

4 Beschreibung und funktionelle Charakterisierung des Autotransporters PmpD als Adhäsion von *C. pneumoniae*

4.1 Problemstellung

Im Rahmen der 2D-Analyse von RK 4 Tage p.i. (Abschnitt 3.2.3) wurden verschiedene Fragmente von PmpG/I (Pmp6) und PmpD (Pmp21) gefunden. Für PmpD wurde unlängst Prozessierung und Oberflächen-Lokalisierung eines N-terminalen Teils gezeigt. Dies würde mit bioinformatischen Vorhersagen übereinstimmen, nach denen die Pmp die erste bekannte Proteinfamilie von Autotransportern der Chlamydiaceen sein könnten. Außerdem führte die Inkubation von Endothelzellen mit rekombinantem PmpD (wie auch mit Pmp20) zu einer NF- κ B-vermittelten Induktion der inflammatorischen Zytokine Interleukin (IL)-6, IL-8 und des MCP-1 (Vandahl *et al.*, 2002; Niessner *et al.*, 2003).

Ungeachtet dieser Indizien wurden der genaue Exportmechanismus und die Funktion der Pmp bislang nicht gezeigt. Prozessierung, Lokalisierung und die funktionellen Eigenschaften von PmpD sollten daher näher untersucht werden. Dazu wurde ein Antiserum gegen den N-terminalen Teil von PmpD hergestellt, mit dessen Hilfe das Profil von Synthese, Prozessierung und Transport aufgeklärt sowie die These einer Funktion als Adhäsion von *C. pneumoniae* evaluiert werden sollte. Die adhäsiven Eigenschaften von PmpD sollten auch mithilfe des rekombinanten N-terminalen Teils sowie durch Genfusion an die Translokationsdomäne des Autotransporters AIDA-I in transgenen *E. coli*-Stämmen untersucht werden.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Synthese und posttranslationale Modifizierung

Bei der Proteomanalyse aufgereinigter RK von *C. pneumoniae* 4 Tage p.i. (Abschnitt 3.2.3) wurden Fragmente von PmpD (Pmp21) im 2D-Gel an zwei Stellen gefunden: Zwei Spots waren im Größenbereich <70 kDa und eine Serie aus 2 x 3 Spots bei 55

kDa (Abb. 12A). Die Massenanalyse der tryptischen Verdauung der beiden größeren Proteinspots ergab eine Übereinstimmung mit theoretischen tryptischen Spaltprodukten des N-terminalen Teils von PmpD. Die Spaltprodukte waren im Sequenzbereich von L122-K655 (unterstrichen in Abb. 12B). Die gleiche Analyse der drei kleineren Spots ergab eine Übereinstimmung mit Spaltprodukten von T670-R1115 in der PmpD-Sequenz (fett+kursiv in Abb. 12B). Von den beiden übereinanderliegenden Spotreihen der beiden Fragmente (Abb. 12A) lieferte nur die untere, stärker gefärbte Reihe positive Ergebnisse bei der Massenspektroskopie.

Neben dem Molekulargewicht stimmte auch die *in silico* Berechnung der isoelektrischen Punkte von 4,6-4,7 für ein Protein mit den abgedeckten AS am N-Terminus („N-pmpD“ genannt) und 4,4 für ein Protein, das den mittleren Teil von PmpD umfasst („M-pmpD“) mit den beobachteten Laufverhalten im zweidimensionalen Gel überein. Der daraus sich ergebende Aufbau von PmpD ist schematisch in Abb. 13 gezeigt.

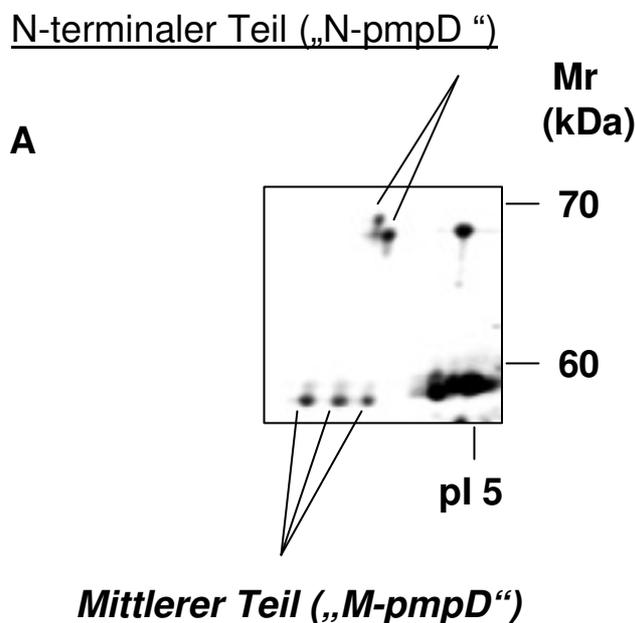


Abb. 12 Post-translationale Modifikation von PmpD

Ausschnitt aus einem silbergefärbten 2D-Gel von *C. pneumoniae* RK (4 Tage p.i.) (A).

Die mit MALDI gemessenen Massen des tryptischen Verdauens der einzelnen Spots stimmten mit Peptiden aus dem N-terminalen (unterstrichen, L122–K655) und mittleren (**fett+kursiv**, T670–R1115) Teil von PmpD überein (B, nächste Seite). Eingezeichnet sind auch die Signalsequenz (kleine Buchstaben) und der bekannte C-Terminus (grau) (Vandahl *et al.*, 2002).

B

1	mvakktvrsy	rssfshsviv	ailsagiafe	AHSLHSSELD	LGVFNKQFEE
51	HSAHVEEAQT	SVLKGSDPVN	PSQKESEKVL	YTQVPLTQGS	SGESLDLADA
101	NFLEHFQHLF	EETTVFGIDQ	<u>KLVWSDLDTR</u>	<u>NFSQPTQEPD</u>	<u>TSNAVSEKIS</u>
151	SDTKENRKDL	ETEDPSKKS	<u>LKEVSSDLPK</u>	<u>SPETAVAAIS</u>	<u>EDLEISENIS</u>
201	<u>ARDPLQGLAF</u>	<u>FYKNTSSQSI</u>	<u>SEKDSSFQGI</u>	<u>IFSGSGANS</u>	<u>LGFENLKAPK</u>
251	<u>SGAAVYSRDR</u>	<u>IVFENLVKGL</u>	<u>SFISCESLED</u>	<u>GSAAGVNIVV</u>	<u>THCGDVTLTD</u>
301	<u>CATGLDLEAL</u>	<u>RLVKDFSRGG</u>	<u>AVFTARNHEV</u>	<u>QNNLAGGILS</u>	<u>VVGNGKAIIV</u>
351	EKNSAEKSN	GAFACGSFVY	SNNENTALWK	ENQALSGGAI	SSASDIDIQG
401	NCSAIEFSGN	QSLIALGEHI	GLTDFVGGGA	LAAQGTTLTR	NNAVVCVKV
451	TSKTHGGAIL	AGTVDLNETI	SEVAFKQNTA	ALTGGALSAN	DKVIIANNFG
501	<u>EILFEQNEVR</u>	<u>NHGGAICYGC</u>	<u>RSNPKLEQKD</u>	<u>SGENINIIGN</u>	<u>SGAITFLKNK</u>
551	<u>ASVLEVMTQA</u>	<u>EDYAGGGALW</u>	<u>GHNVLDSNS</u>	<u>GNIQFIGNIG</u>	<u>GSTFWIGEYV</u>
601	<u>GGGAILSTDR</u>	<u>VTISNNSGDV</u>	<u>VFKGNKGOCL</u>	<u>AQKYVAPQET</u>	<u>APVESDASST</u>
651	<u>NKDEKSLNAC</u>	<u>SHGDHYPPKT</u>	VEEEVPPSL	EEHPVVSST	IRGGGAILAQ
701	HIFITDNTGN	LRFSGNLGGG	EESSTVGDLA	IVGGGALLST	NEVNVCNQ
751	VVFSNDVTSN	GCDSSGAILA	KKVDISANHS	VEFVSNGSGK	FGGAVCALNE
801	SVNITDNGSA	VSFSKNRTRL	GGAGVAAPQG	SVTICGNQGN	IAFK ENFVFG
851	SENQRS GGGA	IIANSSVNIQ	DNAGDILFVS	NSTGSYGGAI	FVGSVASEG
901	SNPR TLTITG	NSGDILFAKN	STQTAASLSE	KDSF GGGAIY	TQNLKIVKNA
951	GNVSFYGNRA	PSGAGVQIAD	GGTVCLEAFG	GDILFEGNIN	FDGSFNAIHL
1001	CGNSDKIVEL	SAVQDK NIIF	QDAITYEENT	IRGLPDKDVS	PLSAPSLIFN
1051	SKPQODSAQH	HEGTIRFSRG	VSKIPQIAAI	QEGTLALSQN	AELWLAGLK Q
1101	ETGSSIVLSA	GSILR IFDSQ	VDSSAPLPTE	NKEETLVSAG	VQINM S SPTP
1151	NKDKAVDTPV	LADIISITVD	LSSFVPEQDG	TLPLPPEIII	PKGTKLHSNA
1201	IDLKIIDPTN	VGYENHALLS	SHKDIPLISL	KTAEGMTGTP	TADASLSNIK
1251	IDVSLPSITP	ATYGHTGVWS	ESKMEDGRLV	VGWQPTGYKL	NPEKQGALVL
1301	NNLWSHYTDL	RALKQEIFAH	HTIAQRMELD	FSTNVWGSGL	GVVEDCQONIG
1351	EFDGFKHHLT	GYALGLDTQL	VEDFLIGGCF	SQFFGKTESQ	SYKAKNDVKS
1401	YMGAAAYAGIL	AGPWLIKGAF	VYGNINNDLT	TDYGTLGIST	GSWIGKGFIA
1451	GTSIDYRYIV	NPRRFISAIV	STVVPFVEAE	YVRIDLPEIS	EQGKEVRTFQ
1501	KTRFENVAIP	FGFALEHAYS	RGSRAEVNSV	QLAYVFDVYR	KGPVSLITLK
1551	DAAYSWKSYG	VDIPCKAWKA	RLSNNTWNS	YLSTYLAFNY	EWREDLIAYD
1601	FNGGIRIIF				

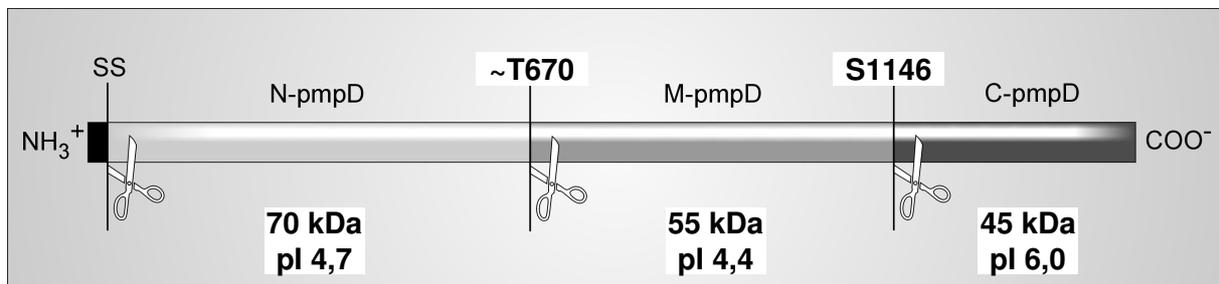


Abb. 13 Modell des Aufbaus von PmpD

Schematische Zusammenfassung der Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte der gefundenen Fragmente sowie die publizierten bzw. vermuteten Schnittstellen.

Eine Spaltung vom C-Terminus („C-pmpD“) nach Überquerung der OM wäre typisch für Autotransporter und somit in Übereinstimmung mit den bioinformatischen Analysen, die PmpD der Familie der Autotransporter zuordnen. Zur Untersuchung der Synthese- und Prozessierungskinetik sowie der Lokalisierung von PmpD wurde ein polyklonales Antiserum gegen den N-terminalen Teil hergestellt. N-pmpD wurde dafür von S17-T670 mit einem (His)₆-Anker in *E. coli* überexprimiert und das denaturierte, rekombinante Protein zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Infizierte HEp-2 Zellen wurden 1, 2, 3 oder 4 Tage nach der Infektion in reduzierendem SDS-Probenpuffer aufgekocht, die Proben per SDS-PAGE getrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Im Immunblot (Abb. 14) zeigen sich drei für infizierte Proben typische Banden, mit denen das Antiserum reagierte: Eine Bande in der Größe von ca. 170 kDa, was der vollen Länge von PmpD entspricht, eine bei 120-130 kDa in der Größe des N-terminalen und des mittleren Teils ohne den C-Terminus, und eine bei 70 kDa und damit in etwa so groß wie der N-Terminus allein (N-pmpD). Nach einem Tag p.i. hat die Teilung der Chlamydien noch nicht eingesetzt. Die fehlenden Proteinbanden in der ersten Spur deuten auf eine zu geringe Zahl von Bakterien in der Probe hin. Der Blot wurde gestrippt und zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge mit monoklonalen Antikörpern gegen chlamydiales Hsp70 inkubiert; auch hier konnte in der ersten Spur noch kein Protein von *C. pneumoniae* nachgewiesen werden.

Alle Proteinbanden wurden ab zwei Tage p.i. in infizierten Zellen detektiert. Die 130 kDa große Bande war jedoch zu späteren Zeitpunkten schwächer. Wie bei den meisten polyklonalen Antikörpern zeigten Banden in nicht-infizierten Zellen („-“) Kreuzreaktionen mit Wirtszellproteinen, u.a. auch direkt unter der 70 kDa-Bande. Diese konnten jedoch klar vom Bandenmuster infizierter Zellen unterschieden werden. Die gleichen Ergebnisse wurden erzielt nach Isolierung der IgG-Fraktion aus dem Kaninchenserum oder nach Affinitätsreinigung mit dem rekombinanten N-pmpD mittels CNBr-aktivierter Sepharose.

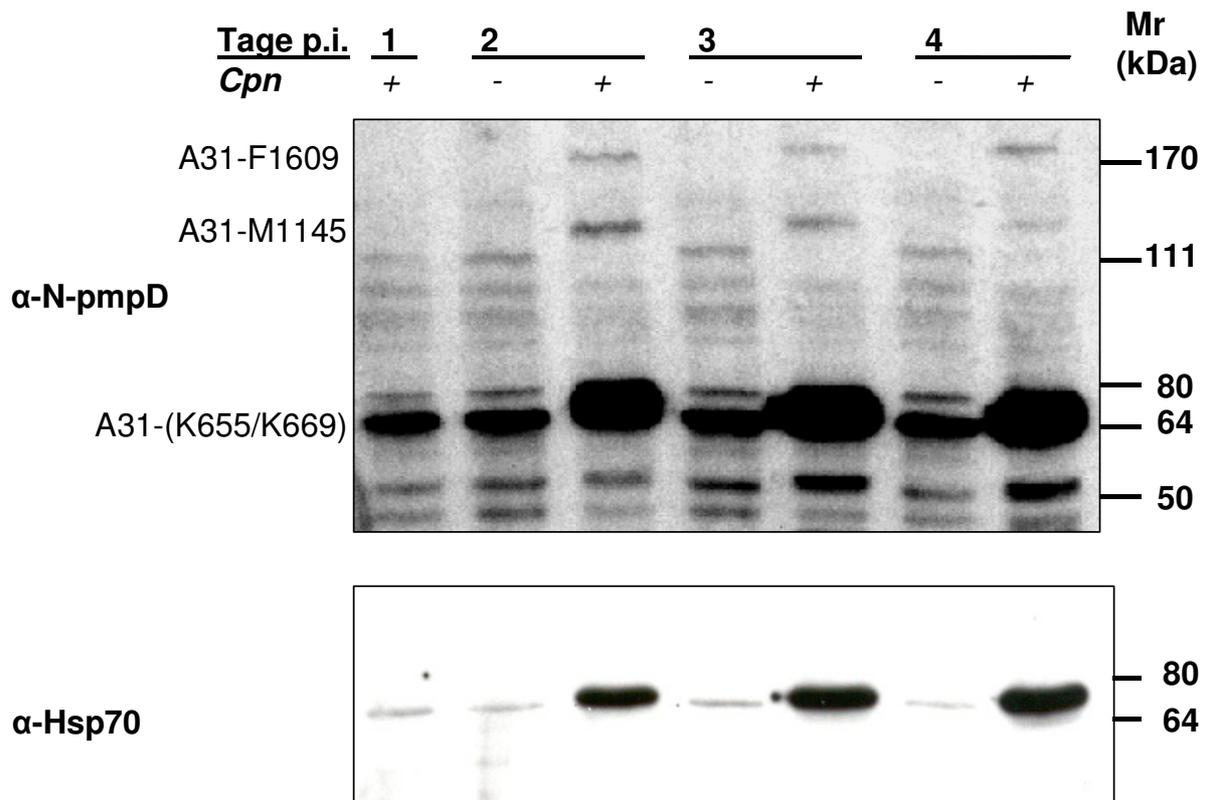


Abb. 14 Prozessierung von PmpD im Verlauf einer Infektion *in vitro*

HEp-2 Zellen wurden mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI = 1) und 1, 2, 3 oder 4 Tage inkubiert. Gesamtzelllysate wurden mit einem 6% SDS-Gel getrennt. Der Immunblot mit dem Antiserum gegen N-pmpD zeigt zu allen Zeitpunkten drei Banden in der Größe von ca. 170, 130 und 70 kDa (Hauptbande) in infizierten Zellen (*Cpn* +).

Unten ist der gleiche Blot zu sehen, gestriipt und zur Normalisierung mit einem Antiserum gegen chlamydiales Hsp70 inkubiert.

Damit wurde die in aufgereinigten, späten RK im 2D-Gel gefundene Prozessierung auch während der akuten Infektion *in vitro* bestätigt. Die Prozessierung von PmpD wurde außerdem durch Immunpräzipitation des nativen Moleküls untersucht. Infizierte Zellen wurden dazu in RPMI Medium ohne Methionin/Cystein aber in Anwesenheit von $100 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ [^{35}S]-Methionin/Cystein markiert, in nicht-denaturierendem, reduzierendem RIPA-Puffer lysiert und mit α -N-pmpD immunpräzipitiert (Abb. 15). In allen Fällen war bei infizierten Zellen eine Bande bei 70 kDa in der Größe von N-pmpD zu erkennen. Das gegen das rekombinante Protein hergestellte Antiserum erkannte also auch das native, chlamydiale Protein, welches während der Infektion geschnitten vorliegt. Da jedoch die Bindung an das ganze PmpD und das Fragment ohne den C-Terminus zu schwach bzw. die Proteine in zu geringer

Konzentration vorhanden waren, konnte die Prozessierungskinetik auch durch eine zusätzliche Periode ohne Markierung („chase“) nicht näher untersucht werden.

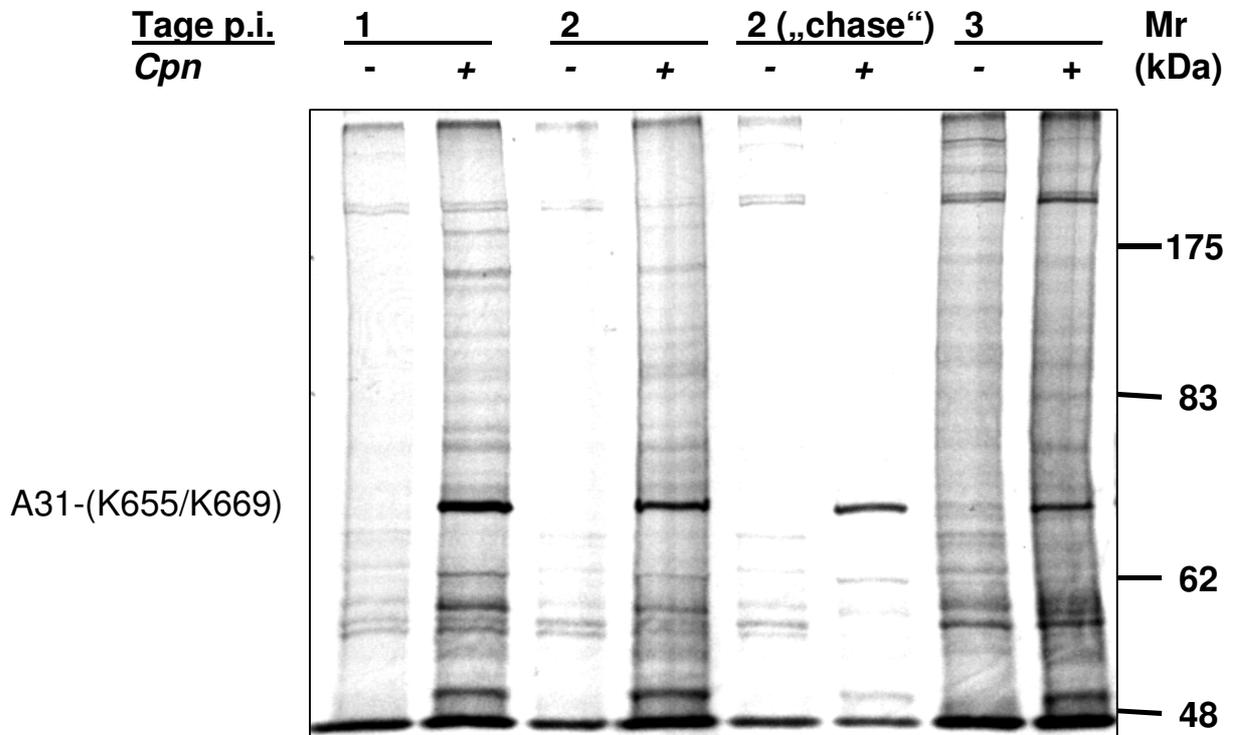


Abb. 15 Immunpräzipitation von N-pmpD

C. pneumoniae infizierte HEp-2 Zellen wurden 1, 2 oder 3 Tage mit $100 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ [^{35}S]-Met/Cys im Medium metabolisch markiert. Nach waschen in PBS wurden die Zellen direkt oder nach 2 h Inkubation in normalem Medium („chase“) in nicht-denaturierendem Puffer lysiert und die Proteine mit Antiserum gegen N-pmpD sowie Protein A-gekoppelter Sepharose präzipitiert. Die einzige spezifische Bande war in der Größe von N-pmpD (70 kDa) in infizierten Zellen (*Cpn* +).

Persistente Chlamydien weisen eine abnormale Membranmorphologie auf, die Expression vieler für die Membranbiosynthese verantwortlichen Gene ist dabei jedoch unverändert (Belland *et al.*, 2003). Es stellte sich daher die Frage, ob bei PmpD Synthese und Prozessierung im Persistenzstadium verändert sind. Das Bandenmuster infizierter Zellen im Western Blot nach Zugabe des Eisen-Chelators DAM ($50 \mu\text{M}$) zeigte jedoch bis zu 3 Tagen p.i. sowohl qualitativ als auch quantitativ keine Unterschiede zu den Ergebnissen bei der akuten Infektion (Daten nicht gezeigt).

4.2.2 Lokalisierung an der Bakterienoberfläche

4.2.2.1 Lokalisierung im intrazellulären Stadium

Basierend auf Ähnlichkeiten bezüglich Sequenz und struktureller Komposition vermuteten schon zwei Arbeitsgruppen einen Export von PmpD nach dem Typ V-Sekretionsmechanismus (Yen *et al.*, 2002; Henderson *et al.*, 1998).

Nach Überquerung der beiden bakteriellen Membranen sollte der Autotransporter PmpD an die Oberfläche gelangen. Zur Überprüfung dieser Vorhersage wurde ein Protokoll entwickelt, um selektiv Moleküle an der Bakterienoberfläche in der infizierten Wirtszelle mit Antikörpern zu detektieren. Infizierte Zellen wurden dazu zwei Tage p.i. fixiert, mit Glaskügelchen (425-600 µm Durchmesser) überschichtet und vorsichtig geschwenkt. Eukaryontische Membranen einschließlich der Inklusionsmembran wurden dabei permeabilisiert, während die Bakterien intakt blieben. Nach Inkubation mit primären und mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörpern konnte unter dem Mikroskop gezeigt werden, dass PmpD einer Immunfärbung zugänglich war, während die Inkubation mit Antikörpern gegen einen intrazellulären Faktor als Negativ-Kontrolle keine Färbung ergab (Abb. 16). Als Kontrolle wurde hier ein Antikörper verwendet, der gegen den Fur-Transkriptionsfaktor in *E. coli* hergestellt und von Michael Vasil (Universität von Colorado, Denver) zur Verfügung gestellt wurde. Bei Behandlung der Zellen mit Triton X-100 als Positiv-Kontrolle wurden auch die Bakterien permeabilisiert und somit intrazelluläre Proteine zugänglich.

Parallel zu diesen Experimenten wurden auch *C. trachomatis*-infizierte HEp-2 Zellen angefärbt bzw. lysiert und gelelektrophoretisch getrennt. Es zeigte sich jedoch nur eine geringe Reaktivität des Antiserums gegen das homologe Protein, so dass im Immunblott keine spezifischen Banden und mit der Immunfluoreszenz nur eine schwache Färbung zu erkennen war (Daten nicht gezeigt). Prozessierung und Lokalisierung von PmpD in *C. trachomatis* wurden daher nicht weiter untersucht.

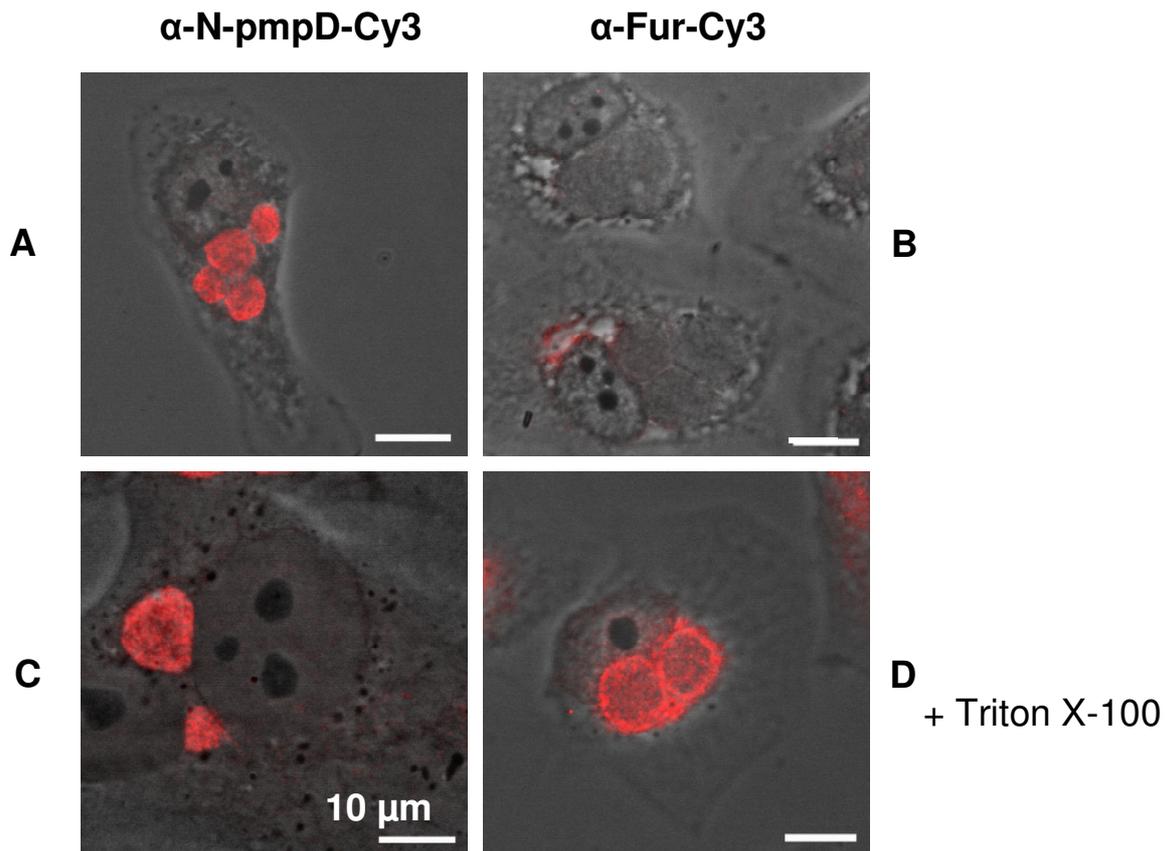


Abb. 16 Oberflächenexposition von PmpD – differenzielle Permeabilisierung

C. pneumoniae-infizierte HEp-2 Zellen wurden 2 Tage p.i. entweder mit STF[®] fixiert und entweder unter Beibehaltung der Integrität der Bakterienmembran mit Glasperlen (425-600 μ m) permeabilisiert (A, B) oder mit 2% PFA fixiert und mit 0,5% Triton X-100 vollständig permeabilisiert (C, D). Die Proben wurden mit Antiserum gegen N-pmpD (in rot, A, C) oder das Fur-Protein aus *E. coli*, das einen intrazellulären Faktor in *C. pneumoniae* erkennt (rot, B, D), in 0,2% BSA gefärbt. Ohne Permeabilisierung mit Triton X-100 konnte nur N-pmpD detektiert werden, was auf eine Lokalisierung an der Oberfläche hindeutet.

Von vielen Autotransportern ist eine Spaltung des N-Terminus von der C-terminalen Translokationseinheit und die Sekretion ins Medium bekannt (Goldberg *et al.*, 1993). Da auch PmpD prozessiert wird, wurde die Lokalisierung von N-pmpD im Verlauf der Infektion mittels Immunfluoreszenz bestimmt. Zu allen Zeiten (1-3 Tage p.i.) war ausschließlich eine Färbung innerhalb der Inklusion und in Assoziation mit einzelnen Bakterien zu beobachten (Abb. 17A, C, E). Auch das Färbungsmuster sprach für ein bakterielles Oberflächenprotein: die α -N-pmpD Färbung (rot) umschloss die einzelnen, mit α -Hsp60 gefärbten RK (grün) und ähnelte Honigwaben. Anhaltspunkte für eine Sekretion ins Cytoplasma der Wirtszelle oder die Integration in die Inklusionsmembran wurden nicht gefunden.

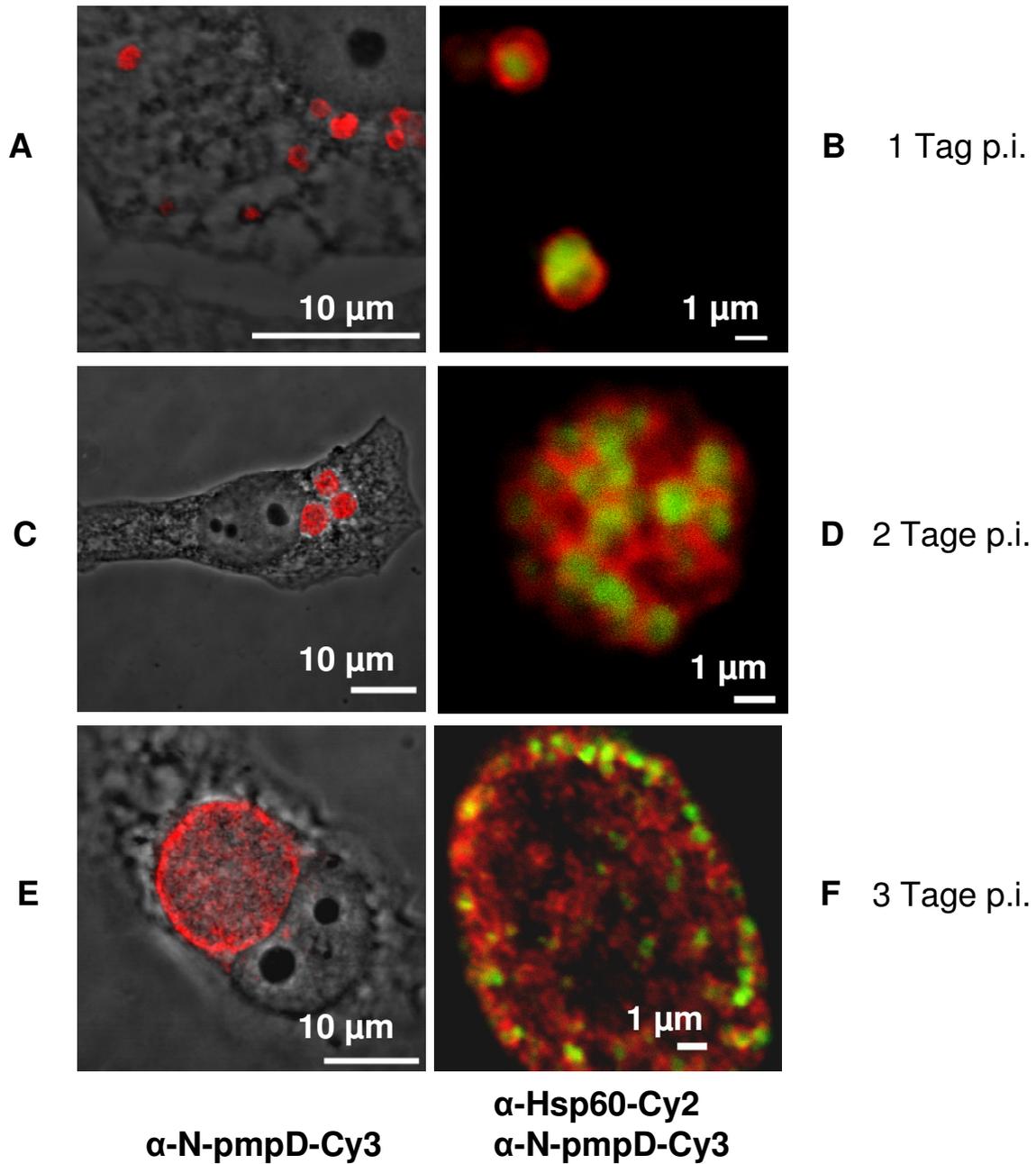


Abb. 17 Assoziierung von PmpD mit den Bakterien

C. pneumoniae-infizierte HEp-2 Zellen wurden 1, 2 oder 3 Tage p.i. (A/B, C/D, E/F) mit STF[®] fixiert, mit 0,5% Triton X-100 permeabilisiert und mit Antiserum gegen N-pmpD (in rot) bzw. gegen Hsp60 (in grün) gefärbt. N-pmpD konnte nicht außerhalb der Inklusion gefunden werden (Fluoreszenz+Phasenkontrast: A, C, D). Die α -N-pmpD-Färbung schien wie ein Würfel die Hsp60-gefärbten RK zu umgeben (B) und zeigte in größeren Inklusionen eine Honigwaben-ähnliches Muster (D, F).

Zur genaueren Aufklärung der subzellulären Lokalisierung innerhalb der Inklusion wurden infizierte Zellen immuno-Gold gefärbt und elektronenmikroskopisch analysiert. Drei Tage nach Infektion teilen sich einige RK noch, andere entwickeln sich schon zu EK. Alle chlamydialen Formen konnten mit α -N-pmpD gefärbt werden, RK, EK und Zwischenformen. Die Goldfärbung befand sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der konfokalen Mikroskopie bevorzugt an der Oberfläche der Bakterien. Außerdem war sie assoziiert mit vesikulären Strukturen innerhalb der Inklusion, die von den Bakterien abgeschnürt zu werden schienen (Abb. 18).

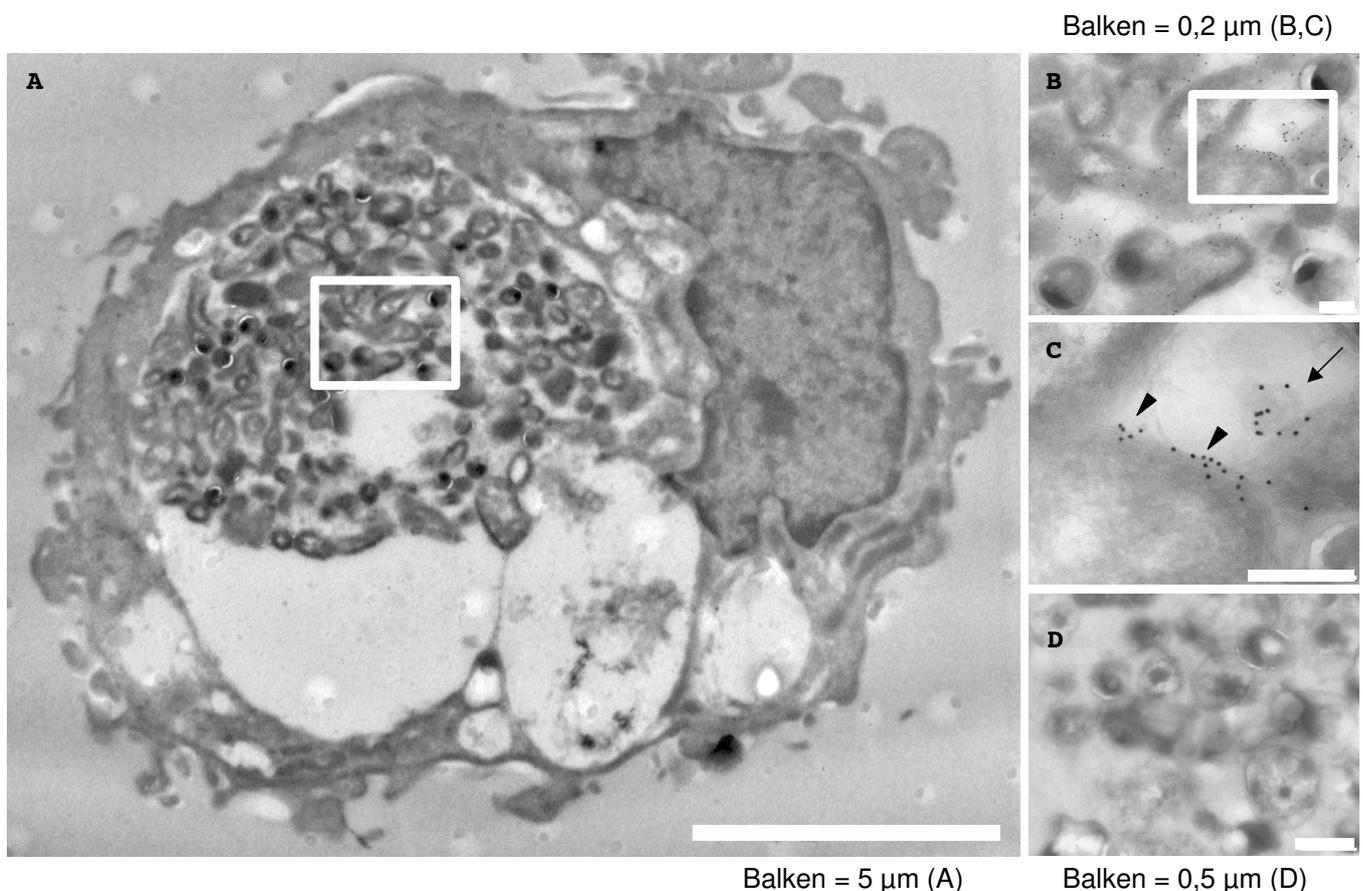


Abb. 18 Lokalisierung von PmpD an der Bakterienoberfläche

C. pneumoniae-infizierte HEP-2 Zellen wurden 3 Tage p.i. in 4% PFA/0,1% Glutaraldehyd fixiert, mit 1,6 M Saccharose/25% Polyvinylpyrrolidon infiltriert, auf Aluminiumstumpfe befestigt und eingefroren. Ultradünne Kryoschnitte wurden mit Antiserum gegen N-pmpD und anti-Kaninchen Sekundärantikörper gekoppelt mit Goldkolloiden (12 nm) inkubiert. Die Goldpartikel zeigen die Anwesenheit von PmpD bei RK, EK sowie intermediären Formen (B, C = Vergrößerungen von A), waren aber mit dem prä-Immunsereum nicht oder nur unspezifisch zu sehen (D). Dominierend war die Färbung auf der Oberfläche der Bakterien (C, Pfeilköpfe) sowie die Assoziation mit Vesikel-ähnlichen Strukturen im Lumen der Inklusion (C, Pfeil).

Darüber hinaus wurde die Lokalisierung von N-pmpD während der persistenten Infektion in HEp-2 Zellen untersucht und dazu die infizierten Zellen 3 Tage lang mit 50 μ M DAM inkubiert. Die Größe der Inklusionen war verglichen mit der akuten Infektion stark vermindert, in einigen Fällen war nur ein RK bzw. AK in einer Inklusion zu finden (Abb. 19). In größeren Inklusionen zeigte sich das wabenförmige Muster der α -N-pmpD Färbung (rot), allerdings waren einige Plätze „leer“ bzw. nicht mit Antikörpern gegen Hsp60 (grün) gefärbt. Die Struktur der durch PmpD markierten Hülle war unregelmäßig und verglichen mit Inklusionen mit nur einem RK bei frühen akuten Infektionen (Abb. 17B) von atypischer Morphologie.

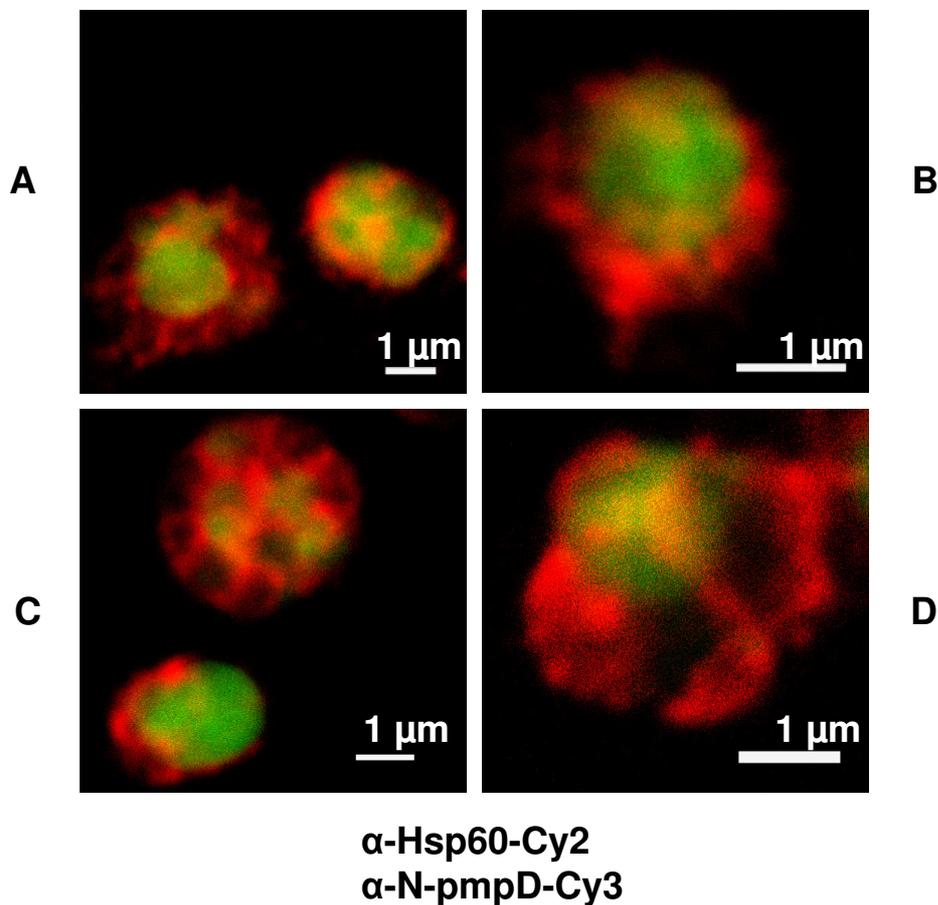


Abb. 19 Lokalisierung von PmpD mit der Membran persistenter Bakterien

C. pneumoniae-infizierte HEp-2 Zellen wurden 3 Tage p.i. in Anwesenheit von 50 μ M DAM inkubiert, mit STF[®] fixiert, mit 0,5% Triton X-100 permeabilisiert und mit Antiserum gegen N-pmpD (rot) bzw. gegen Hsp60 (grün) gefärbt. N-pmpD umgab die Hsp60-gefärbten AK in einer unregelmäßigen, sich weit ausdehnenden Struktur (A-C), die manchmal wie partiell leere Inklusionen wirkten (D). Größere Inklusionen wiesen das Honigwaben-ähnliche Muster auf (C).

4.2.2.2 Interaktion von N-pmpD mit extrazellulären EK

Um die Oberflächenlokalisierung von N-pmpD auch auf extrazellulären, infektiösen EK zu überprüfen, wurde der Ansatz eines limitierten Trypsin-Verdaus gewählt. Aufgereinigte EK wurden mit zunehmenden Konzentrationen an Trypsin versetzt, abzentrifugiert und mittels SDS-PAGE und Immunblot analysiert. Die Menge des immunreaktiven N-pmpD nahm konzentrationsabhängig ab, während die Gesamtmenge an Hsp70 konstant blieb (Abb. 20). Die Trypsin-Zugänglichkeit spricht für eine Oberflächenlokalisierung im Gegensatz zum intrazellulären Hsp70.

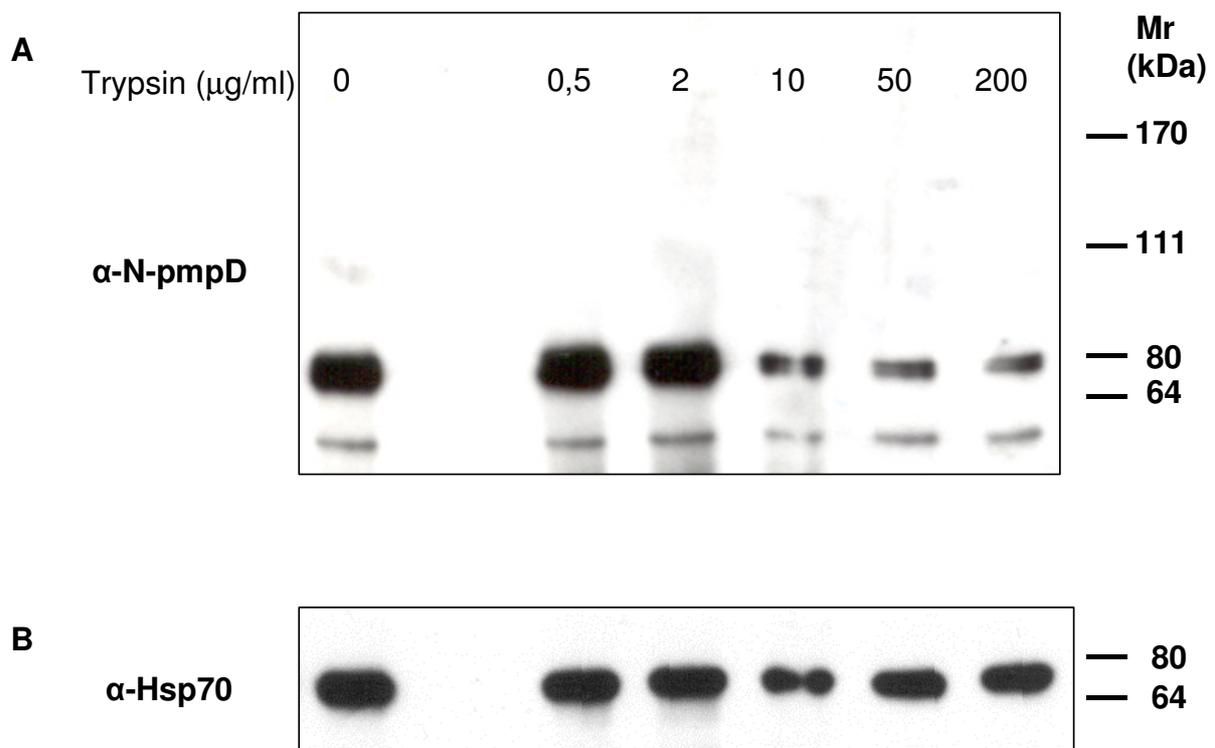


Abb. 20 PmpD ist oberflächenexponiert – limitierender Trypsinverdau

20 µl EK-Suspension (1×10^7 IFU) von *C. pneumoniae* wurden mit 0; 0,5; 2; 10; 50 und 200 µg ml⁻¹ Trypsin 30min bei 37°C inkubiert. Die EK wurden pelletiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach Gelelektrophorese wurde der Blot mit Antiserum gegen N-pmpD (A) und im Anschluss daran gegen chlamydiales Hsp70 (B) inkubiert. Während die immundetektierbare Menge an Hsp70 konstant blieb, wurde N-pmpD ab einer Konzentration von 10 µg ml⁻¹ Trypsin verdaut.

Obleich PmpD nach dem Export von der C-terminalen Translokationseinheit abgespalten wird und bei EK nur ein 70 kDa großes Fragment nachweisbar ist, blieb der N-Terminus mit der Bakterienoberfläche verbunden. Da in N-pmpD keine Transmembrandomänen vorhanden sind, könnte dafür eine Interaktion mit OM-Strukturen

verantwortlich sein. Bei anderen Autotransportern, wie etwa dem Ag49 oder dem AIDA von *E. coli*, ist nach der Prozessierung vom C-Terminus eine nicht-kovalente Bindung an die Bakterienoberfläche bekannt. Sie kann durch moderate Hitzeeinwirkung (10-20min bei 60°C) unterbrochen und der N-Terminus so von den Bakterien losgelöst werden (Caffrey und Owen, 1989; Benz und Schmidt, 1992).

N-pmpD jedoch konnte weder so, noch durch andere Behandlungen, welche nicht-kovalente Wechselwirkungen schwächen, von den EK abgelöst werden: Wechsel des pH-Wertes, Entfernung divalenter Kationen mittels EDTA und hohe Salzkonzentration verminderten nicht die Menge des EK-assoziierten N-pmpD. Nur ein alkalischer pH von >12, bei dem jedoch auch die Membranstruktur zerstört wird, führte zu teilweiser Ablösung von N-pmpD (Abb. 21).

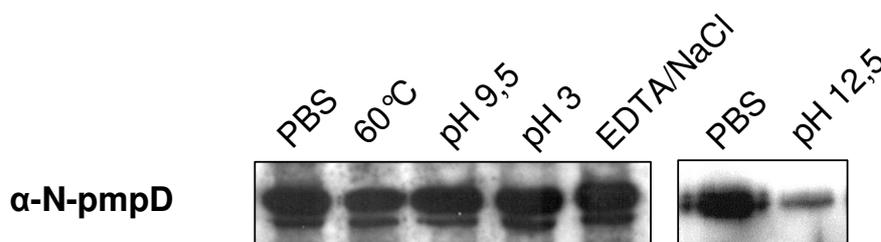


Abb. 21 N-pmpD bindet an extrazelluläre EK

20 μ l EK-Suspension (1×10^7 IFU) wurden in einem Volumen von 1 ml 60min bei 37°C (bzw. 20min bei 60°C) in verschiedenen Puffern inkubiert: 200 mM KH_2CO_3 (pH 9,5); 100 mM Glycin (pH 3,0); 60 mM EDTA + 3 M NaCl; PBS und 100 mM NaOH (pH 12,5). Die EK wurden pelletiert und wie in Abb. 20 geblottet und immunodetektiert. Nur extrem basische Bedingungen konnten N-pmpD von den Bakterien entfernen.

Chlamydien besitzen eine einzigartige Zellwandzusammensetzung, bei der Peptidoglykan weitgehend fehlt, dafür aber ein über Disulfidbrücken verknüpftes Netzwerk an Cystein-reichen OM- und periplasmatischen Proteinen strukturelle Stabilität verleiht. Um die mögliche Interaktion von N-pmpD mit diesen Strukturen zu überprüfen, wurde die OM als unlösliche Fraktion bei Inkubation von EK in 2% N-Lauryl-Sakosin (Sarkosyl), sowie die chlamydialen OM-Komplexe (COMC) aufgrund deren Eigenschaft, ohne reduzierendes Milieu auch in 2% SDS unlöslich zu sein, isoliert (Abb. 22A). Ein geringer Anteil an Gesamt-N-pmpD auf den EK (<5%) verblieb sowohl im OM- als auch im COMC-Pellet, konnte aber durch Zusatz von DTT oder β -

Mercaptoethanol (2-ME) in Lösung gebracht werden. Im weiteren wurden EK mit verschiedenen Klassen von Detergentien inkubiert (jeweils 2% Endkonzentration) und die unlösliche Menge an N-pmpD immundetektiert (Abb. 22B).

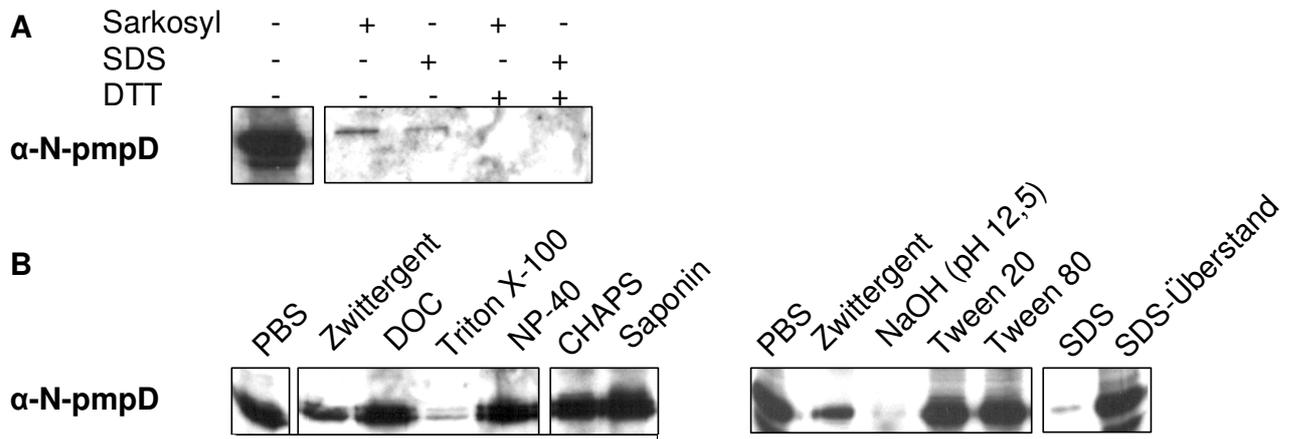


Abb. 22 N-pmpD interagiert mit Bestandteilen der OM

Aus 20 µl EK-Suspension (1×10^7 IFU) wurden OM-Fractionen (unlöslich in 2% Sarkosyl) oder COMC-Fractionen (unlöslich in 2% SDS) isoliert. Unter reduzierenden Bedingungen (10 mM DTT + 10% 2-ME) konnte kein N-pmpD detektiert werden (A). EK (1×10^7 IFU) wurden außerdem mit verschiedenen Detergenzien (2% Zwittergent[®] 3-14, DOC, Triton X-100, NP-40 (Igepal CA-630), CHAPS, Tween[®] 20 und 80 oder Tensiden (2% Saponin) inkubiert (NaOH und SDS zur Kontrolle). Im Pellet verbliebenes N-pmpD wurde immundetektiert, zur Kontrolle auch der mit 6% TFA gefällte Überstand (gezeigt bei SDS, B).

Das aliphatische Detergens Zwittergent[®] 3-14 hatte einen schwächeren Effekt auf die Ablösung des N-pmpD von der OM als das ionische SDS, war aber auch schwächer als Triton X-100. Sowohl Triton als auch NP-40 (= Igepal CA-630) oder Tween[®] – die keinen Einfluss auf die Bindung von N-pmpD hatten – gehören zur Klasse der polyoxiden nicht-ionischen Detergenzien. Die unterschiedlichen Lösungseffekte konnte daher keiner Systematik zugeordnet werden. Allerdings ist das ebenfalls nicht-ionische Steroid CHAPS als milderes Detergenz bekannt, das wie die Gallensäure Na-Desoxicholat (DOC) keinen Einfluss auf die Interaktion hatte. Auch das Tensid Saponin schwächte die Bindung nicht – im Gegensatz zu seinem Widerpart N-Lauryl-Sarkosin (siehe oben).

4.2.3 Biologische Aktivität und Funktion von PmpD

4.2.3.1 Neutralisierung der Infektivität von EK in vitro

Ungeachtet der großen stammesgeschichtlichen Distanz zwischen den Chlamydien und den Proteobakterien weist PmpD Homologien zu verschiedenen bakteriellen Adhäsinen auf. Die Homologien waren bezogen auf die ganzen Proteine nicht hoch und auf einzelne Abschnitte beschränkt: Besonders Bereiche um die Aminosäure-motive GGAI/L/V waren oft davon betroffen, wie exemplarisch in Abb. 23 mit einem multiplen Alignment einer Sequenz aus dem mittleren Teil von PmpD mit anderen Adhäsinen gezeigt.

	858		939
PmpD	GGAI IANSSVNIQDNAGDILFVSNSTGSY GGAI FVGSVLVASEGNSPRTLITITGNSGDILFAKNSTQTAASLSEKDSFG GGAI		
rOmpA_1	GAVIKATTTKL..TNAASVLTLTNVNAVLTGAIDNTTGVDNVGVLNLNGALSQVTGNI..GNTNALATISVGAGKATLGGAV		
HMWA	GGDFLAKHAND..NNTARIGLLGGRYDVGNFLLDGNTALASQVGVNISNAANISVAGE..TVISGVSSNSRGQGWRGIDISN		
FN0291	GNITIKNKLTS..QNLNNKNTANVNA...GFLDVHNKISSVGNIK...AITMKTNNL..DNSGNILTNSLTTAENINKGSI		
Consensus	Gg.iian.....Na..il...n.....gaidv...vas.g.....ait...g.i.....s.....Sl.....ggai		

Abb. 23 Sequenzvergleich eines Abschnitts von PmpD mit bakteriellen Adhäsinen.

Mit der *BLAST*-Suchfunktion wurden Proteine mit homologen Bereichen zu PmpD gesucht und die Consensus- Aminosäuresequenz mit dem Programm *MultAlin* evaluiert. Gezeigt sind Sequenzen von PmpD (*C. pneumoniae*), OmpA (*Rickettsia conorii*), HMWA (*Yersinia pestis*) und FN0291 (*Fusobacterium nucleatum*). Die angegebene Sequenz umfasst 3 GGAI-Motive in PmpD (**fett**).

Wichtigstes Indiz für eine Funktion als Adhäsine waren diese Motive aus vier Aminosäuren, deren häufiges Vorkommen in den heterogenen Pmp-Proteinen ursprünglich zum Anlass genommen wurde, die Pmp in einer Familie zusammenzufassen. Abb. 24 zeigt einen Überblick über ihre Lage in der PmpD-Sequenz. Die Sequenz GGAI/L/V kommt in PmpD 16 mal, und ausschließlich im N-terminalen und mittleren Bereich, meist in Abwechslung mit FxxN (18 mal) vor (Abb.24).

```

1  mvakktvrsyrssfshsvivailsagiafeAHSLHSSELDLGVFNKQFEE
51  HSAHVEEAQTSVLKGS DPVNPSQKESEKVLTYQVPLTQGSSELDLADA
101 N FLEHFQHLFEETT VFGIDQKLVWSDLDTRNFSQPTQEPDTSNAVSEKIS
151 SDTKENRKDLETEDPSKKSGLKEVSSDLPKSPETA VAAISEDLEISENIS
201 ARDPLQGLAF FYKN TSSQSISEKDS SFQGIIFSGSGANSGLGFENLKAPK
251 SGAAVYSDRDIVFENLVKGLSFI SCESLEDGSAAGVNIVVTHCGDVT LTD
301 CATGLDLEALRLVKDFSR GGAV FTARNHEVQNNLAGGILSVVGNKGAIIVV
351 EKNSAEKSN GGAF ACGSFVYSNNENTALWKENQALS GGAI ISSASDIDIQG
401 NCSAIE FSGN QSLIALGEHIGLTD FVGG GGAL AAQGT LTLRNNAVVQCVKN
451 TSKTH GGAI LAGTVDLNETISEVA FKQN TAALT GGAL SANDKVIIANNFG
501 EIL FEQN EVRNH GGAI YCGCRSNPKLEQKDS GENINIIGNSGAIT FLKN K
551 ASVLEVMTQAEDYAG GGAL WGHNVLLDSNSGNIQ FIGN IGGSTFWIGEYV
601 GGAI LSTDRVTISNNSGDVV FKGN KGQCLAQKYVAPQETAPVESDASST
651 NKDEKSLNACSHGDHYPPKT
      VEEEVPPSLEEHPVVSSTDIRG GGAI LAQ
701 HIFITDNTGNLR FSGN LGGGEESSTVGD LAIVG GGAL LSTNEVNVC SNQN
751 VV FSDN VTSNGCDS GGAI LAKKVDISANHSVE FVSN GSGKF GGAV CALNE
801 SVNITDNGSAVS FSKN RTRLGGAGVAAPQGSVTICGNQGNIA FKEN FVFG
851 SENQRSG GGAI IANSSVNIQDNAGDIL FVSN STGSY GGAI FVGSVLVASEG
901 SNPRTLITGNSGDIL FAKN STQTAASLSEKDSF GGAI YTQNLKIVKNA
951 GNVS FYGN RAPSGAGVQIADGGTVCLEAFGGDIL FEGN INFVDFSNAIHL
1001 CGNDSKIVELSAVQDKNIIFQDAITYEENTIRGLPKDVSPLSAPSLIFN
1051 SKPQDDSAQHHEGTIRFSRGSVIPQIAAIQEGTLALSQNAELWLAGLKQ
1101 ETGSSIVLSAGSILRIFDSQVDSSAPLPTENKEETLVSAGVQINM
      SSPTP
1151 NKDKAVDTPVLADIISITVDLSSFVPEQDGTLP LPEIIPKGTKLHSNA
1201 IDLKIIDPTNVGYENHALLSSHKDIPLISLKTAEGMTGTPTADASLSNIK
1251 IDVSLPSITPATYGHGTGVWSESKMEDGRLVVGWQPTGYKLNPEKQ GALVL
1301 NNLWSHYTDLRALKQEIFAHTIAQRMELD FSTN VWGSGLVGVVEDCQ NIG
1351 EFDGFKHHLTGYALGLDTQLVEDFLIGGCF SQFFGKTESQSYKAKNDVKS
1401 YMGAAYAGILAGPWLKGA FVYGNINNDLTTDYGT LGISTG SWIGKGFIA
1451 GTSIDYRYIVNPRRFISAIVSTVVPFVEAEYVRIDLPEISEQGKEVRTFQ
1501 KTRFENVAIPFGFALEHAYS RGSRAEVNSVQLAYVFDVYRKGPVSLITLK
1551 DAAYSWKSYGVDIPCKAWKARLSNNT EWNSYLSSTYLAFNYEWREDLIAYD
1601 FNGGIRIIF

```

Abb. 24 Verteilung der GGAI/L/V und FxxN-Motive in der PmpD-Sequenz

Die für die Pmp-Familie charakteristischen GGAI-Motive (**fett, schattiert**) finden sich jeweils 9 mal in N-pmpD und 7 mal in M-pmpD, FxxN (**mit Rahmen**) jeweils 9 mal in beiden Abschnitten und nur einmal in C-pmpD. Die GGAI-Motive sind 7 mal 27-29 AS voneinander entfernt und wechseln sich mit wenigen Ausnahmen mit den FxxN in der Reihenfolge ab.

Ob bei bakteriellen Adhäsinen oder, wie im Fall des Zonadhäsins, bei eukaryontischen Oberflächenfaktoren – alle bislang bekannten Proteine mit mehr als einem GGAI/L/V-Motiv haben eine Funktion bei der Bindung oder Erkennung eukaryontischer Zellen (Grimwood und Stephens, 1999). Wenn PmpD oder seine oberflächen-

exponierten Teile ebenfalls eine Funktion bei der Bindung an Wirtszellen zukommt, sollten Antikörper gegen den N-Terminus die Infektivität von *C. pneumoniae* neutralisieren. EK wurden daher vor Infektion von HEp-2 Zellen 1 h bei 37°C mit unterschiedlichen Konzentrationen von gereinigten Antikörpern gegen N-pmpD inkubiert. Diese waren von Serumkomponenten abgetrennt worden, indem entweder rekombinantes N-pmpD an Sepharose gekoppelt und so alle Antikörper die an das native rN-pmpD binden isoliert, oder mit Protein A-Sepharose die gesamte IgG-Fraktion isoliert wurden. Beide Antikörper-Fraktionen hatten den gleichen Effekt auf die Infektivität (Abb. 25): Bereits 0,5 mg ml⁻¹ (10% v/v) α-N-pmpD verminderte die Zahl der Inklusionen um fast die Hälfte, bei 4,5 mg ml⁻¹ α-N-pmpD wurde die Infektion der Zellen fast vollständig verhindert. Kontrollansätze mit monoklonalen Antikörpern gegen MOMP oder LPS hatten keinen inhibierenden Effekt.

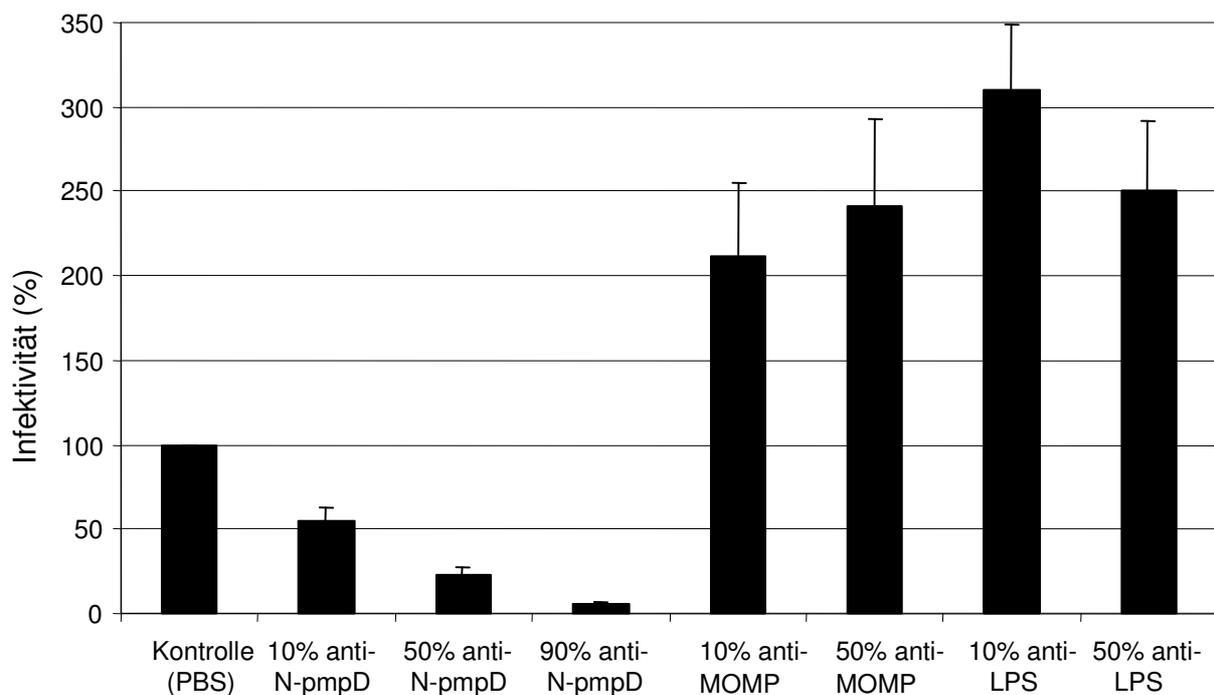


Abb. 25 Neutralisierung der Infektivität mit Antikörpern gegen N-pmpD

Verschiedene Mengen (in % des Volumens von 100 µl) des Antiserums (entweder mit rN-pmpD isoliert oder die mit Protein A gereinigte IgG Fraktion) wurden mit 5x10⁵ IFU 1 h bei 37°C in PBS inkubiert. Aliquots davon wurden zur Infektion von HEp-2 Zellen verschieden verdünnt. Nach 2 Tagen wurden die Inklusionen gefärbt und der Mittelwert der Verdünnungen bestimmt. Die Inkubation der EK mit 0,5 mg ml⁻¹ des α-N-pmpD Antiserums („10%“ V/V) reduzierte die Infektivität um die Hälfte, bei 2,5 mg ml⁻¹ („50%“) oder 4,5 mg ml⁻¹ („90%“) waren nur noch 20% bzw. 5% der ursprünglichen Infektivität vorhanden. Kontrollantikörper gegen MOMP oder LPS verminderten die Infektivität der EK hingegen nicht, sondern erhöhten sogar die Zahl der sich entwickelnden Inklusionen.

Wenn der Grund für die Neutralisierung der Infektivität ist, dass die Antikörper das putative Adhäsın PmpD an der Bindung an seinen Wirtsrezeptor hindern, sollte das rekombinante Protein im Überschuss vorliegend den gleichen Effekt haben, da es dann mit der Bindung der EK an die Rezeptoren konkurrierte. rN-pmpD alleine hatte jedoch keinen kompetitiven Effekt. Der exportierte N-terminale Teil von Autotransportern nimmt erst bei bzw. nach Überquerung der OM die richtige Konformation ein; der im Cytoplasma von *E. coli* überexprimierte Teil könnte daher in der falschen Konformation vorliegen. Zur Überprüfung der Funktion von PmpD sollten daher die N-terminalen Teile N-pmpD und N+M-pmpD in *E. coli* exprimiert und wie in *C. pneumoniae* über ein TypV-Sekretionssystem an die Oberfläche transportiert werden.

4.2.3.2 Genfusionen an AIDA-I und Aufbau eines Modellsystems

Zum Transport von N-pmpD und N+M-pmpD an die Oberfläche in transgenen *E. coli* wurde der C-Terminus mit dem des AIDA-I Autotransporters ersetzt, außerdem die N-terminale Signalsequenz mit der des Cholera-toxins (Maurer *et al.*, 1999). Die Fusionsproteine aus N-pmpD (A31 bis T668) sowie N+M-pmpD (A31 bis M1145) und der C-terminalen AIDA-I Translokationseinheit (β -Pore + Linker) wurden in voller Länge exprimiert, was aber zu Lyse der transgenen Bakterien führte: In den ü/n-Kulturen waren keine koloniebildenden Einheiten mehr vorhanden und die OM der Bakterien war nicht intakt, da das periplasmatische Maltose-Bindeprotein (MBP) in einem limitierenden Trypsin-Verdau analog Abb. 20 nicht geschützt war. Die 16 Cysteine im N-terminalen und mittleren Abschnitt von PmpD könnten bei Ausbildung von Disulfid-Brücken und damit stabilen Sekundärstrukturen im Periplasma mit der Translokation interferieren, weshalb das hybride Protein entweder in Anwesenheit von 10 mM β -ME oder in einem *E. coli*-Stamm ohne die periplasmatische Oxidoreduktase DsbA exprimiert wurde. In beiden Fällen war der AIDA-I-vermittelte Transport erfolgreich, die Bakterien lysierten nicht und N-pmpD bzw. N+M-pmpD (Abb. 26) waren Trypsin-zugänglich und folglich an der Oberfläche lokalisiert.

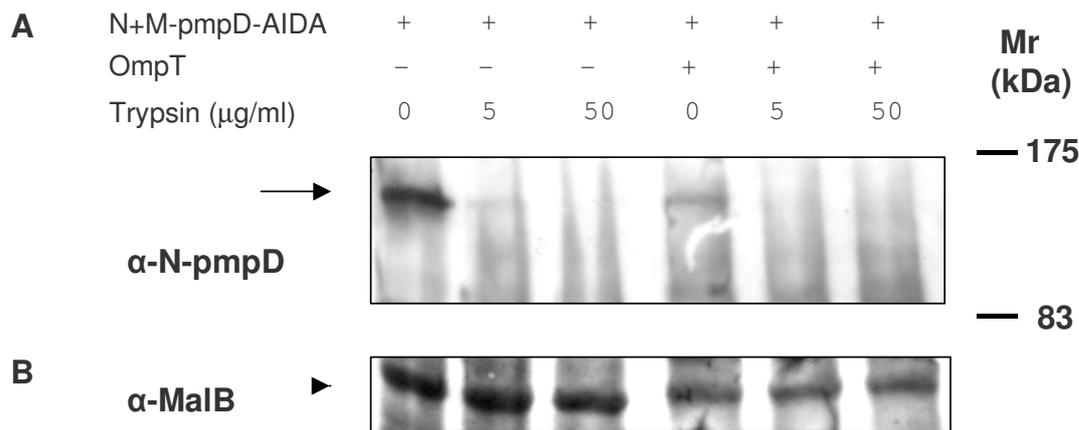


Abb. 26 Synthese und Oberflächenzugänglichkeit von N+M-pmpD-AIDA

1 ml einer ü/n-Kultur von *E. coli* JK321 (DsbA⁻/OmpT⁻) oder JCB571 (DsbA⁻) mit der Fusion N+M-pmpD-AIDA wurden mit 0; 5; und 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Trypsin 45 min bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach der Gelelektrophorese wurde der Blot mit Antiserum gegen N-pmpD (A) und im Anschluss daran gegen das periplasmatische MBP aus *E. coli* (B) inkubiert. Während die immundetektierbare Menge an MBP konstant blieb (Pfeilspitze), konnte N-pmpD bzw. der an N-pmpD gebundene und an der Oberfläche exponierte Teil des Fusionsproteins nicht mehr detektiert werden (Pfeil).

Das Antiserum gegen N-pmpD detektierte jeweils nur ein Protein in der vollen Länge von ~167 kDa in der Größe des ungeschnittenen Fusionsproteins (1585 AS, ohne Signalsequenz 1568 AS). Die Gesamtmenge in Bakterien ohne die OM-Protease OmpT war jedoch deutlich größer. Bei Anwesenheit von OmpT fand sich hingegen im Überstand ein mit α -N-pmpD immundetektierbares Protein in der Größe von N+M-pmpD. Das gleiche war bei der Fusion nur des N-terminalen Teils (N-pmpD-AIDA) zu beobachten: Abhängig von OmpT war ein Protein in der Größe von N-pmpD mit α -N-pmpD im Überstand nachzuweisen (Abb. 27A). Eine Spaltung zwischen N- und M-pmpD fand jedoch nicht statt. Die dafür in *C. pneumoniae* verantwortliche Protease ist nicht bekannt, ebensowenig deren Erkennungssequenz. Abb. 27B vergleicht die bekannten Schnittstellen in PmpD zwischen M- und C-pmpD (M1145 und S1146) und in PmpG (A872 und S873) (Vandahl *et al.*, 2002) mit einem Bereich unmittelbar vor M-pmpD sowie der OmpT-Schnittstelle in AIDA-I.

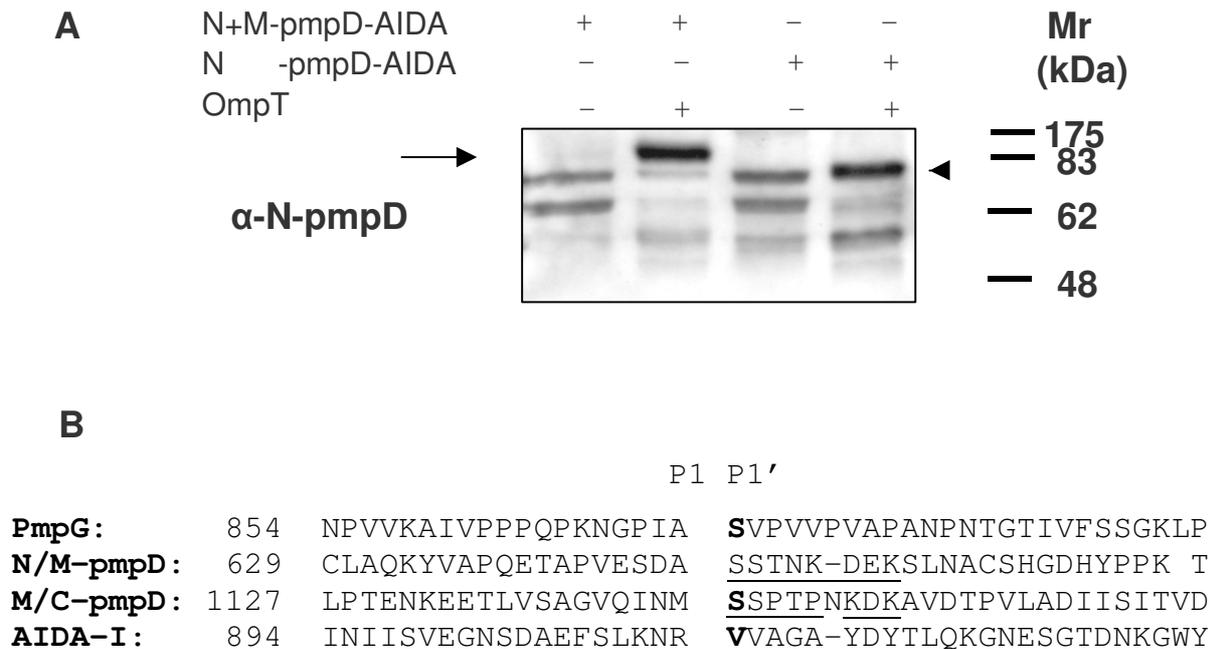


Abb. 27 Prozessierung der Fusionsproteine und Vergleich von bekannten und vermuteten Schnittstellen

Der Überstand von 0,5 ml einer ü/n-Kultur von *E. coli* JK321 (DsbA⁻/OmpT⁻) oder JCB571 (DsbA⁻) wurde über Microcon[®]-Säulen eingeeengt und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach der Gelelektrophorese wurde der Blot mit Antiserum gegen N-pmpD inkubiert. Bei dem OmpT-positiven transgenen Stamm mit dem Plasmid für das Fusionsprotein N-pmpD-AIDA war ein Protein in der Größe von N-pmpD (Pfeilspitze), mit der Genfusion N+M-pmpD-AIDA war ein Protein in der Größe von N+M-pmpD im Überstand zu finden (A).

OmpT schneidet AIDA-I (*E. coli*) nach R912, das auch in den Fusionsproteinen vorkommt. Die Erkennungssequenz der chlamydialen Protease ist nicht bekannt, die Abschnitte C-terminal von bekannten Schnittstellen (**fett**) in PmpG (Pmp6, *C. pneumoniae*) sowie vor dem C-Terminus von PmpD (M/C-pmpD) weisen aber Ähnlichkeiten auf mit einem Bereich (unterstrichen) vor dem nach Abb. 12 ersten tryptischen Peptid von M-pmpD, T673.

In dem Grenzbereich zwischen N- und M-pmpD, der bei T670 als erste AS von M-pmpD endet, gibt es wie bei der bekannten Schnittstelle zwischen M- und C-pmpD zwei Serine an der P1' und der P2'-Position, denen kurz danach ein Wechsel an positiv- und negativ geladenen AS folgt. Dieser Bereich ähnelt dem C-Terminus von AIDA-I, in dem der Schnittstelle zwei Valine und danach ebenso zwei AS-Triplets folgen (Abb. 27B). Für OmpT ist das basische Arginin an der P1-Position des AIDA-I-Linkers ausschlaggebend für die Erkennung der Schnittstelle, die Parallelen in den Pmp-Sequenzen könnten jedoch Indiz sein für eine Spaltung zwischen A647 und S648 bei der Prozessierung von N- und M-pmpD, bei der die Schnittstelle noch nicht bestimmt werden konnte.

4.2.3.3 Stimulierung von humanen Monozyten

Bei der Untersuchung der biologischen Aktivität aller 21 Pmp wurde unlängst bei Endothelzellen eine NF- κ B vermittelte Induktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 and MCP-1 durch die rekombinanten Proteine Pmp20 und Pmp21 (PmpD) beobachtet (Niessner *et al.*, 2003).

Bekannt ist bei anderen Autotransportermolekülen die Aktivierung humaner Monozyten nach Inkubation mit den rekombinanten Proteinen (Lorenzen *et al.*, 1999). Um zu untersuchen, ob auch PmpD Monozyten aktiviert und diese Aktivität vom oberflächenexponierten N-Terminus abhängt, wurde das lösliche rN-pmpD in verschiedenen Konzentrationen 24 h mit Zellen der Monozyten-Zelllinie THP-1 inkubiert und danach deren metabolische Aktivität (Abb. 28) sowie die IL-8 Konzentration im Überstand (Abb. 29) gemessen.

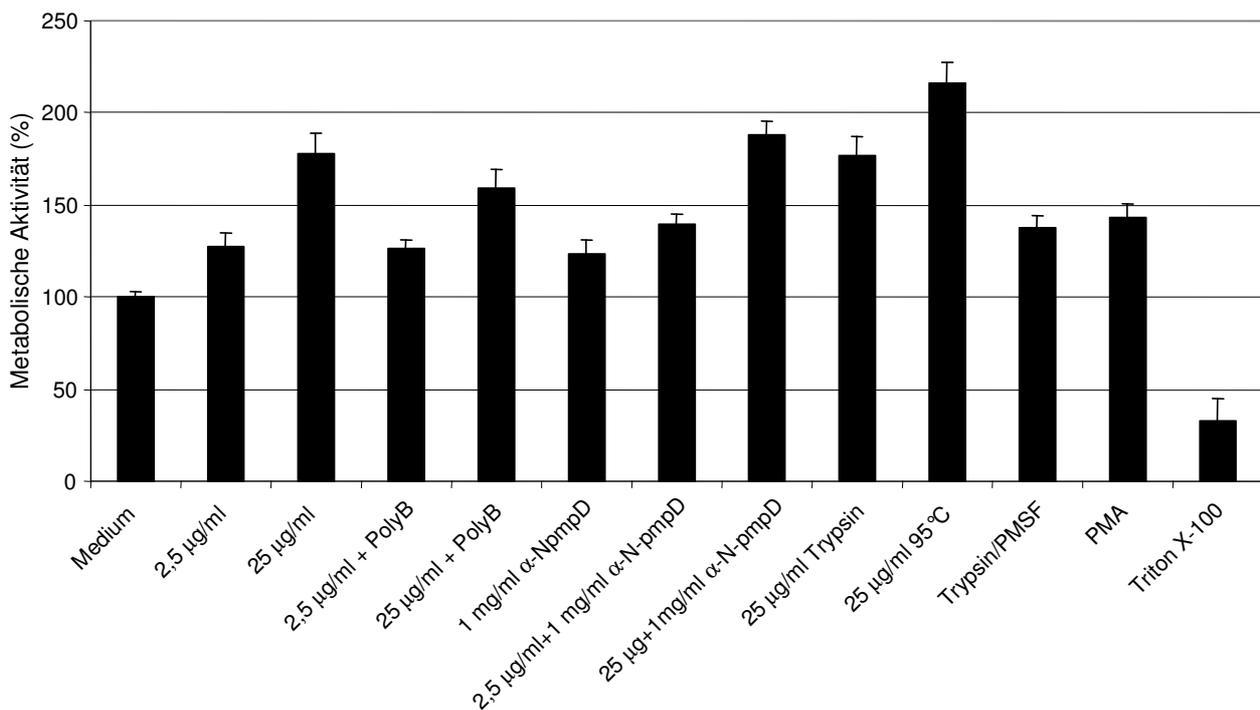


Abb. 28 rN-pmpD stimuliert die metabolische Aktivität humaner Monozyten

THP-1 Zellen (4×10^4) wurden 40 h in ihrem Zellzyklus synchronisiert und in 200 μ l Medium mit folgenden Zusätzen versetzt: 2,5 und 25 μ g ml^{-1} rN-pmpD, rN-pmpD vorbehandelt mit 100 μ g ml^{-1} Polymyxin B (30min bei 37°C), α -N-pmpD Antiserum, α -N-pmpD-rN-pmpD Antigen-Antikörper-Komplexe, rN-pmpD verdaut mit Trypsin (200 μ g ml^{-1} , 30min bei 37°C und inaktiviert mit 2 mM PMSF), hitzedenaturiertes rN-pmpD (10min bei 95°C), Trypsin/PMSF und 100 nM PMA. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit 2% Triton X-100 lysiert. Die metabolische Aktivität wurde nach Inkubation für 24 h bei 35°C und 5% CO_2 mit dem kolorimetrischen WST-1 Test bestimmt (A_{450} nach 120min Inkubation bei 37°C).

Die metabolische Aktivität nahm konzentrationsabhängig zu und erreichte fast die doppelte Aktivität der nicht-stimulierten Zellen. Die Werte übertrafen sogar die der Behandlung der THP-1 Zellen mit PMA. PMA regt die Zellen zum Differenzieren an und diente als Positiv-Kontrolle zur Stimulierung.

Den größten stimulierenden Effekt hatte rN-pmpD jedoch, wenn es vorher mit dem Antikörper inkubiert, von Trypsin ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$, 30min bei 37°C inkubiert und mit 2 mM PMSF inhibiert) gespalten oder durch Hitze (10min bei 65° oder 95°C) denaturiert worden war.

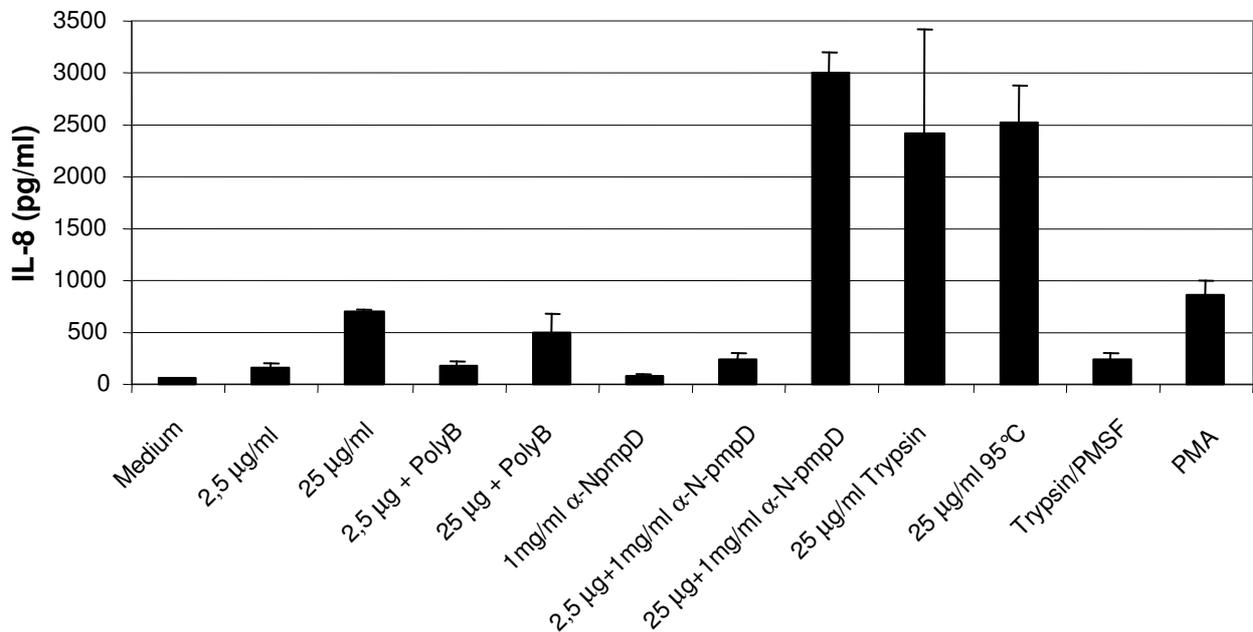


Abb. 29 IL-8 Sekretion humaner Monozyten durch rN-pmpD

Die Konzentration an IL-8 in den Überständen der in Abb. 28 synchronisierten und 24 h mit Präparationen von rN-pmpD inkubierten THP-1 Zellen (4×10^4) wurden mit einem IL-8 sandwich- ELISA bestimmt. Die konzentrationsabhängige IL-8 Sekretion korrelierte mit der metabolischen Aktivität. Hitzedenaturiertes, gespaltenes oder mit Antikörpern versetztes rN-pmpD zeigte aber einen deutlich stärkeren Effekt.

Auch bei der IL-8 Sekretion wurde ein Anstieg in Abhängigkeit von der rN-pmpD-Konzentration gemessen (Abb. 29). Die Werte für die durch Inkubation von rN-pmpD mit Antikörpern entstandenen Immunkomplexe sowie die tryptischen Peptide bzw. die hitzebehandelten Ansätze waren jedoch um den Faktor 4-5 höher als bei unbehandeltem rN-pmpD der gleichen Konzentration.

Die Antwort auf rN-pmpD in Form einer Stimulierung der metabolischen Aktivität und der IL-8 Sekretion wurde auch bei Vorbehandlung mit Polymyxin B beobachtet (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 30min inkubiert bei 37°C). Sie ist daher nicht auf LPS-Kontaminationen des gereinigten rekombinanten Proteins zurückzuführen. Im Fall des Verdauens mit Trypsin hatte PMSF-inaktiviertes Trypsin als Negativkontrolle einen deutlich geringeren Effekt und konnte die Steigerung daher nicht bzw. nur teilweise erklären.

4.3 Diskussion

4.3.1 Prozessierung und Translokation von PmpD

PmpD wurde bei der Proteomanalyse von *C. pneumoniae* RK (siehe Abschnitt 3.2.3) in zwei Fragmenten gefunden und daher in diesem Kapitel genauer untersucht. Eine Prozessierung nach dem Export von PmpD wäre in Übereinstimmung mit bioinformatischen Analysen, die einen Typ V-Translokationsmechanismus vorhersagen. Die sogenannten Autotransporter-Proteine weisen eine Komposition aus zwei Domänen auf, eine N-terminale Translokationseinheit mit Signalsequenz für eine Überquerung der Cytoplasmamembran über den Sec-Komplex und einen β -Faltblatt-reichen C-Terminus. Mit dem C-Terminus bilden sie sich ihre eigene Translokationspore und überqueren so die OM (Yen *et al.*, 2002; Henderson *et al.*, 1998). In der Tat besitzt der C-terminale Teil von PmpD einen hohen Anteil von β -Faltblatt-Strängen mit einem periodischen Wechsel zwischen hydrophoben und -philen Abschnitten und könnte Berechnungen des Programms *Amphi* (Jahnig, 1990) zufolge eine amphipatische Pore bilden. Auch die Größe von 40-45 kDa ist typisch für Transportdomänen von Autotransportern, enthält überdurchschnittlich viele Tryptophane und ein Phenylalanin am Ende, vermutlich zur Verankerung in der OM.

Die in der Proteomanalyse aufgereinigter RK gefundene Prozessierung konnte auch während der Infektion humaner Epithelzellen durch den Immunblot des Gesamtzelllysats bestätigt werden (Abb. 14). Das beobachtete Bandenmuster spricht für einen sukzessiven Prozessierungsverlauf in mehreren Schritten:

Mit dem α -N-pmpD Antiserum konnte nicht nur ein Protein in der Größe des ganzen PmpD (~170 kDa), sondern u.a. auch ein Fragment bei 125 kDa detektiert werden. Es könnte sich dabei um das intermediäre N+M-pmpD handeln, das nach Überquerung der OM von seiner C-terminalen Translokationseinheit (~45 kDa) abgespalten wird. Eine weitere Spaltung führte dann zu den in der 2D-Analyse beobachteten Produkten, von denen das N-terminale N-pmpD im Immunblot und bei der Immunpräzipitation (Abb. 15) das prädominante Produkt war. Bei Immunblots isolierter EK war keines der Pro-Proteine mehr detektierbar, nur noch das prozessierte Fragment (N-pmpD). Diese Ergebnisse sind im Modell in Abb. 30 (Abschnitt 4.3.3.2) dargestellt. Da PmpD selbst kein bekanntes Proteasemotiv besitzt, muss ein anderes Protein auf der Oberfläche für die Prozessierung verantwortlich sein. Mit Ausnahme der Sequenz EVN NLN (Position P3-P3') der Serin-Protease Unterfamilie enterobakterieller Autotransporter sind Spaltstellen und Art der Proteasen unter den Autotransportern wenig konserviert (Henderson *et al.*, 1998). Die Art der die Pmp prozessierenden Proteasen und deren Erkennungsmotiv bleibt daher ungeachtet der C-terminalen Sequenzähnlichkeiten offen (siehe auch Abb. 27 und Abschnitt 4.3.3.1).

Auch andere Arbeitsgruppen fanden bereits Hinweise auf die Prozessierung verschiedener Pmp. Während die beiden Pro-Proteine, das 170 kDa große N-pmpD sowie das 125 kDa N+M-pmpD, erst in dieser Arbeit zum ersten mal nachgewiesen wurden, konnte mit A30 die N-terminale AS eines 66 kDa großen Fragments von PmpD, wahrscheinlich das 70 kDa große N-pmpD, bereits identifiziert werden (Vandahl *et al.*, 2002). Das Ergebnis steht in Einklang mit der Abspaltung der Signalsequenz im Periplasma. Außerdem fand man durch N-terminale Sequenzierung mit S1146 am C-Terminus die C-terminale Schnittstelle (siehe Abb. 12B und 13). In der ersten Proteomkartierung von *C. pneumoniae* EK wurde PmpD ausschließlich über das C-terminale Fragment (47 kDa, pI 5.5) gefunden (Vandahl *et al.*, 2001). Dagegen konnte in dieser Arbeit nur der N-terminale und mittlere Teil identifiziert werden. Erklärung für die komplementären aber unterschiedlichen Ergebnisse könnten die verschiedenen Probenaufarbeitungen für die 2D-Gelelektrophorese, die Färbemethoden und nicht zuletzt des Ausgangsmaterial (RK vs. EK) sein.

Gesetzt den Fall, weitere Pmp Moleküle sind wie *in silico* vorhergesagt Autotransporter, so lassen sich Ergebnisse früherer Arbeiten, die von deren Autoren als

widersprüchlich oder unspezifisch interpretiert worden waren, jetzt deuten: So wurden bei Immunblots für Proteine der PmpG Familie in *C. pneumoniae* kleinere Proteine beobachtet – vermutlich Ergebnis posttranslationaler Prozessierung (Grimwood *et al.*, 2001). Unterschiede im Laufverhalten im SDS Gel einiger Pmp zwischen gekochten und nicht gekochten Proben könnte ein Indiz für die β -Faltblattporen im C-Terminus sein, für die ein Temperatur-abhängiges Laufverhalten typisch ist (McCafferty *et al.*, 1995; Knudsen *et al.*, 1999; Christiansen *et al.*, 1999). Bei *C. psittaci* bzw. *C. abortus* waren nur der N-Terminus verschiedener Pmp an der Bakterienoberfläche exponiert, was bedingt durch den Exportmechanismus ein Wesensmerkmal der Autotransporter wäre (Everett und Hatch, 1995; Longbottom *et al.*, 1998; Vretou *et al.*, 2003). Schließlich wurde mit einer differentiellen Permeabilisierung für Pmp6, -20 und -21 (PmpD) von *C. pneumoniae* eine Oberflächenfärbung beschrieben (Vandahl *et al.*, 2002). Bei genauerer Betrachtung des N-terminalen Teils von PmpD konnte in dieser Arbeit durch Elektronenmikroskopie, Immunfluoreszenz und limitierter Proteolyse die Lokalisierung an der Oberflächen eindeutig bestätigt werden. Die Immunmikroskopie infizierter Zellen belegt dabei die Anwesenheit von N-pmpD in den RK, die α -N-pmpD-Färbung erscheint wie ein Ring oder auch ein Würfel um die mit α -Hsp60 gefärbten Bakterien (Abb. 17).

Dieses Muster war auch in Bakterien unter Eisenmangel erkennbar, obgleich die Membranstruktur atypisch erschien und damit typisch für persistente Chlamydien (Abb. 19, siehe auch Kapitel 3). Dass aber PmpD im Persistenzstadium in gleicher Menge gebildet und transloziert wird, war nicht zu erwarten: Wenn die Funktion von PmpD auf den EK die Bindung an Wirtszellrezeptoren ist, sollte es während der Persistenz nicht benötigt und könnte folglich herunterreguliert werden. Erklärung hierfür könnte eine relativ große Menge an PmpD auf den EK sein, die keine kurzfristige Synthese und Export beim Ende der Persistenz zulässt. In der Tat gehörten die gefundenen Fragmente zu den dominanten Proteinspezies im 2D-Gel der RK (Abb. 12A) und ähnlich dem MOMP wird PmpD auch im akuten Infektionsverlauf nicht erst am Ende, sondern zu jedem Zeitpunkt gebildet. Auch bei *C. trachomatis* wurde unlängst gezeigt, dass ungeachtet der ausbleibenden Teilung viele Prozesse einschließlich der Membranbiosynthese in den persistenten AK normal verlaufen, was eine schnelle Reorganisation in infektiöse EK bei Wegfall des Persistenzstimulus ermöglicht (Belland *et al.*, 2003).

Das geschnittene N-pmpD bleibt der Immunfärbung zufolge mit den Bakterien assoziiert, es wurde kein Hinweis auf eine Sekretion gefunden. Zu keinem Zeitpunkt war eine Lokalisierung im Cytoplasma der Wirtszelle oder auch in der Inklusionsmembran zu beobachten (Abb. 17). Allerdings zeigen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine starke Assoziation mit Vesikel-ähnlichen Strukturen innerhalb der Inklusion, die durch Abschnürung von den RK oder durch Abstreifen von der OM entstanden sein könnten (Abb. 18). Derartige Vesikel wurden schon vereinzelt beschrieben, es konnte ihnen bislang jedoch noch keine physiologische Funktion zugeschrieben werden (Richmond und Stirling, 1981; Heuer *et al.*, 2003).

4.3.2 Interaktion mit der Äußeren Membran

Bei isolierten EK lag N-pmpD an der Oberfläche nur noch prozessiert und damit nicht mehr kovalent an seine Pro-Proteine gebunden vor (Abb. 20). Die Natur der Bindung von N-pmpD an die OM konnte nicht abschließend geklärt werden. Sie ähnelte in ihrer Hitze-Resistenz keiner bislang für Autotransporter bekannten nicht-kovalenten Interaktion und könnte mit der einzigartigen Membranstruktur der Chlamydien zusammenhängen. Das Peptidoglykan enthält keine Muraminsäure, in und unter der OM findet man dafür aber ein Netzwerk aus Cystein-reichen Proteinen, die bei Lyse der Wirtszelle und damit dem Eintritt in oxidierendes Milieu untereinander Disulfidbrücken ausbilden und den EK so strukturelle Stabilität verleihen. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen sind diese chlamydialen OM-Komplexe (COMC) selbst bei 2% SDS unlöslich. N-pmpD konnte zu einem kleinen Bruchteil mit den COMC sowie mit Sarkosyl-unlöslichen OM-Fractionen nur unter oxidativen Bedingungen pelletiert werden (Abb. 22A). Andererseits konnten auch die nicht-ionischen Detergenzien Triton X-100 und Zwittergent[®] 3-14 große Teile des gebundenen N-pmpD von der OM lösen, während die Behandlung mit Na-Desoxicholat, NP-40, CHAPS, Tween[®], dem Tensid Saponin, EDTA, hohen Salzkonzentrationen oder moderatem pH-Wechsel ergebnislos blieben (Abb. 22B).

PmpD besitzt mit 19 Cysteinen (davon 16 in N+M-pmpD) für Autotransporter ungewöhnlich viele potentielle Disulfidbrücken: Bei der Typ V-Sekretion wird die OM im ungefalteten Zustand überquert, die Ausbildung von Disulfidbrücken im Periplasma – ein oxidatives Milieu bei extrazellulären Bakterien – würde daher zu

Sekundärstrukturen führen und die Translokation stören (Klauser *et al.*, 1992). Die hohe Zahl an Cysteinen könnte bei Chlamydien auf eine Assoziation mit den COMC hinweisen. Da die Inkubation mit reduzierendem DTT oder β -ME allein jedoch keinen Effekt hatte, ist eine direkte Bindung des N-pmpD über Disulfidbrücken an Proteine der OM unwahrscheinlich. Möglich wäre aber eine anders geartete Interaktion mit Proteinen, die ihrerseits über Disulfidbrücken an COMC gebunden sind. Die Reihe der Spots im 2D-Gel (Abb. 13) deutet auf Modifizierungen von N-pmpD hin, die wie etwa Fettsäurereste für die Interaktion zur Wirtszelle oder auch zur OM wichtig sein könnten. In den Massenspektren der drei Proteinspezies wurden allerdings keine Hinweis auf Modifizierungen in Form von bekannten Massenverschiebungen gefunden.

4.3.3 Interaktion mit den Wirtszellen

4.3.3.1 Interaktion mit Epithelzellen bei der Infektion

Bis heute konnte keinem der 21 Pmp von *C. pneumoniae* oder den Pmp anderer Chlamydien eine Funktion zugeschrieben werden. Schon bei der Einteilung der Proteine in eine Familie war allerdings eine Rolle bei der Adhäsion oder Invasion vermutet worden. Homologien zu bakteriellen Adhäsinen (Abb. 23) besonders im N-terminalen und mittleren Teil, etwa mit OmpA (*Rickettsia* spp.), FN0291 (*F. nucleatum*), HMWA (*Y. pestis*) oder TibA (*E. coli* ETEC) und vor allem die auffällig häufigen GGAI und FxxN-Motive gaben Anlass für Spekulationen bezüglich ihrer Funktion: Diese Motive werden sonst nur bei Proteinen gefunden, die in Erkennung oder Bindung eukaryontischer Membranen involviert sind (Everett und Hatch, 1995). Durch Inkubation der EK von *C. pneumoniae* mit den gegen den N-Terminus gerichteten, polyklonalen Antikörpern wurde die Infektivität, gemessen an den sich entwickelnden Inklusionen, um mehr als 95% vermindert. Kontrollversuche mit kommerziellen Antikörpern gegen MOMP oder LPS hingegen reduzierte die Infektivität nicht. Im Gegenteil zeigte sich eine Erhöhung der gezählten Inklusionen um den Faktor 2-3, was mit einer verstärkten Aufnahme der opsonisierten EK durch Bindung und Internalisierung über F_c -Rezeptoren erklärt werden kann (Su *et al.*, 1991; Scidmore *et al.*, 1996).

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die mit α -N-pmpD opsonierten EK aufgenommen werden und erst danach die intrazelluläre Entwicklung blockiert ist. Allerdings führte die Bindung mit Antikörpern bereits bei anderen OM-Komponenten und Oberflächenantigenen zur Inhibierung von Adhäsion und Aufnahme. Bei *C. trachomatis* war das für PorB, Hsp70 und MOMP der Fall (Kawa und Stephens, 2002; Mamelak et al, 2001; Caldwell und Perry, 1982). Publierte Ziele protektiver Antikörper bei *C. pneumoniae* waren ein 76 kDa-, ein 54 kDa großes Protein sowie zwei unbekannte Antigene. Bindung eines Zellwand-assoziierten Glykoaminoglykans wirkt neutralisierend bei *C. pneumoniae* und *C. trachomatis*, Bindung des Glykolipid Exoantigens GLXA bei *C. psittaci* und *C. trachomatis*, und monoklonale Antikörper gegen LPS waren wirksam bei *C. pneumoniae* (Rasmussen-Lathrop et al., 2000; Wolf et al., 2001; Peterson et al., 1998; Girjes et al., 1993; An et al., 1997; Gran et al., 1993; Wiedmann-Al-Ahmad et al., 1997).

Der letzte Beweis für eine funktionelle Rolle von PmpD als Adhäsion steht jedoch noch aus. Bei transgenen *E. coli* Bakterien war die Expression von PmpD toxisch, auch nach Austausch der Signalsequenz durch die von OmpA. Ein Fusionsprotein von N-pmpD sowie N+M-pmpD an die C-terminale Translokationseinheit (β -Pore + Linker) des Autotransporters AIDA-I (Maurer et al., 1999) wurde in voller Länge exprimiert und unter reduzierenden Wachstumsbedingungen bzw. in Abwesenheit der Oxidoreduktase DsbA an die Oberfläche transportiert (Abb. 26). *In vivo* wäre für die intrazellulären Chlamydien auch im Periplasma ein reduzierendes Milieu gegeben. Wie oben erwähnt würde die Ausbildung von Disulfidbrücken die Translokation stören, auch wenn es vereinzelt Beispiele für einen Export Cystein-enthaltender Proteine nach dem TypV-Sekretionsmechanismus gibt (Klauser et al., 1992; Jose et al., 1996; Veiga et al., 1999; Brandon und Goldberg, 2001). Die Fusionsproteine wurden in *E. coli* von OmpT geschnitten, nicht jedoch die Verbindung zwischen N- und M-pmpD, vermutlich aufgrund der Abwesenheit der in *C. pneumoniae* dafür verantwortlichen Protease (Abb. 27). Der N-terminale Teil von Fusionsproteinen mit AIDA-I wird in *E. coli* nach dem Export von der Protease OmpT vom C-Terminus abgespalten, welcher als β -Faltblattpore in der OM verbleibt (Maurer et al., 1997). OmpT schneidet bevorzugt zwischen zwei basischen AS, aber auch nach einem Arginin an der Position P1 dem kein Aspartat oder Glutamat folgt, also etwa zwischen R-A, R-M, R-Q, R-S oder R-V wie bei AIDA-I (Sugimura und Nishihara,

1988; Okuno *et al.*, 2002; Maurer *et al.*, 1997). Obgleich in N- und M-PmpD insgesamt 19 Arginine und auch 3 mal R-X (X=A/S/V) vorkommen, waren die im Überstand gefundenen Fusionsproteine nicht weiter prozessiert. Dies würde für eine dichte, stabile Faltung des exportierten Teils sprechen, könnte aber auch auf eine nur direkt an der Bakterienoberfläche wirksame proteolytische Aktivität von OmpT hinweisen (Maurer *et al.*, 1997). Bei *C. pneumoniae* war in gereinigten EK kein ungeschnittenes PmpD mehr detektierbar (Abb. 20), was den Schluss nahe legt, dass PmpD nur das Vorläuferprotein und die zur Oberfläche exportierten Teile (N- und M-pmpD) die funktionellen Domänen darstellen. Die zweifache Spaltung könnte als Signal für die Einnahme der richtigen, bindungsvermittelnden Konformation dienen und die fehlenden adhäsiven Eigenschaften der transgenen Bakterien auf eine falsche Konformation des Fusionsproteins zurückgeführt werden. Negative Adhäsionsergebnisse sind auch für Fusionsproteine aus funktionellen Domänen und Translokationseinheiten mit anderen Autotransportern beschrieben. Es wurde daher eine spezifische Interaktion der passagierten N-terminalen Domänen mit dem eigenen C-Terminus vermutet, die mit einer fremden Translokationseinheit nicht gegeben sein könnte (Hendrixson und St.Geme, III, 1998; Laarmann *et al.*, 2002). Ebenfalls nicht erfolgreich waren Adhäsionsversuche mit rekombinantem N-pmpD an der Oberfläche von Latexkugeln (\varnothing 0,33 μ m) und Epithelzellen (Daten nicht gezeigt). Grund hierfür könnte eine falsche Faltung des überexprimierten Proteins sein (siehe 4.3.3.2). Ob und wie N- und M-pmpD zusammenspielen und die Bindung sowohl zur OM als auch zu den postulierten Wirtszellrezeptoren vermitteln, ist unklar. Möglich wäre die erforderliche Mitwirkung anderer Oberflächenstrukturen auf *C. pneumoniae*, etwa der 20 übrigen Pmp – in ihrer Kombination eventuell abhängig vom Wirtszelltyp. Das große Repertoire an Adhäsinkomponenten von *C. pneumoniae* könnte so den weiten Wirtszellbereich erklären, ähnlich der Spezifität der Neisserien Opa Proteine für verschiedene CAECAM- (CD66) bzw. Heparansulfat-Proteoglykan Rezeptoren (Dehio *et al.*, 1998; Meyer, 1999). Eine den *opa*-Genen analoge Expressionsheterogenität und die daraus resultierende Variation der Bakterienoberfläche wurde bislang nur für zwei PmpG Proteine beschrieben (Pedersen *et al.*, 2001; Rocha *et al.*, 2002).

4.3.3.2 Aktivierung von Monozyten

Eine völlig andere Rolle könnte PmpD bei Chlamydien-assoziierten, chronischen Entzündungsreaktionen zukommen. Rekombinantes N-pmpD hat die Eigenschaft, konzentrationsabhängig metabolische Aktivität und IL-8 Sekretion bei THP-1 Zellen *in vitro* zu stimulieren (Abb. 28 und 29). Damit konnte nach der IgA1 Protease von *N. gonorrhoeae* ein weiterer Autotransporter identifiziert werden, der unabhängig von LPS zur proinflammatorischen Zytokinproduktion und der nachfolgenden Gewebeläsionen beitragen und damit zur Klasse der „Moduline“ genannten Virulenz- bzw. Pathogenitätsfaktoren gezählt werden kann (Lorenzen *et al.*, 1999). Die mechanistischen Hintergründe sind noch weitgehend unklar, denkbar wäre eine Modulation der Aktivität über die Interaktion mit Rezeptormotiven wie die ITAM- oder ITIM-Motive im Falle der Neisserien Opa Proteine (Dehio *et al.*, 1998).

Nach Infektion mit *C. pneumoniae* wurde eine pro-inflammatorische Zytokinantwort (IL-1 β , TNF- α , IL-6) bereits bei Mono Mac 6 sowie peripheren Blutmonozyten beobachtet, IL-8 wurde außerdem von Lungenmakrophagen produziert (Heinemann *et al.*, 1996; Kaukoranta-Tolvanen *et al.*, 1996; Redecke *et al.*, 1998). Es gibt Hinweise, dass die IL-8 Sekretion humaner Blutmonozyten und Mausmakrophagen von bakteriellen Zellbestandteilen verursacht wird, lebensfähige Bakterien also nicht erforderlich sind und der Effekt unabhängig von Hsp60 ist (Netea *et al.*, 2000; Bulut *et al.*, 2002).

Bei Endothelzellen wurde eine NF- κ B-abhängige Induktion von IL-6, IL-8 und MCP-1 mit rekombinatem Pmp20 oder Pmp21 (PmpD) beschrieben (Niessner *et al.*, 2003). Unklar ist jedoch, ob die THP-1-stimulierenden Eigenschaften des rekombinanten N-pmpD auf ähnliche Mechanismen zurückgeführt werden können. Dass die anderen, in genannter Studie getesteten Pmp keine derartige Wirkung besaßen, spricht gegen eine Beteiligung der allen Pmp eigenen, auffälligen GGAI und FxxN Motive. Dennoch könnte deren Abfolge und Anordnung in den einzelnen Pmp sowie im Kontext aller OM-exponierter Proteine für die Interaktion mit verschiedenen Wirtszellrezeptoren ausschlaggebend sein. Auffallend ist etwa, dass Position und Zahl dieser Vier-Aminosäuremotive bei *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* nahezu identisch sind, während die gesamte Homologie im N-terminalen Bereich nur bei 47% (Identität = 32%) liegt. Die stärkste Stimulierung wurde mit Antigen-Antikörper Komplexen beobachtet, sowie nach Hitzedenaturierung oder Trypsin-Spaltung des Proteins (Abb. 28 und 29). Im ersten Fall könnte die Bindung zweier N-pmpD-Moleküle durch

einen Antikörper zu einem lokalen Vernetzungseffekt der N-pmpD Rezeptoren führen. In den anderen Fällen könnten die postulierten, stimulierenden Epitope nach einer Denaturierung oder Spaltung in Peptide besser an die Wirtszellrezeptoren binden als in einem rekombinanten Protein mit einer eventuell suboptimalen Konformation. Im Einklang mit der Hypothese eines dreidimensionalen Musters dieser Motive wären auch Vorhersagen einer β -helikalen Faltung des N-Terminus der Pmp, die so auch die richtige Anordnung bestimmter, immundominanter Epitope sicherstellt (Vretou *et al.*, 2003). Abb. 30 fasst die Vorstellungen von Prozessierung, Translokation und Faltung von PmpD schematisch zusammen.

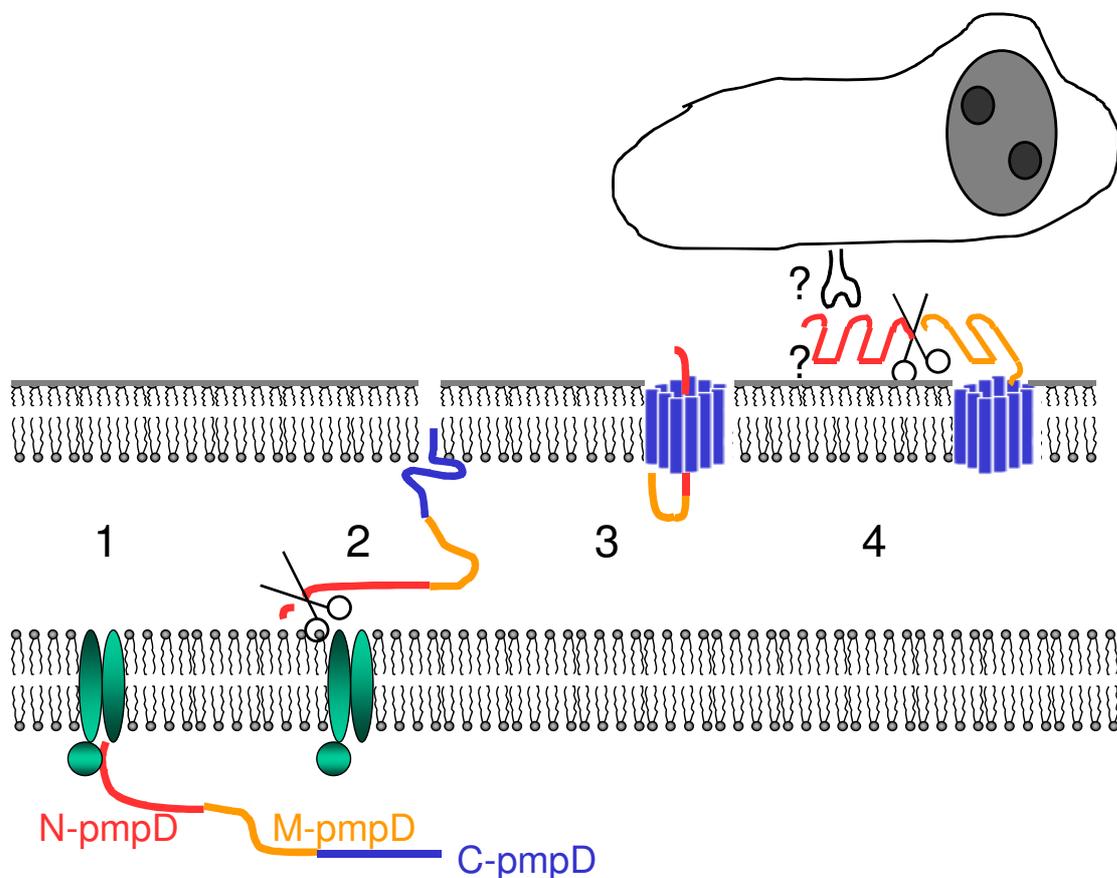


Abb. 30 Modell für Translokation, Prozessierung und Faltung von PmpD

PmpD wird nach der Synthese wahrscheinlich Sec-abhängig ins Periplasma transportiert (1). Nach Abspaltung der Signalsequenz bildet der C-terminale Teil eine Translokationspore aus β -Faltblattstrukturen (2), durch die der exportierte N-terminale Teil an die Oberfläche gelangt (3). Dort faltet er sich vermutlich nach Spaltung in N- und M-pmpD in eine zur Interaktion mit den Wirtszellrezeptoren kompetente Konformation (4). Unbekannt sind sowohl der oder die Rezeptoren, als auch die Art der Interaktion der geschnittenen Teile mit der Bakterienmembran.

4.3.4 Ausblick

Während Prozessierung und Lokalisierung von PmpD an der Oberfläche aufgeklärt werden konnte, bleiben bei der Betrachtung seiner Funktion noch Fragen offen.

Die nahezu vollständige Reduzierung der Infektivität nach Bindung mit Antikörpern legt eine Schlüsselrolle des N-terminalen Teils bei der Interaktion mit HEp-2 Zellen nahe. Zudem stimulierte das rekombinante Protein die metabolische Aktivität von THP-1 Zellen und führte zu einer IL-8 Sekretion. Denkbar ist, dass diese Eigenschaften *in vivo* durch weitere chlamydiale Faktoren moduliert werden, ob lokalisiert auf der Oberfläche oder zu Beginn der Infektion ins Zytoplasma der Wirtszelle sekretiert.

Auffallend bei PmpD und den anderen Pmp sind die zahlreichen der bei anderen Organismen sehr seltenen GGAI und FxxN-Aminosäuremotive im N-terminalen Bereich. Ihre Funktion könnte eng mit der Bindung an Rezeptoren für die Internalisierung in nicht-professionell phagozytotische Zellen oder die Aktivierung monozytischer Zellen zusammenhängen. Durch eine Epitop-Kartierung von PmpD und den Einfluss dieser Antikörper auf die Infektion verschiedener Wirtszelltypen könnten die relevanten Regionen identifiziert werden. Anhaltspunkt für ein selektives Vorgehen kann der beobachtete Anstieg der inflammatorischen Aktivierung bei Denaturierung und tryptischem Verdau von rN-pmpD sein: Die Isolierung der aktiven Peptide etwa durch HPLC-Trennung des tryptischen Verdau oder die Herstellung synthetischer Peptide nach dem Vorbild der theoretischen tryptischen Peptide und die Bestimmung ihrer biologischen Wirksamkeit sollten hier Klarheit über das Zusammenspiel verschiedener Motive und Bereiche bringen. Als Alternative zum rekombinanten Protein könnten die Peptide auch die Identifizierung der eukaryontischen Rezeptoren mittels chemischer Verknüpfung und Immunpräzipitation der Peptid-Bindungspartner erleichtern.

Da die Bindung von N-pmpD die Infektivität von *C. pneumoniae in vitro* neutralisiert, wäre im weiteren die Untersuchung der Auswirkungen einer passiven Verabreichung der Antikörper *in vivo* aufschlussreich, vor allem aber die Evaluation von PmpD als Zielstruktur einer protektiven Immunisierung.