

Funktionelle Proteomanalyse
von
Chlamydophila pneumoniae

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Wolfgang Wehrl
aus Amberg

Mai 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas F. Meyer

2. Gutachter: Prof. Dr. Volker A. Erdmann

Disputation am 10.01.2005

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY | 1 |
| 2 EINLEITUNG | 5 |
| 2.1 Grundlagen der Chlamydiaceen | 5 |
| 2.1.1 Taxonomische Einteilung..... | 5 |
| 2.1.2 Chlamydien-assoziierte Krankheiten..... | 5 |
| 2.1.2.1 <i>Chlamydia trachomatis</i> | 6 |
| 2.1.2.2 <i>Chlamydophila pneumoniae</i> | 7 |
| 2.1.3 Lebenszyklus und Biologie der Chlamydien..... | 7 |
| 2.2 Persistenz | 9 |
| 2.2.1 Persistenz und chronische Krankheiten..... | 9 |
| 2.2.2 <i>In-vitro</i> induzierte Persistenzarten..... | 10 |
| 2.2.3 Eisenmangel und Persistenz..... | 11 |
| 2.3 PmpD und die Adhäsion von <i>C. pneumoniae</i> | 12 |
| 2.3.1 Adhäsion und Invasion..... | 12 |
| 2.3.2 Adhäsine und Adhäsinsrezeptoren bei Chlamydien..... | 12 |
| 2.3.3 Die Familie der polymorphen Membranproteine..... | 13 |
| 2.3.4 Autotransporter..... | 14 |
| 2.4 Zielsetzung | 14 |
| | |
| 3 PROTEOMANALYSE AKUTER UND PERSISTENTER ENTWICK- LUNGSPHASEN VON <i>C. PNEUMONIAE</i> | 16 |
| 3.1 Problemstellung | 16 |
| 3.2 Ergebnisse | 16 |
| 3.2.1 Metabolische Markierung bakterieller Proteine in infizierten Zellen | |
| 3.2.2 Strategien von <i>C. pneumoniae</i> während der frühen Persistenz- phasen..... | 22 |
| 3.2.2.1 Antwort von <i>C. pneumoniae</i> auf Eisenmangel zu Beginn der Infektion..... | 22 |
| 3.2.2.2 Änderungen in der Proteinkomposition nach Beginn der Infektion..... | 24 |
| 3.2.3 Strategien von <i>C. pneumoniae</i> zum Ende des Infektionszyklus..... | 31 |

| | |
|---|----|
| 3.3 Diskussion | 34 |
| 3.3.1 Proteinbiosynthese der intrazellulären Chlamydien | 34 |
| 3.3.2 Regulationsmechanismen zu Beginn der Eisenmangel- induzierten Persistenz | 35 |
| 3.3.3 Schwerpunkte von <i>C. pneumoniae</i> bei der Differenzierung von RK zu EK | 40 |
| 3.3.4 Ausblick | 42 |
| | |
| 4 BESCHREIBUNG UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES AUTOTRANSPORTERS PMPD ALS ADHÄSIN VON <i>C. PNEUMONIAE</i> | 43 |
| 4.1 Problemstellung | 43 |
| 4.2 Ergebnisse | 43 |
| 4.2.1 Synthese und posttranslationale Modifizierung | 43 |
| 4.2.2 Lokalisierung an der Bakterienoberfläche | 49 |
| 4.2.2.1 Lokalisierung im intrazellulären Stadium..... | 49 |
| 4.2.2.2 Interaktion von N-pmpD mit extrazellulären EK..... | 54 |
| 4.2.3 Biologische Aktivität und Funktion von PmpD | 57 |
| 4.2.3.1 Neutralisierung der Infektivität von EK <i>in vitro</i> | 57 |
| 4.2.3.2 Genfusionen an AIDA und Aufbau eines Modellsystems..... | 60 |
| 4.2.3.3 Stimulierung von humanen Monozyten..... | 63 |
| 4.3 Diskussion | 65 |
| 4.3.1 Prozessierung und Translokation von PmpD | 65 |
| 4.3.2 Interaktion mit der Äußeren Membran | 68 |
| 4.3.3 Interaktion mit den Wirtszellen | 69 |
| 4.3.3.1 Interaktion mit Epithelzellen bei der Infektion..... | 69 |
| 4.3.3.2 Aktivierung von Monozyten..... | 72 |
| 4.3.4 Ausblick | 74 |
| | |
| 5 MATERIAL | 75 |
| 5.1 Bakterienstämme | 75 |
| 5.1.1 <i>E. coli</i> | 75 |
| 5.2.2 <i>C. pneumoniae</i> und <i>C. trachomatis</i> | 75 |
| 5.2 Zelllinien | 75 |

| | |
|---|----|
| 5.3 Plasmide | 75 |
| 5.4 Oligonukleotide | 76 |
| 5.5 Enzyme und Kits | 76 |
| 5.6 Antikörper | 77 |
| 5.6.1 Primäre Antikörper..... | 77 |
| 5.6.2 Sekundäre Antikörper..... | 77 |
| 5.7 Puffer und Lösungen | 78 |
| 5.8 Medien und Zusätze | 81 |
| 5.9 Feinchemikalien | 81 |
| 5.10 Geräte und Verbrauchsmaterial | 82 |
| 5.11 Computersoftware | 83 |
| | |
| 6 METHODEN | 83 |
| 6.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren | 83 |
| 6.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA | 83 |
| 6.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA nach Holmes und Quigley (Boiling-Prep)..... | 83 |
| 6.1.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab (Midi-Prep) | |
| 6.1.2 PCR | 84 |
| 6.1.3 Gelelektrophorese | 85 |
| 6.1.4 Enzymatische Modifizierung und Klonierung von DNA-Fragmenten | |
| 6.1.4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen und Ligation | |
| 6.1.4.2 Klonierung mit der Di-/Trinukleotid- Methode..... | 85 |
| 6.1.5 Fällung von DNA | 86 |
| 6.1.6 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation | 86 |
| 6.2 Arbeiten mit Proteinen | 87 |
| 6.2.1 Eindimensionale Gelelektrophorese | 87 |
| 6.2.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese | 88 |
| 6.2.3 Proteinfärbung | 88 |
| 6.2.4 Enzymatischer Verdau | 88 |
| 6.2.4.1 Verdau von chlamydialen EK mit Trypsin..... | 88 |
| 6.2.4.2 Verdau von chlamydialen EK mit Proteinase K..... | 89 |

| | |
|---|------------|
| 6.2.4.3 Verdau von Proteinspots mit Trypsin..... | 89 |
| 6.2.5 Proteinidentifizierung über die Massenspektrometrie..... | 89 |
| 6.2.5.1 MALDI und PMF..... | 89 |
| 6.2.5.2 Peptidsequenzierung über ESI-MS/MS..... | 90 |
| 6.2.6 Westernblot und Immundetektion..... | 90 |
| 6.2.7 Immunpräzipitation..... | 90 |
| 6.2.8 Proteinexpression zur Herstellung polyklonaler Antikörper..... | 91 |
| 6.2.9 ELISA..... | 91 |
| 6.3 Arbeiten mit Zellkulturen..... | 92 |
| 6.3.1 Kultivierung humaner Epithelzellen..... | 92 |
| 6.3.2 Kultivierung humaner Monozyten..... | 92 |
| 6.3.3 WST-1 Test..... | 92 |
| 6.4 Arbeiten mit <i>C. pneumoniae</i>..... | 93 |
| 6.4.1 Infektion von Epithelzellen mit <i>C. pneumoniae</i>..... | 93 |
| 6.4.1.1 Aktive Infektion, Herstellung eines Bakterienstamms und Titerbestimmung..... | 93 |
| 6.4.1.2 Persistentes Infektionsmodell..... | 93 |
| 6.4.1.3 Neutralisierungsversuche..... | 94 |
| 6.4.2 Metabolische Markierung..... | 94 |
| 6.4.3 Isolierung von RK und EK im Dichtegradienten..... | 95 |
| 6.4.4 Isolierung von OM- und COMC-Fractionen..... | 95 |
| 6.4.5 Native Immun-Färbung infizierter Zellen..... | 95 |
| 6.4.5.1 Immunfluoreszenz..... | 96 |
| 6.4.5.2 Elektronenmikroskopie..... | 96 |
| 7 LITERATURVERZEICHNIS..... | 97 |
| 8 ANHANG..... | 108 |
| 8.1 Konstruktübersicht | 108 |
| 8.2 Danksagung..... | 110 |
| 8.3 Veröffentlichungen aus dieser Arbeit..... | 112 |
| 8.4 Lebenslauf..... | 113 |
| 8.5 Publikationsliste..... | 114 |
| 8.6 Abkürzungen..... | 115 |