

3 Proteomanalyse akuter und persistenter Entwicklungsphasen von *C. pneumoniae*

3.1 Problemstellung

Die Entwicklungsstadien beim Eintritt in die persistente Lebensform sowie am Ende des Infektionszyklus sollten auf Proteinebene untersucht werden. Dazu wurden zuerst die metabolische Markierung der intrazellulären Bakterien etabliert und ein Referenzgel des radioaktiv markierten Proteoms von *C. pneumoniae* erstellt. Die Besonderheiten der Proteinkomposition während der frühen Phasen einer persistenten Infektion konnten dann in zeitlich aufeinander folgenden Schritten beschrieben werden. Als Persistenzmodell für *C. pneumoniae* sollte dabei die Eisenlimitierung dienen, wie sie auch als Teil der unspezifischen Immunabwehr *in vivo* auftritt.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Metabolische Markierung bakterieller Proteine in infizierten Zellen

Voraussetzung für die Proteomanalyse obligat intrazellulärer Bakterien ist die Möglichkeit, zwischen eukaryontischen und prokaryontischen Proteinen differenzieren zu können. Eine Möglichkeit ist die physische Trennung der ganzen Bakterien nach Aufschluss infizierter Zellen (siehe Abschnitt 3.2.3). Eine Aufreinigung der persistenten Chlamydien gelang bislang jedoch nicht, vermutlich wegen der nicht einheitlichen Struktur der polymorphen, aberanten Körperchen und deren labiler Zellwände. Daher wurde hier die alternative Strategie einer selektiven Markierung prokaryontischer Proteine durch Einbau radioaktiver Aminosäuren bei gleichzeitiger Inhibierung der eukaryontischen Proteinbiosynthese gewählt. Sie bietet darüber hinaus die Möglichkeit, einzelne Zeitabschnitte durch zeitlich versetzte Zugabe der nachweisbaren Aminosäuren getrennt betrachten zu können.

Eukaryontische Ribosomen (70S) können spezifisch mit Cycloheximid (CH) oder Emetin (ET) blockiert werden. Die publizierten Bedingungen für den Einsatz dieser Inhibitoren der Wirtszellproteinbiosynthese bei der metabolischen Markierung von *C. pneumoniae* variieren jedoch je nach Arbeitsgruppe. Dabei betragen die verwen-

ten CH-Konzentrationen mitunter bis zu $3000 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Molestina *et al.*, 2002) und wurden daher in eigenen Vorversuchen optimiert. Es wurde eine konzentrationsabhängige Reduktion der Proteinbiosynthese nicht-infizierter HEp-2 Zellen von 36% bei $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ über 3,5% bei $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ bis hin zu 0,05% bei $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ bzw. $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ im Vergleich zu normalen Wachstumsbedingungen ohne CH (= 100%) beobachtet. Eine zusätzliche Inhibierung mit $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ET war bis $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ CH noch um den Faktor 3-4 möglich, hatte bei höheren CH Konzentrationen aber keinen Einfluss mehr. Trotz der Reduzierung verblieb stets ein Hintergrund an Proteinsynthese der Wirtszellen, der selbst in infizierten Zellen (MOI <5) bei gleicher Menge aufgetragener Radioaktivität das Muster der Proteinkomposition dominierte.

Abb. 3 zeigt das Proteinmuster nicht-infizierter HEp-2 Zellen, die 24 h in einem Medium ohne Methionin und Cystein, aber in der Anwesenheit von $100 \mu\text{Ci } [^{35}\text{S}]$ -Methionin und -Cystein markiert wurden. Metabolisch markierte Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber gesammelt und pelletiert. Die Zellen wurden in 2D-Probenpuffer mit 9 M Harnstoff, 70 mM DTT, 2% CHAPS, 2% Ampholyten und Proteinaseinhibitoren (in 5-fachem Volumen oder $20 \mu\text{l}$ pro 1×10^6 Zellen) aufgenommen. 1×10^6 cpm der gelösten Proteine wurden mit zweidimensionaler Gelelektrophorese getrennt, fixiert, getrocknet und mittels Autoradiographie detektiert (6 Tage bei 1×10^6 cpm).

Das nahezu identische Muster wurde bei schwach infizierten Zellen (MOI <5) mit oder ohne CH im Medium erzielt, wenn auch mit geringerer Ausbeute an eingebauter Radioaktivität bei gleichen Markierungsbedingungen (Bild nicht gezeigt). Demgegenüber zeigt Abb. 4 das Proteinmuster von *C. pneumoniae*, das erst bei einer Infektionsrate von 50 (MOI = 50: 50 EK/Wirtszelle) erzielt wurde.

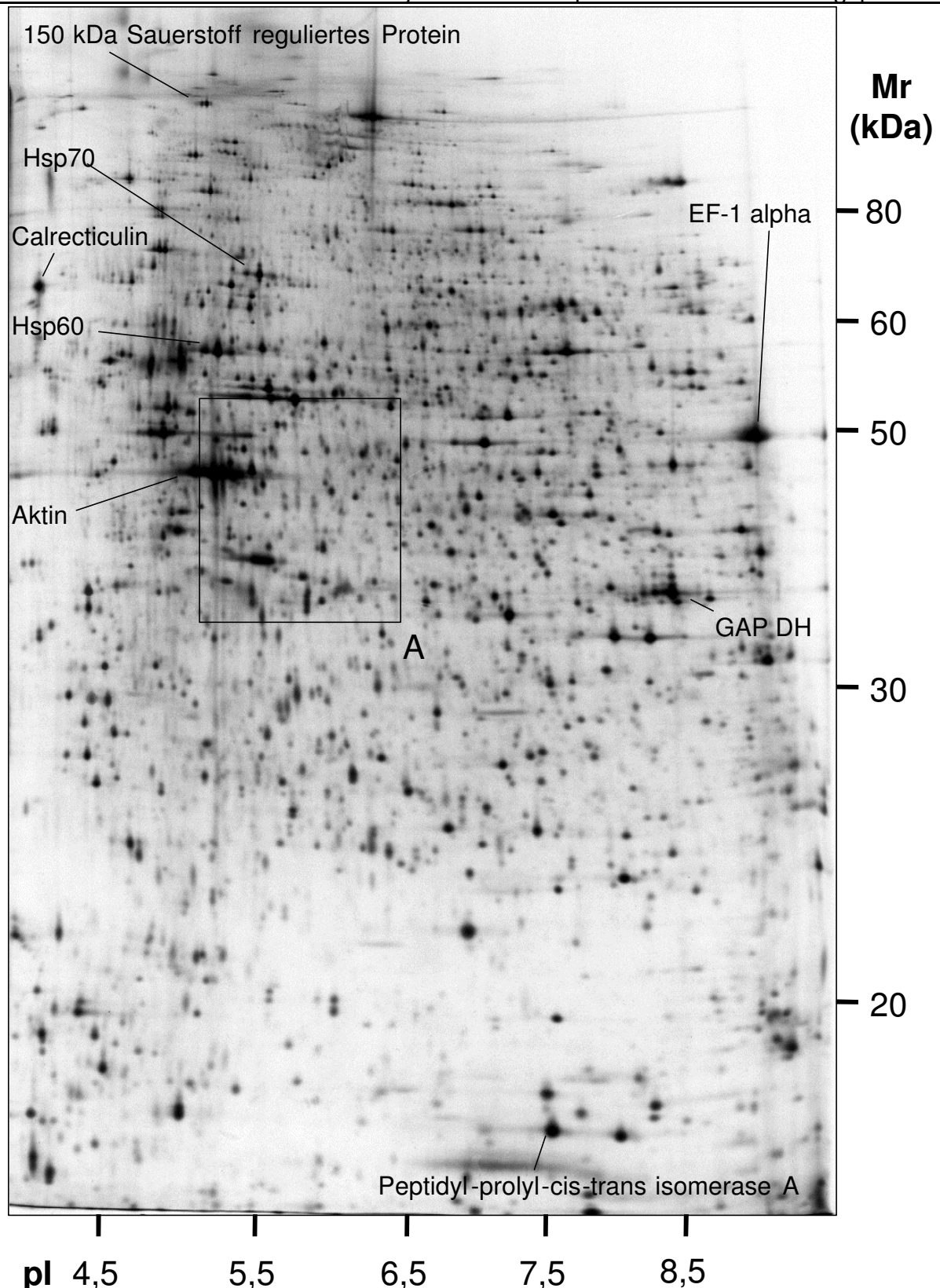


Abb. 3 Referenzgel des Proteoms nicht-infizierter HEp-2 Zellen

Semikonfluente HEp-2 Zellen wurden mit Medium ohne Met und Cys aber mit $100 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ $[^{35}\text{S}]\text{-Met/Cys}$ versetzt und 24 h bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Die markierten Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst, durch Zentrifugation pelletiert und in 2D-Probenpuffer resuspendiert. 1×10^6 cpm markiertes Zelllysate wurden über eine 2D-Gelelektrophorese getrennt und autoradiographisch detektiert. Das nahezu gleiche Muster wurde bei Behandlung der Zellen mit CH vor oder während des Markierungszeitraums erzielt. Die Lage einiger charakteristischer Proteine ist mit Abkürzungen angezeigt.

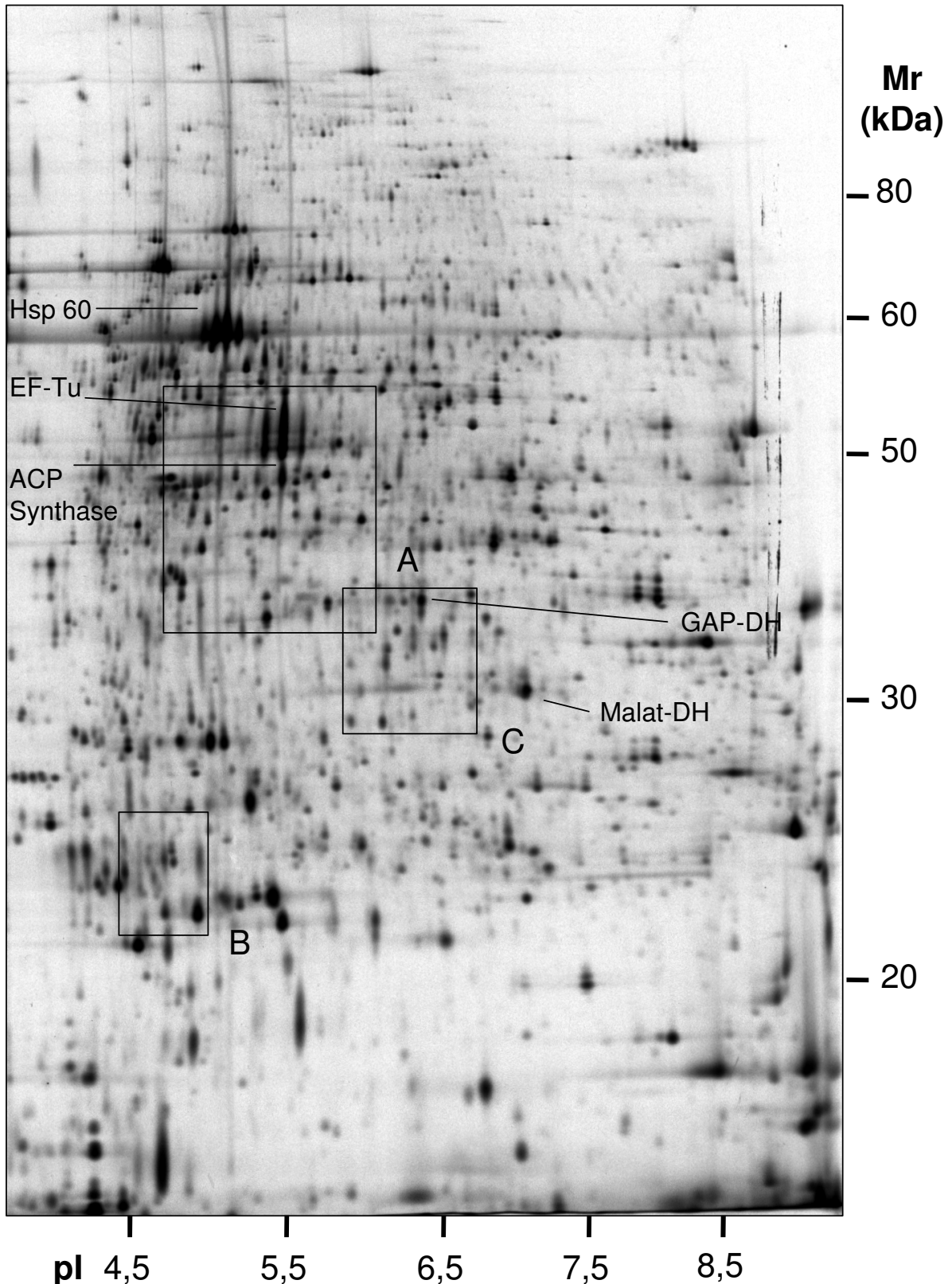


Abb. 4. Referenzgel des Proteoms von *C. pneumoniae* 24-48 h p.i.

Semikonfluente HEP-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* (MOI = 50) in der Anwesenheit von $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ CH infiziert. Nach 24 h wurde das Medium durch eines ohne Met und Cys aber mit $100 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ [^{35}S]-Met/Cys ersetzt und die Zellen weiter für 24 h bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Wie in Abb. 3 beschrieben wurden 1×10^6 cpm des Lysates über eine 2D-Gelelektrophorese getrennt und detektiert.

Bei MOI = 10 beobachtet man einen schmalen Übergangsbereich, in dem die Rate eingebauter Aminosäuren von Bakterien und HEp-2 Zellen sich die Waage halten. Im mittleren Bild der Abb. 5 ist ein Ausschnitt zu sehen, der sich im Vergleich mit den stark infizierten und den uninfizierten (Box A in Abb. 4 und 3) wie die Summe der beiden Muster darstellt. Im Folgenden wurde eine Infektionsrate von 50 gewählt, um ausschließlich das Bakterienproteom untersuchen zu können.

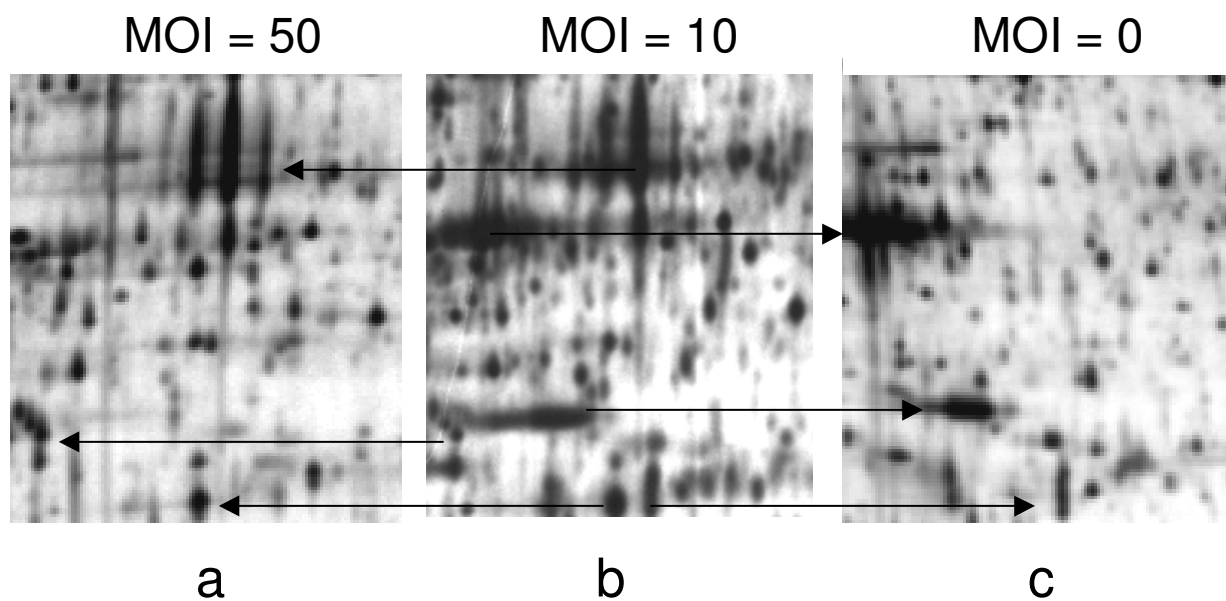


Abb. 5 Vergleich von eukaryontischem und prokaryontischem Proteinmuster

In mäßig infizierten HEp-2 Zellen (b) sind charakteristische Proteinspezies sowohl nicht-infizierter (c) als auch hoch infizierter (a) Zellen zu sehen. Vergrößerung des Ausschnitts „A“ in Abb. 3 (c) und 4 (a). Die beiden Proteinmuster konnten eindeutig unterschieden werden.

Das Muster der metabolisch markierten Proteine im Standardgel (24-48 h p.i.) umfasst 1361 Spots oder Proteinspezies (Abb.5). Erfahrungsgemäß sind Proteine durch posttranslationale Modifizierungen mehrfach vertreten, so dass die Zahl der Proteinspots schätzungsweise ein Drittel bis die Hälfte Proteine repräsentieren (Mattow *et al.*, 2003a). Da von den 1071 vorhergesagten Genprodukten von *C.*

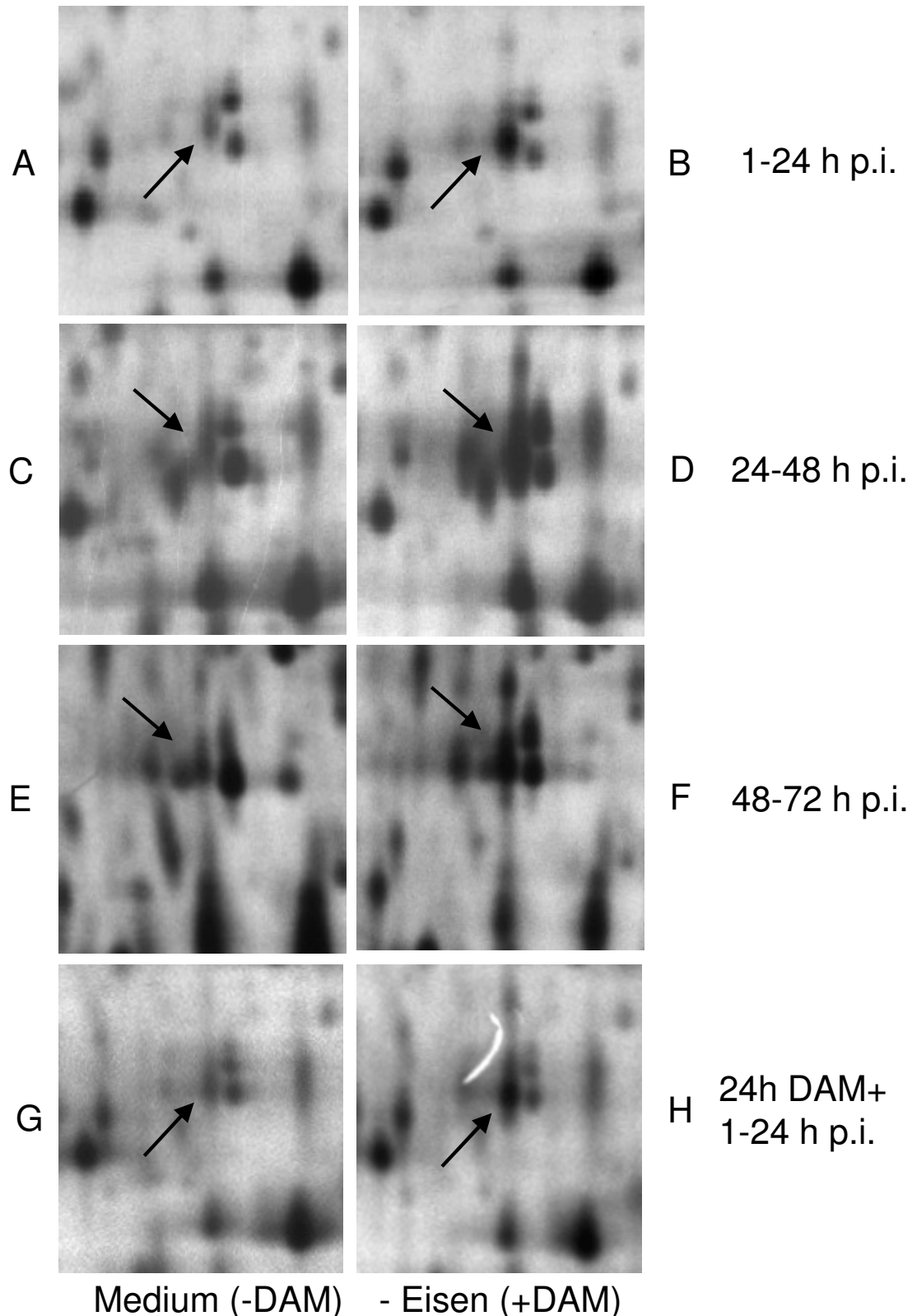
pneumoniae nur 701 im Trennbereich des 2D-Gels liegen ($M_r = 15-140$ kDa und $pI = 4-9$), könnte mit dem Referenzgel die Hälfte aller chlamydialen Proteine und 70-80% im Trennbereich abgedeckt sein.

Zur Verifizierung des Proteinmusters von *C. pneumoniae* wurden RK über eine Dichtegradienten-Ultrazentrifugation von EK und Wirtszellkomponenten getrennt (siehe Abschnitt 3.2.3) und 500 mg des Gesamtlysats mit 1×10^6 cpm markierten Proteinen auf ein präparatives 2D-Gel aufgetragen. Die intensivsten Spots wurden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mit einem MALDI-Massenspektrometer gemessen. Aus dem Vergleich der Peptidmassen mit dem Peptidmassen-„Fingerabdruck“ (PMF) aller in der Datenbank theoretisch verdauten Proteine konnten die jeweiligen Polypeptide identifiziert werden. Die RK-Fractionen waren frei von EK, enthielten aber Kontaminationen aus der Wirtszelle, so dass nicht alle gemessenen Massen einem Protein aus *C. pneumoniae* zugeordnet werden konnten und in Einzelfällen die zusätzlichen Peptide sogar die Identifizierung des kontaminierenden Proteins der HEP-2 Zellen (z.B. die NADH Dehydrogenase) durch Suche in der Human-Proteindatenbank erlaubten. Dennoch gelang über eine selbst-generierte *C. pneumoniae*-Datenbank im PMF-Suchprogramm *Mascot* die zweifelsfreie Identifizierung von Hsp60, EF-Tu, ACP Synthase, Malat- and GAP-Dehydrogenase (*Mascot score* >65 und Sequenz-Abdeckung >24%) (Abb.5). Kontaminationen aus Keratin- und Trypsinpeptiden sowie Massen von der Matrix wurden vor der Datenbanksuche mit dem Programm *MS Screener* entfernt. Als Ausschlusskriterium diente dabei das Vorkommen dieser Massen in mindestens 10% aller Spektren eines Verdauansatzes. Zusätzlich erlaubt das Programm die Entfernung modifizierter bzw. nicht-tryptischer Massen aufgrund deren Abweichung von der Standardabweichung aller Peaks im Verhältnis zur absoluten Peptidmasse. Der *Mascot score* der Suchergebnisse ließ sich durch diese Beschränkung der gemessenen Massen um durchschnittlich 5-10% verbessern. Die theoretischen Massengewichte (in kDa) und die vorhergesagten isoelektrischen Punkte (pI) wurden zum Kalibrieren des ersten Referenzgels von *C. pneumoniae* benutzt (Abb. 4).

3.2.2 Strategien von *C. pneumoniae* während der frühen Persistenzphasen

3.2.2.1 Antwort von *C. pneumoniae* auf Eisenmangel zu Beginn der Infektion

Um die Ereignisse zu Beginn der persistenten Infektion mit denen des aktiven Entwicklungszyklus vergleichen zu können, wurden infizierte Zellen sequentiell 1 h, 24 h oder 48 h nach Infektion unter Erhöhung der CH-Konzentration auf $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ 24 h lang mit $100 \mu\text{Ci}$ [^{35}S]-Methionin/Cystein inkubiert. Im initialen Zeitraum von 1-24 h p.i. war das Muster der Proteinspezies mit und ohne Eisenrestriktion fast identisch. Nur ein Spot (SSP 2117) war unter eisenlimitierenden Bedingungen (+ $50 \mu\text{M}$ DAM) stark hochreguliert ($p < 0,02$). Auch im weiteren Verlauf der Infektion blieb die Menge von SSP 2117 unter Eisenmangel bis zum Ende des Beobachtungszeitraums 72 h p.i. erhöht (Abb. 6).



Medium (-DAM) - Eisen (+DAM)

Abb.6 Spot SSP 2117 wird bereits vor 24 h p.i. und bis 72 h p.i. hochreguliert. Vergrößerung des Ausschnitts „B“ aus Abb. 4. HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI = 50) und von 1-24 h p.i. (A, B), 24-48 h p.i. (C, D) oder 48-72 h p.i. (E, F) ohne (A, C, E) oder mit (B, D, F) Zusatz des Eisen-Chelators Deferoxamin Mesylat (DAM, 50 μ M) metabolisch markiert. Auch bei Vorbehandlung der Zellen mit 50 μ M DAM 24 h vor Infektion (G) ergab sich das gleiche Bild wie ohne (H) im Markierungszeitraum 1-24 h p.i. Einziger hochregulierter Spot bis 24 h p.i. war SSP 2117, der bis Ende des Beobachtungszeitraums von 1-72 h p.i. hochreguliert blieb (Pfeil).

Der Großteil der metabolischen Veränderungen wurde erst während der folgenden 24 h beobachtet (siehe Abschnitt 3.2.2.2). Da biologisch gespeichertes Eisen eine für die Persistenzentwicklung verzögernde Wirkung haben könnte, wurden die Zellen vor der Infektion 24 h mit 50 μ M DAM vorbehandelt. Es zeigte sich das gleiche Bild wie bei Zugabe des Chelators erst zu Beginn der Infektion: Allein SSP 2117 war signifikant hochreguliert (Abb. 6G und H). Die iterative Antwort in der Proteinregulation stand also in Zusammenhang mit dem chlamydialen Entwicklungszyklus und war nicht durch eine nur langsam abfallende verfügbare Eisenmenge bedingt.

3.2.2.2 Änderungen in der Proteinkomposition nach Beginn der Infektion

Im Zeitraum von 24-48 h p.i. waren in den DAM-behandelten Zellen im Vergleich zu normalen Infektionsbedingungen 11 Spots herunter- und 8 hochreguliert, wie eine vergleichende Analyse der beiden Bedingungen ergab. Die gescannten Autoradiogramme der 2D-Gele wurden dazu mit dem Programm *PD Quest* densitometrisch normiert und die statistisch signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den beiden Gruppen bestimmt. Eine Replikatgruppe bestand dabei aus 3 Gelen von 3 unabhängigen Experimenten. Die graphische Darstellung der regulierten Spots ist in Abb. 7 gezeigt, die Durchschnittswerte der Replikatgruppen sowie die experimentell bestimmten Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte in Tab.1). Die 19 differentiell regulierten Proteinspots entsprechen 1,4% der im Referenzgel aufgelösten 1361 Spots (Abb. 4).

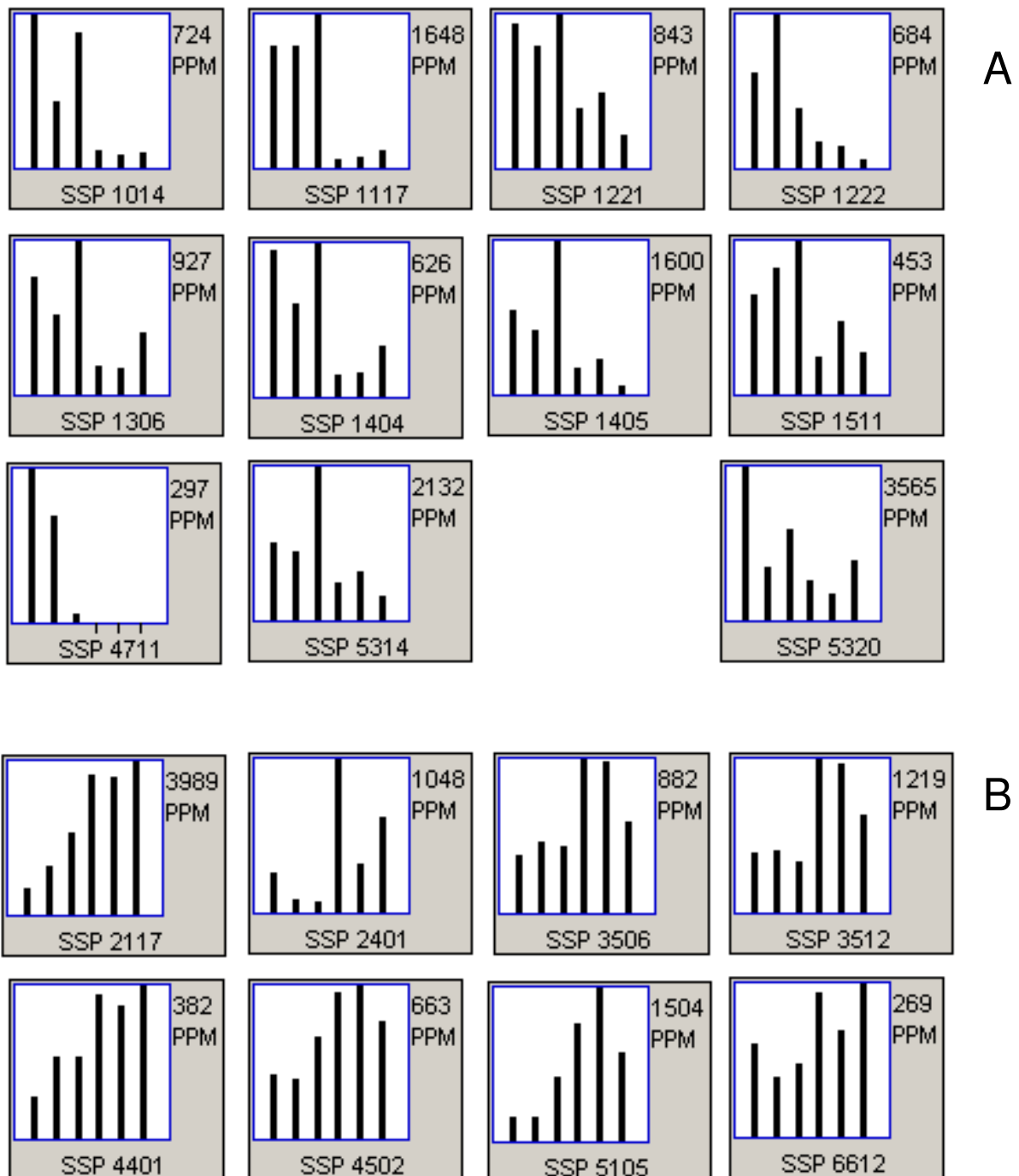


Abb.7 Regulierte Proteinspezies im Zeitraum 24-48 h p.i.

Autoradiogramme der 2D-Gele wurden mit PD Quest (Biorad) verglichen und statistisch ausgewertet. Von 24-48 h p.i. waren 11 Proteinspots mit einer Signifikanz von $p < 0.05$ ($p < 0.01$ bei SSP 5320) herunter- (A) und 8 hochreguliert (B). Die Höhe jedes Balkens repräsentiert die Intensität (in PPM) des jeweiligen Spots in einem Gel. Das Analyseset bestand aus jeweils 3 Geln aus 3 unabhängigen Experimenten und zeigt zuerst die nicht-behandelten Infektionen und danach die DAM-behandelten und damit unter Eisenmangel kultivierten.

Tab.1 Zusammenfassung der regulierten Spots

SSP	Kontrolle * (Medium)	DAM *- Behandlung	** Regulation	Mr / pI *** (~ kDa /)
1014	560,1	68,5	↓	15 / 4,3
1117	1429,1	125,9	↓	22 / 4,6
1221	768,3	306,8	↓	27 / 4,5
1222	449,5	83,3	↓	26 / 4,5
1306	708,1	231,1	↓	32 / 4,5
1404	537,5	133,2	↓	45 / 4,3
1405	1052,2	238,7	↓	45 / 4,3
1511	374,2	151,3	↓	47 / 4,5
2117	1358,3	3760,1	↑	24 / 4,7
2401	142,9	697,6	↑	45 / 4,6
3506	371,3	734,9	↑	47 / 5,2
3512	458,2	1300,8	↑	47 / 5,4
4401	170,8	349	↑	47 / 5,7
4502	317,3	586,4	↑	47 / 5,7
4711	172,2	1,1	↓	58 / 6,0
5105	367,6	1176,9	↑	23 / 6,3
5314	1448,8	503	↓	34 / 6,2
5320	2323,7	978,2	↓	32 / 6,1
6612	132,5	236,9	↑	53 / 6,8

* Quantitativer Durchschnitt der 3 Gele einer Replikat-Gruppe

** Regulation in DAM-behandelten Kulturen verglichen mit normalem Infektionsmedium

*** aus dem Standardgel geschätzte Werte, die im Fall der identifizierten Proteine mit den theoretisch berechneten übereinstimmten (fett gedruckt, SSP 4401 und 4502 waren Formen des gleichen Proteins).

Eine Regulation wurde bei einem *p*-Wert von <0.05 mit dem *t*-Test (>95% bei der statistischen Auswertung in *PD Quest*) als signifikant gewertet. Ausnahme war SSP

5320 mit einem p -Wert von $<0,1$ ($>90\%$), dessen Intensität im ersten Experiment bei DAM-Behandlung deutlich abnahm und daher als reguliert bewertet wurde (Abb. 7 und 8). Abb. 8 (= Box C in Abb. 4) zeigt auch die späte Regulation der beiden Spots (SSP 5314 and 5320) erst nach 24 h p.i. Der Zeitraum von 48-72 h p.i. wurde nicht mehr in die Analyse mit einbezogen, da sich die Proteinkomposition ab diesem Zeitpunkt deutlich änderte und ein Vergleich mit den früheren Markierungszeiträumen nicht mehr möglich war, wie exemplarisch in Abb. 8 E und F zu sehen.

Ungeachtet der moderaten Änderungen auf Proteinebene in den ersten 48 h der persistenten Infektion war es nicht möglich, die heteromporphen und fragilen „aberanten“ RK aufzureinigen. Deshalb wurde von den über einen Dichtegradienten getrennten, normalen RK ein präparatives Gel angefertigt, die regulierten Proteinspots tryptisch verdaut und massenspektrometrisch untersucht. Abb. 9A zeigt exemplarisch das Massenspektrum des tryptischen Verdaus von Spot SSP 5314 (Pfeilspitze in Abb. 8) und Abb. 10 das PMF-Suchergebnis in der Datenbank mit seiner Identifizierung als *Chromosome Partitioning Protein* (ParB). Mit zwei Ausnahmen konnten alle Hauptpeaks dem chlamydialen Protein zugeordnet werden. Vier Peaks mit schwacher Intensität wurden aufgrund der typischen Isotopenverteilung als Peptidmassen vom Hintergrundrauschen unterschieden. Elf der 12 in der Datenbank gefundenen Peptide hatten in Übereinstimmung mit der zu erwartenden, besseren Ionisierung in der Gasphase ein Arginin am C-Terminus, das eine Peptid mit einem C-terminalen Lysin ($M_r = 1875,91$) besaß hingegen ein Arginin am N-Terminus.

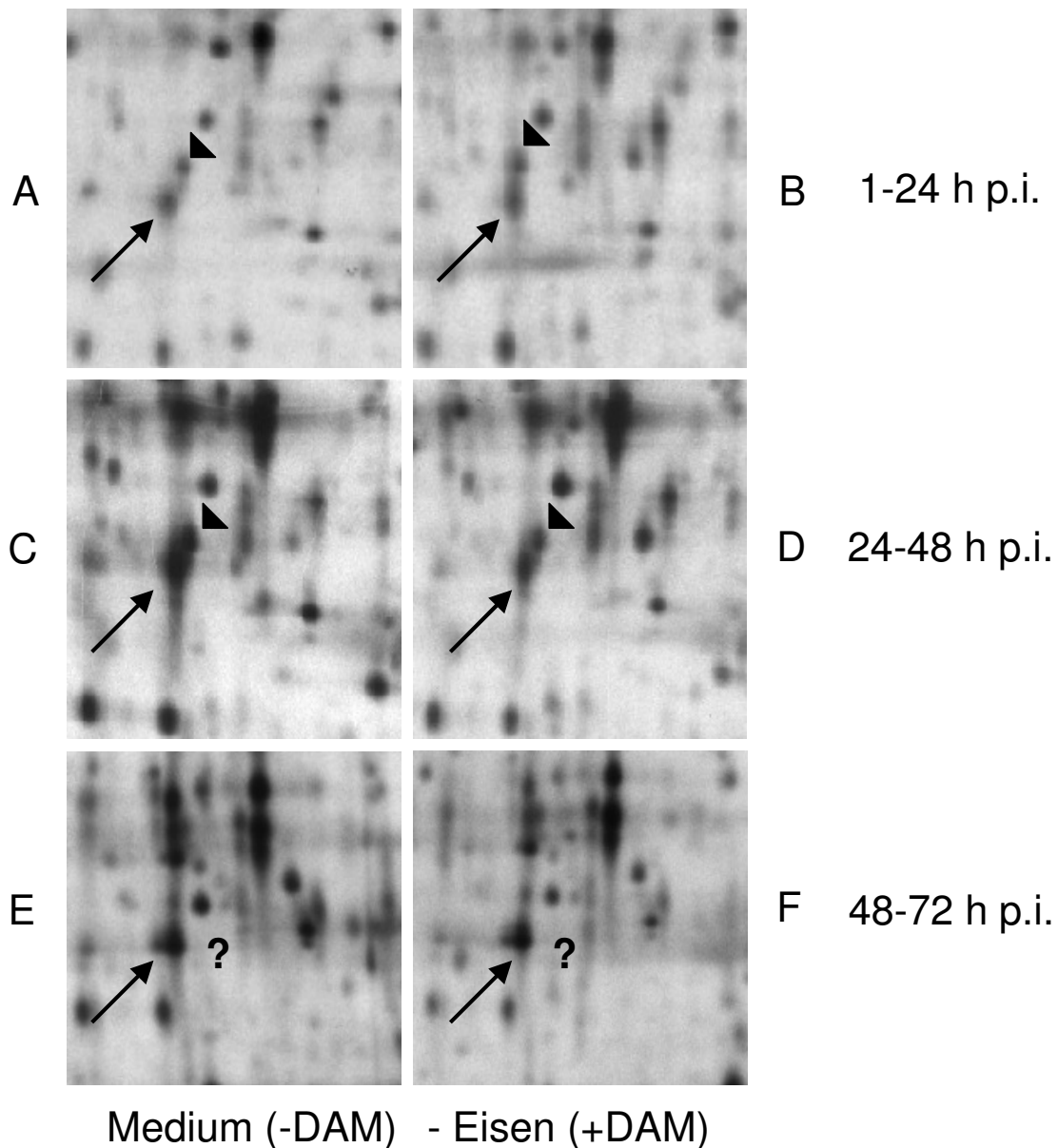


Abb. 8 Regulation zweier Spots im Zeitraum 24-48 h p.i.

Vergößerung des Ausschnitts „C“ aus Abb. 4.

HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI = 50) und von 1-24 h p.i. (A, B), 24-48 h p.i. (C, D) oder 48-72 h p.i. (E, F) ohne (A, C, E) oder mit (B, D, F) Zusatz von 50 μ M DAM metabolisch markiert. Die beiden identifizierten Proteinspots SSP 5314 (Chromosom Partitionierungs Protein ParB, Pfeilspitze) und SSP 5320 (Thioredoxin Reduktase TrxB, Pfeil) waren von 24-48 h p.i. herunterreguliert aber im Zeitraum 1-24 h p.i. unverändert.

Allerdings waren die Massen nicht aller Verdauung so eindeutig chlamydialen Proteinen zuzuordnen. Abb. 9B zeigt ein Massenspektrum, in dem 7 Peptide mit den von Adenosylmethionin-8-Amino-7-Oxononanoat Aminotransferase (BioA) vorhergesagten, 7 weitere aber mit den theoretischen Peptiden des humanen Proteins Isocitrat-Dehydrogenase A (IDHA) übereinstimmten. Letzteres musste an der gleichen Stelle im Gel gelaufen sein und ist Indiz für die Verunreinigungen der RK-Präparation durch Wirtszellbestandteile (Abschnitt 3.2.3, Abb. 11).

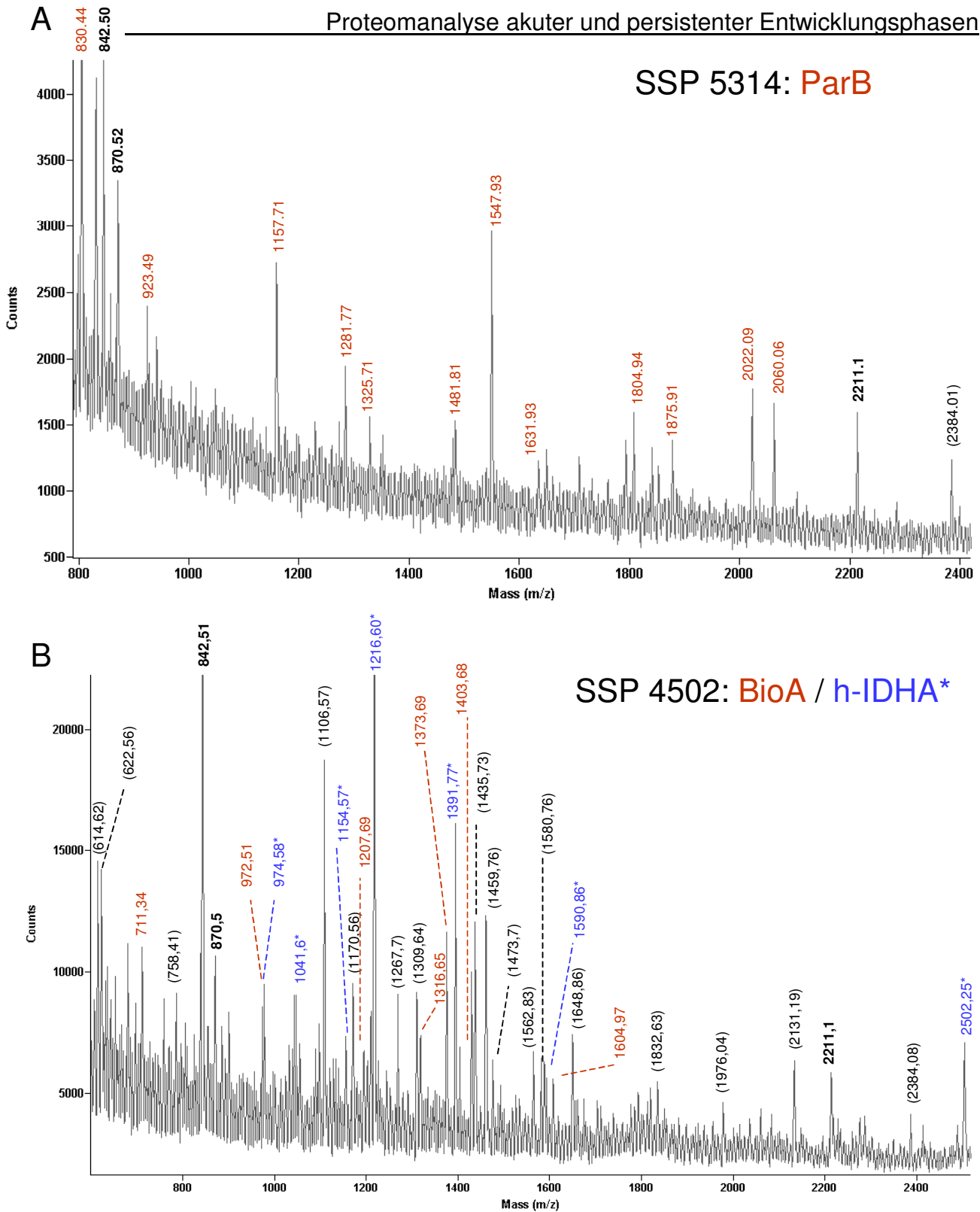


Abb. 9 MALDI-Massenspektren der trypt. Peptide der Spots SSP 5314 bzw. 4502

SSP 5314 (A) und 4502 (B) wurden aus einem präparativen 2D-Gel ausgeschnitten und ü/n mit Trypsin verdaut. Die eingegangenen Peptide wurden in 0,5% TFA/Acetonitril (2/1) aufgenommen, mit 2,5-DHB gemischt und nach Ko-Kristallisation im Reflektron-Modus eines *time-of-flight* MALDI Massenspektrometers gemessen.

Peptidmassen von ParB (A) bzw. BioA (B) sind rot, die vom humanen Protein IDHA in blau mit* gekennzeichnet (B). Massen, die nicht zugeordnet werden konnten sind in Klammern dargestellt, Peptide aus dem Selbstverdau von Trypsin wurden als interne Standards zum Kalibrieren der Spektren verwendet (842,5 and 2211,1) (**fett**).

```

1  MTEEISKDTI IEVAIDDIRV SPFQPRRVFS NEELQELIAS IKAVGLIHPP
51  VVREICTGDR VLYYELIAGE RRWRAMQLAG ATTIPVILKH VIADGTAAEA
101 TLIENIQRVN LNPIEMAEAF KRLIHVFGLT QDKVAYKVGK KRSTVANYLR
151 LLALSKTIQE SLLQGQITLG HAKVILTLED PILREKLNEI IIQEHLAVRE
201 AELIAKQLIS EEGSSILELKP TPLDMAESSK QHEELQRRLS DLCGYKVQIK
251 TRGSKATVSF HLQNTQDLQK LEAWLSSHGT LSESLS
    
```

Start-	Ende	beobachtet	Mr (theor.)	Abw.	NG	Sequenz
2	- 19	2060,06	2059,05	-0,02	1	TEEISKDTIIEVAIDDIR
20	- 26	830,44	829,43	-0,01	0	VSPFQPR
27	- 42	1875,91	1874,90	-0,11	1	RVFSNEELQELIASIK
43	- 53	1157,71	1156,70	-0,01	0	AVGLIHPPVVR
61	- 71	1325,71	1324,70	0,00	0	VLYYELIAGER
61	- 72	1481,81	1480,80	-0,00	1	VLYYELIAGERR
90	- 108	2022,09	2021,08	0,03	0	HVIADGTAAEATLIENIQR
109	- 122	1631,93	1630,92	0,07	1	VNLNPIEMAEAFKR
143	- 150	923,49	922,48	-0,00	0	STVANYLR
174	- 184	1281,77	1280,76	-0,01	0	VILTLEDPILR
185	- 199	1804,94	1803,93	-0,09	1	EKLNEIIIIQEHLAVR
187	- 199	1547,93	1546,92	0,04	0	LNEIIIIQEHLAVR

Abb. 10 Identifizierung von SSP 5314 als *Chromosome Partitioning Protein* (ParB) anhand des PMF

Die gemessenen Massen wurden mit den theoretischen Peptid-Fingerabdrücken (PMF) der Proteine von *C. pneumoniae* CWL029 mit dem Programm *Mascot* verglichen. Als Datenbasis diente eine selbst generierte Datenbank mit den publizierten Sequenzen von *C. pneumoniae*. Die unterstrichenen Aminosäuren zeigen die durch die gemessenen Peptidmassen abgedeckten Proteinbereiche von ParB (=Cpn0684). Die Sequenzabdeckung betrug 45%.

Spot SSP 2401 konnte nur über die alternative Ionisierung und Messung des Peptidgemisches über die ESI-Q-TOF identifiziert werden (Tab. 2). Von 4 Peptiden des chlamydialen Proteins Cpn0623 wurden dazu die Primärsequenz bestimmt. Die weiteren identifizierten Proteine sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tab.2 Zusammenfassung aller identifizierten, differentiell regulierten Proteine

SSP	Mascot score	Sequenz-abdeckung	Mr (kDa)	pI	Identität
1221	49	23%	26,7	5,2	Hypothetisches Protein Cpn0011
5314	218	45%	32,0	6,1	<i>Chromosome Partitioning Protein</i> (ParB)
5320	83	51%	33,5	6,2	Thioredoxin Reduktase (TrxB)
4401	48	15%	46,9	5,7	Adenosylmethionin-8-Amino-7-Oxononanoat Aminotransferase (BioA)
2401	-*	24%	31,0**	4,7**	Hypothetisches Protein Cpn0623
4502	60	17%	46,9	5,7	Adenosylmethionin-8-Amino-7-Oxononanoat Aminotransferase (BioA)

* Die Identität wurde über Sequenzinformationen von 4 Peptiden über ESI-MS/MS ermittelt.

** gemessene Werte (ca.): Mr = 45 kDa; pI = 4,6

Die Ergebnisse dieser Analysen (außer SSP 2401) dienen auch zum Aufbau einer *C. pneumoniae* Datenbank und sind auf der homepage des Max-Planck-Institutes für Infektionsbiologie öffentlich zugänglich (<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE>).

3.2.3 Strategien von *C. pneumoniae* zum Ende des Infektionszyklus

Zur Analyse der Proteinkomposition von RK am Ende des Infektionszyklus während der Redifferenzierung in infektiöse EK (3-4 Tage p.i.) wurde der zweite Ansatz einer physischen Trennung der Bakterien von der Wirtszelle verfolgt. Die Proteine auf den 2D-Gelen konnten dann mit einer klassischen Silberfärbung angefärbt werden.

Zunächst wurde ein Protokoll für die Aufreinigung der Chlamydien in Anlehnung an Publikationen für *C. trachomatis* etabliert (Hatch *et al.*, 1981). Die besten Ergebnisse wurden mit einem Dichtegradienten aus 30, 35, 40 und 45% erzielt, über den der postnukleäre Überstand infizierter und mittels Glasperlen aufgeschlossener HEp-2 Zellen geschichtet und zentrifugiert wurde. Die Bande zwischen der 30- und 35%igen Lösung enthielt die RK-Fraktion, während in der Schicht zwischen der 35- und 40%igen Lösung die EK migrierten. Die EK waren erst nach 3 Tagen der Infektion zu sehen, RK aber sowohl nach 2 Tagen, als auch zum späten Zeitpunkt nach 4 Tagen.

Durch den asynchronen Verlauf des Infektionszyklus sind auch zum Zeitpunkt der Wirtszelllyse noch teilende und sich differenzierende RK vorhanden.

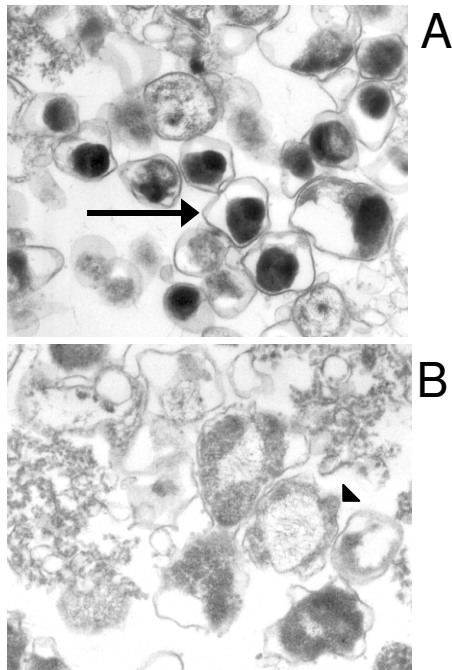


Abb.11 Verifizierung der isolierten Fraktionen als EK und RK

Der post-nukleäre Überstand infizierter und aufgeschlossener HEp-2 Zellen wurden über einem Dichtegradienten aufgetrennt. Die Fraktionen wurden in Epon eingebettet und elektronenmikroskopisch analysiert. In der Fraktion zwischen 40 und 45% Urografin waren vorwiegend EK (A, Pfeil), in der zwischen 35 und 40% Urografin ausschließlich RK (B, Pfeilspitze). Beide Fraktionen enthielten aber Restbestandteile der Wirtszellen.

Die Reinheit der Präparationen wurde elektronenmikroskopisch überprüft (Abb. 11). Während in der EK-Fraktion einige RK migrierten, war die im folgenden proteinanalytisch untersuchte RK-Fraktion frei von EK. EK waren dabei leicht durch die für *C. pneumoniae* typische, Pfirsich-förmige Gestalt mit dichtgepacktem Chromatin und asymmetrischer Membran zu erkennen. Beide Fraktionen enthielten aber Kontaminationen von Wirtszell-Bestandteilen, die auch das Muster der 2D-Gele dominierten. Durch substraktive Analyse der Gelmuster von dem parallel aufgearbeiteter, nicht-infizierter Zellen gelang es, die zusätzlichen und damit von *C. pneumoniae* stammenden Proteine zu betrachten. Es handelte sich um etwa 150 der 840 Silbergefärbten Spots (ca. 18%) und damit weniger als bei der metabolischen Markierung in Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2.

Tab.3 Zusammenfassung der Hauptproteine von RK 4 Tage p.i.

SSP	Mascot score	Sequenz Abdeckung	Mr (kDa)	pI	Identität
		25%*	170,87*	4,8	PmpD (mittlerer Teil: T670-R1115)
		25%*	170,87*	4,8	PmpD (N-terminaler Teil: L122-K655)
0006	46	29%	21,89	4,8	Thiol-spezif. Antioxidanz Peroxidase
0008	60	22%	29,32	4,9	Glukose-6-phosphat DH
0010	61	28%	11,31	4,7	10 kDa Chaperonin
0108	68	32%	29,32	4,8	Glukosamin-6-phosphat Isomerase/Deaminase (DevB)
0708	74	24%	68,21	4,8	CPn0728
0901	97	10%	144,83*	5,3	PmpG/I (N-terminaler Teil: N164-K867)
1002			20**	5,0**	-
1702	59	22%	71,31	5,0	Hsp70
1705			75**	5,3**	-
2101	71	24%	30,37	5,3	EF-Ts
3105			32**	5,5**	-
3303	45	12%	44,67	5,5	Acyl-Carrier Protein Synthase
4405	100	29%	48,08	5,8	Yops - Sekretions ATPase YscS/SctN
4711			70**	6,0**	-
6101			37**	6,2**	-
6103	61	13%	36,81	6,3	Glycerinaldehyd-3-phosphat DH
8107			35**	6,9**	-
8116	56	25%	33,93	7,2	Penizillin Toleranz Protein (LytB)

* PmpD: Es wurden 2 Fragmente gefunden (siehe 4.2.1), die zusammen 25% abdeckten.

PmpG: Es wurde 1 Fragment gefunden

** keine Identifizierung möglich - geschätzte Werte aus dem Laufverhalten im Gel

Von den RK-Präparationen wurde ein präparatives Gel mit 250 µg Proteinmenge hergestellt und die 20 intensivsten, postuliert chlamydialen Proteine tryptisch verdaut und massenspektrometrisch untersucht. Sie sind mit beobachtetem Molekulargewicht und pI in Tabelle 3 zusammengefasst, außerdem ist die Identität der über den PMF identifizierten Proteine angegeben.

3.3 Diskussion

3.3.1 Proteinbiosynthese der intrazellulären Chlamydien

Persistente Chlamydieninfektionen sind mit Entstehung oder Verlauf vieler chronischer Krankheiten assoziiert und bislang nicht mit Antibiotika zu therapieren. Bei Fluorquinolonbehandlung wurde vielmehr sogar eine verstärkte Induktion der Persistenz beobachtet (Dreses-Werringloer *et al.*, 2000). Das Fehlen jeglicher Therapieansätze ist auch auf eine bisher nur unzureichende Charakterisierung der Persistenz auf molekularer Ebene zurückzuführen.

Im gewählten Ansatz sollten auf Proteinebene die ersten Schritte bei Etablierung einer Persistenz untersucht werden, die durch Eisenmangel ausgelöst wird (Al Younes *et al.*, 2001). Um nur die synthetisierten und modifizierten Proteine der Bakterien zu detektieren, wurden sie unter gleichzeitiger Hemmung der eukaryontischen Proteinbiosynthese durch CH in verschiedenen Zeitfenstern mit radioaktiven Aminosäuren markiert. In kleineren Konzentrationen ($1-2 \mu\text{g ml}^{-1}$) wird CH auch bei Routineinfektionen *in vitro* dem Medium zugesetzt um die Infektionseffizienz zu erhöhen. Entgegen weitläufiger Meinung beeinflusst eine Infektion aber nicht die intrazellulär verfügbare Menge an Aminosäuren, weshalb der Grund für den positiven Effekt von CH auf die Infektion nicht der Wegfall des konkurrierenden, eukaryontischen Aminosäureeinbaus als vielmehr die ausbleibende, aktive Antwort der Zelle zur Bekämpfung der intrazellulären Eindringlinge ist (Harper *et al.*, 2000). Das Muster der Proteinspezies infizierter Zellen glich jedoch bei der Routine-Infektionsrate von 1-2 dem nicht-infizierter Zellen (Abb. 3). Die Ursache dafür könnte in der Tendenz von *C. pneumoniae* liegen, den Zellrasen nicht gleichmäßig zu infizieren, sondern einige Zellen anderen zu bevorzugen. So beobachtet man, dass bestimmte Zellen mehrfach, andere dagegen gar nicht infiziert werden. Zellen mit mehreren Inklusionen entwickeln sich dabei oft polynukleär (Greene und Zhong, 2003). Allerdings ist unklar, ob eine Infektion sich stimulierend auf die Zellteilung auswirkt oder die EK bevorzugt Zellen infizieren, die sich gerade teilen. Ab einer MOI von ca. 15 sind etwa 90-95% der Zellen infiziert und man kann das bakterielle Proteinmuster detektieren (Abb. 4). Für die weiteren Versuche wurde eine Infektionsrate von 50 gewählt, um nahezu vollständige Infektion zu erhalten; viele Zellen sind dann bereits mehrfach infiziert. Neben der CH Konzentration ist also auch die Infektionsrate für die Markierung der intrazellulären Bakterien und vor allem der unter den

Chlamydien am langsamsten wachsenden *C. pneumoniae* entscheidend (auch B. Vandahl, persönl. Kommuniaktion). In einem Bereich um MOI = 10 konnten die Proteinmuster von Wirtszelle und Bakterien, die sich deutlich voneinander unterschieden, gleichzeitig markiert und beobachtet werden (Abb. 5). Dieser Übergangsbereich war sehr schmal, was gegen eine sukzessive Dominanz der Chlamydienproteine bei zunehmender MOI und damit ein Nebeneinander von Wirts- und Bakterienproteinsynthese spricht. Denkbar wäre daher auch eine aktive Unterdrückung der Wirtszellsynthese in infizierten Zellen.

Ein Vergleich des chlamydialen Proteinmusters mit bereits publizierten Daten von 2D-Proteomanalysen war nur sehr bedingt möglich, da die meisten anderen Arbeitsgruppen die weitverbreitete IPG-Technik mit immobilisierten Ampholyten zur Herstellung des pH-Gradienten in der 1. Dimension verwenden. Das hier benutzte System löslicher Ampholyte ist aufwendiger in der Durchführung, dafür aber vielseitiger und im Ergebnis über den weiten pI-Bereich schärfer trennend. Die Verifizierung des Proteoms von *C. pneumoniae* gelang anhand einiger markanter Proteine (Hsp60, EF-Tu, ACP Synthase, Malat- and GAP-Dehydrogenase) sowie regulierter Proteine (siehe unten), deren beobachtete Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte mit den *in silico* berechneten übereinstimmten.

3.3.2 Regulationsmechanismen zu Beginn der Eisenmangel-induzierten Persistenz

Zu Beginn der Infektion (bis zu 24 h) war unter Eisenlimitation nur ein kleines Protein im sauren Bereich hochreguliert: **SSP 2117**, Mr ~24 kDa, pI ~4,7 (Abb. 6 und 8).

Eisenmangel ist Teil des unspezifischen Schutzes gegen pathogene Erreger. Diese haben jedoch zahlreiche Strategien entwickelt, um sich der Eisenlimitation anzupassen und benutzen einen Abfall der Eisenkonzentration sogar als Signal, Virulenzfaktoren zu exprimieren (Ratledge und Dover, 2000; Litwin und Calderwood, 1993). Auch das zum Spot SSP 2117 gehörende Protein könnte in die Koordination der Antwort von *C. pneumoniae* involviert sein, zumal seine Hochregulation den Ereignissen nach 24 h p.i. (Abb. 7) vorangeht.

Zentrale Sensoren und Regulatoren der Eisenkonzentration sind in Gram-negativen Bakterien oft Verwandte des globalen Transkriptionsfaktors *Ferric uptake regulator* (Fur, ~20 kDa, pI 4-5), der ebenfalls bei Eisenmangel hochreguliert wird und die dann folgende Antwort koordiniert (Hantke, 2001). In *C. trachomatis* wurde ein His-reiches, 20 kDa großes Gegenstück zum Fur-Protein bereits beschrieben, das DcrA, dessen Transkript auch bei IFN γ -Behandlung verstärkt gebildet wird (Wyllie und Raulston, 2001; Belland *et al.*, 2003). Ob SSP 2117 das oder ein Fur-ähnliches Protein in *C. pneumoniae* ist bleibt hypothetisch, da die Identität nicht ermittelt werden konnte. Neben Größe, isoelektrischem Punkt und Expressionsverhalten spricht allerdings auch seine absolute Menge als Teil der 35 stärksten Proteinspots (berechnet nach der densitometrischen Intensität) dafür: Im Modellorganismus *E. coli* kommt Fur mit 5-10 000 Molekülen pro Zelle in sehr hoher Zahl vor, weshalb man ihm auch eine Funktion bei der Speicherung freien Eisens zuschreibt (Andrews *et al.*, 2003).

Der Großteil der Persistenz-spezifischen Entwicklung gemessen an einer veränderten Proteinkomposition wurde erst nach 24 h p.i. beobachtet. Insgesamt 19 Proteinspezies waren dann deutlich unterschiedlich reguliert, was 1,4% der im Referenzgel aufgelösten Proteinkomposition entspricht. Bei spontan-persistenten Infektionen von *C. trachomatis* in Monozyten wurden Veränderungen wie ein geringerer Metabolismus für sehr frühe Zeitpunkte festgestellt, die meisten Veränderungen auf Transkriptomebene waren jedoch erst zwischen 2 und 3 Tagen p.i. evident (Gerard *et al.*, 2002; Gerard *et al.*, 2001). Wann genau sich das persistente Wachstum manifestiert könnte abhängig sein von Organismus und Stimulus. So stört die Blockierung der Peptidoglykansynthese als Wirkmechanismus von β -Lactam-Antibiotika wahrscheinlich die Entwicklung der RK erst bei der Teilung, was dann zu den großen AK führen könnte: Peptidoglykan wird bei Chlamydien nicht zur strukturellen Stabilisierung der Zellwand, wohl aber als Gerüst für die Formierung des Septums benötigt (Moulder, 1993). Schließlich gibt es Berichte über die Herunterregulation verschiedener Membranproteine, die auf eine gestörte Konversion von RK oder AK in infektiöse EK hinweisen (Moulder, 1993; Beatty *et al.*, 1995). In einer Studie zur IFN γ -Behandlung bei *C. pneumoniae* wurden Antworten auf Transkriptomebene nur für die Zeit nach 24 h p.i. publiziert, was in Analogie zum Eisenmangel auf eine normale Entwicklung zu Beginn der Infektion, also bei

Etablierung der unabhängigen Inklusion und der Differenzierung EK → RK schließen lässt (Mathews *et al.*, 2001). Bei den schneller wachsenden *C. trachomatis* waren 12 h p.i. erste Veränderungen bei der Genexpression detektierbar, die sich morphologisch erst ab 24 h p.i. manifestierten. Viele herunterregulierte Transkripte waren von Proteinen, die erst spät im Entwicklungszyklus gebraucht werden, wie etwa zur Kondensation des Chromatins (Belland *et al.*, 2003).

Erkenntnisse über das *in vivo* wahrscheinliche Wachstum unter Eisenmangel sind rar. Bei *C. pneumoniae* wurde mit 1D-Immunblot-Analyse nur ein immunogenes Protein in der Größe von 54 kDa gefunden, das nach DAM-Behandlung (200 µM) herunterreguliert war (Freidank *et al.*, 2001). Bei *C. trachomatis* wurden mit der 2D-Elektrophorese 19 hochregulierte und 1 herunterregulierter Spots beobachtet, von denen 2 identifiziert werden konnten. Allerdings unterschieden sich die AK von denen nach IFN γ -Behandlung beobachteten, was für eine andere Art von Persistenz sprechen würde (Raulston, 1997). Ergebnisse verschiedener Chlamydien-Spezies und Persistenzstimuli sind jedoch nur bedingt übertragbar. So wurden im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit bei IFN γ -behandelten *C. pneumoniae* keine herunterregulierten Proteine beobachtet (Molestina *et al.*, 2002). In letzterer Studie war neben Hsp60 auch MOMP hochreguliert, was im Widerspruch zu den Beobachtungen bei *C. trachomatis* steht, bei dem MOMP im Vergleich zu Hsp60 um den Faktor 5 weniger nachweisbar war (Beatty *et al.*, 1993). Auf Transkriptomebene schließlich zeigte sich bei *C. pneumoniae* eine forcierte Transkription des Gens für MOMP (*omp1*) aber eine gleichbleibende für *hsp60* und damit die zu *C. trachomatis* genau entgegengesetzte Regulation (Mathews *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit waren bis zum Ende des beobachteten Zeitraums (72 h p.i.) **weder MOMP noch Hsp60** signifikant verändert. Die widersprüchlichen Ergebnisse könnten dabei nicht nur auf biologische Unterschiede, sondern auch durch das jeweilige Detektionssystem zurückgeführt werden und wegen der unterschiedlichen Ansätze sogar auf Proteomebene divergieren. Im Gegensatz zum Vergleich der metabolisch markierten Proteine mit einem aus gereinigten EK generierten Referenzgel (Molestina *et al.*, 2002; Raulston, 1997) wurden in dieser Arbeit die differentiell regulierten Spots direkt aus gereinigten RK identifiziert, auch wenn dies nicht für alle gelang. Grund dafür könnte die unzureichende Ionisierung der chlamydialen Peptide bei der MALDI durch

einen Überschuss an HEp-2 Peptiden sein; bei SSP 4502 beispielsweise konnte das komigrierende humane Protein identifiziert werden (Abb. 9B). Bedingt durch die Trocknung des Gels vor der Autoradiographie waren zudem Keratine anwesend, die die Identifizierung erschwerten. Dennoch gelang die Zuordnung von 5 der differentiell regulierten Proteine (6 Proteinspots). Bei SSP 2401 wich das Molekulargewicht um 14 kDa vom beobachteten ab. Ein falschpositives Ergebnis kann hier nicht ausgeschlossen werden, allerdings wurde die Anwesenheit von insgesamt 4 Peptiden über deren Sequenzierung nachgewiesen. Die Ursache für das im Experiment abweichende Laufverhalten ist unklar.

Zu den herunterregulierten Proteinen zählten Thioredoxin Reduktase B (TrxB), das Chromosomen Partitionierungsprotein B (ParB) sowie ein hypothetisches Protein unbekannter Funktion (Cpn0011) (Tab. 2). Eisen ist essentiell für fast alle Organismen, jedoch auch Quelle hochreaktiver Hydroxyl-Radikale ($\cdot\text{OH}$), die in der Haber-Weiss Reaktion entstehen. Zweiwertiges Eisen reagiert dabei mit H_2O_2 in einer Fenton-ähnlichen Reaktion: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$ (Pierre und Fontecave, 1999). Neben des restriktiven Umgangs mit freiem Fe^{2+} durch regulierte Aufnahme und Speicherung haben sich daher auch Systeme zur Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies entwickelt. **TrxB** ist zusätzlich zu seiner Rolle beim Nukleotidstoffwechsel Teil des Systems für die Redoxregulation und Resistenz gegen oxidativen Stress. Die Regulation erfolgt durch den Fur-homologen Peroxid Regulator (Per) (Horsburgh *et al.*, 2001). Da mit Verminderung der Eisenkonzentration auch die Belastung mit toxischen Radikalen für *C. pneumoniae* abnimmt, wird bei DAM-Behandlung auch weniger TrxB benötigt. Unklar ist dabei, ob diese Reaktion spezifisch für die DAM-induzierte Persistenz ist, da bei einer postulierten reduzierten metabolischen Aktivität der AK auch weniger Sauerstoffradikale entstehen sollten.

ParB bindet an das bakterielle Chromosom und bringt es mit Unterstützung von ParA zur neuen Replikationszone sich teilender Bakterien. Es heftet sich an die Membran und stellt so sicher, dass die Kopien in die beiden Tochterzellen aufgeteilt werden (Bignell und Thomas, 2001). Eine Reduzierung der ParB-Menge als Folge oder Ursache einer gestörten Zellteilung steht damit im Einklang mit den morphologischen Beschreibungen persistenter AK. Außerdem wurde im Fall IFN γ -behandelter *C.*

trachomatis von der verminderten Expression der für die Zellteilung zuständigen Gene *ftsK*, *ftsW* und *amiA* berichtet, während die DNA-Replikationsmaschinerie und die Biosynthese der Zellwand sowie die meisten Stoffwechsellzyme nicht betroffen waren (Byrne *et al.*, 2001; Belland *et al.*, 2003). Andere Gruppen beobachteten veränderte Regulationen von Proteinen für die Zellwandstabilität oder von der Muramidase NlpD, was mit der Inhibierung der Peptidoglykan-abhängigen Zellteilung im Einklang steht (Hogan *et al.*, 2003; Moulder, 1993; Mathews *et al.*, 2001). Interessant ist die Diskrepanz zur gleichbleibenden Transkription des *parB*-Gens von persistenten *C. trachomatis* in Monozyten (Gerard *et al.*, 2001). Neben dem unterschiedlichen Persistenzmodell sollte hier auch die Möglichkeit einer post-transkriptionellen Regulation in Betracht gezogen werden. Die Modifizierung der Translation durch Bindung an die mRNA wurde bei der Eisen-Regulation von Prokaryonten bereits beschrieben (Alen und Sonenshein, 1999).

Cpn0011 weist Homologien mit dem für RK-EK Transformationsvorgänge wichtigen cystein-reichem Protein CRPA Protein auf. Auch wenn die Funktion damit nicht geklärt ist, ist gerade die Korrelation mit einem physiologischen Zustand ein wichtiger Anhaltspunkt bei der genaueren Untersuchung bislang unbekannter, Chlamydien-spezifischer Genprodukte.

Von den hochregulierten Proteinen konnte die Adenosylmethionin-8-Amino-7-oxononanoat Aminotransferase (BioA) sowie das Cpn0623 identifiziert werden. **BioA** kam in zwei Spots vor, obgleich keine post-translationale Modifikation dieser Aminotransferase bekannt ist. Das im Genom von *C. trachomatis* fehlende Enzym ist in die Synthese von Biotin involviert, einem für die Glukoneogenese oder den Fettsäuremetabolismus essentiellen Kofaktor. Eine gesteigerte Biotinsynthese steht nicht im Widerspruch mit der auch in persistenten Bakterien fortgeführten Proteinsynthese und ist darüber hinaus ein weiterer Hinweis auf einen modifizierten Stoffwechsel (Belland *et al.*, 2003). Veränderte Nahrungs- und Produktpräferenzen sind bei anderen persistenten Pathogenen bekannt, für Chlamydien jedoch nicht näher aufgeklärt. Ein spezifisch persistenter Metabolismus fügt sich allerdings in das Bild eines eigenständigen, alternativen Entwicklungsstadiums mit unterschiedlichem Stoffwechselrepertoire, dessen Regulation jedoch noch weitgehend im Unklaren bleibt. So konnte bislang kein bekannter Transkriptionsfaktor mit der persistenten Proteinregulation in Verbindung gebracht werden (Molestina *et al.*, 2002).

Cpn0623 weist einen auffallend hohen Anteil geladener Aminosäuren auf und besitzt Homologien zu Proteinen, die an negativ geladene Makromoleküle binden. Dazu gehört ein Mikrotubuli-bindendes Protein, vor allem aber Transkriptionsfaktoren.

Ähnlich anderer Bakterien könnten „Persistenzgene“ zur generellen Anpassung an ungünstige Lebensumstände und damit an Abwehrmechanismen des Wirts dienen (Rhen *et al.*, 2003). Dies schließt unterschiedliche und auf den jeweiligen Stimulus abgestimmte Strategien jedoch nicht aus. In der Tat wurden bei einer Reihe untersuchter Antigene Unterschiede zwischen einer mit IFN γ oder Aminosäurelimitierung induzierten Persistenz beschrieben (Jones *et al.*, 2001). Als spezifisch für das Wachstum unter Eisenmangel könnte man beispielsweise die Induktion von Eisen-Transportersystemen erwarten. So finden sich Komponenten des unlängst in *Actinobacillus pleuropneumoniae* identifizierten TonB2-Systems (Beddek *et al.*, 2004) auch in den Genomen von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* in gleicher Operonstruktur (nicht veröffentlichte Beobachtung).

Die tatsächlichen Lebensbedingungen *in vivo* mögen andere als die *in vitro* sein; letztere wurden für eine optimale Ausbeute infektiöser EK optimiert. Auch ohne IFN γ könnten daher die Eisenlimitierung im Körper oder die verfügbaren Mengen an Glukose und Aminosäuren zur Persistenzinduktion ausreichen (Harper *et al.*, 2000).

3.3.3 Schwerpunkte von *C. pneumoniae* bei der Differenzierung von RK zu EK

Im Gegensatz zur metabolischen Markierung in Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2 wurde die Proteinkomposition der über einen Dichtegradienten aufgereinigten RK direkt mit Silber-gefärbten analytischen 2D-Gelen untersucht. Wirtszell-Kontaminationen wurden durch die Subtraktion des 2D-Musters nichtinfizierter Zellen nach paralleler Aufarbeitung ausgeschlossen. Die Zahl der so selektierten Proteinspezies war mit etwa 150 erheblich kleiner als die 1361 aus den radioaktiv-markierten Versuchen. Dafür war die Rate der identifizierten Proteine durch die Vorauswahl stark exprimierter und Chlamydien-spezifischer Proteinspezies höher.

Während mit Zugabe der EK bei Beginn der Infektion ein klar definierter Ausgangspunkt gewählt und die frühe Proteinsynthese und -modifikation untersucht werden kann, verläuft der Infektionszyklus mit fortschreitendem Zeitpunkt zunehmend asynchron: Ab 60 h beginnen die ersten RK sich in infektiöse EK zu transformieren,

gleichzeitig aber fahren andere RK bis zur Lyse der Wirtszelle fort sich zu teilen (Moulder, 1991; Wolf *et al.*, 2000). Die identifizierten Proteine können demzufolge von RK in diesen beiden Entwicklungsphasen stammen. Enzyme zu Aufrechterhaltung des Stoffwechsels sowie Chaperone (Glukose-6-phosphat Dehydrogenase, Glycerinaldehyde-3-phosphat Dehydrogenase, Glukosamin-6-phosphat Isomerase/Deaminase DevB, Thiol-spezifische Antioxidanz Peroxidase, EF-Ts und Hsp70) sprechen für aktiven Metabolismus und Proteinbiosynthese, was aber sowohl in proliferierenden wie auch differenzierenden Bakterien der Fall sein kann.

Andere Proteine deuten auf Differenzierungsvorgänge der RK zu EK hin: So ist das Yop Translokations-Protein S als ATPase Teil des Typ III-Sekretionsapparates, der in infektiösen EK gefunden wird und dem eine wichtige Funktion bei Beginn einer neuen Infektion zugesprochen wird. Teile dieses Apparates zur Sekretion von Virulenzfaktoren ins Zytoplasma eukaryontischer Zellen scheinen also bereits in späten RK bereitgestellt zu werden, was für *C. trachomatis* bereits postuliert wurde (Fields *et al.*, 2003). Die Rolle vorhergesagter Proteine wie dem CPn0011 muss noch geklärt werden. Die letzte Klasse von Proteinen wird mit Membranfunktionen in Verbindung gebracht und belegt die Reorganisation der Bakterienmembran bei Kondensation der RK in die osmotisch stabilen, infektiösen EK. Dazu gehören Proteine zur Membransynthese (ACP Synthase, Penizillin Toleranz Protein LytB und 10 kDa Chaperonin) und Vertreter der Gruppe Polymorpher Membran-Proteine (PmpD und PmpG/I). Von PmpG/I wurde ein, von PmpD zwei Fragmente gefunden. Da Spaltung wie auch Struktur der Pmp auf einen bis dahin nicht bekannten Autotransporter-Mechanismus in Chlamydien hindeuten und die Funktion der Pmp noch völlig unbekannt war, wurde im weiteren PmpD genauer untersucht (Kapitel 4).

3.3.4 Ausblick

Mit ParB, TrxB und BioA wurden wichtige Enzyme identifiziert, die mit den bekannten Modellen der Persistenz übereinstimmen. Die Identifizierung weiterer, im Verlauf der Eisenmangel-induzierten Persistenz differenziell regulierter Proteine kann unser Verständnis persistenter Infektionen im allgemeinen und des Eisenmangels im Besonderen erweitern. Dabei wäre eine routinemäßige Sequenzierung der tryptischen Peptide in einer Tandem-MS-Analyse hilfreich, die das Problem der Wirtszellkontaminationen minimieren kann. Parallelen wie Widersprüche zu Daten aus Transkriptionsstudien können Hinweise auf Regulationsmechanismen geben; Signale und Wege der Steuerung akuter wie persistenter Infektionen sind bislang noch weitgehend unbekannt.

Ziel weitergehenderer Arbeiten sollten auch die nur den Chlamydien eigenen Proteine wie Cpn0011 oder Cpn0623 sein, deren Funktionen sehr wahrscheinlich für die einzigartige Biologie der Chlamydien und besonders das Pathogenitätsspektrum persistenter *C. pneumoniae* mit verantwortlich sind. Für die Benennung allgemeiner „Persistenz-Gene“ und -mechanismen wäre ein Vergleich verschiedener Persistenzmodelle (Antibiotika und Zytokine) mit der Eisenlimitierung der nächste Schritt. Sie könnten Ansatzpunkte zur Detektion chronischer und anfangs inapparenter Infektionen liefern sowie zur gezielten Intervention persistenter Infektionen – direkt oder indirekt durch Forcierung einer akuten und damit antibiotisch wieder therapierbaren Entwicklung.

In analoger Weise können auch Anpassungen der Proteinkomposition während entscheidender Phasen im aktiven Infektionszyklus oder in verschiedenen Wirtszell- bzw. Gewebetypen verfolgt werden. Die Methode der radioaktiven Markierung ist dabei am sensitivsten und der klassischen Präfraktionierung mit Silberfärbung vorzuziehen. Trotz der geringeren Sensitivität lieferte die Analyse der späten RK mit letzterer, konventioneller Technik Anhaltspunkte für eine Reorganisation der Bakterienmembran am Ende des Infektionszyklus. Die Validierung weiterer „Targets“ aus Tab. 2 und 3 in Hinblick auf deren Lokalisierung und Funktion während der aktiven oder persistenten Infektion analog dem PmpD (siehe Kapitel 4) kann wichtige Hinweise zum Verständnis des Lebenszyklus von *C. pneumoniae*, dessen Regulation und damit auch Ansatzpunkte zur therapeutischen Intervention oder Prävention liefern.