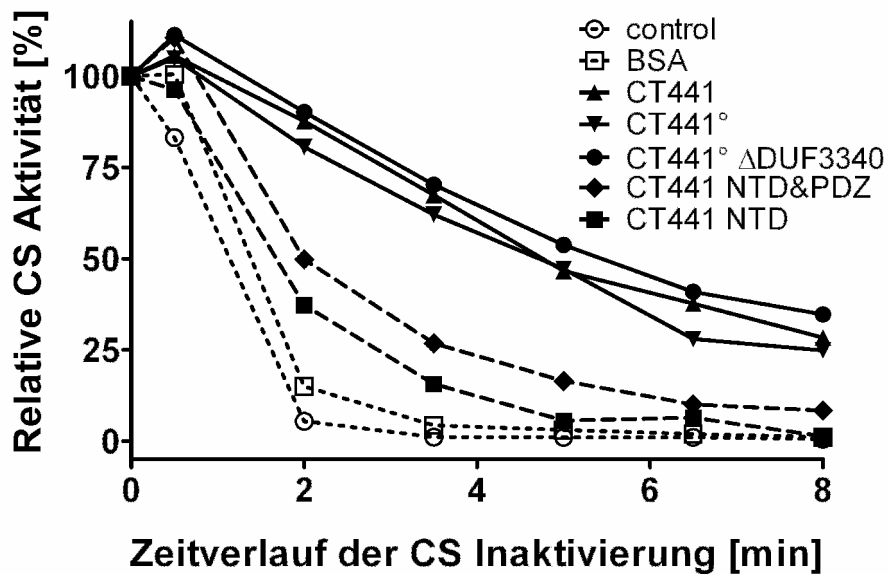


Abb. 37: Photometrische Untersuchung der Chaperonaktivität von CT441. CT441, CT441° sowie CT441° ΔDUF3340 stabilisieren die CS signifikant, während die C-terminale Deletion der Proteasedomäne und der DUF3340 (resultierendes Konstrukt CT441 NTD+PDZ) und der weiteren Deletion der PDZ-Domäne (resultierendes Konstrukt CT441 NTD) zu einer signifikant reduzierten CS-Aktivität führt. Als Negativkontrolle dienen die Chaperon-freie Kontrollprobe sowie eine BSA-haltige Probe. Die Messungen wurden 3-fach durchgeführt und mittels Prism 5 (GraphPad) ausgewertet.

In der Chaperon-freien Kontrollprobe (Negativkontrolle) verliert die CS innerhalb von 2 min nahezu vollständig die Aktivität. Die Zugabe von BSA in einer weiteren Kontrollprobe führt, wie zu erwarten, ebenfalls rasch zum Verlust der CS-Aktivität, da BSA über keine Chaperonaktivität verfügt. Im Gegensatz dazu führt die Zugabe von CT441 zu einer signifikant erhöhten CS-Restaktivität von ca. 80 % nach 2 min im Vergleich zur Negativkontrolle (siehe Statistik, Anhang, Tab. 16-21). Im Verlauf der Messung nimmt die CS-Aktivität graduell auf ca. 40 % nach 6,5 min ab. Die Zugabe der inaktiven Mutante CT441° führt zu einem ähnlichen Verlauf der Messkurve.



Somit zeichnet sich ab, dass CT441 über eine Chaperonaktivität verfügt, die durch die Inaktivierung der proteolytischen Aktivität nicht beeinflusst wird. Die Deletion der C-terminalen DUF3340 hat ebenfalls keinen negativen Einfluss auf die Stabilisierung der CS.

Eine weitere Verkürzung von CT441 durch die Deletion der Protease-Domäne und der sich anschließenden DUF3340 resultiert in einer signifikant verringerten Chaperonaktivität im Vergleich zum Volllängenprotein. Nach 2 min ist im Vergleich zur Kontrollprobe eine CS-Aktivität von ca. 50 % zu verzeichnen, die graduell auf ca. 15 % nach 6,5 min abnimmt. Die zusätzliche Deletion der PDZ-Domäne führt zu einer nochmals verringerten Chaperonaktivität der resultierenden N-terminalen Domäne (NTD) mit einer korrespondierenden CS-Aktivität von ca. 40 % nach 2 min im Vergleich zur Negativkontrolle. Nach 5 min ist hier keine CS-Aktivität mehr detektierbar.

Die Ergebnisse geben einen ersten Hinweis darauf, dass die Chaperonaktivität von CT441 vermutlich in der NTD lokalisiert ist, wobei die PDZ-Domäne ebenfalls involviert zu sein scheint. Eventuell spielt die PDZ-Domäne neben der vermuteten Funktion der Substratbindung für die proteolytische Aktivität auch eine wichtige Rolle für die Chaperonaktivität. Zudem scheint insbesondere die Protease-Domäne aufgrund ihrer Größe eine stabilisierende Rolle zu spielen, die wiederum essentiell für die vollständige Chaperonaktivität ist.

#### **4.5. Zusammenfassende Betrachtungen zur CT441°-Struktur, der CT441:SRAP1-Interaktion und der Chaperonaktivität**

Die Erforschung der Interaktionen von CT441 mit Wirtszellproteinen führte in den letzten Jahren nur zu wenigen Erkenntnissen, die eine klare Funktion als Pathogenitätsfaktor erkennen lassen. Zudem war die strukturbasierte Charakterisierung möglicher Funktionen von CT441 bisher aufgrund einer fehlenden 3D-Struktur nicht möglich. Zwar ist die *tail specific protease* aus *E. coli* (Tsp<sub>EC</sub>) als Serin-Protease mit der höchsten Sequenzidentität zu CT441 seit mehr als zwei Jahrzehnten bekannt und hinsichtlich ihrer Domänenorganisation, der proteolytischen Funktion und Substratspezifität charakterisiert (Silber et al., 1992; Keiler et al., 1995, Keiler & Sauer, 1995; Keiler et al., 1996). Jedoch ließen sich daraus bisher kaum Parallelen zur Funktion von CT441 ableiten (Lad et al., 2007a, b).

Vor diesem Hintergrund stellte die in dieser Arbeit ermittelte Ct441-Proteinstruktur und damit verbundene erste gelöste Struktur einer bakteriellen Tsp ein Novum dar.

Die NTD von CT441 mit ihrer hohen Flexibilität weist eine bisher unbekannt Faltung auf, da keine bereits beschriebenen homologen Proteinstrukturen in der PDB gefunden werden konnten. Der Aminosäuresequenzvergleich und die Strukturvorhersage (Abb. 22) mit Tsp aus pathogenen Gram-negativen Erregern legen nahe, dass Bakterienspezies-übergreifend ähnliche Domänen vorliegen und möglicherweise eine vergleichbare Funktion innehaben. Interessant in diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse des erstmalig für CT441 durchgeführten Chaperonassays (Abschnitt 4.4.), die zeigen, dass die NTD neben der PDZ-Domäne und der Proteasedomäne, vermutlich eine wichtige Rolle in der intrabakteriellen Proteinqualitätskontrolle spielt. Dies könnte bedeuten, dass in den Gram-negativen Pathogenen eine vergleichbare Funktion vorliegt.

Aufgrund des vermutlich hohen Flexibilitätsgrades der Loops, die die PDZ-Domäne mit der NTD und CTD verbinden, war es nicht möglich, die Struktur der PDZ-Domäne zu ermitteln. Eine daraus resultierende Beweglichkeit der PDZ-Domäne ist daher nicht ungewöhnlich, da diese Beobachtung in dem zu CT441 homologen Protein PIID1 (Liao et al., 2000) ebenso gemacht wurde wie in CtpB, wo die Beweglichkeit der PDZ-Domäne für die Aktivierung von CtpB essentiell ist (Mastny et al., 2013).

PDZ-Domänen erkennen und binden typischerweise den C-Terminus von Substratmolekülen, wobei auch in einigen Fällen eine Erkennung interner Sequenzen erfolgt. (Hillier et al., 1999; Beebe et al., 2000; Penkert et al., 2004; Ye & Zhang, 2013). Die CT441 I254W Mutante zeigte im Proteaseaktivitätstest, dass die Unversehrtheit des konservierten Substratbindemotivs der PDZ-Domäne von essentieller Bedeutung ist (Abb. 37). Daher sind verschiedene Wirkungsweisen während der Katalyse für die PDZ-Domäne vorstellbar. Zunächst ist es möglich, dass die PDZ-Domäne interne Peptidreste des Substratmoleküls in der Nähe der Spaltstelle(n) erkennt und dadurch die Spezifität der Substratbindung beeinflusst. Wie im Falle der Proteasen der HtrA-Familie und CtpB wäre auch eine, durch die Interaktion der PDZ-Domäne mit dem Substratmolekül vermittelte, regulatorische Funktion denkbar (Hansen & Hilgenfeld, 2013; Mastny et al., 2013). Für kurze Substrate wie die in dieser Arbeit verwendeten AMC-gekoppelten Peptide ist eine allosterische Regulation jedoch eher unwahrscheinlich, da die große C-terminale AMC-Gruppe die Erkennung durch die PDZ-Domäne und speziell den GIGV-Loop vermutlich verhindert. Dies kann jedoch für die Prozessierung größerer Substrate durchaus von Relevanz sein. Da CT441 *in vitro* in der Lage ist, SRAP1 zu spalten und eine Interaktion mit SRAP1 über die PDZ-Domäne beschrieben wurde, ist es interessant, dass SRAP1 im C-terminalen Bereich eine Sequenz enthält, die Ähnlichkeit mit einem prokaryotischen SsrA-Tag besitzt (SRAP1: <sub>213</sub>AANEEKSAATA<sub>223</sub>; SsrA: AANDENYALAA) (Keiler et al., 1996, Borth et al., 2010). Diese Markierung wird C-terminal an falsch-synthetisierte oder funktionsgestörte zyto- und periplasmatische Proteine angehängt und durch die PDZ-Domäne von TspS und anderer Proteasen der bakteriellen Proteinqualitätskontrolle erkannt, um eine effiziente proteolytische Degradation sicherzustellen (Keiler et al., 1996; Spiers et al., 2002). So spaltet Tsp<sub>EC</sub> ebenfalls Substratmoleküle die mit einem SsrA-Peptid-Tag versehen wurden und stellt somit eine wichtige Komponente der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle dar (Keiler et al., 1996). Es ist daher möglich, dass CT441 eine vergleichbare Funktion in der Proteinqualitätskontrolle in Chlamydien innehat.

Die Homologievergleiche mit bekannten Strukturen aus Prokaryoten, Archaeen und Eukaryoten zeigen, dass die CTD von CT441 eine hochkonservierte Domäne ist (Abschnitt 4.1.6.). Die detaillierte Analyse des aktiven Zentrums führt zudem zu der Annahme, dass CT441 über eine katalytische Triade im aktiven Zentrum verfügt. Dies wird unterstützt durch die in dieser Arbeit durchgeführten Proteinsequenz-Vergleiche und zusätzliche Angaben in der Literatur, die zeigen, dass der korrespondierenden Rest zu Q485 (in CT441) in TspS bzw. CtpAs (*C-terminal processing proteases*) aus Gram-negativen Pathogenen (*Simkania negevensis*, *Protochlamydia amoebophila*, *E. coli*, *Yersinia pestis*, *Salmonella enterica*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae*), Gram-positiven Pathogenen (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) sowie aus Algen (*Acutodesmus obliquus*) und Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*) hochkonserviert ist (Abb. 27; Inagaki et al., 2001; Hoge et al., 2011).

<i>C. trachomatis</i>	418	VV-----VVSRYADG-SVKRYRTISPQK-FYDGPLAVLVSKSSA	AAEIVAQTLQDYGVALIVGDQQT	YGGTIQHQT	489
<i>S. negevensis</i>	411	IV-----VSIKDSNG-NIQHLRFESDL-TWDGPLLVLTKGS	AAEIVAQTLQDYGRAVLVGPSTW	GKGSYQTF	482
<i>P. amoebophila</i>	429	VI-----VISKYSTG-EERFYRDVDGKI-AYDGPLVVLISK	AQALQDYGVAIVVGDH	TYGGTIQT	500
<i>E. coli</i>	415	PI-----VQVRDNG-KVRESDTDGQV-FYKGPLVVLVDR	FAAAMQDYGRALVVGEP-T	FGKGT	485
<i>Y. pestis</i>	414	PV-----VQVRDNG-KVRESDTDGQV-FYKGPLVVLVDR	FAAAMQDYGRALVVGEP-T	FGKGT	494
<i>S. enterica</i>	415	PI-----VQVRDNG-KVRESDTDGQV-FYKGPLVVLVDR	FAAAMQDYGRALVVGEP-T	FGKGT	485
<i>L. pneumophila</i>	265	KAGKQEMIVYTEGRLPGSKFTALANPGDV-LD	NAPIVVLINNGS	ASEIVAGALKDNKRAI	342
<i>V. cholerae</i>	410	PV-----VQVRDSYG-RVNVNSDTDGS	SYSGPMTVLINRYS	ASEIFAAAMQDYGRA	480
<i>S. aureus</i>	289	GK-----TVVKLEKGDTEAIQTSNDALKEAKMD	ISILVNEGS	ASEVFTGALKDYNKAK	362
<i>B. subtilis</i>	272	QP-----YIQIAERNQDGGKRYFSTLTHKK---	AYPNVITDKGS	ASEILAGALKEAGHYDV	342
<i>A. obliquus</i>	259	DL-----VLIADSQGIRDYISADG-NSI-DS	ATPLVVLVNRGT	ASEVLAGALKDSKRGL	329
<i>A. thaliana</i>	364	VI-----VYICDSRGVRDIYDTDGSNAI-AT	SEPLAVLVNKG	TAASEILAGALKDNKRAL	435

Abb. 27: Sequenz-Alignment der Aminosäurereste in der Nähe des aktiven Zentrums von CT441 mit Serin-Proteasen aus *Simkania negevensis*, *Protochlamydia amoebophila*, *E. coli*, *Yersinia pestis*, *Salmonella enterica*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Acutodesmus obliquus* und *Arabidopsis thaliana*. Der Glutaminrest 485 in CT441 ist in diesen Serinproteasen hochkonserviert.

Zudem untermauern die Ergebnisse des Protease-Aktivitätstests die Rolle des Aminosäurerestes Q485. Die Mutation des S455 und K481 im aktiven Zentrum führt, wie zu erwarten, zum völligen Verlust der proteolytischen Aktivität von CT441. Wird

jedoch allein Q485 zu Alanin mutiert, ist ebenfalls keine Spaltung des Reporterpeptids DV7-AMC zu beobachten (Abschnitt 4.1.8.2.).

Interessanterweise bildet CT441 im Kristall Homodimere aus, wobei die Dimerisierung, vermittelt über die Helices  $\alpha O$  und  $\alpha Q$  sowie den  $\beta 2$ -3-Loop in der DUF3340, sich grundlegend von der bei CPAF und CtpB beobachteten unterscheidet (Huang et al., 2008, Mastny et al., 2013). Die beobachtete Dimerisierung könnte die bisher unbekannte Funktion der DUF3340 in der CTD darstellen. Einen Hinweis auf eine biologische Relevanz der Dimerisierung liefern die Ergebnisse des Protease-Aktivitätstests, in dem keine proteolytische Funktion des DUF3340-defizienten CT441 festgestellt wurde (siehe Abschnitt 4.1.8.2.). Andererseits zeigte die für die Reinigung verwendete Größenausschlusschromatographie, dass CT441 und CT441<sup>o</sup> als Monomer in Lösung vorliegen. Ursächlich hierfür könnten z.B. der dabei vorliegende erhöhte Druck oder Scherkräfte sowie der im Vergleich zur Kristallisationsbedingung (pH 6,0) erhöhte pH-Wert von 7,4 sein. Für die identifizierte Chaperonaktivität von CT441 spielt die Dimerisierung keine Rolle, da DUF3340-defizientes CT441 eine zum Volllängenprotein vergleichbare Aktivität besitzt (s. Abschnitt 4.4.).

Die ermittelte CT441-Struktur stellt einen Ausgangspunkt für zukünftige funktionelle Analysen dar. So sind zielgerichtete Mutationen in der NTD bzw. PDZ-Domäne notwendig, um die essentiellen Aminosäurereste für die Vermittlung der Chaperonaktivität zu identifizieren. Um die Annahme klar zu bestätigen, dass die Dimerisierung relevant für die proteolytische Aktivität ist, sind Mutationen einzelner Aminosäurereste in der DUF3340 nötig. Dies führt eventuell zur Identifikation einer spezifischen Region, die wiederum verwendet werden könnte, um einen strukturbasierten Inhibitor zu entwickeln. Die Blockade des Dimerisierungs-Interfaces könnte neben der Entwicklung eines gegen das aktive Zentrum der Protease gerichteten Inhibitors ein mögliches alternatives Ziel für die Wirkstoffentwicklung darstellen. Es wäre theoretisch möglich, dass durch die Inhibition der proteolytischen Aktivität oder der Chaperonaktivität die Chlamydien nicht in der Lage wären, falschgefaltete Proteine im Rahmen der Proteinqualitätskontrolle zu korrigieren bzw. abzubauen. Dies würde zur Akkumulation dieser Proteine führen und das Recycling von Aminosäuren für die Neusynthese von Proteinen wäre erheblich gestört. Ob dadurch die Erreger verstärkt in die Persistenz eintreten oder in Kombination mit etablierten Antibiotika eine vollständige Beseitigung möglich wäre, ist jedoch derzeit spekulativ.



Aufgrund der bisher in der Literatur teils kontrovers diskutierten Rolle von CT441 im Infektionsprozess, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss eine *C. trachomatis*-Infektion auf SRAP1 hat bzw. ob SRAP1 ein Substrat von CT441 darstellt.

Die *in vitro*-Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Spaltung des eukaryotischen Co-Aktivators des Östrogenrezeptors SRAP1, unabhängig von einer Herstellung in prokaryotischen oder eukaryotischen Expressionssystemen, durch den direkten Kontakt mit *C. trachomatis* und CT441 erfolgt (Abb. 28 und 29). Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Borth et al. (2010), die mit Hilfe von *in vitro*-Interaktionsstudien und Immunfluoreszenzfärbungen beobachteten, dass SRAP1 mit der PDZ-Domäne von CT441 interagiert und dadurch im Zytoplasma zurückgehalten, jedoch nicht proteolytisch abgebaut wird.

Im Kontext einer *C. trachomatis*-Infektion humaner HEK293-Zellen konnte hingegen keine eindeutige Spaltung von SRAP1 nach Gewinnung der Zelllysate unter denaturierenden Bedingungen beobachtet werden (Abb. 31). Zwar treten in der sehr späten Phase des Infektionszyklus vereinzelte Degradationsbanden auf, jedoch korrelieren diese zeitlich mit der einsetzenden Lyse der Inklusions- und Plasmamembranen, wie die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen bzw. des LDH-Tests zeigen (Abb. 33, 35, 36). Dadurch ist eine Co-Lokalisation von SRAP1 mit chlamydialen Proteasen einschließlich CT441, die für die Degradation von SRAP1 verantwortlich sein könnten, zwar möglich, jedoch handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine unspezifische Interaktion nach der Lyse der Membranen in der späten Phase der Infektion, die nach derzeitigem Kenntnisstand eine zielgerichtete Funktion im Infektionszyklus nicht erkennen lässt. Daher ist relativ sicher (aber nicht absolut) davon auszugehen, dass es sich im Falle des zellulären Co-Aktivators des Östrogenrezeptors SRAP1 nicht um ein spezifisches Substrat der chlamydialen Protease CT441 während der Infektion handelt. Ein definitiver Ausschluss von SRAP1 als CT441 Substrat ist deswegen nicht zulässig, weil eine offensichtlich starke Über-Produktion von SRAP1 in den HEK293-Zellen durch die Transfektion hervorgerufen wird und eine Translokation weniger CT441-Moleküle in die Wirtszelle nicht endgültig ausgeschlossen werden kann. Es wäre daher möglich, dass SRAP1 im Überschuss vorliegt und eine geringe CT441-vermittelte Degradation mit Hilfe der eingesetzten Methode des Western Blots nicht detektierbar ist. Letztendlich ist in Zukunft die Wiederholung des Experiments mit einem CT441-

defizienten *C. trachomatis*-Stamms nötig, um die Frage einer Beteiligung von CT441 an der SRAP1-Degradation endgültig zu beantworten.

Im allgemeinen Kontext der Infektion humaner Wirtszellen mit *C. trachomatis* stellte sich zudem die Frage, ob eine Translokation von CT441 in das Wirtszell-Zytoplasma stattfinden kann. Aufgrund der bisher veröffentlichten Erkenntnisse verschiedener Arbeitsgruppen ist festzustellen, dass ambivalente Auffassungen bzw. Vermutungen hinsichtlich der Lokalisation von CT441 während der Infektion bestehen. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen (Abschnitt 4.3.) konnte keine Translokation von CT441 aus den Chlamydien bzw. der bakteriellen Inklusion in das Wirtszell-Zytoplasma vor der Lyse der Inklusionsmembran festgestellt werden. Dies stimmt mit Beobachtungen von zwei Arbeitsgruppen überein, die ebenfalls mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen keine Lokalisation von CT441 außerhalb der Inklusion feststellten (Shaw et al., 2002; Zhong, 2011).

In einigen Publikationen wird jedoch sowohl eine periplasmatische Lokalisation als auch eine Lokalisation im Wirtszell-Zytoplasma für CT441 angenommen. Diese Annahme beruht auf der Präsenz des N-terminalen Signalpeptids in CT441, das den Transport mit Hilfe des Typ-II-Sekretionssystems in das bakterielle Periplasma sowie auf unbekanntem Weg weiter in die Wirtszelle sicherstellen soll. Die Annahme einer Lokalisation im Zytoplasma der Wirtszelle wird weiter gestützt durch Experimente zur p65-Degradation durch CT441 zwecks Modulation des NF $\kappa$ B-Signalweges, da davon ausgegangen wird, dass hierfür CT441 im Wirtszell-Zytoplasma vorliegen muss (Lad et al., 2007a; Chen et al., 2010; Christian et al., 2010). Ebenso wurde von Borth et al. eine Lokalisation von CT441 im Wirtszell-Zytoplasma für die Bindung von SRAP1 angenommen (Borth et al., 2010).

Das Dilemma der bisher durchgeführten Studien hinsichtlich der Funktion als Effektorprotein und der Lokalisation von CT441 im chlamydialen Infektionszyklus besteht darin, dass keine funktionellen Mutationen an CT441 direkt, oder an Bestandteilen von möglicherweise beteiligten Sekretionssystemen durchgeführt werden konnten. Dies ist (bzw. war) ein Charakteristikum der Forschung mit Chlamydien und kann erst durch die derzeit beginnende Etablierung von Methoden zur genetischen Manipulation effektiv geändert werden. Es soll außerdem nicht unerwähnt bleiben, dass die Immunfluoreszenzfärbung als derzeitige Methode der Wahl für Lokalisationsstudien von CT441 Limitierungen hinsichtlich des

Auflösungsvermögens aufweist, die eine Translokation von CT441 in das Wirtszell-Zytoplasma im Umfang von wenigen Molekülen nicht aufzulösen vermag. Falls daher CT441, unabhängig von den Ergebnissen bzgl. der unspezifischen Interaktion mit SRAP1, tatsächlich eine Funktion als Effektorprotein im Infektionszyklus haben sollte, können über die hierfür nötigen Transportmechanismen nur Spekulationen angestellt werden.

Herausragende Entwicklungen der letzten zwei Jahre auf dem Feld der genetischen Manipulation von Chlamydien werden die Erforschung der Wirts-Pathogen-Interaktionen tiefgreifend verändern. Derzeit liegt der Fokus größtenteils noch auf der Methodenentwicklung und deren Etablierung. So ist es z.B. derzeit möglich, mittels chlamydialer Plasmide Antibiotika-Resistenzgene in die Chlamydien einzubringen, die eine Selektion von genetisch-veränderten Chlamydien zukünftig sicherstellen sollen. Des Weiteren wurden diese Plasmide modifiziert, um als „Shuttle-Vektor“ definierte Gene in die Chlamydien einzubringen und zu exprimieren. Zukünftig wird es möglich sein, Null-Mutationen (Knockouts) zur Ausschaltung spezifischer Gene im chlamydialen Genom zu etablieren, um somit die funktionelle Charakterisierung von Pathogenitätsfaktoren wesentlich zu verbessern (Beare et al., 2011; Kari et al., 2011; Agaisse & Derré, 2013; Song et al., 2013; Wang et al., 2013; Wickstrum et al., 2013). Im Falle der CT441-SRAP1-Interaktion könnte auf diesem Wege u.a. untersucht werden, ob ein CT441-defizienter *C. trachomatis*-Stamm für die in dieser Arbeit festgestellte schwache SRAP1-Degradation in HEK293-Zellen verantwortlich wäre, die einen definitiven Ausschluss von SRAP1 als CT441-Substrat bisher nicht zulässt, oder ob hierfür womöglich andere Proteasen in Frage kommen (vgl. Abb. 31). Die Ausschaltung essentieller Komponenten des Typ-II-Sekretionssystems wird zudem die Rolle von CT441 als sekretierter Pathogenitätsfaktor in der Wirtszelle einerseits oder eine intrabakterielle Funktion andererseits näher beleuchten.

Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse hinsichtlich der Interaktion von CT441 mit SRAP1, sowie aus den Lokalisationsstudien mittels der Immun-Fluoreszenzfärbungen ist eine intrabakterielle Funktion von CT441 möglich. So führte die funktionelle Analyse von rekombinant hergestelltem CT441 erstmals zur Identifikation einer Chaperonaktivität für eine Tsp überhaupt (Abschnitt 4.4.). Proteine mit Chaperonfunktionen sind in Bakterien seit mehreren Dekaden ein intensiv studiertes Themengebiet und Chaperone werden mit unterschiedlichsten Aufgaben



vor allem innerhalb des Bakteriums in Verbindung gebracht. So stellen z.B. in *E. coli* Chaperone u.a. die Etablierung der Porenbildung des Sec-abhängigen Typ-II-Sekretionssystems in der äußeren Bakterienmembran sicher, die für die Translokation von Proteinen über die äußere Bakterienmembran in den extrabakteriellen Raum wichtig ist (Hardie et al., 1996). Periplasmatische Chaperone wie DegP, DegQ und DegS, die der HtrA-Familie angehören, sind essentielle Faktoren in der periplasmatischen bakteriellen Proteinqualitätskontrolle. Diese stellen ein Überleben des Organismus unter suboptimalen Umweltbedingungen, hervorgerufen durch erhöhte Temperatur, ungünstigen pH-Bedingungen sowie oxidativem oder osmotischen Stress, sicher (Spiess et al., 1999; Clausen et al., 2011; Wrase et al., 2011; Malet et al., 2012; Hansen & Hilgenfeld, 2013). Die bifunktionalen HtrA-Proteine sind Serinproteasen mit einer katalytischen Triade und verfügen über mindestens eine C-terminale PDZ-Domäne für die Bindung miss-gefalteter oder beschädigter Proteine, die ATP-unabhängig entfernt werden (Hansen & Hilgenfeld, 2013).

Entweder werden dabei die Substratproteine mit Hilfe der Chaperon-Aktivität bei niedrigen Temperaturen in die korrekte Konformation überführt oder bei erhöhten Temperaturen als Stress-Signal proteolytisch abgebaut (Spiess et al., 1999).

Ergebnisse von Cryo-EM-Analysen zeigen, dass die Chaperonaktivität von HtrAs meist von der Ausbildung von Oligomeren abhängig ist (Malet et al., 2012).

Im Gegensatz dazu ist die Ausbildung oligomerer Strukturen für die Chaperonaktivität von CT441 nicht notwendig. Die Deletion der DUF3340, die an der Ausbildung des Dimerisierungs-Interface beteiligt ist, führt nicht zu einer Verringerung der Chaperonaktivität. Dies ist interessant, da basierend auf den durchgeführten Protease-Assays die Ausbildung eines funktionellen Dimers eine wichtige Rolle für die proteolytische Aktivität von CT441 zu spielen scheint. Andererseits führt die weitere Deletion der Protease-Domäne zu einer signifikant reduzierten Chaperonaktivität. Dies zeigt, dass vermutlich die Chaperonaktivität mit der NTD bzw. PDZ- Domäne assoziiert ist. Gleichwohl scheint die Proteasedomäne aufgrund ihrer Größe einen stabilisierenden Effekt auszuüben.

In bakteriellen Erregern wie enteropathogenen *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Shigella flexneri* und *Neisseria gonorrhoeae* wurde interessanterweise auch eine Beteiligung von HtrAs an der Infektion in Form sekretierter Pathogenitätsfaktoren beobachtet (Hoy et al., 2010, 2012). *C. trachomatis* besitzt ebenfalls ein HtrA-Protein

(cHtrA), für das sowohl eine Protease- als auch eine Chaperonfunktion beschrieben wurde und das auch im Inklusionslumen und im Zytoplasma der Wirtszelle lokalisiert ist (Huston et al., 2007; Wu et al., 2011). Die Autoren schließen daher eine Beteiligung am Infektionszyklus nicht aus.

Zwar ähnelt CT441 den HtrA-Proteinen hinsichtlich der Präsenz eines N-terminalen Signalpeptids, der PDZ-Domäne sowie einer Serin-Proteasedomäne; Vergleiche der CT441-Struktur mit Proteinstrukturen bakterieller HtrAs zeigten jedoch keine signifikanten Übereinstimmungen der C $\alpha$ -Atompositionen. Aminosäure-Sequenzvergleiche mit cHtrA, für das bisher keine Proteinstruktur verfügbar ist, zeigten ebenfalls keine signifikanten Identitäten auf.

Wie bereits erwähnt besitzt hingegen CT441, basierend auf Aminosäure-Sequenzvergleichen und der *in silico* abgeleiteten Domänenorganisation, Ähnlichkeiten zur periplasmatischen Protease Tsp<sub>EC</sub> (2.5.1., Abb. 5), dass in der periplasmatischen Proteinqualitätskontrolle neben den HtrAs eine wichtige Rolle einnimmt.

Erschwert wird der Vergleich von CT441 mit Tsp<sub>EC</sub> allerdings dadurch, dass keine Tsp<sub>EC</sub>-Proteinstruktur vorliegt. Somit können hinsichtlich der Funktion von CT441 zwar experimentelle Daten von Tsp<sub>EC</sub> herangezogen, jedoch keine strukturbasierten Vergleiche durchgeführt werden. Alle bisherigen experimentellen Daten für Tsp<sub>EC</sub> beziehen sich auf die proteolytische Aktivität im Abbau SsrA-markierter missgefalteter Proteine, während diesbezüglich bisher keine Analysen mit SsrA-markierten Substraten mit CT441 durchgeführt wurden (Keiler et al., 1996). Andererseits wurden keine Untersuchungen hinsichtlich einer Chaperonfunktion von Tsp<sub>EC</sub> durchgeführt und somit stellt die identifizierte Chaperonfunktion von CT441 bisher ein Novum innerhalb der Tsp<sub>s</sub> dar. Eine mögliche Parallele hinsichtlich der Chaperon-Aktivität von CT441 zu Tsp<sub>EC</sub> könnte sich daraus ergeben, dass Tsp<sub>EC</sub> wie CT441 über eine NTD mit unbekannter Funktion sowie über eine PDZ-Domäne, die bisher mit der Substratbindung für die proteolytische Aktivität mit Hilfe der Proteasedomäne in Verbindung gebracht wurde, verfügt. Es wäre durchaus denkbar, dass die Tsp<sub>EC</sub>-NTD mit Hilfe der PDZ-Domäne ebenfalls an einer Chaperonaktivität beteiligt ist, die bisher nicht identifiziert wurde.

Letztendlich kann auf Basis der derzeit verfügbaren Daten für CT441 und Tsp<sub>EC</sub> keine klare Antwort auf die Frage einer intrabakteriellen Funktion von CT441 im Kontext der Proteinqualitätskontrolle gegeben werden, sodass zukünftigen

Untersuchungen die Identifizierung essentieller Aminosäurereste für die Chaperonfunktion in CT441 und die Überprüfung der Beteiligung an der Degradation falsch-gefalteter, SsrA-markierter Proteine obliegt.

Zusammenfassend scheinen nach aktuellem Stand der Literatur die Chlamydien wie auch *E. coli* über mehrere Wege zur Sicherstellung der Protein-Qualitätskontrolle zu verfügen. Neben dem bekannten HtrA-vermittelten Mechanismus ist es theoretisch möglich, dass durch das bi-funktionale CT441 als Vertreter der TspS sowohl die Proteolyse als auch die Überführung von falsch-gefalteten Proteinen in deren korrekte Konformation mittels der Chaperonfunktion erfolgt. Es ist jedoch unklar, wann in welcher Form diese Mechanismen zum Tragen kommen und inwieweit zudem eine aktive Beteiligung am Infektionszyklus vorliegt. Die erstmalige Identifizierung der Chaperonaktivität von CT441 legt jedoch eine Vielzahl von zukünftigen Experimenten nahe, die zwingend angegangen werden sollten. Es muss in zukünftigen Experimenten eruiert werden, ob CT441 analog zu Tsp<sub>EC</sub> in der Lage ist SsrA-markierte Substratmoleküle proteolytisch abzubauen. Andererseits ist es ebenso notwendig zu untersuchen, ob Tsp<sub>EC</sub> über eine bisher nicht identifizierte Chaperonfunktion verfügt und somit möglicherweise ein CT441-Funktionshomolog darstellt.

## 5. Anhang

Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung von CT441 bzw. CT441-Varianten:

Nr.	Oligonukleotid-Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5´ - 3´)	Beschreibung
1	ct441 fwd	TATCAGCATGCGCAGAGCCTCTTCGACGAC	Amplifikation des CT441-Vollängenkonstrukt
2	ct441 rev	CGGGGTACCTTATTGAGCTGGAGTTTGTGATATAG	
3	NDUF+PDZ+Pro rev	CGGGGTACCTTGATCAGCTGGTAGAGCATACT	In Kombination mit Primer 1 Amplifikation von Konstrukt CT441 ΔDUF3340
4	NDUF+PDZ rev	CGGGGTACCGATAATGCCATTACCGTACGGC	In Kombination mit Primer 1 Amplifikation von CT441 NTD&PDZ
5	NDUF rev	CGGGGTACCAGCAAGGACTTCTTTAACCACAAC	In Kombination mit Primer 1 Amplifikation von CT441 NTD
6	ct PDZ+Pro fwd	TATCAGCATGCGGAGGCCCTGCTGATAAAAC	In Kombination mit Primer 2 Amplifikation von Konstrukt CT441 ΔNTD
7	ct Pro fwd	TATCAGCATGCGGTAAGATCACCTTGCACTCTTTC	In Kombination mit Primer 2 Amplifikation von Konstrukt CT441 Protease&DUF3340

Tab. 12: Die Kombination der Oligonukleotide Nr. 6 und Nr. 3 wurde zur Herstellung von Konstrukt CT441 PDZ&Protease verwendet. Die Synthese von Konstrukt CT441 Protease erfolgte mit den Oligonukleotiden Nr. 7 und Nr. 3. Die Schmelztemperatur aller Oligonukleotide beträgt ca. 60°C. In rot sind die jeweiligen *PaeI*- (fwd-Oligonukleotid) bzw. *KpnI*-Schnittstellen (rev-Oligonukleotid) dargestellt.

Verwendete Oligonukleotide zur Mutation von CT441:

Nr.	Oligonukleotid-Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5´- 3´)	Beschreibung
8	CT441° fwd	TTCCGCTG <b>CGG</b> CAGCAG	Mutation von Serin 455 zu Alanin
9	CT441° rev	TCTGCTGC <b>CGC</b> AGCGGA	
10	CT441 K481A fwd	CAACAAACTTATGGAG <b>GCC</b> GGAACCATCCAACAT	Mutation von Lysin 481 zu Alanin
11	CT441 K481A rev	ATGTTGGATGGTTCC <b>GGCT</b> CCATAAGTTTGTTG	
12	CT441 Q485A fwd	GGAAAAGGAACCATC <b>GCC</b> CATCAGACTATCACT	Mutation von Glutamin 485 zu Alanin
13	CT441 Q485A rev	AGTGATAGTCTGATG <b>GGC</b> GATGGTTCCTTTCC	
14	CT441 I254W fwd	AAAGGCATGTGTGGCT <b>TGG</b> GGAGTCGTGCTTAAA	Mutation von Isoleucin 254 zu Tryptophan
15	CT441 I254W rev	TTTAAGCACGACTCC <b>CCA</b> GCCACACATGCCTTT	

Tab. 13: Auflistung der Mutagenese-Oligonukleotide zur Inaktivierung der Aminosäurereste S455, K481 und Q485 im aktiven Zentrum sowie zur Mutation des GIGV-Loops der PDZ-Domäne.

Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung des *sra1*-Gens einschließlich der Korrektur der Nukleotidsequenz im Vorfeld der homologen SRAP1-Produktion:

Nr.	Oligonukleotid-Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5´- 3´)	Beschreibung
16	<i>sra1</i> fwd	GCG <b>CATAT</b> GATGACGCGCTGCCCGCT	fwd-Oligonukleotid für die Amplifikation des <i>sra1</i> -Gens
17	<i>sra1</i> rev1	GAAGCCTGGTATGGTATGGTTCTTCTCAGCTGTGGCTGCAGA	Sequenzkorrektur und 1. Verlängerung des C-Terminus
18	<i>sra1</i> rev2	CGGCG <b>CTCGAG</b> TGAAGCCTGCTGGAAGCCTGGTATGGTATGTTCTTCTCAG	2. Verlängerung des C-Terminus und Oligonukleotid für die Amplifikation von <i>sra1</i> -Gen in Kombination mit Oligonukleotid Nr. 16
19	<i>sra1</i> mut fwd	CAGCAGGCTTCAT <b>TA</b> ACTCGAGGATCCG	Insertion des Stoppcodons (blau) im <i>sra1</i> -Expressionskonstrukt
20	<i>sra1</i> mut rev	CGGATC <b>CTCGAG</b> TTATGAAGCCTGCTG	

Tab. 14: Auflistung der Oligonukleotide zur Amplifikation des *sra1*-Gens und zur Korrektur der C-terminalen Region im Vergleich zur NCBI-Referenzsequenz. In rot sind die *NdeI* (fwd-Oligonukleotid) bzw. *XhoI* (rev-Oligonukleotid) –Schnittstellen dargestellt. In Blau ist die Sequenz des Stoppcodons eingefärbt.

Statistiken für die Datensätze und die Verfeinerung der CT441°-Struktur:

Datensatz	CT441° (NaI)	CT441° (Ta <sub>6</sub> Br <sub>12</sub> )	CT441°
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Einheitszellen-Parameter (a, b, c) [Å]	84.74, 185.92, 209.07	86.22, 183.14, 208.07	86.73, 183.99, 209.62
Wellenlänge [Å]	1.5000	1.2548	0.9184
Auflösungsbereich [Å]	34.66-3.30 (3.48-3.30)	62.41-4.00 (4.22-4.00)	33.44-2.95 (3.11-2.95)
Flüssigkeitsgehalt [%]	69.67	69.47	69.27
Moleküle/ASU (asymmetrische Einheit)	3	3	3
R <sub>merge</sub> [%] <sup>1</sup>	9.2 (68.0)	13.9 (32.6)	6.9 (51.6)
R <sub>pim</sub> [%] <sup>2</sup>	4.7 (29.0)	6.5 (15.3)	3.5 (26.6)
I/σ(I)	17.4 (3.5)	8.1 (4.2)	11.5 (2.1)
Vollständigkeit [%]	99.9 (100)	97.5 (92.8)	92.3 (89.3)
Multiplizität	7.3 (7.3)	5.9 (5.2)	4.5 (4.2)
unabhängige Reflexe	50572 (7282)	27860 (3782)	65713 (9182)
durchschnittliche Mosaizität [°]	0.174	1.17	0.71
R (R <sub>free</sub> ) [%] <sup>3</sup>	-	-	24.8 (28.0)
mittlere B-Faktoren [Å <sup>2</sup> ] <sup>4</sup>	-	-	
Monomer A	-	-	95.8, 117.3, 91.6
Monomer B	-	-	79.4, 74.7, 80.3
Monomer C	-	-	124.7, 175.8, 118.1
Ramachandran Statistik <sup>3</sup>	-	-	92.5, 7.5, 0.0

Tab. 15: Angaben zu den gesammelten Datensätzen sowie zur Verfeinerung der CT441°-Struktur.

Die Werte in den Klammern beziehen sich auf den Bereich höchster Auflösung.

<sup>1</sup> $R_{merge} = \sum_{hkl} \sum_i |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I(hkl)_i$ , wobei  $I(hkl)$  die Intensität der Reflexe  $hkl$  und  $\langle I(hkl) \rangle$  die durchschnittliche Intensität aller äquivalenter Reflexe darstellt.

<sup>2</sup> $R_{pim}$  stellt den *precision-indicating merging R factor* dar (Weiss und Hilgenfeld, 1997).

<sup>3</sup> $R = \sum_{hkl} |F_o(hkl) - F_c(hkl)| / \sum_{hkl} F_o(hkl)$ .  $R_{free}$  wurde für 5 % zufällig ausgewählter Reflexe berechnet, die nicht für die Verfeinerung berücksichtigt wurden.

<sup>4</sup> Gesamtmonomer, NTD, CTD

<sup>5</sup> bevorzugte Regionen, erlaubte Regionen, nicht-erlaubte Regionen



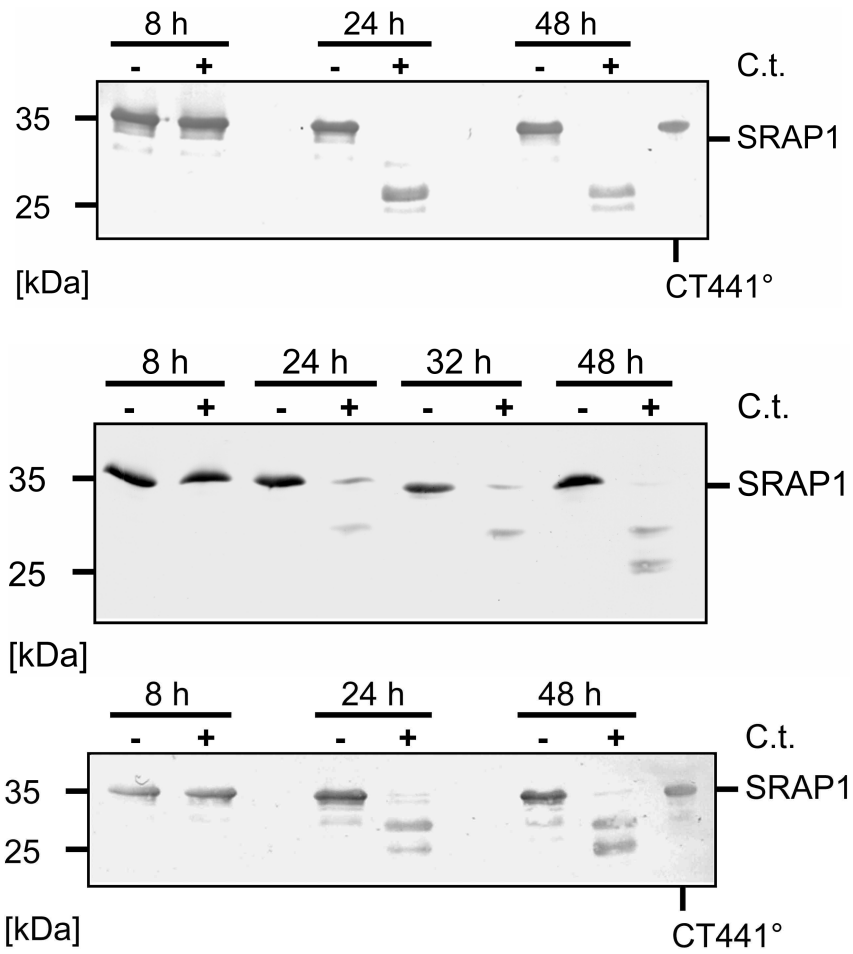


Abb. 38: Inkubation von rekombinant in *E. coli* hergestelltem SRAP1 mit Lysaten infizierter HEp2-Zellen (oben) bzw. HEK293-Zellen (Mitte) unter Verwendung von Lactacystin. HEp2-Zellen wurden in einem weiteren Experiment mit 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid versetzt (unten). Generell wurden die Lysate mit 2 mM Lactacystin bzw. 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid für 30 min vorinkubiert und anschließend für 4 Stunden bei 37°C mit SRAP1 inkubiert. Es kann eindeutig eine Degradation von SRAP1 beginnend ab 24 h p.i. festgestellt werden, die sich zunehmend bis zum Zeitpunkt von 48 h p.i. fortsetzt.

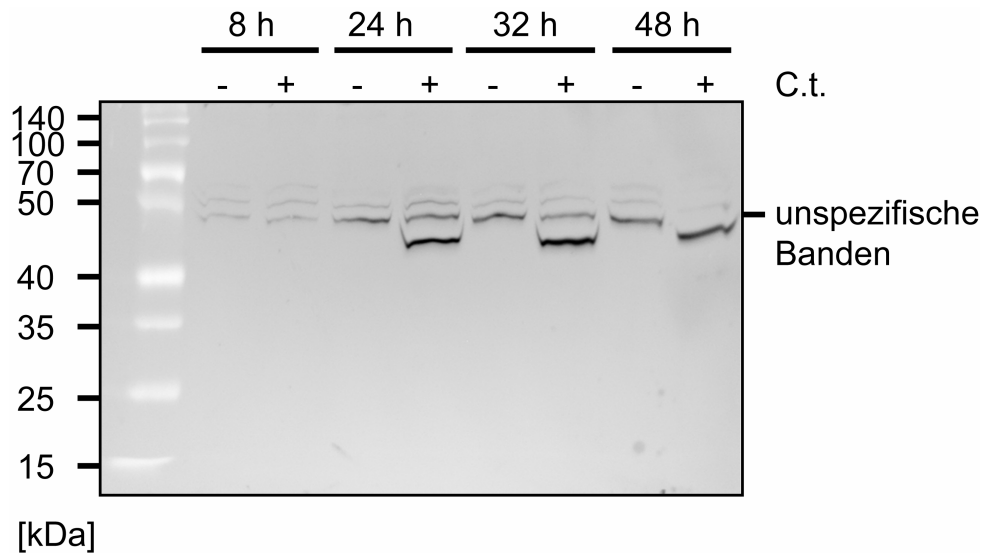


Abb. 39: Western Blot als Negativkontrolle für den Nachweis der SRAP1-Degradation in mit *C. trachomatis* infizierten HEK293-Zellen. Die für dieses Kontrolllexperiment verwendeten Zellen wurden nicht mit dem SRAP1-kodierenden Expressionsvektor transfiziert. Der für den SRAP1-Nachweis eingesetzte anti-SRAP1-Antikörper zeigt keine unspezifische Färbung von Proteinen unterhalb des Molekulargewichtes von 35 kDa. Damit ist sichergestellt, dass die in Abb. 28 festgestellten Degradationsbanden nicht von Proteinen aus *C. trachomatis* stammen.

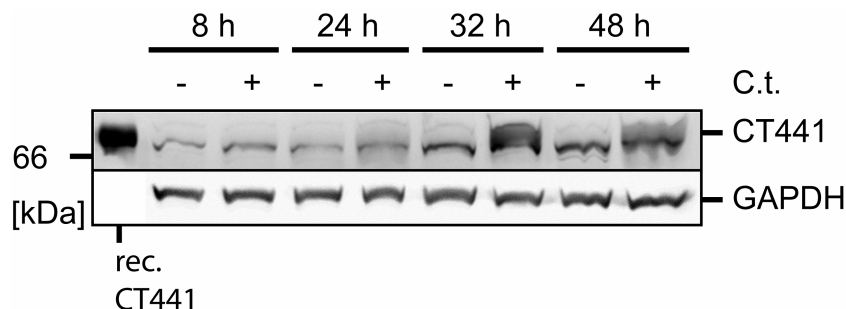


Abb. 40: Nachweis von CT441 in HeLa229-Zellen. CT441 kann eindeutig beginnend ab 32 h p.i. in den mit *C. trachomatis*-infizierten Zelllysaten nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle fungiert der Nachweis des zellulären Proteins GAPDH (36 kDa). Zusätzlich wurde als Positivkontrolle rekombinant hergestelltes CT441 verwendet.

Statistische Auswertung des Chaperon-Assays mit Hilfe der 2-way-ANOVA-Methode:

Als Bezugspunkte dienen die Messpunkte der Kontrollmessung mit dem Messpuffer, der kein BSA bzw. keine CT441-Varianten enthält. Aufgeführt sind die Zeitpunkte der Messung (Spalte 1), die auf 100 normierten Messwerte für die Kontrollmessung (Spalte 2), die korrespondierenden Messwerte der BSA- bzw. CT441-Variantenhaltigen Messlösung (Spalte 3), die sich ergebende Differenz (Spalte 4), der Signifikanzwert P als Kennzahl der statistischen Wahrscheinlichkeit (Spalte 5) und

die sich daraus ergebende Signifikanz, die den statistischen Unterschied zwischen der Kontrollmessung und BSA bzw. den getesteten CT441-Varianten wiedergibt (Spalte 6).

ns: nicht signifikant; Sterne: Quantifizierung der Signifikanz

Zeitpunkte [min]	Messwert Kontrolle	Messwert (BSA)	Differenz	P-Wert	Signifikanz
0	100	100	0	P > 0.05	ns
0,5	83,19	100,6	17,37	P > 0.05	ns
2	5,455	14,98	9,529	P > 0.05	ns
3.5	1,077	4,325	3,248	P > 0.05	ns
5	1,013	3,006	1,993	P > 0.05	ns
6,5	1,024	1,88	0,8565	P > 0.05	ns
8	0,5208	1,056	0,5349	P > 0.05	ns

Tab. 16: Vergleich von BSA mit der Kontrollmessung.

Zeitpunkte [min]	Messwert Kontrolle	Messwert (CT441)	Differenz	P-Wert	Signifikanz
0	100	100	0	P > 0.05	ns
0,5	83,19	105,7	22,48	P > 0.05	ns
2	5,455	87,65	82,2	P<0.001	***
3.5	1,077	67,48	66,4	P<0.001	***
5	1,013	46,68	45,66	P<0.001	***
6,5	1,024	37,73	36,7	P<0.001	***
8	0,5208	28,37	27,85	P<0.01	**

Tab. 17: Vergleich von CT441 mit der Kontrollmessung.

Zeitpunkte [min]	Messwert Kontrolle	Messwert (CT441°)	Differenz	P-Wert	Signifikanz
0	100	100	0	P > 0.05	ns
0,5	83,19	104,9	21,74	P > 0.05	ns
2	5,455	80,6	75,14	P<0.001	***
3.5	1,077	62,06	60,99	P<0.001	***
5	1,013	47,24	46,22	P<0.001	***
6,5	1,024	28,02	27	P<0.01	**
8	0,5208	24,83	24,31	P<0.05	*

Tab. 18: Vergleich von CT441° mit der Kontrollmessung.

Zeitpunkte [min]	Messwert Kontrolle	Messwert (CT441 NTD&PDZ)	Differenz	P-Wert	Signifikanz
0	100	100	0	P > 0.05	ns
0,5	83,19	110,6	27,38	P < 0.01	**
2	5,455	49,83	44,38	P<0.001	***
3.5	1,077	26,83	25,75	P>0.05	*
5	1,013	16,47	15,45	P>0.05	ns
6,5	1,024	10,03	9,002	P>0.05	ns
8	0,5208	8,343	7,822	P>0.05	ns

Tab. 19: Vergleich von CT441 NTD&PDZ mit der Kontrollmessung.

Zeitpunkte [min]	Messwert Kontrolle	Messwert (CT441 ΔDUF3340)	Differenz	P-Wert	Signifikanz
0	100	100	0	P > 0.05	ns
0,5	83,19	111,3	28,12	P < 0.01	***
2	5,455	90,23	84,77	P<0.001	***
3.5	1,077	70,31	69,23	P<0.001	***
5	1,013	53,8	52,79	P<0.001	***
6,5	1,024	40,92	39,9	P<0.001	***
8	0,5208	34,72	34,2	P<0.001	***

Tab. 20: Vergleich von CT441 ΔDUF3340 mit der Kontrollmessung.

Zeitpunkte [min]	Messwert Kontrolle	Messwert (CT441 NTD)	Differenz	P-Wert	Signifikanz
0	100	100	0	P > 0.05	ns
0,5	83,19	96,34	13,15	P > 0.05	ns
2	5,455	37,33	31,88	P < 0.01	**
3.5	1,077	15,65	14,57	P > 0.05	ns
5	1,013	5,61	4,597	P > 0.05	ns
6,5	1,024	6,359	5,336	P > 0.05	ns
8	0,5208	1,307	0,7861	P > 0.05	ns

Tab. 21: Vergleich von CT441 NTD mit der Kontrollmessung.

Student-T-Test für den LDH-Assay:

Analysiert wurde die Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturmedium (mock)-infizierter bzw. *C. trachomatis*-infizierter HEK293-Zellen am Zeitpunkt 0 h, 8 h, 24 h, 32 h und 48 h p.i. zur Überprüfung der Zell-Viabilität. Für den Student T-Test wurde eine Normalverteilung der Einzelmesswerte angenommen.

ns: nicht signifikant; Sterne: Quantifizierung der Signifikanz

Messwerte mock vs. <i>C. trachomatis</i> infizierte HEK293-Zellen					
Zeitpunkt	0 h	8 h	24 h	32 h	48 h
P-Wert	ns	ns	ns	**	***
Signifikanz < 0,05	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja
R <sup>2</sup>	0,1	0	0,44	0,92	0,96

Tab. 22: Statistiken des LDH-Assays.

## 6. Referenzen

Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C. & Zwart, P.H. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst.* **D66**, 213–221.

Afonine, P.V., Grosse-Kunstleve, R.W., Echols, N., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T.C., Urzhumtsev, A., Zwart, P.H. & Adams, P.D. (2012). Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Cryst.* **D68**, 352–367.

Agaisse, H. & Derré, I. (2013). A *C. trachomatis* cloning vector and the generation of *C. trachomatis* strains expressing fluorescent proteins under the control of a *C. trachomatis* promoter. *PLoS One* **8**, e57090.

Askienazy-Elbhar, M. & Henry-Suchet, J. (1999). Persistent “silent” *Chlamydia trachomatis* female genital tract infections. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **7**, 31–34.

Augustine, D.J. (1998). Modelling *Chlamydia*-koala interactions: coexistence, population dynamics and conservation implications. *J. Appl. Ecol.* **35**, 261–272.

Bastidas, R.J., Elwell, C.A., Engel, J.N. & Valdivia, R.H. (2013). Chlamydial intracellular survival strategies. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, a010256.

Baud, D. & Greub, G. (2011). Intracellular bacteria and adverse pregnancy outcomes. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 1312–1322.

Beare, P.A., Sandoz, K.M., Omsland, A., Rockey, D.D. & Heinzen, R. A. (2011). Advances in genetic manipulation of obligate intracellular bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* **2**, 97.

Beato, M. & Klug, J. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Hum. Reprod. Update* **6**, 225–236.

Beatty, W.L., Morrison, R.P. & Byrne, G.I. (1994). Persistent *chlamydiae*: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol. Rev.* **58**, 686–699.

Bedson S.P. & Bland J.W. (1932). Morphological study of psittacosis virus, with the description of a developmental cycle. *Br. J. Exp. Pathol.* **13**, 461–466.

Beebe, K.D., Shin, J., Peng, J., Chaudhury, C., Khera, J. & Pei, D. (2000). Substrate recognition through a PDZ domain in tails protease. *Biochemistry* **39**, 3149–3155.

Belland, R.J., Ouellette, S.P., Gieffers, J. & Byrne, G.I. (2004). *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Cell. Microbiol.* **6**, 117–127.

Berger, L., Volp, K., Mathews, S., Speare, R. & Timms, P. (1999). *Chlamydia pneumoniae* in a free-ranging giant barred frog (*Mixophyes iteratus*) from Australia. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2378–2380.

Berman, H.M., Battistuz, T., Bhat, T.N., Bluhm, W.F., Bourne, P.E., Burkhardt, K., Feng, Z., Gilliland, G.L., Iype, L., Jain, S., Fagan, P., Marvin, J., Padilla, D., Ravichandran, V., Schneider, B., Thanki, N., Weissig, H., Westbrook, J.D. & Zardecki, C. (2002). The Protein Data Bank. *Acta Cryst.* **D58**, 899–907.

Borel, N., Thoma, R., Spaeni, P., Weilenmann, R., Teankum, K., Brugnera, E., Zimmermann, D.R., Vaughan, L. & Pospischil, A. (2006). *Chlamydia*-related abortions in cattle from Graubunden, Switzerland. *Vet. Pathol.* **43**, 702–708.

Borth, N., Massier, J., Franke, C., Sachse, K., Saluz, H.-P. & Hänel, F. (2010). Chlamydial protease CT441 interacts with SRAP1 co-activator of estrogen receptor  $\alpha$  and partially alleviates its co-activation activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **119**, 89–95.

Buchan, D.W., Minneci, F., Nugent, T.C., Bryson, K. & Jones, D.T. (2013). Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Res.* **41**, W349–357.

Buchner, J., Grallert, H. & Jakob, U. (1998). Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein. *Methods Enzymol.* **290**, 323–338.

Bush, R.M. & Everett, K.D.E. (2001). Molecular evolution of the *Chlamydiaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 203–220.

Carabeo, R.A., Grieshaber, S.S., Dooley, C. & Hackstadt, T. (2004). Requirement for the Rac GTPase in *Chlamydia trachomatis* invasion of non-phagocytic cells. *Traffic* **5**, 418–425.

Carabeo, R.A., Dooley, C.A., Grieshaber, S.S. & Hackstadt, T. (2007). Rac interacts with Abi-1 and WAVE2 to promote an Arp2/3-dependent actin recruitment during chlamydial invasion. *Cell. Microbiol.* **9**, 2278–2288.



Chen, D., Lei, L., Lu, C., Flores, R., DeLisa, M.P., Roberts, T.C., Romesberg, F.E. & Zhong, G. (2010). Secretion of the chlamydial virulence factor CPAF requires the Sec-dependent pathway. *Microbiology* **156**, 3031–3040.

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**, 1–8.

Chooniedass-Kothari, S., Hamedani, M.K., Troup, S., Hubé, F. & Leygue, E. (2006). The steroid receptor RNA activator protein is expressed in breast tumor tissues. *Int. J. Cancer* **118**, 1054–1059.

Chooniedass-Kothari, S., Vincett, D., Yan, Y., Cooper, C., Hamedani, M.K., Myal, Y. & Leygue, E. (2010). The protein encoded by the functional steroid receptor RNA activator is a new modulator of ER  $\alpha$  transcriptional activity. *FEBS Lett.* **584**, 1174–1180.

Christian, J., Vier, J., Paschen, S.A. & Häcker, G. (2010). Cleavage of the NF- $\kappa$ B family protein p65/RelA by the chlamydial protease-like activity factor (CPAF) impairs proinflammatory signaling in cells infected with *Chlamydiae*. *J. Biol. Chem.* **285**, 41320–41327.

Cianciotto, N.P. (2005). Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol.* **13**, 581–588.

Cisláková, L., Stanko, M., Fricová, J., Mosanský, L., Trávnicek, M., Halánová, M., Mardzinová, S. & Stefanciková, A. (2004). Small mammals (Insectivora, Rodentia) as a potential source of chlamydial infection in East Slovakia. *Ann. Agric. Environ. Med.* **11**, 139–143.

Clausen, T., Kaiser, M., Huber, R. & Ehrmann, M. (2011). HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 152–162.

Cocchiario, J.L. & Valdivia, R.H. (2009). New insights into *Chlamydia* intracellular survival mechanisms. *Cell. Microbiol.* **11**, 1571–1578.

Corsaro, D. & Greub, G. (2006). Pathogenic potential of novel *Chlamydiae* and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 283–297.

Cosentini, R., Tarsia, P., Canetta, C., Graziadei, G., Brambilla, A.M., Aliberti, S., Pappalè, M., Tantardini, F. & Blasi, F. (2008). Severe asthma exacerbation: role of acute *Chlamydophila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Respir. Res.* **9**, 48.

Cowtan, K. (2006). The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Cryst.* **D62**, 1002–1011.

Dautry-Varsat, A. & Wyplosz, B. (2004). *Chlamydia* – Host Cell Interactions: Recent Advances on Bacterial Entry and Intracellular Development. *Traffic* **5**, 561–570.

DeLano, (2002). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.

Dong, F., Su, H., Huang, Y., Zhong, Y. & Zhong, G. (2004). Cleavage of host keratin 8 by a *Chlamydia*-secreted protease. *Infect. Immun.* **72**, 3863–3868.

Ekici, O.D., Paetzel, M. & Dalbey, R.E. (2008). Unconventional serine proteases: Variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Sci.* **17**, 2023–2037.

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Cryst.* **D66**, 486–501.

European Centre for Disease Prevention and Control. (2012). Surveillance Report. Sexually transmitted infections in Europe 1990–2010. (Stockholm, Sweden).

Evans, P. (2006). Scaling and assessment of data quality. *Acta Cryst.* **D62**, 72–82.

Everett, K.D.E, 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. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 415–440.

Fadel, S. & Eley, A. (2007). *Chlamydia trachomatis* OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin. *J. Med. Microbiol.* **56**, 15–22.

Fields, K.A. & Hackstadt, T. (2002). The chlamydial inclusion: escape from the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 221–245.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. *In the Proteomics Protocols Handbook*, J.M. Walker, ed. (Totowa, USA: Humana Press Inc.), 571–607.

Gérard, H.C., Dreses-Werringloer, U., Wildt, K.S., Deka, S., Oszust, C., Balin, B.J., Frey, W.H., Bordayo, E.Z., Whittum-Hudson, J.A. & Hudson, A.P. (2006). *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* in the Alzheimer's brain. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **48**, 355–366.

Grosse-Kunstleve, R.W. & Adams, P.D. (2003). Substructure search procedures for macromolecular structures. *Acta Cryst.* **D59**, 1966–1973.

Halberstaedter, L. & Prowazek, S.V. (1907). Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom. *Arb. Aus Dem Kais. Gesundheitsamte, Berlin* **26**, 44–47.

Hall, J.M. & McDonnell, D.P. (2005). Coregulators in nuclear estrogen receptor action - from concept to therapeutic targeting. *Mol. Interv.* **5**, 343–357.

Hansen, G. & Hilgenfeld, R. (2013). Architecture and regulation of HtrA-family proteins involved in protein quality control and stress response. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 761–775.

Hardie, K.R., Lory, S. & Pugsley, A.P. (1996). Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J.* **15**, 978–988.

Hauske, P., Meltzer, M., Ottmann, C., Krojer, T., Clausen, T., Ehrmann, M. & Kaiser, M. (2009). Selectivity profiling of DegP substrates and inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 2920–2924.

Hayden, M.S. & Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell* **132**, 344–362.

Hillier, B.J., Christopherson, K.S., Prehoda, K.E., Brecht, D.S. & Lim, W.A. (1999). Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science* **284**, 812–815.

Hoge, R., Laschinski, M., Jaeger, K.-E., Wilhelm, S. & Rosenau, F. (2011). The subcellular localization of a C-terminal processing protease in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **316**, 23–30.

Holm, L. & Park, J. (2000). DaliLite workbench for protein structure comparison. *Bioinformatics* **16**, 566–567.

Hower, S., Wolf, K. & Fields, K.A. (2009). Evidence that CT694 is a novel *Chlamydia trachomatis* T3S substrate capable of functioning during invasion or early cycle development. *Mol. Microbiol.* **72**, 1423–1437.

Hoy, B., Löwer, M., Weydig, C., Carra, G., Tegtmeyer, N., Geppert, T., Schröder, P., Sewald, N., Backert, S., Schneider, G. & Wessler, S. (2010). *Helicobacter pylori* HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. *EMBO Rep.* **11**, 798–804.

Hoy, B., Geppert, T., Boehm, M., Reisen, F., Plattner, P., Gadermaier, G., Sewald, N., Ferreira, F., Briza, P., Schneider, G., Backert, S. & Wessler, S. (2012). Distinct roles of secreted HtrA proteases from gram-negative pathogens in cleaving the junctional protein and tumor suppressor E-cadherin. *J. Biol. Chem.* **287**, 10115–10120.

Hsu, M.-C., Tsai, P.-Y., Chen, K.-T., Li, L.-H., Chiang, C.-C., Tsai, J.-J., Ke, L.-Y., Chen, H.-Y. & Li, S.-Y. (2006). Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from clinical specimens in Taiwan. *J. Med. Microbiol.* **55**, 301–308.

Huang, Z., Feng, Y., Chen, D., Wu, X., Huang, S., Wang, X., Xiao, X., Li, W., Huang, N., Gu, L., Zhong, G. & Chai, J. (2008). Structural basis for activation and inhibition of the secreted *chlamydia* protease CPAF. *Cell Host Microbe* **4**, 529–542.

Huston, W.M., Swedberg, J.E., Harris, J.M., Walsh, T.P., Mathews, S.A. & Timms, P. (2007). The temperature activated HtrA protease from pathogen *Chlamydia trachomatis* acts as both a chaperone and protease at 37 °C. *FEBS Lett.* **581**, 3382–3386.

Hybiske, K. & Stephens, R.S. (2007a). Mechanisms of *Chlamydia trachomatis* entry into nonphagocytic cells. *Infect. Immun.* **75**, 3925–3934.

Hybiske, K. & Stephens, R.S. (2007b). Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 11430–11435.

Inagaki, N., Maitra, R., Satoh, K. & Pakrasi, H.B. (2001). Amino acid residues that are critical for *in vivo* catalytic activity of CtpA, the carboxyl-terminal processing protease for the D1 protein of photosystem II. *J. Biol. Chem.* **276**, 30099–30105.

Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Cryst.* **D66**, 125–132.

Karayiannis, P. & Hobson, D. (1981). Amino acid requirements of a *Chlamydia trachomatis* genital strain in McCoy cell cultures. *J. Clin. Microbiol.* **13**, 427–432.

Kari, L., Goheen, M.M., Randall, L.B., Taylor, L.D., Carlson, J.H., Whitmire, W.M., Virok, D., Rajaram, K., Endresz, V., McClarty, G., Nelson, D.E. & Caldwell, H.D. (2011). Generation of targeted *Chlamydia trachomatis* null mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 7189–7193.

- Keiler, K.C. & Sauer, R.T. (1995). Identification of active site residues of the Tsp protease. *J. Biol. Chem.* **270**, 28864–28868.
- Keiler, K.C., Silber, K.R., Downard, K.M., Papayannopoulos, I.A., Biemann, K. & Sauer, R.T. (1995). C-terminal specific protein degradation: activity and substrate specificity of the Tsp protease. *Protein Sci.* **4**, 1507–1515.
- Keiler, K.C., Waller, P.R.H. & Sauer, R.T. (1996). Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* **271**, 990–993.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797.
- Kumar, Y. & Valdivia, R.H. (2008). Reorganization of the host cytoskeleton by the intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis*. *Commun. Integr. Biol.* **1**, 175–177.
- Lad, S.P., Li, J., da Silva Correia, J., Pan, Q., Gadwal, S., Ulevitch, R.J. & Li, E. (2007a). Cleavage of p65/RelA of the NF- $\kappa$ B pathway by *Chlamydia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 2933–2938.
- Lad, S.P., Yang, G., Scott, D.A., Wang, G., Nair, P., Mathison, J., Reddy, V.S. & Li, E. (2007b). Chlamydial CT441 is a PDZ domain-containing tail-specific protease that interferes with the NF- $\kappa$ B pathway of immune response. *J. Bacteriol.* **189**, 6619–6625.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lanz, R.B., McKenna, N.J., Onate, S.A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. & O'Malley, B.W. (1999). A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* **97**, 17–27.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283–291.
- Le Negrate, G., Krieg, A., Faustin, B., Loeffler, M., Godzik, A., Krajewski, S. & Reed, J.C. (2008). ChlaDub1 of *Chlamydia trachomatis* suppresses NF- $\kappa$ B activation and inhibits I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitination and degradation. *Cell. Microbiol.* **10**, 1879–1892.

Leslie, A.G.W. & Powell, H.R. (2007). Processing diffraction data with Mosflm. *In Evolving Methods for Macromolecular Crystallography 245*, R.J. Read, J.L. Sussman, ed. (Dordrecht, Netherlands: Springer), pp. 41–51.

Letunic, I., Doerks, T. & Bork, P. (2012). SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* **40**, D302–D305.

Liao, D., Qian, J., Chisholm, D.A., Jordan, D.B. & Diner, B.A. (2000). Crystal structures of the photosystem II D1 C-terminal processing protease. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 749–753.

Loew, A. & Gonzalez-Fernandez, F. (2002). Crystal structure of the functional unit of interphotoreceptor retinoid binding protein. *Structure* **10**, 43–49.

Longbottom, D., Russell, M., Dunbar, S.M., Gareth, E. & Herring, A.J. (1998). Molecular cloning and characterization of the genes coding for the highly immunogenic cluster of 90-kilodalton envelope proteins from the *Chlamydia psittaci* subtype that causes abortion in Sheep. *Infect. Immun.* **66**, 1317–1324.

Low, N. & Egger, M. (2002). What should we do about screening for genital *chlamydia*? *Int. J. Epidemiol.* **31**, 891–893.

Mabey, D.C.W., Solomon, A.W. & Foster, A. (2003). Trachoma. *Lancet* **362**, 223–229.

Malet, H., Canellas, F., Sawa, J., Yan, J., Thalassinou, K., Ehrmann, M., Clausen, T. & Saibil, H.R. (2012). Newly folded substrates inside the molecular cage of the HtrA chaperone DegQ. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 152–157.

Marchler-Bauer A., Lu S., Anderson J.B., Chitsaz F., Derbyshire M.K., DeWeese-Scott C., Fong J.H., Geer L.Y., Geer R.C., Gonzales N.R., Gwadz M., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Omelchenko, M.V., Robertson, C.L., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C. & Bryant, S.H. (2011). CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* **39**, 225–229.

Mastny, M., Heuck, A., Kurzbauer, R., Heiduk, A., Boisguerin, P., Volkmer, R., Ehrmann, M., Rodrigues, C.D., Rudner, D.Z. & Clausen, T. (2013). CtpB assembles a gated protease tunnel regulating cell-cell signaling during spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cell* **155**, 647–658.

Matthews, B.W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.

McCoy, A.J., Storoni, L.C. & Read, R.J. (2004). Simple algorithm for a maximum-likelihood SAD function. *Acta Cryst.* **D60**, 1220–1228.

McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C. & Read, R.J. (2007). *Phaser* crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* **40**, 658–674.

McLachlan, A.D. (1982). Rapid comparison of protein structures. *Acta Cryst.* **A38**, 871–873.

Mehlhorn, H. & Grüntzig, J.W. (2005). Expeditionen ins Reich der Seuchen. *First edition, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*, pp. 224.

Menzio, F.D., Pethe, K., Bifani, P., Soncin, F., Brennan, M.J. & Locht, C. (2002). Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans. *Mol. Microbiol.* **43**, 1379–1386.

Mpiga, P. & Ravaoarinoro, M. (2006). *Chlamydia trachomatis* persistence: an update. *Microbiol. Res.* **161**, 9–19.

Paetzel, M., Dalbey, R.E. & Strynadka, N.C.J. (2002). Crystal structure of a bacterial signal peptidase apoenzyme: implications for signal peptide binding and the Ser-Lys dyad mechanism. *J. Biol. Chem.* **277**, 9512–9519.

Penkert, R.R., DiVittorio, H.M. & Prehoda, K.E. (2004). Internal recognition through PDZ domain plasticity in the Par-6-Pals1 complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1122–1127.

Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* **8**, 785–786.

Petrovay, F. & Balla, E. (2008). Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydothila psittaci*. *J. Med. Microbiol.* **57**, 1296–1298.

Pike, A.C.W., Brzozowski, A.M., Walton, J., Hubbard, R.E., Bonn, T., Gustafsson, J.-A. & Carlquist, M. (2000). Structural aspects of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 396–400.

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.



Ponting, C. (1997). Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Sci.* **6**, 464–468.

Pospischil, A. (2009). From disease to etiology: historical aspects of *Chlamydia*-related diseases in animals and humans. *Drugs Today* **45 Suppl B**, 141–146.

Pruitt, K.D., Brown, G.R., Hiatt, S.M., Thibaud-Nissen, F., Astashyn, A., Ermolaeva, O., Farrell, M., Hart, J., Landrum, M.J., McGarvey, K.M., Murphy, M.R., O'Leary, N.A., Pujar, S., Rajput, B., Rangwala, S.H., Riddick, L.D., Shkeda, A., Sun, H., Tamez, P., Tully, R.E., Wallin, C., Webb, D., Weber, J., Wu, W., DiCuccio, M., Kitts, P., Maglott, D.R., Murphy, T.D. & Ostell, J.M. (2014). RefSeq: an update on mammalian reference sequences. *Nucleic Acids Res.* **42**, D756–D763.

Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J. & Bateman, A. (2014). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **42**, D503–D509.

Regan, R.J., Dathan, J.R.E. & Treharne, J.D. (1979). Infective endocarditis with glomerulonephritis associated with cat *chlamydia* (*C. psittaci*) infection. *Br. Heart J.* **42**, 349–352.

Robert Koch-Institut (2001). Epidemiologisches Bulletin 03/2001 (*Robert Koch-Institut, Berlin, Germany*), 83–86.

Schaeffer, A. & Henrich, B. (2008). Rapid detection of *Chlamydia trachomatis* and typing of the *Lymphogranuloma venereum* associated L-Serovars by TaqMan PCR. *BMC Infect. Dis.* **8**, 1–10.

Shaw, A.C., Vandahl, B.B., Larsen, M.R., Roepstorff, P., Gevaert, K., Christiansen, G. & Birkelund, S. (2002). Characterization of a secreted *Chlamydia* protease. *Cell. Microbiol.* **4**, 411–424.

Silber, K.R., Keiler, K.C. & Sauer, R.T. (1992). Tsp: A tail-specific protease that selectively degrades proteins with nonpolar C termini. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 295–299.

Soldati, G., Lu, Z.H., Vaughan, L., Polkinghorne, A., Zimmermann, D.R., Huder, J.B. & Pospischil, A. (2004). Detection of *mycobacteria* and *chlamydiae* in granulomatous inflammation of reptiles: a retrospective study. *Vet. Pathol.* **41**, 388–397.

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.

Spiers, A., Lamb, H.K., Cocklin, S., Wheeler, K.A., Budworth, J., Dodds, A.L., Pallen, M.J., Maskell, D.J., Charles, I.G. & Hawkins, A.R. (2002). PDZ domains facilitate binding of high temperature requirement protease A (HtrA) and tail-specific protease (Tsp) to heterologous substrates through recognition of the small stable RNA A (ssrA)-encoded peptide. *J. Biol. Chem.* **277**, 39443–39449.

Spiess, C., Beil, A. & Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* **97**, 339–347.

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 sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* **282**, 754–759.

Storz, J. & Page, L.E. (1971). Taxonomy of the *Chlamydiae*: Reasons for Classifying Organisms of the Genus *Chlamydia*, Family *Chlamydiaceae*, in a Separate Order, *Chlamydiales* ord. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**, 332–334.

Su, H., Raymond, L., Rockey, D.D., Fischer, 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. USA* **93**, 11143–11148.

Swanson, K.A., Taylor, L.D., Frank, S.D., Sturdevant, G.L., Fischer, E.R., Carlson, J.H., Whitmire, W.M. & Caldwell, H.D. (2009). *Chlamydia trachomatis* polymorphic membrane protein D is an oligomeric autotransporter with a higher-order structure. *Infect. Immun.* **77**, 508–516.

Terwilliger, T.C., Grosse-Kunstleve, R.W., Afonine, P.V., Moriarty, N.W., Zwart, P.H., Hung, L.W., Read, R.J. & Adams, P.D. (2008). Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Cryst.* **D64**, 61–69.

Theegarten, D., Sachse, K., Mentrup, B., Fey, K., Hotzel, H. & Anhenn, O. (2008). *Chlamydoiphila* spp. infection in horses with recurrent airway obstruction: similarities to human chronic obstructive disease. *Respir. Res.* **9**, 14-23.

Vanrompay, D., Andersen, A.A., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (1993). Serotyping of European isolates of *Chlamydia psittaci* from poultry and other birds. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 134–137.

Wang, Y. (1999). Etiology of trachoma: a great success in isolating and cultivating *Chlamydia trachomatis*. *Chin. Med. J.* **112**, 938–941.

Wang, Y., Kahane, S., Cutcliffe, L.T., Skilton, R.J., Lambden, P.R., Persson, K., Bjartling, C. & Clarke, I.N. (2013). Genetic transformation of a clinical (genital tract), plasmid-free isolate of *Chlamydia trachomatis*: engineering the plasmid as a cloning vector. *PLoS One* **8**, e59195.

Weir, E. (2004). Upsurge of genital *Chlamydia trachomatis* infection. *Can. Med. Assoc. J.* **51**, 171.

Weiss, M. & Hilgenfeld, R. (1997). On the use of the merging R factor as a quality indicator for X-ray data. *J. Appl. Cryst.* **30**, 203–205.

Wickstrum, J., Sammons, L.R., Restivo, K.N. & Hefty, P.S. (2013). Conditional gene expression in *Chlamydia trachomatis* using the Tet system. *PLoS One* **8**, e76743.

Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G.W., McCoy, A., McNicholas, S.J., Murshudov, G.N., Pannu, N.S., Potterton, E.A., Powell, H.R., Read, R.J., Vagin, A. & Wilson, K.S. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Cryst.* **D67**, 235–242.

World Health Organization (2001). Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections - overview and estimates. (*Geneva, Switzerland*).

Wrase, R., Scott, H., Hilgenfeld, R. & Hansen, G. (2011). The *Legionella* HtrA homologue DegQ is a self-compartmentizing protease that forms large 12-meric assemblies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 10490–10495.

Wu, X., Lei, L., Gong, S., Chen, D., Flores, R. & Zhong, G. (2011). The chlamydial periplasmic stress response serine protease cHtrA is secreted into host cell cytosol. *BMC Microbiol.* **11**, 87–16.

Ye, F., & Zhang, M. (2013). Structures and target recognition modes of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures. *Biochem J.* **455**, 1–14.

Zhong, G., Liu, L., Fan, T., Fan, P. & Ji, H. (2000). Degradation of transcription factor RFX5 during the inhibition of both constitutive and interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class I expression in *chlamydia*-infected cells. *J. Exp. Med.* **191**, 1525–1534.

Zhong, G. (2011). *Chlamydia trachomatis* secretion of proteases for manipulating host signaling pathways. *Front. Microbiol.* **2**, 1–5.

## **7. Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
AMC	7-amino-4-methylcoumarin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-Indolylphosphatase
BESSY	Berliner Elektronen-Speicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung
BPB	Bromphenolblau
<i>C. pn.</i>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
<i>C. t.</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron (Hamburg)
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	Zellkulturmedium ( <i>Dulbecco's modified eagle's medium</i> )
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DTNB	Dithio-1,4-Nitrobenzoesäure (Ellmans Reagenz)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	fetales Kälberserum
FOM	Gütezahl ( <i>figure of merit</i> )
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEK293	humane embryonale Nierenzellen ( <i>humane embryonic kidney</i> )
HEp2	humane Epithelzellen
IF	Immunofluoreszenz
ifu	Inklusions-formende Einheiten ( <i>inclusion forming units</i> )
IHC	Immunohistochemie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
LB	Luria Bertani (Medium)
LPS	Lipopolysaccharid
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
NBT	Nitrotetrazoliumblau ( <i>nitroblue tetrazolium</i> )
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )

PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion ( <i>polymerase-chain-reaction</i> )
PDB	Proteindatenbank (Protein Data Bank)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten ( <i>relative fluorescence units</i> )
r.m.s.d.	Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung ( <i>root mean square deviation</i> )
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
RPMI-1640	Zellkulturmedium ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung + Tween 20 ( <i>Tris buffered saline + Tween 20</i> )
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
well	Vertiefung (auf Kristallisations- oder Zellkulturplatten)



## 8. Sonstiges

### 8.1. Wissenschaftliche Publikation

Kohlmann, F., Shima, K., Hilgenfeld, R., Solbach, W., Rupp, J. & Hansen, G. (2015). Structural basis of the proteolytic and chaperone activity of *Chlamydia trachomatis* CT441. *J. Bacteriol.* **197**, 211-218.

## 8.2. Lebenslauf

Name: Kohlmann  
Vorname: Friedrich  
Adresse: Dorfstrasse 4  
14641 Wustermark, Deutschland  
Geburtsdatum: 01.11.1980  
Geburtsort: Berlin

### beruflicher Werdegang:

seit 09/2014: Laborleitung / QS-Leitung DMK

04/2009-10/2013: Anfertigung der Doktorarbeit „ Funktionelle und strukturelle Charakterisierung der Protease CT441 aus *Chlamydia trachomatis*“, ausgeführt an den Instituten für Biochemie sowie Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck

07/2008: Diplomarbeit am Robert Koch-Institut Berlin/ Wernigerode, Titel: „Prävalenz, Transkription, Translation und Polymorphismus virulenz-assoziiertes Effektorproteins – Ein Beitrag zu einer Virulenz-Musteranalyse für epidemiologische und klinische Zwecke“

10/2001-08/2007: Studium der Biologie an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

04/2000 - 09/2001: Grundstudium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin

### schulischer Werdegang:

1999 Abitur am Martin-Luther-Gymnasium, Lutherstadt Eisleben

## 9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. h.c. Rolf Hilgenfeld, Direktor des Instituts für Biochemie der Universität zu Lübeck, für die Möglichkeit der Anfertigung der Promotionsarbeit bedanken. Dabei möchte ich vor allem die Bereitstellung einer hervorragenden Infrastruktur im Institut sowie eine stets gesicherte Finanzierung des interessanten interdisziplinären Projekts, auch über die Zeit der DFG-Finanzierung hinaus, besonders hervorheben.

Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Jan Rupp für die hervorragende Betreuung, für kritische und inspirierende Diskussionen, für den Beistand in schwierigen Phasen der Promotion und für die Bereitstellung der ebenfalls hervorragenden Infrastruktur am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck.

Dr. Guido Hansen gilt mein besonderer Dank für die stets exzellente Betreuung, für hilfreiche Gespräche in denen gute Ideen entstanden und Experimente entwickelt wurden, für konstruktive Kritik und hervorragende Unterstützung bei den kleinen und großen Problemen während der Promotion und der Fertigstellung der Publikation.

Bei Dr. Kensuke Shima möchte ich mich für die selbstlose Unterstützung sowie für die konstruktive Zusammenarbeit in herzlicher Atmosphäre bedanken.

Dipl.-Ing. Hans Joachim Kraus, danke ich für die Unterstützung bei allen Computer-assoziierten Problemen.

Bei Silke Schmidtke, Britta Schwarzloh, Susanne Zoske, Doris Mutschall, Walter Verheyen, Anke Hellberg, Siegrid Pätzmann und Kristin Wischnat möchte ich mich für die exzellente Unterstützung im Labor bedanken ohne deren Hilfe die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bei Carolin Haase, Dr. Raspudin Saleem Batcha, Dr. Mirko Hoffmann, Dr. Naoki Sakai, Dr. Monarin Uervirojnangkoorn, Dr. Ksenia Pumpor und Dr. Jeroen Mesters möchte ich mich für die ausgezeichnete Atmosphäre und die Motivation bei Misserfolgen bedanken.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und besonders Dr. Anja Richter, die mich jederzeit vorbehaltlos unterstützt haben und somit diese Arbeit erst ermöglicht haben.