

Aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut für
Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
(Lehrstuhl Bakteriologie)
der
Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Einfluß der GTPasen Rab5a und Rab7 auf die Einschlußkörperentwicklung von
Chlamydia trachomatis und *Chlamydophila pneumoniae*

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Cornelia Schneider
aus München
2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. J. Heesemann
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. R. Waidelich Priv. Doz. Dr. M. Hoelscher Priv. Doz. Dr. St. Linder
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Corinna Barz
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	29.03.2007

Inhaltsverzeichnis

1. <u>Einleitung</u>	1
1.1 Chlamydien	1
1.1.1 Die Familie <i>Chlamydiaceae</i>	1
1.1.2 Chlamydien-assoziierte Krankheitsbilder	2
1.1.3 Entwicklungszyklus	4
1.1.4 Infektionszyklus	6
1.1.4.1 Adhäsion	6
1.1.4.2 Invasion	7
1.1.4.3 Intrazelluläres Überleben und Inklusionbildung	8
1.1.4.4 Inklusion Membrane Proteins (Inc)	11
1.1.4.5 Typ-III-Sekretion	12
1.1.4.6 Homotypische Fusion	13
1.1.4.7 Reorganisation innerhalb des Einschlußkörpers	13
1.1.4.8 Release	14
1.2 Funktionen der Rab GTPasen	15
1.2.1 Rab GTPasen: ihre Rolle im endozytischen Transport der eukaryoten Zelle	15
1.2.2 Rab5	17
1.2.3 Rab7	18
1.2.4 Der Rab-Zyklus	18
1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	19

2.	<u>Material und Methoden</u>	21
2.1	Material	21
2.1.1	Geräte	21
2.1.2	Sonstige Materialien	22
2.1.3	Chemikalien	22
2.1.4	Zelllinie und Zellkultur	22
2.1.5	Antikörper	22
2.1.6	Rab-Plasmide	23
2.1.7	Chlamydienstämme	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Transformation	24
2.2.2	Plasmidpräparation	24
2.2.3	Vermehrung der Chlamydienstämme	24
2.2.4	Transfektion von HeLa Zellen mit Rab5a-GFP und Rab7-GFP und ihren Mutanten	25
2.2.5	Infektion von transfizierten HeLa-Zellen mit <i>C. trachomatis</i> L2 und <i>C. pneumoniae</i>	25
2.2.6	Fixierung und Färbung	26
2.2.7	Mikroskopie und Bearbeitung	26
2.2.8	Statistik	26
3.	<u>Ergebnisse</u>	27
3.1	Versuche zur Untersuchung des Einflusses von Rab5a bei der Bildung von <i>Chlamydia trachomatis</i> –Einschlußkörpern	27
3.1.1	Transfektion von HeLa-Zellen mit der GTPase Rab5a und ihren Mutanten Rab5a S34N und Rab5a Q79L	27

3.1.2	Infektion von Rab5a wt, Rab5a S34N und Rab5a Q79L transfizierten HeLa-Zellen mit <i>Chlamydia trachomatis</i>	29
3.1.3	Untersuchung des Einflusses von Rab5a auf quantitative Größen der Einschlußkörperbildung von <i>C. trachomatis</i>	30
3.1.3.1	Einfluß von Rab5a auf die Infektionsrate von <i>C. trachomatis</i> in HeLa-Zellen	30
3.1.3.2	Einfluß von Rab5a auf die Anzahl der Einschlußkörper in <i>C. trachomatis</i> -infizierten HeLa-Zellen	33
3.1.3.3	Einfluß von Rab5a auf die perinukleäre Lokalisation des Einschlußkörpers in <i>C. trachomatis</i> -infizierten HeLa-Zellen	35
3.1.3.4	Einfluß von Rab5a auf die Größe des Einschlußkörpers in <i>C. trachomatis</i> -infizierten HeLa-Zellen	35
3.2	Versuche zur Untersuchung des Einflusses von Rab7 bei der Bildung von <i>Chlamydia trachomatis</i>-Einschlußkörpern	37
3.3	Versuche zur Untersuchung des Einflusses von Rab5a auf die Bildung von <i>Chlamydomydia pneumoniae</i>-Einschlußkörpern	40
3.3.1	Infektion von Rab5a wt, Rab5a S34N und Rab5a Q79L transfizierten HeLa-Zellen mit <i>C. pneumoniae</i>	40
3.3.2	Untersuchung des Einflusses von Rab5a auf quantitative Größen der Einschlußkörperbildung von <i>C. pneumoniae</i>	42
3.3.2.1	Einfluß von Rab5a auf die Infektionsrate von <i>C. pneumoniae</i> in HeLa-Zellen	42
3.3.2.2	Einfluß von Rab5a auf die Anzahl der Einschlußkörper in <i>C. pneumoniae</i> - infizierten HeLa-Zellen	43
3.3.2.3	Einfluß von Rab5a auf die Lokalisation des Einschlußkörpers in <i>C. pneumoniae</i> -infizierten HeLa-Zellen	43
3.3.2.4	Einfluß von Rab5a auf die Größe des Einschlußkörpers in <i>C. pneumoniae</i> -infizierten HeLa-Zellen	44

4.	<u>Diskussion</u>	45
5.	<u>Zusammenfassung</u>	57
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	59
7.	<u>Abkürzungen</u>	77
8.	<u>Danksagung</u>	
9.	<u>Lebenslauf</u>	

1. Einleitung

1.1 Chlamydien

1.1.1 Die Familie *Chlamydiaceae*

Chlamydien sind obligat intrazellulär sich vermehrende, gramnegative Bakterien, die Erreger verschiedener Krankheitsbilder bei Mensch und Tier sind. Entdeckt wurden sie 1907 von Halberstaedter und von Prowazek (Scholz, 1976). Aufgrund ihrer winzigen Größe (0,3-1 µm) wurden sie früher zu den Viren gezählt. Diese Einteilung wurde in den 60-er Jahren aufgegeben, da sie einige Charakteristika mit Bakterien teilen: zum einen besitzen sie eine Zellwand, die der gramnegativer Bakterien ähnelt, allerdings konnte bisher kein Peptidoglykan nachgewiesen werden. Zum anderen sind ihre Ribosomen prokaryotischen Ursprungs, und sie vermehren sich durch Zweiteilung. Zusätzlich reagieren sie empfindlich auf Antibiotika wie Rifampicin, Chloramphenicol, Erythromycin und Tetracycline (Fields and Barnes, 1992).

Ihr Energiestoffwechsel scheint zum Teil abhängig von der Wirtszelle zu sein, da ein ADP-ATP-Austausch beobachtet werden konnte (Hatch et al., 1982). Dennoch scheinen sie nicht ausschließliche Auxothrophen für ATP zu sein, da Gene für die ATP-Biosynthese nachgewiesen wurden (Stephens et al., 1998).

Durch die Entdeckung neuer Organismen auf Basis von molekularen Markern war die Taxonomie für Chlamydien in den letzten Jahren einer ständigen Änderung unterworfen. Everett et al. schlug eine neue Einteilung der Familie *Chlamydiaceae* in die beiden Gattungen *Chlamydia* und *Chlamydophila* vor. Danach werden der nur humanpathogene Erreger *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia suis* und *Chlamydia muridarum* dem Genus *Chlamydia* zugerechnet, wohingegen die für den Menschen auch wichtigen Erreger *Chlamydia pneumoniae* und *Chlamydia psittaci* ebenso wie *Chlamydia pecorum* unter die Gattung *Chlamydophila* fallen und demnach *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci* und *Chlamydophila pecorum* genannt werden. 3 neue Spezies wurden von *Chlamydia psittaci* abgeleitet: *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila caviae* und *Chlamydophila felis* (Everett et al., 1999).

Neben diesen bereits bekannten Arten traten durch neue Entdeckungen weitere Erreger speziell des menschlichen Respirationstraktes hinzu, die nach der neuen Taxonomie drei neuen Familien zuzuordnen sind: *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* und *Waddliaceae* (Corsaro et al., 2002).

1.1.2 Chlamydien-assoziierte Krankheitsbilder

Im Folgenden sollen die klinischen Erscheinungsformen von *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydophila pneumoniae* kurz besprochen werden, die auch in der vorliegenden Arbeit zu Versuchszwecken herangezogen wurden.

Chlamydia trachomatis

Chlamydia trachomatis ist ausschließlich humanpathogen und ist die bisher am besten untersuchte Art. Die 2 humanpathogenen Biovarien werden in Serotypen (A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L1, L2, L3) aufgeteilt. Die Serotypen A-K rufen Epithelinfektionen hervor, entweder des Augengewebes (A-C) oder in den Epithelien des Urogenitaltraktes (D-K). Demgegenüber rufen die Serotypen L1-L3 das sexuell übertragene Lymphogranuloma venereum (LGV) hervor.

Außerdem existiert ein Biovar der Maus, das in murinen Tiermodellen zu Pneumonitis führt, aber nicht beim Menschen oder anderen Tieren. In ihren klinischen Manifestationen unterscheiden sich die Serotypen, da die LGV-Stämme ein invasiveres Krankheitsbild mit Beteiligung der Submukosa und der entsprechenden Lymphknoten hervorrufen, wohingegen die restlichen Stämme eher oberflächliche, sich an der Mukosa ausbreitende Pathogene sind.

Einige sehr charakteristische Krankheitsbilder werden von diesen Erregern hervorgerufen, wie das Trachom (gr.: „raues Auge“), auch Körnerkrankheit genannt, durch dessen Untersuchung von Halberstaedter und Prowazek 1907 die Einschlußkörper erstmals beschrieben wurden (Scholz, 1976). Bekannt ist dieses Krankheitsbild bereits seit 1500 v.Ch. (Schachter, 1999). Diese Augenerkrankung, die der Art den Namen *C. trachomatis* gab, ist weltweit die Hauptursache für Erblindung, vor allem in Entwicklungsländern, wo sie meist endemisch ist. Sie wird hervorgerufen durch Infektionen mit den Serovaren A-C. Klinisch besteht anfangs eine akute Konjunktivitis, die zu einer folliculären Keratokonjunktivitis und Pannusbildung chronifiziert. Wiederholte Exposition führt zu Vernarbung der Bindehaut, wodurch das Augenlid verzogen wird und es damit auf Dauer zu einer Abschürfung der Kornea mit ihrer Destruktion kommt.

Ursächlich für die weit verbreiteten Genitalinfektionen sind die Serovare D-K, die heute als die weltweit am häufigsten sexuell übertragenen bakteriellen Erreger gelten. Da die Symptomatik dieser Infektionen blande verlaufen kann, kommt es oft zu chronischen Verläufen. Sie sind die häufigste Ursache für Sterilität bei Mann und Frau und für Eileiterschwangerschaften (aus Freidank 1998: Chow 1990, Petersen 1995). Die Krankheitsbilder reichen von Urethritis,

Zervizitis, Endometritis oder Peritonitis bei der Frau, über Urethritis, Prostatitis, Epididymitis oder Proktitis beim Mann. Außerdem können eine Konjunktivitis, Arthritis, ein Exanthem und ein Morbus Reiter auftreten.

Werden Neugeborene während des Geburtsvorganges mit *C. trachomatis* über die mütterliche Genitalschleimhaut infiziert, kann es zu Konjunktivitis, Pneumonie, Otitis media und Pharyngitis kommen. In Deutschland besteht ein generelles Screening für Chlamydien während der Schwangerschaft (Mutterschaftsrichtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen). Zudem besteht in Deutschland v.a. bei Jugendlichen eine dringende Notwendigkeit zur Aufklärung über die Folgen einer Chlamydieninfektion, da diese sexuell übertragbare Krankheit noch relativ unbekannt ist und dennoch in einer Studie die Prävalenzen so hoch waren, daß bereits von einer „heimlichen Epidemie“ gesprochen wurde (Gille et al., 2005).

Die invasiveren Serovare L1-L3 rufen die eher systemische Infektion Lymphogranuloma venereum hervor, die ebenfalls sexuell übertragen wird. Ihr Auftreten wird eher in tropischen Regionen als in den westlichen Industrienationen beobachtet. Klinisch treten Fieber, Myalgien, meningeale Reizung und typischerweise eine Schwellung der inguinalen oder femoralen Lymphknoten auf.

Chlamydomphila pneumoniae

Von *Chlamydomphila pneumoniae* existiert bisher nur ein bekannter Stamm (TWAR). Der erst 1989 als eigene Art anerkannte Erreger *C. pneumoniae* weist weltweit eine große Durchseuchung auf. So spricht die Altersverteilung der Antikörper in klinischen Studien dafür, daß sich fast jeder Mensch einmal in seinem Leben mit *C. pneumoniae* infiziert und reinfiziert. Wie der Name erahnen läßt, handelt es sich hauptsächlich um Infektionen des Respirationstraktes. An erster Stelle stehen hierbei die *C. pneumoniae*-Bronchitis und –Pneumonie und die Sinusitis. Diese Krankheitsbilder verlaufen in 70-90% der Fälle asymptomatisch oder uncharakteristisch, weshalb eine Diagnose des Erregers oftmals ausbleibt. *C. pneumoniae* steht seit einiger Zeit in der Diskussion, an der Entstehung von Arteriosklerose, Koronarer Herzkrankheit und Herzinfarkten beteiligt zu sein.

C. psittaci ruft die sogenannte Psittakose hervor, eine Erkrankung, die durch Vögel übertragen wird, und als schwere, atypische Pneumonie in Erscheinung tritt.

Chlamydien sind empfindlich auf Antibiotika, die in die bakterielle Proteinbiosynthese eingreifen oder mit der DNS interagieren, wie Tetracykline, Chinolone und Makrolide (Hammerschlag, 2002). Als einziger Erreger ist *C. trachomatis* für Sulfonamide empfindlich. Trotz bisher fehlendem Nachweis von Proteoglykanen in der Zellwand sind Chlamydien empfindlich auf Penicillin, was als „chlamydiale Anomalie“ oder „chlamydial peptidoglycan paradox“ bezeichnet wird. Dies ist wahrscheinlich auf die Methodik der bisher durchgeführten Versuche zurückzuführen, da genetische Untersuchungen auf die Existenz einer Peptidoglykanschicht hinweisen (Bavoil et al., 2000).

Ein Hauptcharakteristikum der Infektion mit Chlamydien ist die Fähigkeit dieser Erreger, in der Wirtszelle monate- oder jahrelang durch persistierende Infektion zu verweilen. In diesem Zustand sind sie unempfindlich gegenüber Antibiotika und ihr Metabolismus ist auf das Nötigste beschränkt. Interessanterweise wird die Wirtszellfunktion während der Infektion kaum gestört, was das stumme und chronische Krankheitsbild erklärt. Möglicherweise spielt diese persistierende Form der Infektion eine wichtige Rolle in der Pathogenese bestimmter chronischer Krankheiten beim Menschen, wie beispielsweise Atherosklerose, Asthma und Arthritis.

1.1.3 Entwicklungszyklus

Einzigartig ist der Entwicklungszyklus, in dem Chlamydien in 2 Formen vorkommen: der nicht vermehrungsfähige, aber infektiöse Elementarkörper (EB) und der sich replizierende, nicht infektiöse Retikularkörper (RB). Der sporenhähnliche Elementarkörper ist spezialisiert für das Überleben außerhalb der Zelle, wohingegen der Retikularkörper für die Vermehrung und den Stoffwechsel innerhalb der Wirtszelle verantwortlich ist. Der infektiöse, extrazellulär vorkommende Elementarkörper (0,3 μm) dockt an ein noch unbekanntes Protein der Wirtszelloberfläche und wird internalisiert. Dies erfolgt in Form eines membrangebundenen Vesikels, in dem sich der Elementarkörper 1-2h nach Eintritt in die Zelle in den Retikularkörper differenziert. Die intrazelluläre Entwicklung erfolgt in einer membranumschlossenen Vakuole, auch Inklusion genannt, in der die Erreger sich abseits der verteidigenden Mechanismen ihres Wirtes vermehren können und sich somit eine Überlebensnische geschaffen haben. Sie umgehen die Fusion mit lysosomalen Kompartementen der Wirtszelle und treten in Kontakt mit sphingomyelinhaltigen exozytischen Vesikeln (Hackstadt et al., 1996). Der Retikularkörper vermehrt sich nun in dem immer größer werdenden Vesikel durch Zweiteilung. Je nach Spezies differenzieren sich die Retikularkörper nach 24-48h wieder in Elementarkörper zurück, die Zelle

wird lysiert und die so freigelassenen Elementarkörper können wieder neue Zellen infizieren (Abb.1). Der komplette Zyklus variiert abhängig von der Spezies von 36h-72h (Hackstadt, 1999b). Ein Charakteristikum von Chlamydien ist die Fähigkeit, in der Zelle zu persistieren als vergrößerte, abnorme Retikularkörper mit der Folge eines veränderten und verlängerten Entwicklungszyklus. Die Retikularkörper sind nicht mehr fähig zur Zellteilung und die Reifung zu Elementarkörpern bleibt aus (Hammerschlag, 2002). Diese Effekte werden durch Antibiotika, fehlende Nährstoffe oder Zytokine ausgelöst (Hammerschlag, 2002).

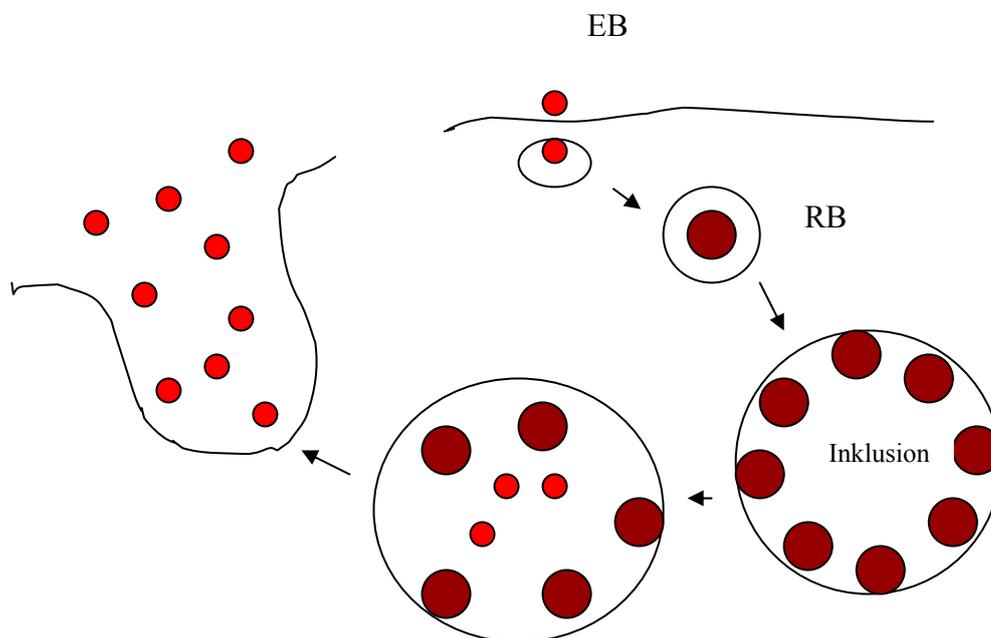


Abb. 1. Schematische Darstellung des Chlamydien-Entwicklungszyklus am Beispiel von *C. trachomatis*. Der infektiöse Elementarkörper (EB) adhärert an der Wirtszellmembran und wird internalisiert. Intrazellulär befindet er sich in einer membranumschlossenen Vakuole, die auch Inklusion genannt wird. In den ersten 2 Stunden nach Infektion differenziert sich der Elementarkörper in den größeren, metabolisch aktiven Retikularkörper (RB). Es erfolgt die Vermehrung der Retikularkörper durch Zweiteilung ab 12 h.p.i. (hours post infection) in dem immer größer werdenden Einschlußkörper. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Retikularkörper von *C. trachomatis* an der Innenmembran und nicht im Lumen des Einschlußkörpers. Ca. 18h nach Infektion beginnen sich die Retikularkörper in Elementarkörper zurückzudifferenzieren, die sich bei *C. trachomatis* im Lumen der Vakuole sammeln. Es erfolgt die Freisetzung der infektiösen Elementarkörper nach ca. 32-72h in die zelluläre Umgebung mit Beginn eines neuen Zyklus.

1.1.4 Infektionszyklus

1.1.4.1 Adhäsion

Der genaue Adhäsionsmechanismus von Chlamydien ist bis heute noch nicht bekannt. Der oder auch die möglichen, unbekanntenen chlamydialen Liganden und Membranrezeptoren wurden bisher noch nicht identifiziert. So stehen eine Reihe von Oberflächenmolekülen als Adhäsine zur Diskussion: das Major Outer Membrane Protein (MOMP) (Su et al., 1996), Heparan-sulfat-like Glykosaminoglykan (Zhang and Stephens, 1992) und das Elementarkörper-spezifische Zysteine-reiche OMP2 (Ting et al., 1995). Für das Serovar L2 von *C. trachomatis* wurde als Ligand MOMP und als Rezeptor auf der Zielzelloberfläche in früheren Studien Heparan-Sulfat beschrieben (Su et al., 1996). Das Heparan-sulfat-like Molekül an der Oberfläche von Elementarkörpern von *C. trachomatis* bindet offensichtlich an Fibronectinmoleküle der Wirtszellmembran (Kleba et al., 2002). In einer neueren Studie wurde PmpD (polymorphic membrane protein D) von *C. pneumoniae*, das als Autotransporter fungiert, als Adhäsion an der Wirtszellmembran beschrieben (Wehrl et al., 2004). Das chlamydiale Heat Shock Protein 70 (Hsp70) spielt möglicherweise in einem späteren Schritt nach der initialen Adhäsion eher in der Festigung der Membranbindung eine Rolle (Raulston et al., 2002).

Die meisten Chlamydien-Spezies binden offensichtlich durch elektrostatische Interaktionen reversibel an Heparan-sulfat-Proteoglycane an der Wirtszellmembran (Zhang et al., 1992; Su et al., 1996; Chen and Stephens, 1994; Wuppermann et al., 2001; Matyszak et al., 2002) und in einem zweiten, irreversiblen Schritt an einen noch unbekanntenen Rezeptor (Carabeo et al., 2001). Es scheint, daß das entscheidende Molekül bereits vor Adhäsion in der Membran des Elementarkörpers verankert ist, da eine de novo Proteinbiosynthese nicht nötig ist (Friis, 1972) und auch Membranhüllen der Elementarkörper alleine internalisiert werden (Eissenberg et al., 1983).

Studien mit CHO-Zellen (chinese hamster ovary cells) gaben den Hinweis auf einen gleichen Adhäsionsmechanismus von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*, denn die Zellen, die resistent für die Infektion mit *C. trachomatis* waren, waren es auch für *C. pneumoniae* (Fudyk et al., 2002). Diese Studien zeigten auch, daß beide Spezies zwar wahrscheinlich den gleichen Adhäsionsmechanismus teilen, aber die darauf folgenden Schritte wie Internalisation oder Wirtszellmodifikation sich unterscheiden.

In Anbetracht der unterschiedlichen Pathogenitätsmuster der verschiedenen chlamydialen

Spezies und Biovare ist es wahrscheinlich, daß Chlamydien sich an mehrere Rezeptoren und damit Adhäsionsmechanismen adaptiert haben.

1.1.4.2 Invasion

Chlamydien verfügen über die Fähigkeit, sich Zugang zu nicht phagozytierenden Zellen, wie z.B. Epithelzellen, zu verschaffen, die normalerweise für Bakterien impermeabel sind. Über den genauen Internalisationsmechanismus von Chlamydien liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. Es scheint, daß die Aufnahme der Chlamydien wahrscheinlich multifaktoriell ist und abhängig von der jeweiligen Chlamydienart, der Wirtszelle und der Inokulationsmethode, die bei Versuchen verwendet wird. So wurde die rezeptorvermittelte Endozytose (RME) in Clathrin-coated pits in polarisierten Epithelzellen (Wyrick et al. 1989), Pinozytose (Prain and Pearce, 1989) und parasitspezifische Phagozytose (Byrne and Moulder, 1978) beobachtet. In Studien, in denen die Zellen mit *C. psittaci* GPIC und *C. trachomatis* Serovar L2 infiziert wurden, konnte man sowohl Cytochalasin D-empfindliche Phagozytose als auch die Pinozytose als Internalisationsmechanismus nachweisen (Reynolds and Pearce, 1991). Die Phagozytose erhöhte zudem noch die Infektiosität beider Spezies im Vergleich mit dem Mechanismus der Pinozytose. In einer 2001 veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, daß das Serovar K von *C. trachomatis* über caveolinhaltige sphingolipid- und cholesterinreiche Raft-Microdomains der Zellmembran in Makrophagen, Hep-2-Zellen und HeLa 229 Zellen internalisiert wird (Norkin et al., 2001). Die Interaktion mit diesen definierten Domänen ist von einigen Bakterien und Viren bekannt, möglicherweise auch deshalb, weil sie mit Signalmolekülen für Signaltransduktionswege angereichert sind (Simons and Toomre, 2000).

Auch scheint es Unterschiede innerhalb der Serovare zu geben. In einer Studie war die Infektion durch Unterbrechung der Mikrofilamente für *C. trachomatis* Serovar E im Vergleich zu Serovar L2 deutlich reduziert, was ein Hinweis darauf ist, daß beide Serovare möglicherweise einen unterschiedlichen Internalisationsmechanismus und unterschiedliche intrazelluläre Entwicklungsbedingungen benutzen (Schramm and Wyrick, 1995).

In den Internalisationsschritt scheint auch das Aktin-Zytoskelett mitinvolviert zu sein, wobei es durch die Adhäsion zu einem Remodelling von Aktin kommt (Carabeo et al., 2002). Dieses Aktin-Remodelling wird bei Bakterien wie Salmonellen und Shigellen durch Proteinsekretion mittels eines Typ-III-Mechanismus induziert (Hardt et al., 1998; Tran et al., 1999), den Chlamydien mit großer Wahrscheinlichkeit auch besitzen (Fields et al., 2003). Erstmals konnte in

einer Studie gezeigt werden, daß die Internalisation von Chlamydien in die Zelle über ein chlamydiales Effektorprotein vermittelt wird („Tarp“, für translocated actin-recruiting phosphoprotein), das durch einen Typ-III-Mechanismus sezerniert wird (Clifton et al., 2004). Zudem konnte die Aktivierung der wirtszelleigenen GTPase ARF6 durch Chlamydien verantwortlich gemacht werden für das Aktin-remodelling während der Invasion (Balana et al., 2005).

Im Gegensatz zu anderen pathogenen Erregern wie z.B. *Toxoplasma gondii*, scheint aber nicht der Eintrittsmechanismus für das weitere intrazelluläre Schicksal bestimmend zu sein, sondern die chlamydieninduzierte Modifikation des Einschlußkörpers durch die Insertion noch unbekannter Proteine (Scidmore et al., 1996b).

1.1.4.3 Intrazelluläres Überleben und Inklusionbildung

Chlamydien unterbrechen durch unbekannte Mechanismen die physiologische Reifung von einem frühen Endosom zu einem Lysosom. Die normalerweise stattfindende Fusion eines Phagosoms mit frühen Endosomen, späten Endosomen und Lysosomen bleibt bei inokulierten Elementarkörpern aus. Diese Fusionshemmung ist aber auf den Einschlußkörper beschränkt, da die generelle Funktion zur Vesikelfusion in infizierten Zellen nicht unterbrochen ist (Eissenberg and Wyrick, 1981; Heinzen et al. 1996). Offensichtlich scheint die Fähigkeit von Chlamydien, sich der Fusion mit Lysosomen zu entziehen, auch abhängig zu sein von dem Stamm und der Zelllinie, die sie infizieren. So werden die okulogenitalen *C. trachomatis*-Stämme in Makrophagen durch Fusion mit Lysosomen eliminiert, wohingegen die LGV Stämme von *C. trachomatis* in diesen Zellen überleben und sich unabhängig von lysosomaler Fusion replizieren können (Yong et al., 1987).

Nach Internalisation scheinen chlamydienhaltige Vesikel mit dem endozytischen Transportweg nicht in Kontakt zu treten. Ab ca. 2h nach Infektion weist das EB-haltige Phagosom keinen Marker mehr auf, der es als typisches frühes bzw. spätes Endosom oder Lysosom charakterisieren würde. Dazu zählen der Transferrin-Rezeptor (TfR), Transferrin (Tf), der kationunabhängige Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (CI-M6PR), die lysosomalen Marker LAMP1 und 2, Cathepsin D und Saure Phosphatase (Heinzen et al., 1996; Scidmore et al., 2003; van Ooij et al., 1997; Scidmore et al. 1996a; Taraska et al., 1996; Al-Younes et al., 1999). Außerdem fehlen fluid-phase Marker wie Lucifer Gelb (LY) und Fluoreszin-isothiocyanat-dextran (FITC) (Heinzen et al., 1996).

Die 2003 veröffentlichte Studie von Rzomp et al. befaßte sich mit derselben Fragestellung wie die vorliegende Arbeit. Darin konnte die Assoziation von Markern des Recycling-Transportweges, den GTPasen Rab 1, 4 und 11 mit dem Einschlußkörper nachgewiesen werden. In dieser Studie fand man keine Assoziation mit den Wildtypen der GTPasen Rab 5 und Rab7, die für entscheidende Schritte des endozytischen Transportweges wichtig sind, s.u. (Rzomp et al. 2003). Schon früh nach Internalisation (>15min) beginnen Chlamydien die Wirtszelle durch Proteinbiosynthese eigener Proteine für verschiedene Funktionen zu modifizieren (Lundemose et al., 1990; Plaunt and Hatch, 1988). Die weiteren, noch nicht genau bekannten Mechanismen zur Reifung, Wachstum und Replikation scheinen die frühe Proteinbiosynthese der Chlamydien vorauszusetzen, worüber es aber bisher unterschiedliche Ergebnisse gibt (Scidmore et al., 1996b und 2003). Allerdings sind zur Umgehung des degradativen Weges in Richtung Lysosom offensichtlich auch bereits bei Internalisation vorhandene Komponenten notwendig, denn auch nur gereinigte Zellwände von Elementarkörpern allein fusionieren nur langsam mit Lysosomen (Eissenberg et al., 1983).

Offensichtlich sind diese Faktoren aber in ihrem Erfolg auf bestimmte Zelllinien beschränkt. In Monozyten, in denen die Replikation für Chlamydien nicht möglich ist, kommt es zu einer schnellen Fusion mit Lysosomen (Ojcius et al., 1997).

Von Scidmore et al. (2003) wurde folgendes Modell vorgeschlagen: 1. Durch die noch unbekanntenen Komponenten der Elementarkörpermembran wird die Fusion zu einem Endolysosom initial verzögert; dieser Mechanismus erfordert keine Proteinbiosynthese, und 2. In einem weiteren Schritt beginnt die aktive Modifikation der Einschlußkörpermembran durch Synthese entsprechender Proteine.

Als Folge dieser Modifikation entgehen chlamydienhaltige Endosomen der lysosomalen Fusion und werden innerhalb der ersten zwei Stunden nach Internalisation zielgerichtet in die peri-Golgi-Region transportiert (Hackstadt et al., 1996; Scidmore et al., 1996b; Higashi 1965; Majeed and Kihlstrom, 1991). Diese Umverteilung scheint von dem Mikrotubulinetzwerk der Wirtszelle abhängig zu sein (Clausen et al., 1997), erfordert zum einen die Beteiligung von F-Aktin und Clathrin (Majeed and Kihlström, 1991) und zum anderen die frühe Proteinsynthese der Elementarkörper (Scidmore et al., 1996b). Wahrscheinlich werden dafür ebenso Proteine durch einen Typ-III-Apparat sezerniert. Zudem scheint die Translokation in Richtung perinukleärer Region dyneinabhängig zu sein (Grieshaber et al., 2003). Dynein ist ein wichtiger Motor für den Transport in Richtung des Minus-Endes der Mikrotubuli, das am MTOC (mikrotubule-organizing center) verankert ist.

Das Aktin-bindende Protein Cortactin läßt sich bis 20 h.p.i. assoziiert mit *C. trachomatis*-Einschlußkörpern finden (Fawaz et al., 1997). Durch die Infektion mit *C. trachomatis* kommt es zur gesteigerten Tyrosin-Phosphorylierung von einigen noch unbekanntem Wirtszellproteinen und möglicherweise auch von Cortactin (Fawaz et al. 1997; Birkelund et al., 1994). Möglicherweise kommt es dadurch zur Aktivierung von Signaltransduktionswegen mit Rearrangement des Zytoskeletts, um die Internalisation zu fördern. Diese Tyrosin-Phosphorylierung scheint noch vor dem Transport zur Golgi-Region stattzufinden, da sie bereits in den ersten 10 Minuten nach Invasion nachzuweisen ist (Fawaz et al., 1997).

Nachdem die Elementarkörper in die Golgi-Region transportiert wurden, treten sie 2h nach Infektion mit dem exozytischen Transportweg in Kontakt, indem sie mit sphingomyelinhaltigen Vesikeln fusionieren, das endogen im Golgi-Apparat aus C6-NBD-Ceramid synthetisiert wurde und deren Destination eigentlich die Exozytose an der Plasmamembran ist (Hackstadt et al., 1995; Hackstadt et al., 1996). In der Folge wird 40-50% des endogen synthetisierten Sphingomyelin in die Zellwand der Chlamydien eingebaut (Scidmore et al., 1996a). Diese Interaktion ist temperatur-, zeit- und energieabhängig (Hackstadt et al., 1996; Wolf and Hackstadt, 2001). Dies gilt sowohl für *C. trachomatis* und *C. psittaci* als auch für *C. pneumoniae* (Hackstadt et al., 1995; Rockey et al., 1996; Wolf and Hackstadt, 2001). Dieser Mechanismus bleibt nach bisherigen Erkenntnissen auf Chlamydien beschränkt, da andere intrazelluläre Pathogene wie z.B. *Coxiella burnetii* kein Sphingomyelin aquirieren (Heinzen et al., 1996). Diese Interaktion führte zu der These, daß der Einschlußkörper im Grunde ein exozytisches Vesikel darstellt, dessen Transport und Fusion zur bzw. mit der Plasmamembran verzögert bzw. inhibiert wird. Interessanterweise bleiben die normalen Abläufe bzw. Transportwege in infizierten Zellen relativ unbeeinträchtigt, da die lysosomale Fusionsfunktion und Exozytose nicht unterbrochen werden (Eisenberg and Wyrick, 1981; Heinzen et al., 1996; Scidmore et al., 1996a).

Weitere Studien konnten zeigen, daß Chlamydien auch Phosphatidylcholin, Phosphatidylinositol, Cardiolipin und Cholesterin zum Wachstum sowohl von der Wirtszelle aquirieren, als auch zur eigenen Synthese von Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol und Phosphatidylserin fähig sind (Wylie et al., 1997). Offensichtlich versuchen die Erreger dadurch, die Inklusionmembran der Wirtszellmembran bezüglich ihrer Molekülzusammensetzung anzugleichen (Hatch and McClarty, 1998).

Es sind bisher nur wenige Wirtszellproteine bekannt, die intrazellulär mit der Einschlußkörpermembran in Verbindung stehen. So wurden Caveolin-1 und Caveolin-2 in Assoziation mit der Membran von *C. trachomatis* Serovar E, F und K, *C. pneumoniae* und *C. caviae*

nachgewiesen. Darüberhinaus fand sich eine Assoziation von ausschließlich Caveolin-2 mit *C. trachomatis* Serovar A-C (Webley et al., 2004).

1.1.4.4 Inclusion Membrane Proteins (Inc)

Die Reifung des Einschlußkörpers mit noch unbekanntem Merkmalen scheint für Chlamydien essentiell zu sein, denn sie sichert das intrazelluläre Überleben. Dabei scheint nicht die Art der Aufnahme eine Rolle zu spielen, sondern die Fähigkeit eigene Proteine zu synthetisieren und damit das Vesikel zu modifizieren (Scidmore et al., 1996b).

In den letzten Jahren wurde in genomischen Untersuchungen die Codierung mehrerer chlamydialer Proteine der Einschlußkörpermembran entdeckt, die die einzigen bisher bekannten bakteriellen Proteine darstellen, die in einer Vakuolenmembran verankert sind und die in ihrer Bedeutung und Funktion zum Großteil noch unbekannt sind. Von diesen sog. Inclusion Membran Proteins (Inc) wurden bisher mehr als 40 im Genom von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* gefunden (Bannantine et al., 2000). Mit Ausnahme von den 2 ebenfalls mit der Einschlußkörpermembran assoziierten Proteinen CopN und Cap1 liegt jedem Inc-Protein als Gemeinsamkeit eine hydrophobische Domäne zugrunde. Incs scheinen chlamydienspezifisch zu sein, da sich bisher keine ähnlichen Proteine in den vorhandenen Datenbanken finden lassen. Zudem unterscheiden sich Inklusionmembranproteine innerhalb der verschiedenen Chlamydienspezies, was eine speziesspezifische Modifikation der Inklusionmembran möglich macht.

Bis jetzt ist IncA das einzige Protein, dem eine Funktion zugewiesen werden konnte. Offensichtlich spielt das IncA-Protein eine wichtige Rolle bei der homotypischen Einschlußkörperfusion, d.h. der Fusion von zwei Einschlußkörpern derselben chlamydialen Spezies in einer Zelle, da durch Zugabe von Antikörpern gegen *C. trachomatis* IncA keine Einschlußkörperfusion zu beobachten war und dieses Protein bei nichtfusionierenden Stämmen nicht in der Membran zu finden sind (Hackstadt et al., 1999; Suchland et al., 2000). In BLAST-Untersuchungen konnte kein IncA-Homolog bei *C. pneumoniae* nachgewiesen werden, was in Einklang mit der Beobachtung einer Studie von Fields steht, in der nichtfusionierende, multiple Einschlußkörper von *C. pneumoniae* gezeigt werden konnten (Fields et al., 2002). Widersprüchlicherweise läßt sich IncA aber bei nichtfusionierenden Stämmen von *C. psittaci* nachweisen, was nicht identische Funktionen der Incs innerhalb der Spezies vermuten läßt (Rockey et al., 1995). Die Membranproteine IncD-G lassen sich bereits innerhalb der ersten zwei

Stunden nach Invasion in der Inklusionmembran nachweisen, was einen möglichen Einfluß auf die frühe Modifikation des Einschlußkörpers bedeutet (Scidmore-Carlson et al., 1999). So wäre es möglich, daß durch die Membranproteine die Fusion mit Lysosomen umgangen und die Interaktion mit dem exozytischen Transportweg in die Wege geleitet wird.

1.1.4.5 Typ-III-Sekretion

Ein Typ-III-Sekretionssystem ermöglicht gramnegativen Bakterien die Sekretion und Injektion spezifischer Proteine als Virulenzfaktoren in das Zytoplasma ihrer Wirtszelle, um damit bestimmte Signaltransduktionswege des Wirtes zu modifizieren (Hueck, 1998). Erreger wie Yersinien, Shigellen und Salmonellen sezernieren so Pathogenitätsproteine. Schon bevor das komplette Genom von *C. trachomatis* sequenziert wurde, gab es Hinweise darauf, daß Chlamydien Typ-III-Sekretions-Gene besitzen (Hsia et al., 1997). Auch die Beschreibung von Oberflächenprojektionen an Retikularkörpern von *C. psittaci* durch Matsumoto 1982 konnten durch modernere elektronenmikroskopische Techniken und Vergleiche mit dem Typ-III-Apparat von Salmonella als wahrscheinliches Typ-III-Sekretionssystem bestätigt werden (Matsumoto, 1982a und 1982b; Kubori et al., 1998). Durch die vollständige Sequenzierung konnte schließlich gezeigt werden, daß Chlamydien einen Typ-III-Sekretionsapparat codieren (Stephens et al., 1998). Zudem fanden sich Beweise, daß dieser Apparat, zumindest unter experimentellen Bedingungen, auch funktioniert (Fields and Hackstadt, 2000). Offenbar unterscheidet sich dieser aber in Bezug auf die Anordnung der Gene und die Anzahl der kodierten Proteine von dem anderer Bakterien und impliziert damit auch die Einzigartigkeit dieses Erregers bezüglich seiner intrazellulären Abwehrstrategien (Rockey et al., 2000). Da man die Projektionen sowohl auf Retikularkörpern, als auch auf Elementarkörpern finden kann, besteht die Möglichkeit, daß die Funktion dieser Typ-III-Sekretion nicht nur in der Versorgung der Vakuole mit Nährstoffen und der Interaktion mit der Wirtszelle besteht, sondern bereits in einem frühen Stadium der Infektion die Pathogenese und die Infektiosität von Elementarkörpern beeinflusst.

In einem heterologen System konnten Inc A-C von *C. pneumoniae* durch den Typ-III-Sekretionsapparat des Erregers *Shigella flexneri* sezerniert werden (Subtil et al., 2001). Diese Ergebnisse unterstützen die Vorstellung, daß Inc-Proteine durch ein Typ-III-Sekretionssystem in die Einschlußkörpermembran eingebaut werden (Fields and Hackstadt, 2000). Ebenso konnte die Sekretion von Tarp (translocated actin-recruiting phosphoprotein) durch das Typ-III-System nachgewiesen werden (Clifton et al., 2004).

1.1.4.6 Homotypische Fusion

In der Zelle haben die Einschlußkörper die Fähigkeit, zu einer großen Vakuole zu fusionieren. Bezüglich dieser Fusion einzelner Vesikel in einer Wirtszelle unterscheiden sich die jeweiligen Arten aber deutlich. So findet man in Epithelzellen, die von *C. psittaci* oder *C. pneumoniae* multipel infiziert wurden, kleine einzelne Einschlußkörper, die keine Tendenz zeigen zu fusionieren. Wird die Zelle dagegen von mehreren *C. trachomatis* Elementarkörpern infiziert, so fusionieren diese ab ca. 10 h.p.i. zu einem einzelnen großen Inklusion. Die homotypische Fusion scheint ein spätes Ereignis der Einschlußkörperentwicklung darzustellen, da sie bis 24 h.p.i. beobachtet werden kann (Hackstadt et al., 1999a). Interessanterweise können auch Einschlußkörper von 2 verschiedenen Serotypen fusionieren, wie es bei *C. trachomatis* Serovar E mit F und J mit K beobachtet wurde (Ridderhof and Barnes, 1989; Suchland et al., 2000). Keine Fusion findet sich dagegen zwischen zwei verschiedenen Arten, wie z.B. *C. trachomatis* und *C. psittaci*. In Zellen, die mit diesen beiden Spezies doppelt infiziert wurden, fusionierten alle *C. trachomatis* Vesikel zu einem einzigen Einschlußkörper, wohingegen die *C. psittaci*-haltigen Endosomen weiterhin als multiple, kleine Vesikel zu erkennen waren (Matsumoto et al., 1991).

Eine homotypische Fusion findet nicht statt, wenn die Proteinbiosynthese der Bakterien durch Chloramphenicol gehemmt wird oder bei einer Inkubationstemperatur von 32°C (van Ooij et al., 1998). Wie bereits weiter oben erwähnt, scheint die homotypische Fusion auch von dem Einschlußkörpermembranprotein IncA abhängig zu sein. In Versuchen mit Isolaten von *C. trachomatis* in Epithelzellen, fehlte bei den nichtfusionierenden Stämmen IncA in ihrer Vakuolenmembran (Suchland et al., 2000).

Die Tatsache, daß die homotypische Fusion von *C. trachomatis* Serovar L2 durch das mikrofilamentzerstörende Cytochalasin D bis >36 h.p.i. stark verzögert wurde, gibt einen Hinweis auf eine Beteiligung des Zytoskeletts bei diesem Fusionsschritt (Schramm and Wyrick, 1995).

1.1.4.7 Reorganisation innerhalb des Einschlußkörpers

Innerhalb der ersten 2 Stunden nach Internalisation beginnen die Elementarkörper sich in Retikularkörper zu differenzieren. Dies läßt sich erkennen an der Auflösung/Entknäuelung des Chromatins als Zeichen verstärkter Transkription und an dem Verlust an Infektiosität (Hackstadt, 1999b).

Chlamydien vermehren sich nach bisheriger Meinung durch Zweiteilung, die nach ca. 12h beginnt. Diese bislang angenommene Art der Reproduktion wurde durch neue Versuche in Frage gestellt. Durch die Sequenzierung des Genoms von Chlamydien entdeckte man, daß sie kein FtsZ-Homolog codieren, was seinerseits aber einen wichtigen Faktor für die Zweiteilung bei Bakterien darstellt (Stephens et al., 1998).

Durch die Differenzierung zu Retikularkörpern kommt es zu einer Größenzunahme der Partikel innerhalb der ersten 8-12 h.p.i.. Während Elementarkörper einen Durchmesser von nur 0,3 µm aufweisen, sind Retikularkörper mit 0,8-1 µm dreifach so groß.

Charakteristischerweise findet man bei *C. trachomatis* die nun ausdifferenzierten Retikularkörper ausschließlich an der Innenseite der Einschlußkörpermembran und nicht im Inneren der Vakuole (Hackstadt et al., 1997). Diese Lage prädestiniert die Retikularkörper, über die Einschlußkörpermembran Kontakt zu ihrer Wirtszelle aufzunehmen und dadurch Nährstoffe und Energiemetaboliten zu aquirieren. Das würde auch die Beobachtung unterstützen, daß die chlamydialen Projektionen durch die Einschlußkörpermembran an Stellen zu finden sind, an denen Retikularkörper besonders eng an die Membran gebunden sind. Im Gegensatz dazu sind Retikularkörper von *C. pneumoniae* in der gesamten Vakuole verteilt (Wolf et al., 2000).

Nach ca. 18 h.p.i. beginnen sich bereits einige Retikularkörper von *C. trachomatis* wieder in Elementarkörper zurückzudifferenzieren, die sich dann im Lumen des Einschlußkörpers sammeln (Wyrick, 2000).

1.1.4.8 Release

Die Zerstörung der Wirtszelle und die Freisetzung der infektiösen Elementarkörper in die Umgebung erfolgt, abhängig von den unterschiedlichen Stämmen, ab 36 Stunden nach Infektionsbeginn (Hackstadt, 1999b). Über die Mechanismen, die dazu führen, ist noch wenig bekannt. So führen die LGV-Stämme von *C. trachomatis* zu einer kompletten Zerstörung der Wirtszelle und damit zur Freisetzung der Elementarkörper. Andere Serovare wie *C. trachomatis* D wählen einen weniger zerstörerischen Weg und schleusen ihren reifen Einschlußkörper durch einen Exozytose-ähnlichen Prozeß über die Zellmembran aus der Wirtszelle (Todd and Caldwell, 1985). Außerdem wurde eine Rotation des Einschlußkörpers beobachtet, die in ein Aufplatzen der gesamten Zelle mündete mit der folgenden Freisetzung der Pathogene (Wyrick, 2000).

1.2 Funktionen der Rab GTPasen

1.2.1 Rab GTPasen: ihre Rolle im endozytischen Transport der eukaryoten Zelle

Rab GTPasen gehören zu der Superfamilie der Ras GTPasen, die vielfältige Funktionen bezüglich Vesikeltransport und Organellbewegungen innerhalb einer Zelle ausführen. Der Name Rab leitet sich ab von „*ras*-like in rat *brain*“, hervorgegangen aus Versuchen mit Säugetieren (Touchot et al., 1987). Sie lassen sich an der zytosolischen Seite an Membranen von Vesikeln und Organellen finden und kontrollieren die endozytischen, sekretorischen und exozytotischen Transportwege, indem sie die Interaktion von Molekülen an der Transportvesikelmembran mit Molekülen der Akzeptormembran regulieren. Sie sind involviert in die Reifung, das Andocken und die Fusion von Vesikeln. Neuere Studien geben auch Hinweis auf eine Involvierung in Transportfunktionen entlang des Zytoskelettes (Nielsen et al., 1999). Durch Genom-Studien ließ sich bis jetzt die Codierung von 60 verschiedenen Rab GTPasen in menschlichen Zellen finden (Bock et al., 2001), von denen für einige angenommen wird, in den verschiedenen Stadien des Vesikelverkehrs spezifische Funktionen in Bezug auf Transport, Targeting und Fusion von Vesikeln innezuhaben.

So scheinen Rab GTPasen und sog. SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment/acceptor receptor) zu interagieren, eine zweite Gruppe von Proteinen, die für die zielgerichtete Zusammenführung von Vesikeln nötig sind (McBride et al., 1999).

Speziell der frühe endozytische Transportweg (Abb.2) gibt der eukaryoten Zelle die Möglichkeit, Partikel gleich nach Internalisation zu sortieren durch das Einschleusen in Abbau- bzw. Verarbeitungswege; er basiert prinzipiell auf der Fusion von Zellorganellen mit spezialisierten Vesikeln. Dadurch lassen sich endozytierte bzw. auf anderem Wege internalisierte Moleküle aussortieren und in die jeweilige intrazelluläre Region bringen, für die sie bestimmt sind. Dies gilt für Rezeptoren, Membranproteine, Nährstoffe und pathogene Erreger, die in speziellen Vesikeln verpackt in die jeweiligen Zielorganellen transportiert werden. Diese komplexen Abläufe und Interaktionen sind bis jetzt noch wenig verstanden, deshalb wird folgende Beschreibung nur ein schematisches Bild wiedergeben können.

Die endozytischen Organellen können in frühe und späte Kompartimente aufgeteilt werden. Nach Endozytose werden internalisierte Moleküle, umschlossen von einer Zellmembran, zu sogenannten „frühen Endosomen“ transportiert, die durch spezielle Marker als solche charakterisiert werden, und fusionieren mit diesen. Die Reifung eines Endosoms ist ein komplexer Prozess, in den ein dynamischer Austausch von endosomalen Markern mit

intrazellulären Kompartimenten involviert ist. Jedem Schritt des Reifungsprozesses nach Endozytose können spezielle Marker zugeordnet werden. Diese Marker werden von verschiedenen Membranproteinen gebildet und sind nützlich für die Unterscheidung zwischen den jeweiligen Endosomen untereinander. Die „frühen Endosomen“ sind beispielsweise durch den Transferrinrezeptor (TfR) und early endosome antigen 1 (EEA1) als solche erkennbar. Die Hauptaufgabe dieser Endosomen ist es, die internalisierten Liganden von ihren Rezeptoren zu trennen, die Rezeptoren zu „recyclen“ und die Liganden auszusortieren zu ihrer Degradation im Lysosom. Diesen ersten Schritt kontrollieren die GTPasen Rab4, Rab5 und Rab11 (Bucci et al., 1992; Gorvel et al., 1991; Ullrich et al., 1996; Daro et al., 1996). Der Weg zu den Lysosomen führt von den „frühen Endosomen“ über die „späten Endosomen“, die durch den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor charakterisiert sind. In diesen Schritt des Vesikelverkehrs ist die spezifische RabGTPase Rab7 involviert (Feng et al., 1995). Die Marker der Lysosomen sind Cathepsin D und LAMPs (Lysosome-associated membrane proteins), auch lysosomal membrane glycoproteins (lgps) genannt. Sie zeigen aber keinen CI-M6PR, weshalb sie auch als lgp-positiv, CI-M6PR-negativ beschrieben werden (Kornfeld and Mellman, 1989).

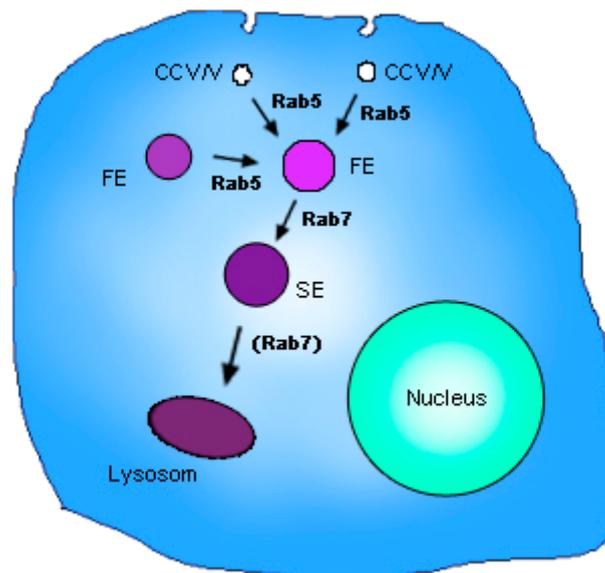


Abb. 2. Intrazellulärer Vesikeltransport am Beispiel des endosomal Transportweges mit Rab GTPasen. Nach Endozytose befinden sich inkorporierte Proteine oder Pathogene in speziellen Vesikeln (CCV (Clathrin coated vesicles)/V (Vesikel)), die in einem ersten Schritt mit den frühen Endosomen (FE) fusionieren. Für die Fusion von inkorporiertem Vesikel mit den frühen Endosomen ist Rab5 essentiell, ebenso wie für die Fusion von FE mit FE. In einem nächsten Schritt, der Rab7 benötigt, kommt es zur Fusion von frühem Endosom mit spätem Endosom (SE). Der weitere Transport endet im sauren Lysosom. Für diesen letzten Schritt ist möglicherweise auch Rab7 zur Regulation notwendig.

Die Reifung eines Endosoms scheint ein dynamischer Prozess zu sein, der vermutlich viele transiente Fusionsereignisse beinhaltet, die von Desjardins als „kiss and run“ Hypothese bezeichnet wurden (Desjardins, 1995). Prinzipiell gehen diesen Weg alle internalisierten Partikel, hätten nicht einige pathogene intrazelluläre Erreger Strategien entwickelt, die diese streng gerichtete Vesikelreifung umgehen bzw. verhindern.

1.2.2 Rab5

Rab5 ist die bisher am ausführlichsten untersuchte Rab-GTPase. Sie läßt sich assoziiert mit der Plasmamembran, den frühen Endosomen und in Clathrin-coated Vesikeln finden (Chavrier et al., 1990; Stenmark et al., 1994a; Bucci et al., 1992; Stenmark and Olkkonen, 2001). Die speziellen Funktionen von Rab5 sind nach bisherigen Kenntnissen limitierend für die Endozytose (Bucci et al., 1992; Stenmark et al., 1994b) und die Fusion von endozytierten Vesikeln mit frühen Endosomen (Gorvel et al., 1991; McLauchlan et al., 1998).

Die meisten endozytierten Moleküle werden zu spezifischen Kompartimenten in der Zelle gebracht außer die Rezeptoren, die hauptsächlich „recycled“ werden, d.h. die zur Zellmembran zurückgebracht und in eine erneute Runde eingeschleust werden. Einige internalisierte Partikel fusionieren mit dem Lysosom, in dem die meisten Proteine durch den niedrigen pH-Wert zerstört werden. Speziell dieser Weg stellt eine erfolgreiche Möglichkeit der Wirtszelle dar, unerwünschte inkorporierte Pathogene zu bekämpfen und unschädlich zu machen. Viele intrazelluläre Erreger haben speziell Rab5 zum Angriffspunkt gemacht, um der Degradation zu entgehen. *Mycobacterium bovis* entgeht durch Rab5-Retention an der Phagosommembran der Reifung des Phagosomes zu einem Phagolysosom (Via et al., 1997; Clemens et al., 2000). Rab5 läßt sich nicht an Phagosomen von Legionellen nachweisen, wodurch sich dieser Erreger von dem endosomalen Transportweg isoliert (Clemens et al., 2000).

Bis jetzt existieren einige Effektorproteine, die die Funktion von Rab5 unterstützen. Der wahrscheinlich wichtigste Effektor scheint EEA1 (early endosome antigen 1) zu sein, der sich auch an den entsprechenden endozytierten Vesikeln finden läßt (Simonsen et al., 1998; Christoforidis et al., 1999a). Der Effektor-Komplex aus Rabaptin-5 und Rabex-5 ist essentiell für die endozytische Membranfusion (Horiuchi et al., 1997). Auch Phospholipase A und Phosphatidylinositol-3-Kinase sind in die Rab5-Funktion involviert (Barbieri et al., 1996; Li et al., 1995; Christoforidis et al., 1999b), was auf eine enge Assoziation mit Signalwegen hinweist.

Rab5 liegt in der Zelle in drei verschiedenen Isoformen vor, die mit a, b und c bezeichnet

werden. Alle drei scheinen in die Endozytose und in den endozytischen Transport in eukaryotischen Zellen involviert zu sein (Bucci et al., 1995). Die Unterschiede in ihren Funktionen kennt man bis heute noch nicht. In vorliegenden Versuchen wurde ausschließlich die Rab5a-Form verwendet.

1.2.3 Rab7

Rab7 läßt sich an späten Endosomen nachweisen (Stenmark and Olkkonen, 2001). Es reguliert den Transportschritt von frühen Endosomen zu späten Endosomen und ist dafür essentiell (Feng et al., 1995; Vitelli et al., 1997; Mukhopadhyay et al., 1997). Außerdem scheint diese GTPase in die Aggregation bzw. die Fusion von Lysosomen involviert zu sein (Bucci et al., 2000).

Auch diese GTPase wird von Pathogenen zum intrazellulären Überleben benutzt. So wird das Überleben von *Mycobacterium bovis* zusätzlich zur Retention von Rab5 durch Ausschluß von Rab7 gesichert, wodurch die Reifung des Phagosomes zu einem Phagolysosom unterbunden wird (Via et al., 1997; Clemens et al., 2000). Im Gegensatz dazu ist für den Erreger *Coxiella burnetii* das saure Milieu eines speziellen Phagosoms überlebenswichtig, an dessen Membran vermehrt Rab7 nachgewiesen wurde (Heinzen et al., 1996; Beron et al., 2002). Eine Erhöhung des lysosomalen pH-Wertes durch den V-ATPase-Hemmer Baf A führte zur Wachstumshemmung des Erregers (Heinzen et al., 1996). Durch die Retention von Rab7 ist die weitere Reifung dieses Phagosoms unterbrochen (Beron et al., 2002).

Der einzige bisher bekannte Effektor für Rab7 ist das Rab7-interacting lysosomal protein (RILP), dessen Funktion die Vermittlung der Fusion zwischen spätem Endosom und Lysosom ist (Cantalupo et al., 2001; Jordens et al., 2001).

1.2.4 Der Rab-Zyklus

Rab GTPasen sind zelluläre Schalter, die im „An-Zustand“ (GTP-gebunden) oder „Aus-Zustand“ (GDP-gebunden) existieren. Innerhalb des Zytosols liegen sie in der inaktiven GDP-Form vor, fixiert mit einem Inhibitor-Protein: GDI (GDP dissociation inhibitor).

Das Modell des Rab-Zyklus soll im folgenden an dem Beispiel der GTPase Rab5 erklärt werden: Der Funktionszyklus beginnt mit dem Austausch von GDP gegen GTP durch den Guanin Nukleotid Exchange Faktor (GEF). Die GTPase ist selbst auch zur Hydrolyse fähig, nur viel

langsamer und in viel niedrigeren Raten. Durch den Austausch ist Rab5 aktiviert und kann mit Hilfe des Rab-Effektors Rabaptin-5 an eine Vesikelmembran binden. Nach erfolgter Vesikelfusion wird GTP durch ein GTPase-activating protein (GAP) zu GDP hydrolysiert, wodurch Rab5 wieder inaktiviert ist und die Bindung mit Rabaptin5 löst. Der inaktivierte Rab5-GDP-Komplex wird durch Assoziation mit GDI in das Zytosol entlassen, interagiert mit Rab escort protein (REP) und ist bereit für einen neuen Zyklus (Abb.3).

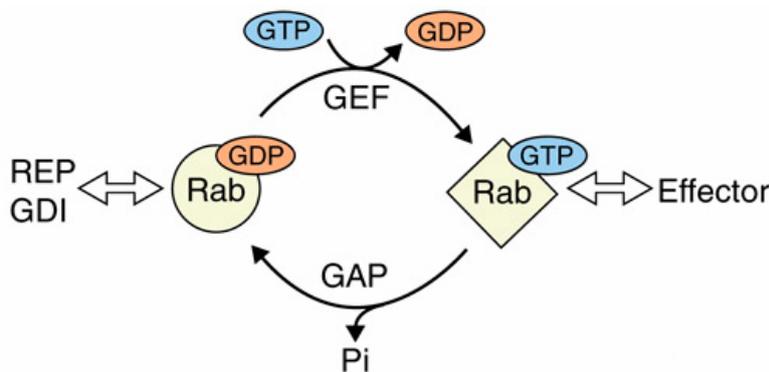


Abb. 3. Schematische Darstellung des Modells des Rab-Zyklus. Weitere Ausführungen siehe Text. (aus: Stenmark and Olkkonen, 2001, 3007.1).

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Chlamydien vermehren sich intrazellulär in einem membrangebundenen Einsschlußkörper, der nicht mit Lysosomen fusioniert. Ebenso wie Legionellen, Mykobakterien und Toxoplasmen besitzen sie eine spezielle Strategie, die ihr intrazelluläres Überleben gegenüber den Verteidigungsmechanismen des Wirtes sichert. Bisher ist unverstanden, wie und wodurch Chlamydien ihren Einschlußkörper und ihre Wirtszelle modifizieren. Als fremd erkannte Organismen werden normalerweise über das endozytische Vesikelsystem zum Abbau in die Lysosomen transportiert. Da die Einschlußkörpermembran keine typischen frühen Marker wie Transferrin-Rezeptor, lysosomale Saure Phosphatase oder lysosomale Membranproteine LAMP1 und LAMP2 aufweist, lag die Vermutung nahe, daß bereits in dieser frühen Phase ein Mechanismus bestehen muß, diesen Weg zu umgehen. Die GTPasen Rab5a und Rab7 sind essentielle Regulatoren des frühen endozytischen Transportweges und könnten somit Einfluß auf die Inklusionbildung und/oder- reifung haben.

In vorliegender Arbeit sollte die Einschlußkörperentwicklung von *Chlamydia trachomatis* unter Einfluß der GTPasen Rab5a bzw. Rab7 und ihrer Mutanten in HeLa- Zellen beobachtet werden.

Zudem sollten quantitative Aspekte wie die Infektionsrate, die Einschlußkörpergröße, -lokalisierung und -anzahl in Abhängigkeit von Rab5a genauer untersucht werden.

Vorergebnisse zeigten, daß sich die verschiedenen Chlamydien-Spezies in ihrem zellbiologischen Verhalten zum Teil unterscheiden. Deshalb wurde auch die Reifung der Einschlusskörper von *Chlamydomphila pneumoniae* in mit Rab5a transfizierten Zellen analysiert.

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zum weiteren Verständnis der intrazellulären Pathogen-Wirt-Interaktionen von *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydomphila pneumoniae* auf zellbiologischer Ebene zu liefern.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Brutschrank:

BBD 6220 Heraeus Instruments, Hanau

Mikroskope:

Leica TCS NT Laser Scanning Mikroskop Leica Microsystems, Heidelberg

Leitz DMRDE Fluoreszenzmikroskop Leica Microsystems, Heidelberg

Kamera:

Spot RT Slider 2.3.1. Diagnostic Instruments, USA

Neubauer Zählkammer Brand, Landshut

Schüttelinkubator:

Certomat BS-1 B. Braun, BiotechInternational, Melsungen

Sterilwerkbank BDK Luft- und
Reinraumtechnik GmbH BDK, Sonnenbühl-Genkingen

Spectrometer: Ultrospec 3000 PharmaciaBiotech (Biochrom) Ltd.,
Cambridge, England

Zentrifugen:

Megafuge 3.0 R Heraeus Instruments, Osterode

Sigma Laboratory Centrifuges Typ 3K18 Sigma, Osterode am Harz

2.1.2 Sonstige Materialien

Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Falcon/Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont de Claix, Frankreich; Eppendorf, Hamburg; Nunc, Roskilde, Dänemark; Gibco, jetzt Invitrogen, Karlsruhe; Sigma-Aldrich, München.

2.1.3 Chemikalien

Für die Zellkultur wurden folgende Chemikalien benutzt: RPMI-1640 Medium, L-Glutamin, Dulbeccos` s PBS und FBS von GIBCO/ Invitrogen, Karlsruhe.

Transformation: SOC-Medium; LB-Medium, Becton/Dickinson, Heidelberg; Antibiotika: Ampicillin.

Plasmidpräparation: QIAGEN Plasmid Maxi-Kit, QIAGEN, Hilden.

Transfektion: FuGene^{TM6} Transfection Reagent, Boehringer, Mannheim; Cycloheximid: Sigma-Aldrich, München.

Antikörperfärbung: Triton X und Mowiol, Sigma-Aldrich, München.

2.1.4 Zelllinie und Zellkultur

Sowohl für die Versuche mit *Chlamydia trachomatis* als auch mit *Chlamydophila pneumoniae* wurden ausschließlich HeLa 229Zellen verwendet. Die Zellen wurden in RPMI-Medium, dem 5% PenStrep, 5% Glutamin und 10% FBS zugesetzt waren, bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

2.1.5 Antikörper

Chlamydia trachomatis:

Monoklonaler, anti-MOMP Maus-Antikörper,

Klon 5D1/30:

Biogenesis, Poole, England, über Quartett
Immunodiagnostika Biotechnologie GmbH,
Berlin

Chlamydophila pneumoniae:

Monoklonaler, anti-TWAR Maus-Antikörper,

Klon 57/062:

Biogenesis, Poole, England, über Quartett
Immunodiagnostika Biotechnologie GmbH,
Berlin

Sekundärantikörper:

TRITC-gelabelte Anti-Maus Schafs-Antikörper:

Sigma-Aldrich, München

2.1.6 Rab-Plasmide

Die für die Transfektionen verwendeten pSFFV-GFP-Rab5 (Rab5a Wildtyp, dominant-negativ Rab5aS34N, dominant-aktiv Rab5aQ79L) bzw. pSFFV-GFP-Rab7 (Rab7 Wildtyp und dominant-negativ Rab7 T22N) Konstrukte wurden freundlicherweise von Dr. Craig Roy, Boyer Center for Molecular Medicine, Section of Microbial Pathogenesis, Yale University, New Haven, Connecticut, USA, zur Verfügung gestellt.

2.1.7 Chlamydienstämme

Chlamydia trachomatis LGV, Serovar L2 (434 B):

Dr. Prof. Eberhard Straube, Klinikum der
Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut
für Medizinische Mikrobiologie.

Chlamydophila pneumoniae TWAR-39

(Taiwan acute respiratory-Stamm):

Washington Research Foundation, Seattle,
WA, USA.

2.2 Methoden

2.2.1 Transformation

Zur Herstellung von GFP-Rab-Plasmiden wurden diese in kompetente E.coli-Bakterien (DH5 α) transformiert. Die Plasmide wurden 30 min. zusammen mit CaCl₂ kompetenten-E.coli in Eppendorfröhrchen auf Eis belassen. Anschließend wurde diese Mischung für 90 Sekunden in ein 42°C heißes Wasserbad transferiert. Nach 1 min. auf Eis wurde jedem Eppendorfröhrchen 1ml SOC-Medium zugegeben. Für 30 Minuten wurden die Röhrchen im Wasserbad bei 37°C leicht geschüttelt, damit die Bakterien den Antibiotika-Resistenzmarker (Ampicillin), der durch das Plasmid codiert wird, exprimieren konnten. Zum Schluß wurden die transformierten Bakterien auf ampicillinhaltige (100 μ g/ml Medium) Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation der Klone wurden sie in Glycerol-Medium aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2 Plasmidpräparation

Die transformierten E.coli-Stämme wurden über Nacht in Erlenmeyerkolben mit 300ml LB (Luria-Bertani)-Medium und dem entsprechenden selektiven Antibiotikum Ampicillin (100 μ g/ml) im Schüttelinkubator bei 37°C vermehrt. Die anschließende Plasmid-Präparation wurde gemäß des Maxi-Kit-Protokolls von QIAGEN durchgeführt.

Die DNA-Konzentration der einzelnen Plasmidpräparationen wurden im Spektrometer gemessen und die Plasmide bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3 Vermehrung der Chlamydienstämme

Für alle Versuche mit *Chlamydia trachomatis* wurde der Stamm L2 (434 B) aus Jena verwendet. Es erfolgte keine Purifikation, sondern subkonfluente HeLa-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer IFU von $3,7 \times 10^9$ /ml mit *Chlamydia trachomatis* L2 infiziert, Cycloheximid in 200 μ l RPMI-Medium mit 5%FBS in einer Konzentration von 1 μ g/ml zugegeben und ohne Zentrifugation bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Nach 72h wurde der Überstand abgenommen, die adhärennten Zellen abgeschabt und in 2-SP-Medium gegeben. Durch Zentrifugation wurden die HeLa-Zellen partiell lysiert und intrazelluläre Chlamydien in den Überstand freigesetzt. Davon wurden Aliquots von 1ml hergestellt und bei -80°C gelagert. Der Titer dieser Aliquots betrug ca. 3×10^9 IFU/ml.

Chlamydomphila pneumoniae TWAR wurde auf gleiche Weise in HeLa-Zellen vermehrt und gelagert; allerdings war die Infektionszeit länger (168h=7Tage).

2.2.4 Transfektion von HeLa Zellen mit Rab5a-GFP und Rab7-GFP und ihren Mutanten

Für die transiente Transfektion von HeLa-Zellen wurden autoklavierte 12mm Glasplättchen in 24-well-Platten gelegt und jedes well mit 1ml RPMI-Medium aufgefüllt. Dem Medium waren 5% PenStrep, 5% Glutamin und 10% FBS zugesetzt. Pro well wurden 200 000 HeLa-Zellen ausgesät. Nach ca. 22h im Inkubator bei 37 °C und 5%CO₂ waren die subkonfluenten (80%) Zellen adhärent und bereit für die Transfektion.

Als Transfektions-Kit wurde FuGene™⁶ Transfection Reagent, Boehringer, Mannheim benutzt. Da die Transfektion besser ohne Zusatz von PenStrep gelang, wurde nur RPMI-Medium mit 2%FBS verwendet. Die folgenden Angaben gelten pro well: In einem sterilen Eppendorf-Gefäß wurden zu 17µl Medium 3µl Fugene pipettiert, ohne in Kontakt mit der Plastikoberfläche zu kommen. Die Rab-Plasmide wurden in entsprechender Menge zugegeben, daß sich eine Endkonzentration von 0,2µg DNA pro well (500µl) ergab. Es folgte die Inkubation bei Raumtemperatur über ca. 25 min.. Nach zweimaligem Waschen der Glasplättchen mit Medium, um abgestorbene Zellen und Zelldebris zu entfernen, wurden 480µl RPMI+2%FBS vorgelegt, so daß sich mit Zugabe von ca. 20µl der Fugene-Mischung ein Endvolumen von 500µl in jedem well befand. Die Zellen wurden 24h, ohne Auswechseln des Mediums, bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert.

2.2.5 Infektion von transfizierten HeLa-Zellen mit *C. trachomatis* L2 und *C. pneumoniae*

Um die Transfektionschemikalien zu entfernen, wurden die Zellrasen der HeLa-Zellen nach 24h zweimal mit RPMI-Medium und 4%FBS gewaschen. Von demselben Medium wurden in jedes well 200µl vorgelegt. Für die Infektionsdosis mit *Chlamydia trachomatis* LGV Serovar L2 (434 B) ließ sich ein Volumen von 0,5µl errechnen, was $1,5 \times 10^6$ IFUs/well entsprach. Die Infektion mit *Chlamydomphila pneumoniae* TWAR wurde mit 2×10^4 IFUs/well durchgeführt. Nach Zugabe der entsprechenden Infektionsdosis wurden die Zellen 50 min. bei 37°C mit 2300 rpm zentrifugiert. Um die Proteinbiosynthese der HeLa-Zellen zu hemmen, wurde Cycloheximid in einer Konzentration von 1µg/ml in 200µl RPMI+4%FBS pro well zugegeben. Die infizierten Zellen wurden bei 37°C und 5%CO₂ 20h-24h (*C. trachomatis*) bzw. 46h (*C. pneumoniae*) inkubiert.

2.2.6 Fixierung und Färbung

Nach 20h-24h/46h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 10 min. in 3,7% Formalin bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend erfolgte eine 3-malige Waschung mit PBS. Für die anschließende Antikörperfärbung war es nötig, die Zellmembranen 10 min. mit TritonX 0,1% zu permeabilisieren. Danach wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen. In einer Feuchtkammer wurden die Glasplättchen vorsichtig auf einen Tropfen (=15µl) Primärantikörper gelegt. Der Antikörper war gegen das MOMP-Oberflächenprotein von *Chlamydia trachomatis* bzw. gegen *Chlamydophila pneumoniae* gerichtet und jeweils 1:100 mit PBS verdünnt. Die ursprüngliche Konzentration des *C. trachomatis*-Antikörper entsprach 2mg/ml, die des *C. pneumoniae*-Antikörpers 3,2mg/ml. Die Inkubationszeit betrug 1h in der Feuchtkammer. Anschließend erfolgte eine dreimalige Waschung mit PBS. Der TRITC-gelabelte Sekundärantikörper wurde in gleicher Weise appliziert. Er war ebenfalls 1:100 mit PBS verdünnt. Nach 1h Inkubation in der Feuchtkammer wurden die Zellen erneut dreimal in PBS gewaschen. Auf einen Glasobjektträger wurden 5µl Mowiol, Sigma-Aldrich, pipettiert und die Glasplättchen mit der Zellschicht nach unten aufgelegt. Abschließend erfolgte die Versiegelung der Glasplättchen mit Nagellack.

2.2.7 Mikroskopie und Bearbeitung

Die Präparate wurden mit einem Leitz DM Fluoreszenzmikroskop und einem konfokalen Leica Laser-Scanning-Immunfluoreszenz-Mikroskop untersucht und ausgewertet. Die konfokalen Bilder wurden mit Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems, Inc., Mountain View, California) bearbeitet.

2.2.8 Statistik

Zur Datenbearbeitung wurde Microsoft Office Excel 2003 verwendet. Die Datenbewertung erfolgte über den Fisher-Test, errechnet mittels R : Copyright 2005, The R Foundation for Statistical Computing Version 2.1.1 (2005-06-20), ISBN 3-900051-07-0.

Zur deskriptiven Analyse wurden Histogramme eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 **Versuche zur Untersuchung des Einflusses von Rab5a bei der Bildung von *Chlamydia trachomatis*-Einschlußkörpern**

Da Rab5 in einem sehr frühen Stadium des endozytischen Transportweges für die Vesikelfusion essentiell ist (Barbieri et al., 1998; Stenmark et al., 1994b), wurde in einem ersten Versuch der mögliche Einfluß der konstitutiv inaktiven (S34N) und der konstitutiv aktiven (Q79L) Rab5a Mutante auf die Einschlußkörperbildung nach 24h Infektion untersucht. Als Kontrolle wurden mit Rab5a wt transfizierte Zellen herangezogen. Die Transfektion wurde nach dem FuGene Protokoll durchgeführt. Die über 24h transfizierten HeLa-Zellen wurden im Anschluß 24h mit *C. trachomatis* Serovar L2 infiziert, fixiert und die Einschlußkörper mit einem TRITC-gelabelten Sekundäntikörper, der gegen einen Anti-MOMP-Primäntikörper gerichtet war, durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemacht.

3.1.1. Transfektion von HeLa-Zellen mit der GTPase Rab5a und ihren Mutanten Rab5a S34N und Rab5a Q79L

Es wurden diejenigen Zellen nach 48 h.p.t. (hours post transfection= Stunden nach Transfektion) untersucht, die in der Testreihe ausschließlich transfiziert waren, um die Wirkung der Rab5a Mutanten auf die Morphologie der intrazellulären Vesikel im Vergleich zu Rab5a Wildtyp zu beschreiben. Als Zeitpunkt wurden 48 h.p.t. gewählt, da die Zellen nach 24h Transfektion noch 24h mit *C. trachomatis* infiziert wurden und damit insgesamt 48h transfiziert waren. Die Plasmide besitzen an ihrem N-Terminus GFP (green fluorescent protein), wodurch ihre Expression in Form von grüner Fluoreszenz im Mikroskop dargestellt werden konnte.

Die Rab5a-Mutante Q79L weist durch eine Punktmutation in der GTPase-Domäne (Glutamin zu Leucin) eine herabgesetzte GTPase-Aktivität auf, wodurch sie in der GTP-gebundenen, d.h. aktivierten Form in der Zelle vorliegt (Ceresa et al., 2001). In Versuchen mit dieser Mutante kam es zu einer Zunahme der Transferrinendozytoseaktivität und der Vesikelfusion mit daraus resultierenden stark vergrößerten frühen Endosomen, die hauptsächlich in der perinukleären Region zu finden waren (Stenmark et al., 1994b). Dies konnte auch bei vorliegenden Transfektionen nachgewiesen werden. Die Zellen sind von vielen Vakuolen übersät,

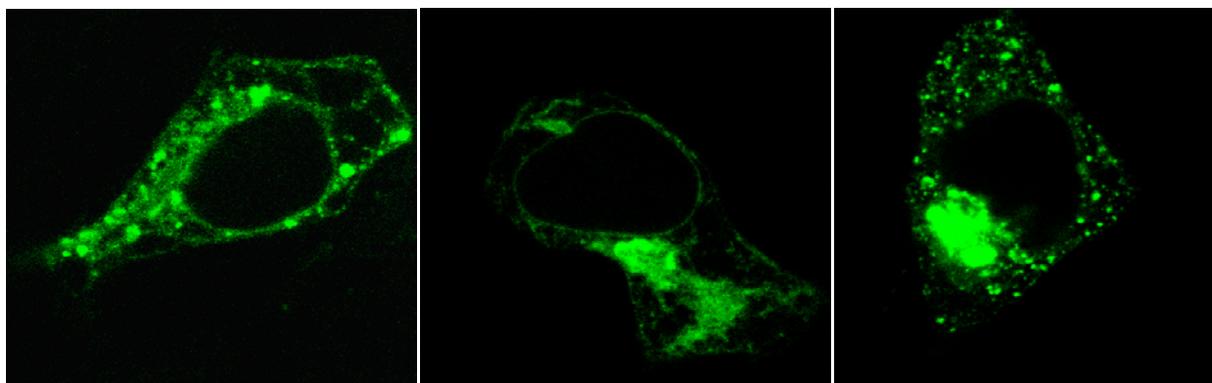
3. Ergebnisse

wobei die stärkste Fluoreszenz perinukleär sichtbar ist (Abb.4c).

Die Vakuolenmorphologie des Wildtyps von Rab5a ähnelt der der aktiven Mutante Rab5a Q79L. Die Transfektion von HeLa-Zellen mit Rab5a Wildtyp zeigte eine in der ganzen Zelle verteilte Grünfärbung, die besonders in Nähe des Zellkerns hervortrat und eine deutlich erkennbare Vesikelbildung (Abb.4a). Dies ist konsistent mit der Beobachtung einer Studie, in der auch für Rab5a Wildtyp bei Überexpression eine Vergrößerung der Endosomen beschrieben wurde (Bucci et al., 1992).

In anderen Studien zeigte die konstitutiv inaktive Rab5-Mutante S34N fragmentierte, verkleinerte frühe Endosomen (Stenmark et al., 1994b). Damit konsistent erscheint die Rab5 S34N-GFP-Fluoreszenz in vorliegendem Versuch diffus in der Zelle verteilt, ohne deutlich sichtbare und abgegrenzte Vakuolenbildung mit nur vereinzelt noch erkennbaren Vesikeln (Abb.4b). Auch ist eine Akkumulation der Fluoreszenz perinukleär nicht eindeutig zu erkennen.

Dieselbe Beobachtung konnte auch in Kinetikversuchen gemacht werden, in denen die Transfektionen schon früher, d.h. 28 h.p.t., 31 h.p.t. und 33 h.p.t. analysiert wurden. Mit diesem Versuch konnte die Funktionalität der verschiedenen Rab5-Proteine im HeLa-Transfektionsmodell bestätigt werden.



a.) **Rab5a wt**

b.) **Rab5a S34N**

c.) **Rab5a Q79L**

Abb. 4. Transfektion von HeLa-Zellen mit dem GFP-Rab5a wt, der konstitutiv-inaktiven Mutante GFP-Rab5a S34N und der konstitutiv-aktiven Mutante GFP-Rab5a Q79L.

Nach 48h Transfektion wurden die Zellen fixiert.

a.) GFP-Rab5a wt: erkennbare, etwas klumpig erscheinende Vesikelbildung, verteilt in der ganzen Zelle mit perinukleärer Akkumulation.

b.) GFP-Rab5a S34N: diffuse intrazelluläre Verteilung der Grünfluoreszenz ohne deutliche Vesikelbildung und ohne eindeutige perinukleäre Akkumulation.

c.) GFP-Rab5a Q79L: deutlich abgegrenzt erkennbare Vakuolen mit perinukleärer Akkumulation.

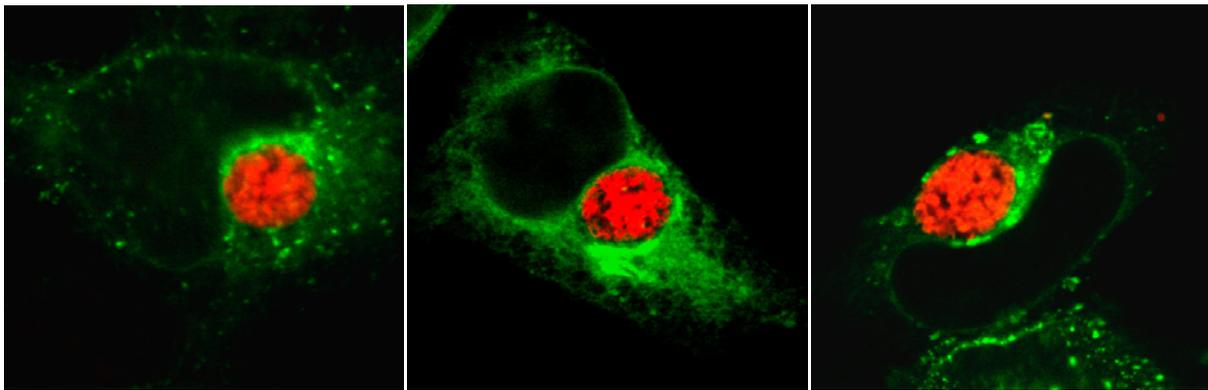
3.1.2 Infektion von Rab5a wt, Rab5a S34N und Rab5a Q79L transfizierten HeLa-Zellen mit *Chlamydia trachomatis*

Nun stellte sich die Frage, ob sich ein Einschlußkörper von *C. trachomatis* in HeLa-Zellen entwickeln kann, die mit Rab5a oder seinen Mutanten transfiziert wurden. Die über 24h transfizierten Zellen wurden für weitere 24h mit *C. trachomatis* infiziert. 24 h.p.i. wurden die Zellen fixiert und die Einschlußkörper mit einem TRITC-gelabelten Sekundärantikörper, der gegen einen Anti-MOMP-Primärantikörper gerichtet war, durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemacht.

Nach 48h Transfektion und 24h Infektion zeigte sich sowohl in mit beiden Mutanten transfizierten Zellen, als auch in den Präparaten des Rab5a Wildtyps, ein großer, einzelner Einschlußkörper (Abb.5). Charakteristischerweise bildet *C. trachomatis* einen einzelnen, großen Einschlußkörper in einer infizierten Zelle (Ridderhof and Barnes, 1989; van Ooij et al., 1998; Blyth and Taverne, 1972). Da sich dieser Einschlußkörper unabhängig von der Rab5-Aktivität entwickeln konnte, scheint die GTPase Rab5a nicht essentiell für die Inklusionbildung zu sein.

Auf die Morphologie der Vesikelbildung mit Rab5a und seinen Mutanten hatte die Infektion der transfizierten HeLa-Zellen mit *C. trachomatis* keinen Einfluß, denn es fand sich dasselbe Bild wie in nichtinfizierten Zellen. Die konstitutiv inaktive Mutante war diffus in der ganzen Zelle verteilt ohne deutlich erkennbare Vesikelbildung (Abb.5b). Auch die Expression der konstitutiv aktiven Rab5a Mutante Q79L wies dieselbe Vesikelverteilung und -morphologie auf wie in nichtinfizierten Zellen. Es zeigten sich wieder stark vergrößerte Vesikel mit deutlicher Akkumulation nahe des Zellkerns (Abb.5c). Obwohl Rab5a und seine Mutanten nahe des Einschlußkörpers zu finden sind, ließ sich eine Zirkumferenz von Rab5a um den Einschlußkörper, wie vorbeschrieben bei anderen RabGTPasen (Rab1, Rab4, Rab6 und Rab11), hier nicht beobachten (Rzomp et al., 2003). Die sehr selten beobachtete Gelbfärbung um den Einschlußkörper herum ist am ehesten einer teilweisen Überblendung zuzuschreiben, da sie unspezifisch sowohl bei Rab5wt als auch bei beiden Mutanten zu beobachten war.

Da die GTPase Rab5a offensichtlich nicht essentiell für die grundsätzliche Bildung eines Einschlußkörpers ist, stellte sich die Frage, ob die unterschiedlichen Aktivitäten der Rab5a Mutanten möglicherweise Einfluß auf quantitative Größen wie die Infektionsrate, die Einschlußkörperanzahl, -lokalisierung sowie -größe nehmen.



a.) **Rab5a wt** b.) **Rab5a S34N** c.) **Rab5a Q79L**

Abb. 5. Ein Einschlußkörper von *C. trachomatis* bildet sich in mit Rab5a und seinen Mutanten transfizierten HeLa-Zellen, unabhängig von der Aktivität der jeweiligen Mutante.

Nach 24h Transfektion mit GFP-Rab5a wt, GFP-Rab5a S34N oder GFP-Rab5a Q79L wurden die HeLa-Zellen mit *C. trachomatis* für 24h infiziert. Im Anschluß wurden die Präparate fixiert und die Chlamydien mit einem TRITC-gelabelten Sekundärantikörper, der gegen einen Anti-MOMP-Primärantikörper gerichtet war, durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemacht.

a.) Der *C. trachomatis* Einschlußkörper (rot) befindet sich in Nähe des Zellkerns. Deutlich sichtbar ist die Vesikelbildung von Rab5a wt mit Akkumulation am Zellkern und Inklusion.

b.) Das Inklusion befindet sich in Zellkernnähe. Die Verteilung von GFP-Rab5a S34N in der Zelle ist diffus, eine Vesikelbildung ist nicht abgrenzbar.

c.) Der Einschlußkörper von *C. trachomatis* liegt perinukleär. Deutlich sichtbar ist die Akkumulation von GFP-Rab5a Q79L in Nähe des Zellkerns. Die Vesikel sind gut sichtbar und wirken vergrößert.

3.1.3 Untersuchung des Einflusses von Rab5a auf quantitative Größen der Einschlußkörperbildung von *C. trachomatis*

3.1.3.1 Einfluß von Rab5a auf die Infektionsrate von *C. trachomatis* in HeLa-Zellen

Um die Infektionsrate beurteilen zu können, wurden in einem ersten Schritt jeweils sowohl die ausschließlich transfizierten Zellen als auch die transfizierten Zellen mit Einschlußkörper gezählt und ihr Verhältnis in einem zweiten Schritt mittels des Fisher-Tests statistisch ausgewertet.

Hierfür wurden die Präparate des letztbeschriebenen Versuches beurteilt, je 15 Gesichtsfelder pro Präparat mit einer ähnlichen Gesamtzellzahl von durchschnittlich 60-80 Zellen pro Gesichtsfeld. Aus diesen 15 Werten wurde der Mittelwert gebildet. Da die Versuche unabhängig voneinander dreimal durchgeführt wurden, wurden aus allen 3 Versuchswerten die Mittelwerte summiert und daraus wiederum der Mittelwert berechnet. Für die mit dem Wildtyp transfizierten Zellen ergab sich im Durchschnitt von 3 Versuchen eine Zahl von 1,4 transfizierten Zellen pro Gesichtsfeld,

3. Ergebnisse

die gleichzeitig auch einen *C. trachomatis*-Einschlußkörper aufwiesen. Bei der konstitutiv inaktiven Mutante Rab5a S34N kam es im Mittel bei 1,9 transfizierten Zellen zur Inklusionreifung. Einen etwas niedrigeren Wert wiesen die Zellen der konstitutiv aktiven Mutante Rab5a Q79L mit 0,8 auf (Abb.6). Obwohl die Infektionsrate bei allen Versuchen 24 h.p.i. durch die Inaktivierung von Rab5a erhöht wurde, konnte dieser Effekt statistisch durch den Fisher-Test nicht als signifikant eingestuft werden. In der statistischen Auswertung fiel einmalig in der Berechnung der einzelnen Versuche ein signifikanter Wert sowohl zwischen Rab5a Wildtyp und Rab5a S34N mit einer signifikant erhöhten Infektionsrate für Rab5a S34N als auch zwischen Rab5a S34N und Rab5a Q79L auf. Bei letzter Kombination trat erneut eine erhöhte Infektionsrate bei der inaktiven Mutante Rab5a S34N auf. Möglicherweise ist ein Effekt vorhanden, dieser aber nicht groß genug, um ihn bei dieser Stichprobengröße statistisch belegen zu können. Weitere Versuche könnten hierüber Aufklärung verschaffen. Da sich keine Signifikanz darstellte, muß angenommen werden, dass die Aktivität von Rab5a für das Ausmaß der Infektionsrate von HeLa-Zellen zumindest in vorliegenden Versuchsbedingungen eine untergeordnete bzw. keine Rolle spielt.

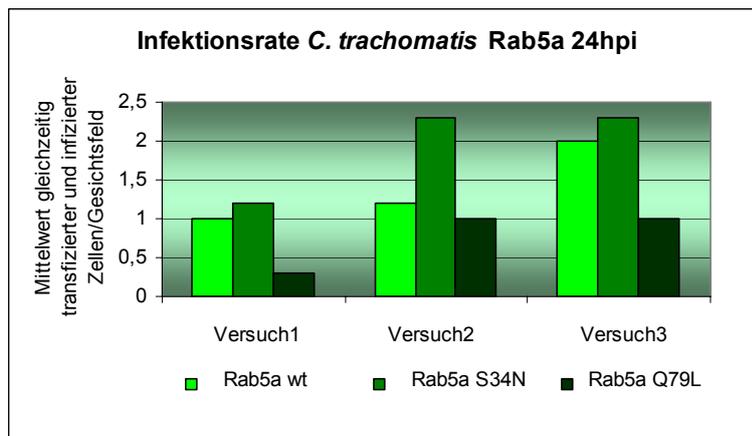


Abb. 6. Die Aktivität von Rab5a hat keinen signifikanten Einfluß auf die Infektionsrate von HeLa-Zellen mit *C. trachomatis* L2 24 h.p.i..

In jeweils 3 unabhängigen, identischen Versuchen wurden die mit GFP-Rab5a wt, GFP-Rab5a S34N oder GFP-Rab5a Q79L transfizierten Zellen in je 15 Gesichtsfeldern gezählt, die einen Einschlußkörper von *C. trachomatis* enthielten. Daraus wurde dann für jeden der 3 Versuche der Mittelwert gebildet, der in obigem Diagramm als Balken dargestellt wurde. Der Unterschied zwischen Rab5a wt, Rab5a S34N und Rab5a Q79L war im Fisher-Test nicht signifikant.

Die vorangehenden Versuche wurden alle nach einer *C. trachomatis*-Infektion über 24h ausgewertet, zu einem Zeitpunkt, an dem die Inklusionentwicklung ihren Höhepunkt erreicht hatte und sich bereits viele Retikularkörper zu Elementarkörpern rückdifferenziert hatten. Zu diesem Zeitpunkt war der Einschlußkörper ausgereift und es ließ sich kein Einfluß der GTPase Rab5a auf die qualitative und quantitative Inklusionentwicklung nachweisen. Da angenommen wird, dass die Modifikation der Inklusionmembran schon zu einem frühen Zeitpunkt stattfindet, bestand die Möglichkeit, daß die Entwicklung und Reifung des Einschlußkörpers zu einem früheren Zeitpunkt unter dem Mutanteneinfluß beschleunigt bzw. verzögert war. Um die mögliche unterschiedliche zeitliche Entwicklung der Einschlußkörperbildung zu verschiedenen Zeitpunkten unter Einfluß der Rab5a Mutanten zu beobachten, wurden Hela-Zellen mit Rab5 S34N, Rab5 Q79L und mit Rab5 Wildtyp als Kontrolle 24h transfiziert und anschließend mit *C. trachomatis* infiziert. Da der Einschlußkörper im Fluoreszenzmikroskop erst ab 14 h.p.i. ausreichend beurteilbar ist, wurden als Messzeitpunkte 14h, 17h und 19h festgelegt. Die Präparate wurden 14 h.p.i., 17 h.p.i. und 19 h.p.i. fixiert, mit einem TRITC-gelabelten Sekundärantikörper gegen Anti-MOMP-Primär-Antikörper gefärbt und durch das Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

14 h.p.i. wies in der quantitativen Auswertung Rab5a wt die höchste Infektionsrate auf; eine statistische Signifikanz konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb.7).

Nach 17h *C. trachomatis*-Infektion lag die Zahl für infizierte Rab5awt Zellen im Durchschnitt bei 1,5. Im Vergleich dazu ergab sich bei Rab5a S34N ein nicht wesentlich höherer Wert von 1,9 und bei Rab5a Q79L eine ähnliche Anzahl von 1,4 (Abb.7). Wiederum unterschieden sich die Werte in der statistischen Auswertung mittels Fisher-Test nicht signifikant.

19h nach Infektion war der letzte Zeitpunkt der Kinetikuntersuchung und entsprach dem Inklusionentwicklungsstadium, in dem sich bereits die Retikularkörper wieder in Elementarkörper zurückdifferenzierten. 19 h.p.i. unterschied sich die Infektionsrate zwischen den mit Rab5a S34N und Rab5a Q79L transfizierten Zellen nicht. Für die Kontrolle Rab5a Wildtyp ergab sich im Mittel 0,9 gleichzeitig transfizierte und infizierte Zellen pro Gesichtsfeld (Abb.7).

Sieht man diese Ergebnisse in Vergleich mit denen 24h nach Infektion, so findet man in der Kinetik ebenso keine Tendenz bezüglich einer höheren Infektionsrate im Zeitraum 14-19 h.p.i. durch eine bestimmte Mutante. Aus diesen Beobachtungen konnte geschlossen werden, daß im Verlauf der Einschlußkörperentwicklung 14 h.p.i. -24 h.p.i. kein quantitativer Einfluß von Rab5a auf die Infektionsrate von *C. trachomatis* besteht.

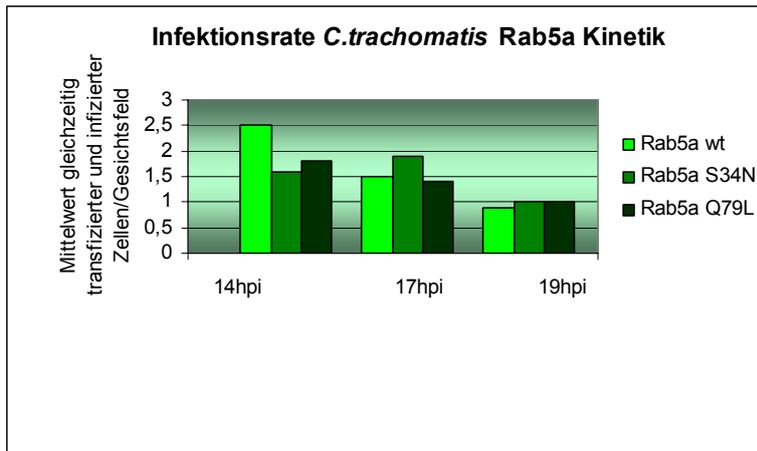


Abb. 7. Kinetik der Infektionsrate von Rab5a transfizierten HeLa-Zellen mit *C. trachomatis*.

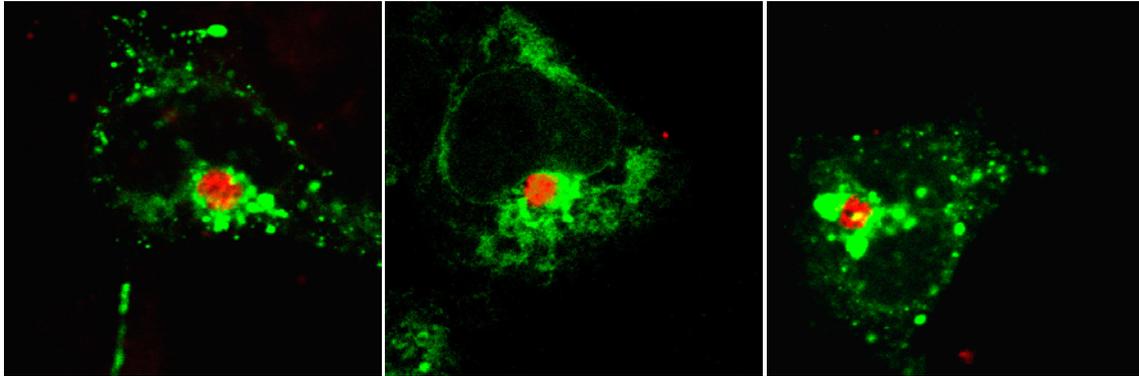
Es wurden die mit GFP-Rab5a wt, GFP-Rab5a S34N oder GFP-Rab5a Q79L transfizierten Zellen in je 15 Gesichtsfeldern gezählt, die einen Einschlußkörper von *C. trachomatis* enthielten. Daraus wurde dann für jeden der Versuche der Mittelwert gebildet, der in obigem Diagramm als Balken dargestellt wurde. Die statistische Auswertung mit dem Fisher-Test ergab keinen signifikanten Unterschied zu den dargestellten Zeitpunkten.

3.1.3.2 Einfluß von Rab5a auf die Anzahl der Einschlußkörper in *C. trachomatis*-infizierten HeLa-Zellen

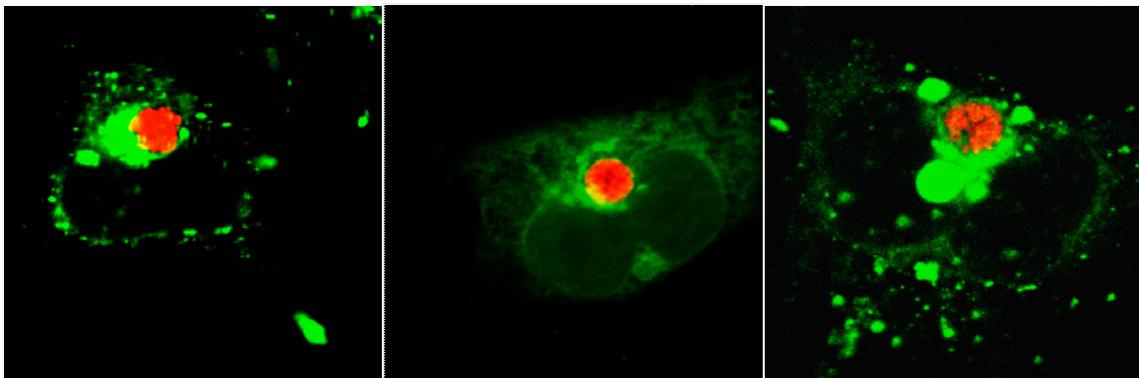
Mehrere Einschlußkörper von *C. trachomatis* fusionieren in einer einzigen Zelle zu einem einzelnen, großen Einschlußkörper (Ridderhof and Barnes, 1989; Blyth and Taverne, 1972; van Ooij et al., 1998). Um zu zeigen, inwieweit die RabGTPasen möglichen Einfluß nehmen auf die Anzahl der gebildeten Einschlußkörper in einer Zelle, wurden vorherige Versuche auf mehrfache Einschlußkörperbildungen untersucht. Vergleich man 24 h.p.i. die mit den beiden Mutanten transfizierten Zellen mit der Wildtypkontrolle, so ließ sich kein Unterschied bezüglich der Anzahl der Einschlußkörper pro Zelle feststellen. Es zeigte sich nach 24h Infektion bei allen Mutanten ein einzelner, großer Einschlußkörper (Abb.5). Dennoch fanden sich in vorliegenden Versuchen bei allen Mutanten selten multiple Einschlußkörper pro Zelle; die Häufigkeit war unter allen Mutanten aber gleich.

Auch zu früheren Zeitpunkten bei Analyse der bereits besprochenen Kinetikuntersuchungen zeigte sich nur ein *C. trachomatis*-Einschlußkörper pro HeLa-Zelle. Die Anzahl an multiplen Vakuolen in einer Zelle war bei allen 3 Rab5a Formen vernachlässigbar klein und ließ keine Tendenz speziell bei einer Mutante erkennen (Abb.8).

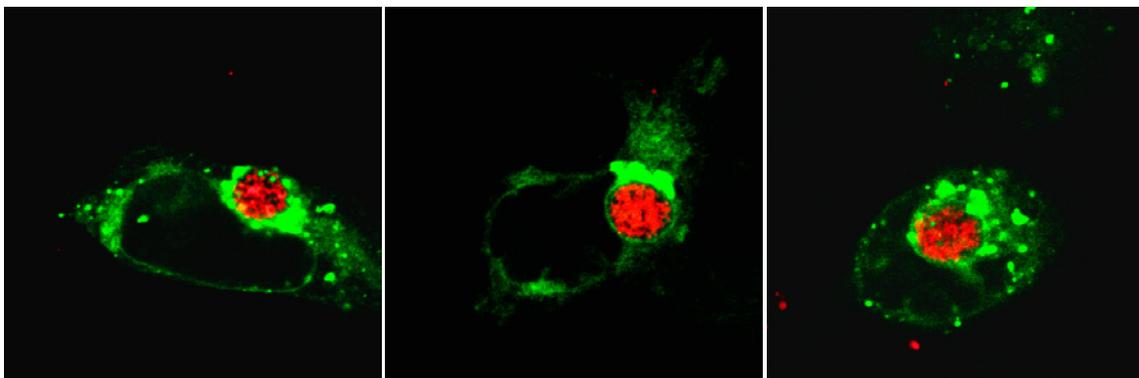
14 h.p.i.



17 h.p.i.



19 h.p.i.



a.) **Rab5a wt**

b.) **Rab5a S34N**

c.) **Rab5a Q79L**

Abb. 8. Kinetik der Infektion von *C. trachomatis* in GFP-Rab5a-transfizierten HeLa-Zellen.

Nach 24h Transfektion mit GFP-Rab5a wt, GFP-Rab5a S34N oder GFP-Rab5a Q79L wurden die HeLa-Zellen mit *C. trachomatis* infiziert und nach 14 h.p.i., 17 h.p.i. und 19 h.p.i. fixiert. Die Chlamydien wurden mit einem TRITC-gelabelten Sekundärantikörper, der gegen einen Anti-MOMP-Primärantikörper gerichtet war, durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Zu allen 3 Zeitpunkten erkennt man die Entwicklung eines Einschlußkörpers (rot). Gut erkennbar die deutliche Vesikelbildung bei Rab5a wt und Rab5a Q79L, wohingegen sich die Transfektion mit Rab5a S34N über alle Zeiträume nur als eine diffuse Grünfluoreszenz darstellt. Die z.T. deutlich sichtbare Gelbfärbung scheint ein Überblendungseffekt zu sein, da sie bei allen Rab-Formen auftritt.

Zusammenfassend fand sich bezüglich der Anzahl der Einschlusskörper an den Untersuchungszeitpunkten 14 h.p.i., 17 h.p.i. und 19 h.p.i. sowie 24 h.p.i. kein Unterschied zwischen den beiden Rab5a Mutanten und dem Rab5a Wildtyp.

3.1.3.3 Einfluß von Rab5a auf die perinukleäre Lokalisation des Einschlusskörpers in *C. trachomatis*-infizierten HeLa-Zellen

Die Lokalisation der Chlamydienvakuole in einer infizierten Zelle liegt üblicherweise in der perinukleären Region, weshalb sich die Frage stellte, ob durch die unterschiedliche Mutantenaktivität eine Änderung der Einschlusskörperlokalisierung erfolgt.

In den HeLa-Zellen, die mit Rab5a Wildtyp transfiziert wurden, zeigte sich 24 h.p.i. im Fluoreszenzmikroskop zu 100% eine typische Einschlusskörperbildung nahe des Zellkerns. Mit der konstitutiv inaktiven Mutante Rab5aS34N transfizierte HeLa-Zellen zeigten ebenfalls eine Inklusionbildung perinukleär. Dasselbe Ergebnis ließ sich bei Transfektion mit Rab5 Q79L 24 h.p.i. beobachten (Abb.5).

Auch in den Kinetikversuchen fand sich sowohl in mit Rab5a Wildtyp transfizierten Zellen als auch in mit beiden Mutanten transfizierten Zellen die Inklusionslokalisierung 14 h.p.i., 17 h.p.i. und 19 h.p.i. in der perinukleären Region (Abb.8).

3.1.3.4 Einfluß von Rab5a auf die Größe des Einschlusskörpers in *C. trachomatis*-infizierten HeLa-Zellen

Da die Transfektion von HeLa-Zellen mit Rab5aQ79L und Rab5aS34N keinen Einfluß auf die Infektionsrate, die Einschlusskörperfusion und die intrazelluläre Lokalisation von *C. trachomatis* hatte, blieb noch die Frage offen, ob die kontinuierliche Entwicklung und das Wachstum des Einschlusskörpers unter dem Einfluß der Rab5a-Mutanten verzögert bzw. beschleunigt wird. Hierfür wurde untersucht, welchen Durchmesser der Einschlusskörper nach 24h Infektion aufwies. Für die Auswertung wurden die Präparate des zuvor beschriebenen Versuches herangezogen. Es wurden je 10 Einschlusskörperdurchmesser in transfizierten Zellen pro Präparat aus 3 Versuchsreihen ausgemessen und daraus der Mittelwert gebildet. Nach 24-stündiger Transfektion mit Rab5a S34N, Rab5a Q79L oder Rab5a wt und anschließender *C. trachomatis*-Infektion zeigten sich nach 24h Infektion bei Rab5a wt Einschlusskörper mit einem Durchmesser von durchschnittlich 9,6µm (Abb.9). Bei der konstitutiv-inaktiven Mutante Rab5a

3. Ergebnisse

S34N ergab sich ein ähnlicher Durchschnittswert von 9,8 μ m. In die konstitutiv-aktive Mutante Rab5a Q79L exprimierenden Zellen ließen sich 24 h.p.i. Einschlußkörper mit einem vergleichbaren Durchmesser von durchschnittlich 9,7 μ m finden. Somit war keine Wachstumsverzögerung oder -beschleunigung des *C. trachomatis* Einschlußkörpers unter dem Einfluß der Rab5a-Mutanten 24 h.p.i. nachweisbar.

Ebenso zeigte sich zu den Zeitpunkten 12 h.p.i. (Daten nicht gezeigt), 14 h.p.i., 17 h.p.i. und 19 h.p.i. kein Größenunterschied im Einschlußkörperdurchmesser zwischen Rab5a Wildtyp und seinen Mutanten (Abb.9).

14 h.p.i. war der Einschlußkörperdurchmesser im Mittel bei den allen 3 Rab5a Mutanten annähernd gleich.

Nach 17h Infektion betrug die Einschlußkörpergröße in einer mit Rab5a S34N transfizierten Zelle 4,8 μ m im Durchmesser. Bei Rab5a Q79L ließ sich ein ähnlicher Durchschnittswert von 5,1 μ m ausmessen. Somit weicht die Einschlußkörpergröße beider Mutanten 17 h.p.i. nicht wesentlich von den 5,6 μ m Durchmesser des Wildtyps ab (Abb.9). Den größten Einschlußkörperdurchmesser wiesen demnach 17 h.p.i. Rab5a Wildtyp exprimierende Zellen auf, gefolgt von Rab5aQ79L .

19 h.p.i. erreichten die Einschlußkörper in mit Rab5a Wildtyp transfizierten Zellen einen Durchmesser von 6,6 μ m. Davon unterschied sich die Größe eines Einschlußkörpers bei Rab5a S34N mit 6,2 μ m und bei Rab5a Q79L mit 6,5 μ m nicht wesentlich (Abb.9).

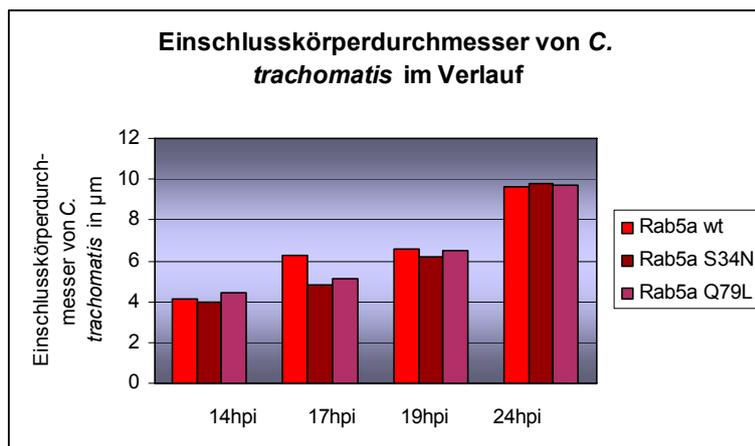


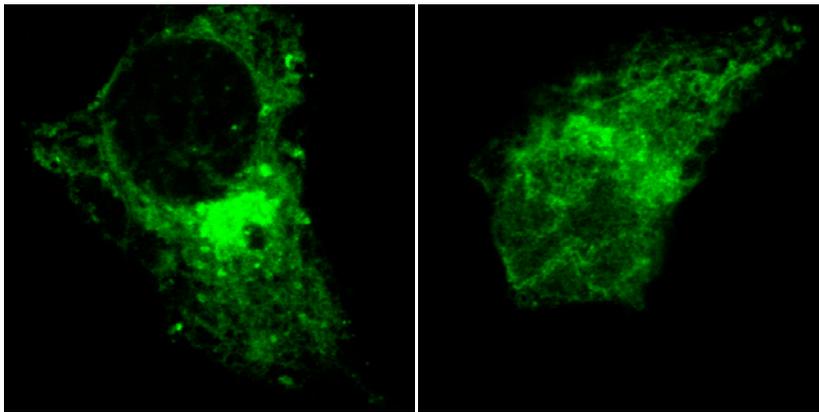
Abb. 9. Mittlerer Durchmesser des Einschlußkörpers von *C. trachomatis* 14 h.p.i., 17 h.p.i. und 19 h.p.i. und 24 h.p.i. in HeLa-Zellen, transfiziert mit GFP-Rab5a wt, GFP-Rab5a S34N oder GFP-Rab5a Q79L. Die Mittelwerte der Durchmesser ergaben sich durch Abmessung von je 10 Einschlußkörpern pro Versuch von insgesamt 3 unabhängigen, identischen Versuchen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Durchmesser der Vakuolen im Verlauf der intrazellulären Entwicklung von *C. trachomatis* kontinuierlich größer wurden, ohne Hinweis auf eine Beeinflussung durch die Aktivität von Rab5a.

3.2 Versuche zur Untersuchung des Einflusses von Rab7 bei der Bildung von *Chlamydia trachomatis*-Einschlußkörpern

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß auch die GTPase Rab7 eine wichtige Rolle im Verlauf des endozytotischen Transportweges spielt, denn sie ist für den Transport zwischen Frühem Endosom und Spätem Endosom essentiell (Feng et al., 1995; Vitelli et al., 1997; Mukhopadhyay et al., 1997). Dieser Schritt mündet letztendlich in die Zerstörung der Partikel im Lysosom. Damit stellt diese GTPase einen wichtigen Regulator bezüglich der Lysosom-Biogenese dar und hat somit auch Einfluß auf das Schicksal phagozytierter Partikel. Da Rab5a in einem früheren Transportschritt nicht in die Bildung einer *C. trachomatis*-Vakuole involviert zu sein scheint, war es nicht sehr wahrscheinlich, aber dennoch möglich, daß die GTPase Rab7, die in einen späteren Schritt des endozytotischen Transportweges involviert ist, die Einschlußkörperentwicklung beeinflusst.

Aus der Literatur ist bekannt, daß GFP-Rab7 hauptsächlich mit Lysosomen assoziiert zu finden ist und bei intrazellulärer Expression in der perinukleären Region akkumuliert (Bucci et al., 2000). Bei Analyse der Morphologie der Expression von Rab7 Wildtyp und der konstitutiv inaktiven Mutante Rab7 T22N in HeLa-Zellen zeigte Rab7 Wildtyp 48 h.p.t. das GFP-Signal im Zytoplasma verteilt und die stärkste Grünfluoreszenz nahe des Zellkerns (Abb.10). Bei der Transfektion mit der konstitutiv-inaktiven Mutante Rab7 T22N konnte im Vergleich mit dem Wildtyp eine diffuse Verteilung der exprimierten GTPase innerhalb der ganzen Zelle beobachtet werden. Eine ausgeprägte Vakuolenbildung trat erwartungsgemäß nicht auf (Abb.10).



a.) **Rab7 wt**

b.) **Rab7 T22N**

Abb. 10. Transfektion von HeLa-Zellen mit dem GFP-Rab7 wt oder der konstitutiv-inaktiven Mutante GFP-Rab7 T22N.

Nach 24h Transfektion wurden die Zellen für weitere 24h mit *C. trachomatis* infiziert und anschließend fixiert. Im Bild die Abbildung von ausschließlich 48h transfizierten Zellen aus diesem Versuch.

a.) GFP-Rab7 wt: zum Teil erkennbare Vesikelbildung, verteilt in der ganzen Zelle mit perinukleärer Akkumulation.

b.) GFP-Rab7 T22N: diffuse intrazelluläre Verteilung der Grünfluoreszenz ohne deutliche Vesikelbildung mit perinukleärer Akkumulation.

Auch fand sich 28 h.p.t., 31 h.p.t. und 33 h.p.t. kein Unterschied bezüglich der Transfektionsmorphologie im Vergleich zu 48h nach Transfektion.

Nach Infektion der transfizierten Zellen mit *C. trachomatis* konnte sich wie erwartet 24 h.p.i. ein Einschlusskörper entwickeln (Abb.11). Damit bestätigt dieses Ergebnis die Isolation von *C. trachomatis* im Verlauf des endosomalen Transportweges.

Die Morphologie der Transfektionen mit Rab7 Wildtyp oder Rab7 T22N unter dem Einfluß der intrazellulären Entwicklung eines *C. trachomatis*-Einschlusskörpers unterschied sich nicht von der in nichtinfizierten Zellen. Die Transfektion mit der Rab7-Mutante T22N in infizierten HeLa-Zellen zeigte 48 h.p.t. im Vergleich mit dem Wildtyp eine diffuse Verteilung des exprimierten Plasmids innerhalb der ganzen Zelle ohne ausgeprägte Vakuolenbildung (Abb.11). Es besteht auch eine verstärkte GFP-Fluoreszenz in Nähe des Einschlusskörpers, der perinukleär lag. Im Vergleich dazu zeigte die Expression des Rab7 Wildtyps in Zellen mit Inklusion eher eine deutliche Vakuolenbildung mit einer starken Akkumulation des GFP-Signals perinukleär. Diese Akkumulation fand sich stets in Nähe des *C. trachomatis* Einschlusskörpers (Abb. 11), konsistent mit Beobachtungen von Rzomp et al., 2003, in denen eine inklusionnahe Akkumulation von Rab7wt, aber keine direkte Membranassoziation beschrieben wurde. Da sich sowohl in den ausschließlich transfizierten Kontrollzellen als auch in zusätzlich infizierten Zellen die

3. Ergebnisse

Transfektionsmorphologie nicht unterschied, ist anzunehmen, daß sich *C. trachomatis* und die GTPase Rab7 in HeLa Zellen gegenseitig nicht beeinflussen.

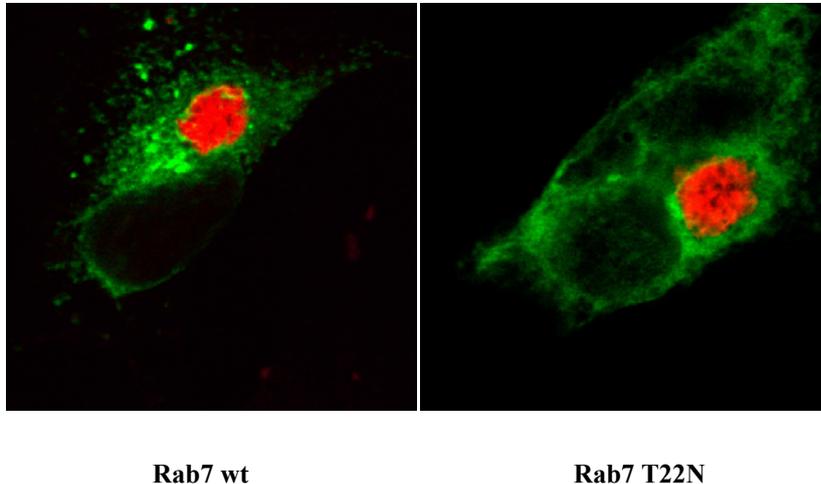


Abb. 11. Die Rab7-Aktivität hat keinen Einfluß auf die Entwicklung eines *C. trachomatis*-Einschlußkörpers. Nach 24h Transfektion mit GFP-Rab7 wt oder GFP-Rab7 T22N wurden die HeLa-Zellen mit *C. trachomatis* infiziert. Nach weiteren 24h wurden die Präparate fixiert und die Chlamydien mit einem TRITC-gelabelten Sekundärantikörper, der gegen einen Anti-MOMP-Primärantikörper gerichtet war, durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Der rot gefärbte Einschlußkörper zeigt mit beiden Rab7-Plasmiden keine Kolokalisation. Man erkennt bzgl. der Transfektionen eine deutliche Vesikelbildung durch den Rab7 wt im Vergleich mit einer diffusen Grünfluoreszenz der konstitutiv-inaktiven Mutante Rab7 T22N.

Bei Analyse der quantitativen Parameter hatte die Expression von GFP-Rab7 in HeLa-Zellen keinen Einfluß auf die Infektionsrate mit *C. trachomatis*. Die numerische Auswertung ergab 24h.p.i. für Rab7 Wildtyp exprimierende Zellen einen Wert von 4,0 transfizierten Zellen mit Inklusion pro Gesichtsfeld, wovon 4,3 gleichzeitig transfizierte und infizierte Zellen bei Rab7 T22N mittels Fisher-Test nicht signifikant abwichen (ohne Abb.). In den Kinetikuntersuchungen fand sich zwischen beiden Rab7-Mutanten ebenfalls kein Unterschied bzgl. der Infektionsrate (ohne Abb.).

Wie auch in den Versuchen mit Rab5a konnte man in Rab7-transfizierten HeLa-Zellen zu allen Zeitpunkten die Entwicklung von einem einzelnen Einschlußkörper beobachten, der sich in seinem Durchmesser, 24 h.p.i. 9,8µm im Durchschnitt, nicht abhängig von der Rab7-Aktivität unterschied. Der Durchmesser entspricht dem Entwicklungsstadium des *C. trachomatis*-Einschlußkörpers 24 h.p.i. in GFP-Rab5a exprimierenden Zellen. Die Lokalisation des Einschlußkörpers war 14 h.p.i., 17 h.p.i., 19 h.p.i. und 24 h.p.i. stets nahe des Zellkerns.

Die zur Fusion neigenden multiplen Inklusionen von *C. trachomatis* traten zu allen Zeitpunkten einem vernachlässigbaren Prozentsatz auf. Die Anzahl multipler, nicht bzw. noch nicht

fusionierender Inklusions war bei Rab7 Wildtyp und Rab7 T22N identisch und vernachlässigbar klein.

3.3 Versuche zur Untersuchung des Einflusses von Rab5a auf die Bildung von *Chlamydophila pneumoniae*-Einschlußkörpern

3.3.1 Infektion von Rab5a wt, Rab5a S34N und Rab5a Q79L transfizierten HeLa-Zellen mit *C. pneumoniae*

C. trachomatis und *C. pneumoniae* weisen bezüglich ihrer Einschlußkörperentwicklung trotz der engen Verwandtschaft und Übereinstimmung in grundlegenden Mechanismen einige Unterschiede auf. Zum einen differiert die Anzahl der Einschlußkörper pro Zelle, da *C. pneumoniae* in einer Zelle viele einzelne Vakuolen bildet, wohingegen *C. trachomatis*-Vesikel die Eigenschaft besitzen, bei einer hohen Infektionsrate zu einer einzelnen Vakuole zu fusionieren (Ridderhof and Barnes, 1989; Blyth and Taverne, 1972; van Ooij et al., 1998); zum anderen dauert der Infektionszyklus bei *C. pneumoniae* fast doppelt so lange wie bei *C. trachomatis*. Spezies-Spezifität ist bisher auch bezüglich der Interaktion von Proteinen mit der Einschlußkörpermembran zu beobachten. Bis jetzt ist ein Wirtsprotein bekannt (14-3-3 β), das mit einem chlamydialen Protein (IncG) interagiert, allerdings nur von *C. trachomatis*. Eine Assoziation mit dem Einschlußkörper von *C. pneumoniae* oder *C. psittaci* konnte nicht nachgewiesen werden (Scidmore et al., 2001). Daher ist es denkbar, daß Rab5a eine Bedeutung im Infektionszyklus von *C. pneumoniae* haben könnte, die für *C. trachomatis* nicht gezeigt werden konnte.

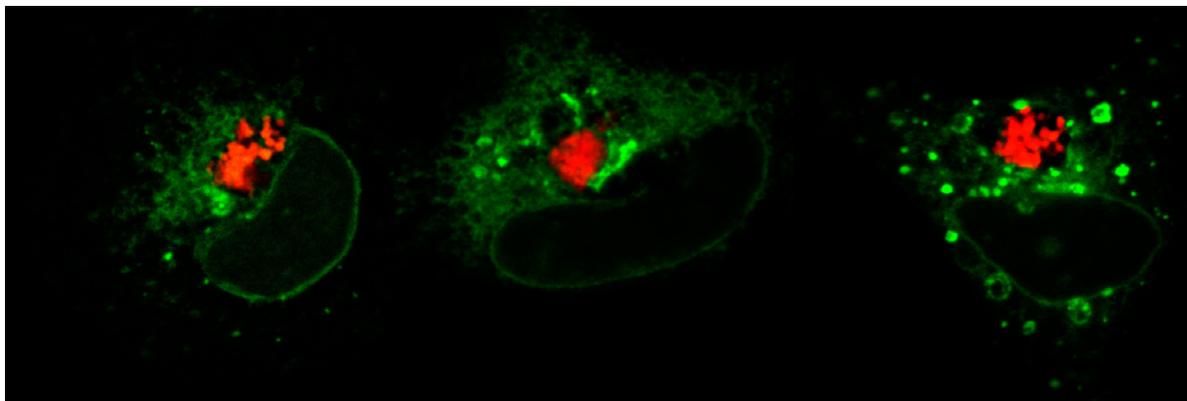
So wurde in Anlehnung an die vorhergehenden Versuche mit *C. trachomatis* der mögliche Einfluß der konstitutiv inaktiven Mutante Rab5a S34N und der konstitutiv aktiven Mutante Rab5a Q79L auf die Einschlußkörperbildung nach 46h Infektion untersucht. Als Kontrolle wurden mit Rab5a Wildtyp transfizierte Zellen herangezogen. Die längere Infektionszeit war nötig, da erst zu diesem Zeitpunkt der *C. pneumoniae*-Einschlußkörper gut entwickelt und im Mikroskop deutlich beurteilbar war. Nach 24h Transfektion wurden die HeLa-Zellen mit *C. pneumoniae* TWAR für weitere 46h infiziert, fixiert und die Einschlußkörper mit einem TRITC-gelabelten Sekundärantikörper, der gegen einen *C. pneumoniae*-Primärantikörper gerichtet war, durch indirekte Immunfluoreszenz im konfokalen Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Es fiel sowohl in Rab5a Wildtyp als auch in beiden Rab5a-Mutanten exprimierenden Zellen nach

3. Ergebnisse

46h Infektion ein einzelner Einschlußkörper auf, der sich wieder unabhängig von der Transfektion der Rab5a-Plasmide entwickeln konnte (Abb. 12).

Auf die Transfektionsmorphologie hatte die Infektion der transfizierten HeLa-Zellen mit *C. pneumoniae* keinen Einfluß (Abb. 12). Trotz der Transfektionszeit von insgesamt 70h und der zusätzlichen *C. pneumoniae*-Infektion von 46h zeigte sich dieselbe intrazelluläre Transfektionsmorphologie wie in den *C. trachomatis*-Versuchen, bei denen die Infektionszeit nur 24h betrug. Die konstitutiv inaktive Mutante Rab5a S34N war ohne deutlich erkennbare Vesikelbildung diffus in der ganzen Zelle verteilt. Die Expression der konstitutiv aktiven Rab5a-Mutante Q79L zeigte stark vergrößerte Vesikel verteilt in der ganzen Zelle. In HeLa-Zellen, die den Rab5a Wildtyp exprimierten, fand sich allerdings eine diffusere Vesikelbildung. Das stärkste GFP-Signal zeigte sich perinukleär in Kolokalisation mit dem *C. pneumoniae*-Einschlußkörper.

Zusammenfassend ließ sich keine Assoziation von Rab5a mit der Einschlußkörpermembran nachweisen (Abb. 12). Dieses Ergebnis wird von den Beobachtungen von Rzomp (2003), untermauert, bei denen ebenfalls keine Membranassoziation von Rab5 Wildtyp mit *C. pneumoniae* beobachtet werden konnte (Rzomp et al., 2003). Somit war auch die Entwicklung eines *C. pneumoniae*-Einschlußkörpers in vorliegenden Versuchen Rab5a-unabhängig.



a.) **Rab5a wt** b.) **Rab5a S34N** c.) **Rab5a Q79L**

Abb. 12. Die GFP-Rab5a-Aktivität hat keinen Einfluß auf die Einschlußkörperentwicklung von *C. pneumoniae*. Nach 24h Transfektion mit GFP-Rab5a wt, GFP-Rab5a S34N oder GFP-Rab5a Q79L wurden die HeLa-Zellen mit *C. pneumoniae* infiziert. Nach 46h Infektion wurden die Präparate fixiert und die Chlamydien mit einem TRITC-gelabelten Sekundäntikörper, der gegen einen *C. pneumoniae*-Primäntikörper gerichtet war, durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemacht.

a.) In mit Rab5a wt transfizierten HeLa-Zellen zeigt sich zellkernnah ein einziger Einschlußkörper. Das GFP-Signal durch Rab5a wt akkumuliert am Inklusion und Zellkern.

b.) Der einzelne Einschlußkörper befindet sich zellkernnah. Die Vesikelbildung ist diffus und in der Zelle verteilt.

c.) Deutliche, vergrößerte Vesikelbildung durch Rab5a Q79L. Der einzelne *C. pneumoniae*-Einschlußkörper befindet sich in Nähe des Zellkerns.

3.3.2 Untersuchung des Einflusses von Rab5a auf quantitative Größen der Einschlußkörperbildung von *C. pneumoniae*

Um einen möglichen quantitativen Rab5a-Einfluß auf die Einschlußkörperbildung und -reifung nicht zu übersehen, wurden die Präparate bezüglich der Infektionsrate, der Inklusionlokalisation, der Inklusionanzahl und des Inklusiondurchmessers analysiert.

3.3.2.1 Einfluß von Rab5a auf die Infektionsrate von *C. pneumoniae* in HeLa-Zellen

Ausgewertet wurden die gleichzeitig transfizierten und infizierten Zellen in 15 Gesichtsfeldern pro Präparat; je nach Versuch bildeten im Durchschnitt 50 Zellen ein Gesichtsfeld. Die Werte ergaben sich aus den Durchschnittswerten von insgesamt drei Versuchsreihen. Für den Rab5a Wildtyp ergab sich im Durchschnitt eine Zahl von 2,1 transfizierten Zellen pro Gesichtsfeld, die gleichzeitig auch einen *C. pneumoniae*-Einschlußkörper aufwiesen. In mit der konstitutiv inaktiven Mutante Rab5 S34N transfizierten Zellen zeigte sich im Mittel bei 1,65 Zellen ein Einschlußkörper. Einen ähnlichen Wert wiesen die Zellen der konstitutiv aktiven Mutante Rab5a Q79L mit 1,75 auf (Abb.13). Da diese Werte sich nicht signifikant unterscheiden, scheint die unterschiedliche Aktivität der Rab5a-Mutanten die Infektionsrate einzelner Zellen nicht zu beeinflussen.

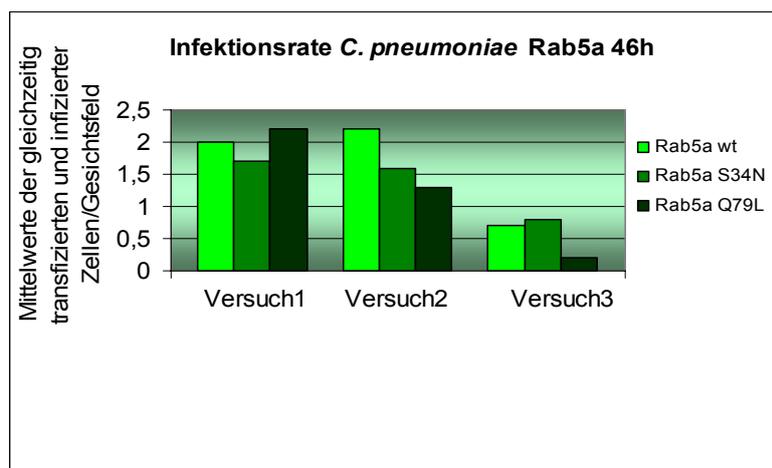


Abb. 13. Die Aktivität von Rab5a hat keinen signifikanten Einfluß auf die Infektionsrate von HeLa-Zellen mit *C. pneumoniae* nach 46h Infektion.

In jeweils 3 unabhängigen, identischen Versuchen wurden die mit GFP-Rab5a wt, GFP-Rab5a S34N oder GFP-Rab5a Q79L transfizierten Zellen in je 15 Gesichtsfeldern gezählt, die einen Einschlußkörper von *C. pneumoniae* enthielten. Daraus wurde dann pro Versuch jeweils der Mittelwert gebildet, der in obigem Diagramm als Balken dargestellt wurde.

3.3.2.2 Einfluß von Rab5a auf die Anzahl der Einschlußkörper in *C. pneumoniae*-infizierten HeLa-Zellen

Um zu zeigen, inwieweit Rab5a möglichen Einfluß nimmt auf die Anzahl der gebildeten *C. pneumoniae*-Einschlußkörper in einer Zelle, wurden diese in allen Präparaten ausgezählt. Vergleich man die mit den beiden Mutanten transfizierten Zellen mit der Wildtypkontrolle, so ließ sich kein Unterschied bezüglich der Anzahl der Inklusions pro Zelle feststellen. Es zeigte sich nach 46h Inkubation sowohl im Wildtyp als auch bei beiden Mutanten ein einzelnes, großes Inklusion (Abb.12). Bei einer hohen Infektionsrate der Wirtszelle bildet *C. pneumoniae* charakteristischerweise mehrere Einschlußkörper in einer Zelle aus, die im Gegensatz zu *C. trachomatis*-Vesikeln nicht fusionieren (Wolf et al., 2000). In vorliegendem Versuch war die MOI sehr gering, weshalb es vermutlich zur Ausbildung von nur einem Einschlußkörper kam. Es ist unwahrscheinlich, daß Rab5a ursächlich für diese Anzahl ist, da der einzelne Einschlußkörper sowohl in Rab5a Wildtyp exprimierenden Zellen als auch in die beiden Rab5a-Mutanten exprimierenden Zellen zu finden war. Die selten beobachtete Mehrzahl an Einschlußkörpern in einer Zelle war vernachlässigbar klein und zeigte sich wiederum bei allen drei GFP-Rab5a-Mutanten.

3.3.2.3 Einfluß von Rab5a auf die Lokalisation des Einschlußkörpers in *C. pneumoniae* infizierten HeLa-Zellen

Bezüglich der Lokalisation des *C. pneumoniae*-Einschlußkörpers in einer infizierten Zelle unter Rab5a-Einfluß fanden sich die gleichen Ergebnisse wie bei *C. trachomatis*. Auch der *C. pneumoniae*-Einschlußkörper lässt sich schon bald nach Internalisation der Bakterien üblicherweise in der perinukleären Region finden (Hackstadt et al., 1996; Scidmore et al., 1996b; Higashi 1965; Majeed and Kihlstrom, 1991). In den HeLa-Zellen, die mit Rab5a Wildtyp transfiziert wurden, zeigte sich 46 h.p.i. im Fluoreszenzmikroskop eine typische *C. pneumoniae*-Inklusionbildung nahe des Zellkerns.

Mit der konstitutiv inaktiven Mutante Rab5aS34N transfizierte HeLa-Zellen zeigten ebenfalls eine Inklusionbildung perinukleär. Auch in Rab5 Q79L exprimierenden Zellen ließ sich der Einschlußkörper ausschließlich nahe des Zellkerns nachweisen (Abb. 12).

3.3.2.4 Einfluß von Rab5a auf die Größe des Einschlußkörpers in *C. pneumoniae*-infizierten Hela-Zellen

Zuletzt wurde der Vakuolendurchmesser von *C. pneumoniae* in den mit Rab5a Plasmiden transfizierten Zellen untersucht. Es wurden je 10 Gesichtsfelder pro Präparat ausgewertet und daraus der Mittelwert gebildet. Die durchschnittliche Zellzahl pro Gesichtsfeld betrug 50. Nach 24-stündiger Transfektion mit Rab5 S34N, Rab5 Q79L oder Rab5 Wildtyp und anschließender *C. pneumoniae*-Infektion zeigten sich nach 46h Infektion bei Rab5a Wildtyp Einschlußkörper mit einem Durchmesser von durchschnittlich 5,75µm. Bei der konstitutiv-inaktiven Mutante Rab5a S34N ergab sich ein ähnlicher Durchschnittswert von 6,1µm. In die konstitutiv-aktive Mutante Rab5a Q79L exprimierenden Zellen ließen sich 46 h.p.i. Einschlußkörper mit einem vergleichbaren Durchmesser von durchschnittlich 5,55µm finden. Somit war keine Wachstumsverzögerung oder -beschleunigung des *C. pneumoniae*-Einschlußkörpers unter dem Einfluß der Rab5a-Mutanten nachweisbar, da sich die mittleren Durchmesserwerte nach 46h Infektion nicht signifikant unterschieden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß Rab5a auch für die Entwicklung eines Einschlußkörpers von *C. pneumoniae* nicht essentiell ist und keinen Einfluß auf die Infektionsrate, die Inklusionlokalisation und ihre Größe nachweisbar ist.

4. Diskussion

Nach heutigem Wissensstand sind die Interaktionen von Chlamydien mit ihrer Wirtszelle Voraussetzung für das intrazelluläre Überleben der Erreger. Die wahrscheinlich schon sehr früh einsetzende Modifikation der Inklusionmembran, die Umgehung der Fusion mit intrazellulären lysosomalen Vesikeln und die Kontaktaufnahme mit dem exozytischen Transportweg stellen für Chlamydien wichtige Schritte dar, ihre einzigartige Nische in eukaryoten Zellen einzurichten und sich unabhängig von den Verteidigungsstrategien der Wirtszelle zu entwickeln. Da durch genetische Analysen die Codierung für einen Typ-III-Apparat entdeckt wurde (Stephens et al., 1998; Hsia et al., 1997) und bisher ein chlamydiales Protein (IncA) in der Einschlußkörpermembran dargestellt werden konnte, das durch die Wirtszelle phosphoryliert wird (Rockey et al., 1997), wird vermutet, daß Chlamydien durch einen Typ-III-Mechanismus mit dem Wirt über die Sekretion essentieller Virulenzfaktoren interagieren. Dieser Mechanismus ist bei anderen Pathogenen wie Yersinien, Salmonellen, Shigellen und Pseudomonas ausführlich beschrieben (Hueck et al., 1998).

Die molekularen Mechanismen, über die sich Chlamydien den physiologischen Abwehrmechanismen der eukaryoten Zelle nach Internalisation entziehen, sind bis heute nicht verstanden. Mikroorganismen haben vielfältige Mechanismen entwickelt, um der Zerstörung durch eine Wirtszelle zu entgehen, die in vielen Fällen auf der Modifikation ihrer Phagosomen bzw. deren Membran beruhen. In diesem Zusammenhang kommt den GTPasen Rab5 und Rab7 im Zusammenspiel von bakterienhaltigem Phagosom und Wirtszelle Bedeutung zu. Intrazelluläre Bakterien beeinflussen diese Proteine dahingehend, daß sie ihre Bindungen an Phagosomen modulieren und damit eingreifen in die Interaktion bzw. Regulation der phagozytierten Vesikel mit weiteren Vesikeln (Sturgill-Koszycki et al. 1996, Uchiya et al. 1999, Fratti et al. 2001). Diese beiden GTPasen spielen auch eine wichtige Rolle bei den Abwehrmechanismen einiger anderer Bakterien wie Salmonellen (Rab5, Hashim et al., 2000), Mykobakterien (Rab5, Via et al, 1997; Clemens et al., 2000), *Coxiella burnetii* (Rab7, Beron et al., 2002) und Legionellen (Rab5, Clemens et al., 2000).

So sistiert die Reifung des salmonellenhaltigen Phagosoms in einem frühen Schritt des endozytischen Weges, da durch Retention von Rab5 die Fusion mit Frühen Endosomen ausgelöst wird und die reguläre Reifung zu einem Phagolysosom durch fehlende Bindung mit Rab7 verhindert wird (Hashim et al., 2000; Mukherjee et al. 2000). Das Überleben von *Mycobacterium bovis* wird durch Rab5-Retention und Ausschluß von Rab7 gesichert, wodurch

4. Diskussion

ebenfalls die Reifung des Phagosoms zu einem Phagolysosom unterbunden wird (Via et al., 1997; Clemens et al., 2000).

Coxiella burnetii vermehrt sich in einer sauren Vakuole, die einem Lysosom ähnelt und an deren Membran Rab7 nachgewiesen wurde (Heinzen et al., 1996; Beron et al., 2002).

Legionellen interagieren nicht mit dem frühen endozytischen Kompartiment, da Rab5 nicht an ihren Phagosomen nachweisbar war (Clemens et al., 2000).

Der Weg, den Chlamydien nehmen, scheint einzigartig zu sein, denn bisher wurde kein anderer Parasit entdeckt, der schon früh mit dem exozytischen Transportweg interagiert und Sphingomyelin aquiriert. Es ist unklar, inwieweit die Einschlußkörper der internalisierten Chlamydien überhaupt mit dem endozytischen Transportweg in Kontakt treten. Inwieweit beeinflussen Rab5 und Rab7 als Regulatoren des frühen endozytischen Vesikelverkehrs die Einschlußkörperbildung, bzw. treten sie überhaupt mit den erregerhaltigen Phagosomen von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* in Kontakt?

Durch die vorliegenden Versuche mit Rab5 Wildtyp und seinen beiden Mutanten, sowie Rab7 Wildtyp und der dominant-inaktiven Mutante konnte gezeigt werden, daß sich Einschlußkörper des Serovars L2 von *C. trachomatis* in mit Rab5 und Rab7 transfizierten HeLa-Zellen entwickeln konnten. Ebenso kam es zur Inklusionentwicklung von *C. pneumoniae* in mit Rab5a transfizierten Zellen. Die Auswertung der Präparate zeigte, daß sich die Bildung und Entwicklung der Einschlußkörper völlig unabhängig von der Aktivität der Rab5- und Rab7-Proteine vollzog. Die Transfektion mit Rab5- und Rab7-Mutanten hatte keinen Einfluß auf die Internalisationsrate von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*, die stadiumentsprechende Größe des Einschlußkörpers, die Lokalisation in der Zelle, und auf die Inklusionanzahl pro Zelle. Diese Beobachtung zeigt, daß die Rab-GTPasen 5 und 7 nicht essentiell für die Einschlußkörperbildung und –reifung von *C. trachomatis* L2 und *C. pneumoniae* in HeLa-Zellen sind.

Der konsequente Ausschluß von Rab5a von der chlamydialen Einschlußkörpermembran ist wahrscheinlich ein wichtiger Schritt, um die Reifung des Phagosoms zu einem Lysosom zu verhindern. Auch ein anderer Erreger, *Legionella pneumophila*, scheint sich dieses Mechanismus zu bedienen und tritt durch Ausschluß von Rab5c ebenfalls nicht mit dem endozytischen Transportweg in Kontakt (Clemens et al., 2000). Die Versuche dieser Studie wurden allerdings ausschließlich mit Rab5c durchgeführt.

Invasion und Rab5a

Der genaue Internalisationsmechanismus von Chlamydien ist noch weitgehend unverstanden. Es wurden die rezeptorvermittelte Endozytose (RME) über Clathrin-coated pits in polarisierten Epithelzellen (Wyrick et al., 1989), Pinozytose (Prain and Pearce, 1989), parasitspezifische Phagozytose (Byrne and Moulder, 1978) und Invasion über caveolinhaltige sphingolipid- und cholesterinreiche Raft-Microdomains (Norkin et al., 2001) beschrieben. Die Aufnahme über cholesterinreiche Domänen wurde in einer weiteren Studie bestätigt (Jutras et al., 2003). Unterschiedliche Ergebnisse, wie die Widerlegung der Aufnahme über Clathrin (Boleti et al., 1999) und über Lipid-rafts (Gabel et al., 2004), tragen zur Unklarheit bei. Die Invasion von *C. trachomatis* scheint mit einer Aktin-Umbildung und daraus folgender Reorganisation von Mikrovilli zu erfolgen (Carabeo et al., 2002) und wird durch Rac vermittelt (Carabeo et al., 2004). Bis jetzt ist wenig bekannt über die chlamydialen Liganden und die entsprechenden Rezeptoren an der Wirtszellmembran. Erstmals konnte in einer neueren Studie gezeigt werden, daß die Internalisation von Chlamydien in die Zelle über ein Effektorprotein vermittelt wird („Tarp“, für translocated actin-recruiting phosphoprotein), das durch einen Typ-III-Mechanismus sezerniert wird (Clifton et al., 2004). Zudem konnte die Aktivierung der wirtszelleigenen GTPase ARF6 durch Chlamydien verantwortlich für die Aktinreorganisation während der Invasion gemacht werden (Balana et al., 2005). Offensichtlich sind für den jeweiligen Invasionsmechanismus die Membranrezeptoren, die Chlamydienspezies, die verschiedenen Serovare und die Wirtszellart entscheidend (Bavoil et al., 2000), da beispielsweise *C. trachomatis* in polarisierten Zellen öfter über Endozytose aufgenommen wird als in nichtpolarisierten Zellen (Wyrick et al., 1989). In den vorliegenden Versuchen kam es unabhängig von der Rab5a-Aktivität zur Invasion von *C. trachomatis* wie auch von *C. pneumoniae* in mit Rab5a-Mutanten transfizierten HeLa-Zellen, obwohl für die Expression der dominant-negativen Rab5-Mutante S34N in der Literatur eine Abnahme der Endozytoseaktivität beschrieben wird (Stenmark et al., 1994b; Li et al., 1994). Ebenso wurde die Beobachtung gemacht, daß es durch Rab5Q79L zu einer Zunahme der fluid-phase-Endozytose und der Transferrinaufnahme kommt (Stenmark et al., 1994b). Beide in ihrer Funktion gegensätzlichen Mutanten zeigten keine Änderung bezüglich der quantitativen Internalisationsrate, denn die Anzahl der gleichzeitig transfizierten und infizierten Zellen war sowohl bei Expression mit Rab5a Wildtyp als auch bei beiden Rab5a-Mutanten annähernd gleich. Daraus kann geschlossen werden, daß die Internalisation von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* in HeLa-Zellen Rab5a-unabhängig verläuft und sowohl *C. trachomatis* als auch *C. pneumoniae* werden,

4. Diskussion

zumindest in vorliegendem Versuchsaufbau, vermutlich durch einen anderen Invasionsmechanismus als Endozytose in HeLa-Zellen aufgenommen. Daß es einen endozytose-unabhängigen und damit einen Rab5-unabhängigen Internalisationsweg gibt, wird durch eine Studie belegt, in der eine Assoziation von Chlamydien mit cholesterinreichen Lipiddomänen beobachtet wurde, die auch weiterhin nach Internalisation besteht (Jutras et al., 2003). Allerdings scheint weniger der Invasionsweg das spätere Schicksal des chlamydienhaltigen Phagosoms zu beeinflussen, als die frühe Proteinbiosynthese und die folgende Modifikation der Einschlußkörpermembran (Scidmore et al., 1996b). Widersprüchlicherweise wurde allerdings auch in Rab5Q79L exprimierenden Zellen eine unveränderte Endozytoserate von TfR und des fluid phase Markers HRP (Horseradish peroxidase) beschrieben, was die Möglichkeit einer anderen, Rab5-unabhängigen Endozytoseform offen läßt (Ceresa et al., 2001).

Keine Kolokalisation von Rab5a und Rab7 mit dem Einschlußkörper von C. trachomatis und C. pneumoniae

Betrachtet man den reifen Einschlußkörper von *C. trachomatis* bzw. *C. pneumoniae* 24h bzw. 48h nach Infektion bezüglich der Assoziation mit den Rab GTPasen, so findet sich folgendes Bild: In vorliegenden Versuchen ließen sich zwar zu diesen Zeitpunkten die GFP-markierten Rab-GTPasen 5a und 7 immer in Nähe des Einschlußkörpers nachweisen, doch gab es, zumindest mit der lasermikroskopischen Darstellungsmöglichkeit, keinen Hinweis auf eine spezifische Assoziation, die in den Versuchen von Rzomp et al., (2003), als fluoreszierender Ring um das Inklusion aufgefallen war. Diese Assoziation war mit anderen Rab-GTPasen (1, 4, 6 und 11) und der Inklusionmembran von *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* und *C. muridarum* beobachtet worden, die in Schritte des Recyclings (Rab4 und Rab11), in den Transport in Richtung des trans-Golgi-Network (TGN) (Rab6 und Rab11) und in den Transport von endoplasmatischem Retikulum (ER) in Richtung Golgi-Apparat involviert sind (Rab1) (Sönnichsen et al., 2000; Ullrich et al., 1996; Mallard et al., 2002; Wilcke et al., 2000; Tisdale et al., 1992). Auch zu früheren Zeitpunkten, 12h bis 19h nach Infektion mit *C. trachomatis*, ließ sich keine Assoziation von Rab5a und Rab7 mit der Einschlußkörpermembran nachweisen. Diese Ergebnisse sind konsistent mit denen von Rzomp, die ebenfalls keine Kolokalisation mit Rab5 und Rab7 nachweisen konnten. Die Tatsache, daß sich sowohl der Wildtyp als auch die aktiven und inaktiven Mutanten von Rab5a und Rab7 nicht an der Einschlußkörpermembran finden ließen, bestätigen die Vermutung, dass Chlamydien eher mit Recycling- als mit frühen endosomalen Transportwegen in Verbindung treten. Unterstützt wird diese Vermutung auch durch den Nachweis von Sphingomyelin-

aufnahme in der peri-Golgi-Region durch den Einschlußkörper und die sich vermehrenden Chlamydien und damit dem Inkontaktreten mit dem exozytischen Transportweg (Hackstadt et al., 1996; Wolf et al., 2001).

Die in vorliegenden Versuchen selten beobachteten Gelbfärbungen um und in den *C. trachomatis*-Einschlußkörpern sind am ehesten Überblendungen, da diese Beobachtung sich sowohl bei den GFP-Rab5a Mutanten als auch dem Wildtyp feststellen ließ und somit keine Spezifität für eine GTPase aufwies. In den Versuchen von Rzomp et al. (2003) konnten ähnliche Gelbfärbungen gezeigt werden, die in dieser Studie aber eindeutig als Rab-spezifische Membranassoziation von Rab1, 4, 6 und 11 nachgewiesen werden konnten.

Frühes Austreten aus dem endozytischen Transportweg

Aus früheren Studien ist bekannt, daß Rab5 essentiell für die Fusion von endozytierten Vesikeln bzw. Clathrin-coated vesicles mit den ersten Vesikeln des endozytischen Transportweges, den frühen Endosomen, ist (Gorvel et al., 1991; McLauchlan et al., 1998). Ebenso hat diese GTPase entscheidende Regulatorfunktionen am Beginn des Vesikelverkehrs, wenn es zur Fusion zwischen zwei Frühen Endosomen (Barbieri et al., 1998; Gorvel et al., 1991; Bucci et al., 1992) bzw. zwischen einem Endosom und Phagosom kommt (Alvarez-Dominguez et al., 1996). Bisher konnte keine Interaktion des Einschlußkörpers mit den verschiedenen Schritten des endozytischen Transportweges nachgewiesen werden. Die Marker für Frühe Endosomen (Transferrin [Tf]/Transferrin-Rezeptor [TfR] und early endosomal antigen 1 [EEA 1]), für Späte Endosomen (Kation-independent Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) und für Lysosomen (LAMP-1, LAMP-2 [=lysosomale Membranproteine] und Cathepsin D [=lysosomale Protease]) konnten nicht in reifen Einschlußkörpern nachgewiesen werden (Heinzen et al., 1996; Scidmore et al., 2003; van Ooij et al., 1997; Scidmore et al. 1996a; Taraska et al., 1996; Al-Younes et al., 1999). Außerdem fehlen fluid-phase Marker wie Lucifer Gelb und Fluoreszin-isothiocyanat-dextran (Heinzen et al. 1996). Auch der lysosomale Marker Saure Phosphatase ist nicht in reifen Einschlußkörpern von *C. trachomatis* nachzuweisen (Heinzen et al., 1996). Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse von van Ooij, der eine enge Assoziation von frühen und späteren endozytischen Markern (Tf, TfR und CI-M-6-P-R) mit dem Einschlußkörper beschrieben hatte (van Ooij et al. 1997). Durch genauere mikroskopische Techniken wurde nur eine nahe Lokalisation von Endosomen an dem Einschlußkörper, aber keine Fusion mit der Einschlußkörpermembran oder ein intraluminaler Markernachweis beschrieben (Scidmore et al.,

2003). Auch sind durch die Infektion mit *C. trachomatis* nicht alle Transportwege einer Zelle gestört, sondern nur beschränkt auf das Pathogen, da andere Vesikel mit Lysosomen fusionieren können (Eissenberg and Wyrick, 1981, Heinzen et al., 1996).

Auch in vorliegenden Versuchen fand sich keine Assoziation des Einschlußkörpers von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* mit Rab5a. In Bezug auf die vorliegenden Ergebnisse würde das bedeuten, daß sich der Erreger schon vor dem ersten Schritt des endozytischen Transportweges, nämlich der Fusion des endozytierten Vesikels mit dem Frühen Endosom, von der regulären Phagosomenreifung in einer eukaryoten Zelle isoliert und sich unabhängig davon entwickelt. Normalerweise fusionieren endozytierte Vesikel sehr schnell mit Lysosomen (Oates and Touster, 1976; Segal et al., 1980). Es wird angenommen, daß diese Isolation in zwei Schritten abläuft (Fields and Hackstadt, 2002): im ersten, inaktiven Schritt muß die Zellwand von Chlamydien Faktoren besitzen, um der Fusion mit Lysosomen zu entgehen. Die entsprechenden chlamydialen Zellwandfaktoren müssen schon vor Internalisation vorhanden und somit unabhängig von chlamydialer Proteinbiosynthese sein, da z.B. gereinigte Zellwände von *C. psittaci*-Elementarkörpern auch nur langsam mit Lysosomen fusionieren (Eissenberg et al., 1983). Der 2. Schritt erfordert eine aktive Modifikation der Einschlußkörpermembran, denn durch Hemmung der sehr früh einsetzenden Proteinbiosynthese mit Chloramphenicol kommt es bei *C. trachomatis* zu einer schnellen Fusion mit Lysosomen und der bakteriellen Degradation (Scidmore et al., 1996b; Friis et al., 1972).

Auch daß sich Rab7 als Regulator in einem späteren Schritt nicht in Assoziation mit der Einschlußkörpermembran finden ließ, bestätigt als Negativkontrolle diese Isolation von frühen Transportwegen.

Homotypische Fusion und Morphologie

In jeder infizierten Zelle fand man 24 h.p.i. einen einzigen, großen Einschlußkörper, was der Fähigkeit von *C. trachomatis* entspricht, in einer multipel infizierten Wirtszelle zu einem Einschlußkörper zu fusionieren (Ridderhof and Barnes, 1989; Blyth and Taverne, 1972; van Ooij et al., 1998). Diese Fusion scheint abhängig zu sein von der Temperatur und der bakteriellen Proteinbiosynthese (van Ooij et al., 1998).

Auch in den Kinetikversuchen mit *C. trachomatis*, die einen Zeitraum von 12h (Daten nicht gezeigt) bzw. 14h-19h nach Infektion untersuchten, zeigte sich in den meisten Präparaten ein einzelner Einschlußkörper. Schon zu dem am frühesten untersuchten Zeitpunkt 12 h.p.i. (Daten

4. Diskussion

nicht gezeigt) ließ sich nur ein einzelner Einschlusskörper erkennen, was entweder auf eine niedrige MOI oder auf eine bereits stattgefundenene Fusion hinweist, da die homotypische Fusion einzelner Inklusions bereits 10 h.p.i. beginnt (Hackstadt et al., 1999a).

Ein einzelner Einschlußkörper fand sich zu allen untersuchten Zeitpunkten sowohl in mit der konstitutiv-inaktiven Mutante von Rab5a transfizierten Zellen, als auch in Zellen der konstitutiv-aktiven Mutante, obwohl die GTPase Rab5a Vesikelfusionen reguliert (Barbieri et al., 1998; Stenmark et al., 1994b). Man müßte daher annehmen, daß nur in Zellen, in denen die inaktive Form von Rab5a exprimiert wird, mehrere Inklusions zu sehen sind. Dies konnte in vorliegenden Versuchen nicht beobachtet werden. Daher bestehen 3 Möglichkeiten: 1.) zum einen spielt Rab5a keine Rolle bei der homotypischen Fusion von *C. trachomatis*-Vesikeln, 2.) zum anderen ist die Fusion der einzelnen Vesikel bereits 12 h.p.i. abgeschlossen oder 3.) die MOI war zu klein, sodaß die transfizierten HeLa-Zellen nicht multipel infiziert wurden. Wäre letzteres der Fall, wäre die Frage mit diesem Versuchsaufbau letztendlich nicht untersucht.

Selten fanden sich in vorliegenden Versuchen bei allen Mutanten multiple Einschlußkörper bei *C. trachomatis* L2, die sich möglicherweise damit erklären lassen, daß nach 24h Infektion einzelne Zellen später als die Mehrzahl infiziert wurden und die Fusion zu einer einzelnen Vakuole noch ausstand. Es sind einige Subgruppen von bestimmten Stämmen bekannt, deren Vakuolen nicht fusionieren, wozu das Serovar L2 aber nicht gehört (Suchland et al., 2000). Da die multiplen Einschlußkörper bei allen Mutanten zu finden waren, kann von keinem spezifischen Effekt ausgegangen werden.

Auch war der Durchmesser eines *C. trachomatis*-Einschlußkörpers bei Rab5a Wildtyp nach 24 h.p.i. fast gleichgroß wie der der Mutanten (ca. 9,7µm). Somit kam es in Zellen, die mit Rab5a Wildtyp oder seinen Mutanten transfiziert wurden, zu keiner Entwicklungsverzögerung der Einschlußkörperbildung, und es zeigte sich folglich dafür keine Abhängigkeit von der Rab5a-Aktivität. Es ist wahrscheinlich, daß der Erreger selbst seine Vesikelmembran so modifiziert, daß Rab5 keine Möglichkeit mehr hat anzudocken. Es sind Proteine in der Einschlußkörpermembran bekannt, die offensichtlich eine wichtige Rolle bei dieser Vesikelfusion spielen; denn wird das Einschlußkörpermembranprotein IncA in *C. trachomatis*-haltigen Inklusions mit komplementären Antikörpern geblockt, so findet die Fusion mehrerer Inklusions nicht statt (Hackstadt et al., 1999). Klinische Isolate von *C. trachomatis*, die kein IncA exprimieren, zeigen ebenfalls keine Fusion, sondern multiple Einschlußkörper (Suchland et al., 2000). Im Gegensatz zu *C. trachomatis* ist es ein Charakteristikum von *C. pneumoniae*-Vakuolen, nicht zu fusionieren und multiple Einschlußkörper in einer Zelle zu bilden (Wolf et al., 2000).

4. Diskussion

Die Tatsache, daß man in vorliegenden Versuchen mit allen 3 Rab5a-Mutanten in jeder Zelle nur einen Einschlußkörper von *C. pneumoniae* fand, ist wahrscheinlich der niedrigen MOI-Rate bei Infektion zuzuschreiben. Nach 46 h.p.i. wiesen die Einschlußkörper sowohl in Rab5a-Wildtyp-Zellen als auch in denen der beiden Rab5a-Mutanten einen durchschnittlichen Durchmesser von 5,8µm auf, was eine zeitgleiche Entwicklung impliziert.

Spezies-Spezifität von C. trachomatis und C. pneumoniae

Genetische Vergleiche konnten zeigen, daß sich die verschiedenen Chlamydienspezies in der Proteinzusammensetzung ihrer Einschlußkörpermembranen deutlich unterscheiden (Bannantine et al., 2000). Damit besteht die Möglichkeit für jede Spezies, auf unterschiedliche Art mit dem Wirt zu interagieren. So konnte beispielsweise eine Lokalisation von Rab6a und Rab6b nur bei Einschlußkörpern von *C. trachomatis* Serovar D und L2 gefunden werden und nicht bei *C. muridarum* und *C. pneumoniae*, wohingegen Rab1, Rab4a/b und Rab11a/b mit den Einschlußkörpern aller untersuchten Chlamydienspezies (*C. trachomatis* Serovar D und L2, *C. muridarum* und *C. pneumoniae*) kolokalisierten (Rzomp et al., 2003). In den letztgenannten Versuchen von Rzomp wurden die GTPasen Rab5wt bzw. Rab7wt ausschließlich in Verbindung mit der Spezies *C. trachomatis* L2 getestet. In vorliegenden Versuchen konnte keine Kolokalisation von Rab5a, Rab7 und ihren Mutanten sowohl bei *C. trachomatis* Serovar L2 noch bei *C. pneumoniae* AR39 gefunden werden. Wenn dies als spezies-spezifische Beobachtung gewertet würde, besteht die Möglichkeit, daß eine Interaktion beispielsweise mit einer anderen Spezies wie *C. psittaci* bzw. *C. muridarum* dennoch stattfindet, was eine Option für weitere Versuche darstellt.

Lokalisation

Aus früheren Studien ist bekannt, daß Chlamydien sehr bald nach ihrer Invasion in die perinukleäre Region transportiert werden (Hackstadt et al., 1996; Scidmore et al., 1996b; Higashi 1965; Majeed and Kihlstrom, 1991), um mit dem exozytischen Transportweg in Verbindung zu treten und dadurch Sphingomyelin von Vesikeln des Golgi-Apparates auf ihrem Weg zur Plasmamembran zu akquirieren (Hackstadt et al., 1997). Der Mechanismus dieses frühen Transportes ist allerdings bis jetzt noch nicht genau bekannt. Anscheinend sind F-Aktin und Clathrin bei der intrazellulären Verteilung von *C. trachomatis* Serovar L2 und E involviert (Majeed and Kihlström, 1991). In einigen Studien, allerdings nicht in Zusammenhang mit Chlamydien,

scheint Rab5 auch bei intrazellulären Transportmechanismen eine Rolle zu spielen, da Rab5 in die Reorganisation von Aktin-Stress-Fasern involviert ist (Imamura et al., 1998) und assoziiert mit zytoskelettalen Elementen gefunden wurde (Kurzchalia et al., 1992). Außerdem reguliert Rab5 den Transport von frühen Endosomen entlang von Mikrotubulen (Nielsen et al., 1999). Auch ist bekannt, daß überexprimiertes Rab5a Wildtyp und die Mutante Q79L in der perinukleären Region akkumulieren (Bucci et al., 1992; Stenmark et al., 1994b). Da Rab5a auch noch in den zytoskelettalen Transport involviert zu sein scheint und in der gleichen intrazellulären Region wie Chlamydien zu finden ist, bestand die Möglichkeit, daß durch Expression der Mutanten eine Änderung im Transport bzw. der Lokalisation der inkorporierten Chlamydien beobachtet werden könnte. In den vorliegenden Versuchen mit Rab5a und *C. trachomatis* bzw. *C. pneumoniae* war der Einschlußkörper ausnahmslos in der perinukleären Region lokalisiert, unabhängig davon, ob die Wirtszelle mit dem Wildtyp, der dominant-aktiven oder dominant-inaktiven Mutante von Rab5a transfiziert war. Somit ließ sich keine Änderung bezüglich der Lokalisation unter dem Einfluss von Rab5a feststellen, obwohl die intrazelluläre Umverteilung zumindest von *C. trachomatis* als mikrotubulusabhängig beschrieben wurde (Clausen et al., 1997). In der Studie von Nielsen war die Bewegung von frühen Endosomen entlang von Mikrotubulen Rab5-abhängig; allerdings waren erstere direkt mit Rab5 assoziiert nachgewiesen worden, was eine Membranfusion voraussetzt. Da Rab5a in vorliegenden Versuchen auch nicht mit der Einschlußkörpermembran assoziiert war, wäre es unwahrscheinlich, daß auch der intrazelluläre Transport von Chlamydien durch die GTPase beeinflusst wird. Allerdings war auch in den Versuchen von Nielsen die Regulation der Endosomen-Motilität unabhängig von der Endosomenfusion (Nielsen et al., 1999). Somit scheint die GTPase Rab5a nicht in den intrazellulären Transport von Chlamydien involviert zu sein. Möglicherweise könnten aber die GTPasen Rab6 (Mallard et al., 2002) und Rab11 (Wilcke et al., 2000), die den Transport von Frühen Endosomen in Richtung Trans-Golgi-Netzwerk regulieren, in den Inklusionstransport involviert sein, da letztere assoziiert an dem Einschlußkörper von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* in Versuchen von Rzomp et al., (2003), nachgewiesen werden konnten.

Transfektion mit Rab5a Q79L

Die Expression der konstitutiv aktiven Rab5a-Mutante Q79L führt zu vergrößerten endosomalen Vesikeln innerhalb der Zelle (Stenmark et al., 1994b). Dies konnte auch bei vorliegenden transienten Transfektionen in HeLa-Zellen beobachtet werden. Ebenso ist ein Anstieg der

Transferrin-Endozytoserate und eine Hemmung des Transferrin-Recycling durch Expression dieser Mutante bekannt (Stenmark et al., 1994b). Im Gegensatz dazu wurde aber in einer neueren Studie gezeigt, daß trotz der extrem vergrößerten Endosomen, die Rate der Transferrin-rezeptorvermittelten Endozytose und des Recyclings innerhalb der Zelle nicht von der erhöhten Aktivität dieser Mutante beeinflusst werden (Ceresa et al., 2001). Offensichtlich scheint die stabile Expression von Rab5aQ79L zwar die Fusion der Endosomen untereinander zu beeinflussen, nicht aber die Funktionen im endozytischen Membranverkehr. Änderungen in der Endosomenmorphologie führen somit nicht zwangsläufig zu einer Änderung des Vesikelverkehrs. Die intrazelluläre Expression von Rab5aQ79L in vorliegenden Versuchen führte zu einer veränderten Endosomenmorphologie, aber weder zu einer Störung der Internalisation noch zu einer Entwicklungsverzögerung und Transportänderung der Einschlußkörper von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*.

Rab-Isoformen

Die vorliegenden Versuche wurden alle mit Rab5a durchgeführt. Es existieren noch 2 weitere Isoformen, Rab5b und Rab5c, die in ihrer Funktion und Kompartimentlokalisierung als ähnlich beschrieben wurden (Bucci et al., 1995; Singer-Krüger et al., 1994; Singer-Krüger et al., 1995). Interessanterweise hatten 2 Homologe dieser 3 Isoformen in Versuchen mit *Trypanosoma brucei* unterschiedliche Funktionen (Field et al., 1998). Zudem konnten in einer Studie von Alvarez-Dominguez und Stahl Unterschiede in der Funktion von Rab5a und Rab5c beobachtet werden (Alvarez-Dominguez and Stahl, 1999). Auch in den Versuchen von Rzomp wurde Rab5a verwendet. Es wäre eine Option, in weiteren Versuchen den Einfluß der beiden anderen Rab5 Isoformen auf die Einschlußkörperentwicklung von Chlamydien zu untersuchen.

Unklarer Einfluß von endogenem Rab

Es ist anzunehmen, daß die transfizierte Zelle auch zusätzlich noch endogene Rab-Proteine synthetisiert. In den Versuchen von Rzomp konnten diese nicht immunhistologisch nachgewiesen werden, d.h. die Funktion der endogenen Rab-GTPasen bleibt bezüglich der Interaktion mit Chlamydien letztendlich noch unklar. Selbst wenn Cycloheximid verwendet wurde, ist aufgrund des Proteinturnovers wahrscheinlich noch endogenes Rab in der Zelle enthalten. Prinzipiell wird angenommen, daß sich die GFP-Plasmide in der Zelle wie die entsprechenden endogenen GTPasen verhalten. Aber selbst der GFP-markierte Wildtyp von

Rab5a führte in vorangegangenen Studien bei Überexpression zu einer Vergrößerung der Endosomen, zu einer Stimulation der Endosomenfusion, Beschleunigung der fluid-phase Endozytose und der Transferrinaufnahme (Gorvel et al., 1991; Bucci et al., 1992; Roberts et al., 1999; Stenmark et al. 1994b).

Die Transfektion stellt eine Überexpression der Rab-GTPasen dar und ist so eigentlich nicht mit dem natürlichen Zustand in der Zelle vergleichbar. Es sind sogar Versuche mit Rab5aQ79L beschrieben worden (allerdings nicht GFP-gelabelt), in denen trotz Expression der Mutante und trotz morphologischer Vergrößerung der Endosomen unerwarteterweise keine Änderung des Transferrinrecyclings bzw. in der Endozytoserate der Zelle beobachtet werden konnte (Ceresa et al., 2001), d.h. trotz Expression der Mutante ist keine Änderung in einer ihr zugeordneten Zellfunktion aufgetreten.

Begrenzung durch die Zelllinie

Offensichtlich scheint die Fähigkeit von Chlamydien, sich der Fusion mit Lysosomen zu entziehen, auch von der Zelllinie abhängig zu sein, die sie infizieren. So fusionieren die okulogenitalen *C. trachomatis*-Stämme in Makrophagen mit Lysosomen (Yong et al., 1987), wohingegen sich *C. psittaci*- und die LGV-Stämme von *C. trachomatis* in diesen Zellen unabhängig von lysosomaler Fusion replizieren können.

Unter diesen Voraussetzungen besteht die Möglichkeit, die Wirkung aktiver und inaktiver Mutanten involvierter Rab-GTPasen auf die Inklusionreifung speziell in Makrophagen zu untersuchen.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass die an frühen endozytischen Transportwegen beteiligten GTPasen Rab5 und Rab7 keinen Einfluß auf die Bildung und Entwicklung von Einschlußkörpern von *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydothila pneumoniae* in HeLa-Zellen haben. Da beide GTPasen nicht an der Inklusionmembran lokalisieren, sind diese Ergebnisse mit der Hypothese vereinbar, daß die Exklusion von Rab5 vom Einschlußkörper einen wesentlichen Mechanismus zum intrazellulären Überleben von Chlamydien darstellt. Die Überprüfung dieses Modells und gegebenenfalls genaue mechanistische Aufklärung sollte Ziel weiterer Untersuchungen sein.

5. Zusammenfassung

Chlamydia trachomatis und *Chlamydophila pneumoniae* sind humanpathogene, obligat intrazelluläre Erreger, die sich in einer membrangebundenen Vakuole entwickeln. Durch noch unbekannte Mechanismen entgehen sie der Fusion mit intrazellulären lysosomalen Vesikeln und nehmen Kontakt mit dem exozytischen Transportweg auf. Wie andere Pathogene scheinen Chlamydien einen spezifischen Abwehrmechanismus zu besitzen, um dem streng gerichteten frühen endozytischen Transportweg zu entkommen, der normalerweise über den Weg von frühen Endosomen zu späten Endosomen und schließlich in der Degradation inkorporierter Erreger in dem lysosomalen Kompartiment endet. Wichtige Regulatoren dieser Schritte sind die GTPasen Rab5 und Rab7, die für einzelne Schritte dieser Strecke essentiell sind. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß dieser GTPasen auf die Entwicklung der Einschlußkörper von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* zu untersuchen, indem HeLa-Zellen mit konstitutiv-aktiven und konstitutiv-inaktiven Mutanten transfiziert und anschließend mit den zwei Chlamydienspezies infiziert wurden.

Folgende Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit erzielt:

1. Die Entwicklung der Einschlußkörper von *C. trachomatis* L2 und *C. pneumoniae* ist unabhängig von der Aktivität von Rab5a und Rab7.
2. Rab5a und Rab7 kolokalisieren nicht mit der Einschlußkörpermembran von *C. trachomatis* L2 und *C. pneumoniae*.
3. Ein signifikanter Einfluß von Rab5a und Rab7 auf die Infektionsrate von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* in infizierten HeLa-Zellen war nicht nachweisbar.
4. Die Internalisation von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* ist unabhängig von Rab5a.
5. *C. trachomatis* L2 und *C. pneumoniae* werden unabhängig von der Rab5a-Aktivität in die perinukleäre Region transportiert.
6. Die Morphologie der Einschlußkörper von *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* wird nicht durch Rab5a und Rab7 beeinflusst.

Diese Ergebnisse sind konsistent mit einem Modell, in dem der Ausschluß von Rab5 von der Inklusionmembran entscheidend zum intrazellulären Überleben der Chlamydien beiträgt.

6. Literaturverzeichnis

Alvarez-Dominguez, C., Barbieri, A.M., Beron, W., Wandinger-Ness, A., Stahl, P.D.

(1996). Phagocytosed live *Listeria monocytogenes* influences Rab5-regulated *in vitro* phagosome-endosome fusion. *J Biol Chem* **271**: 13834-13843.

Alvarez-Dominguez, C., and Stahl, P.D. (1999). Increased expression of Rab5a correlates

directly with accelerated maturation of *Listeria monocytogenes* phagosomes. *J Biol Chem* **274**: 11459-11462.

Al-Younes, H.M., Rudel, T., and Meyer, T.F. (1999). Characterization and intracellular

trafficking pattern of vacuoles containing *Chlamydia pneumoniae* in human epithelial cells. *Cell Microbiol* **1**: 237-247.

Balana, M.E., Niedergang, F., Subtil, A., Alcover, A., Chavier, P., and Dautry-Varsat, A.

(2005). ARF6 GTPase controls bacterial invasion by actin remodelling. *J Cell Sci* **118**: 2201-2210.

Bannantine, J.P., Griffiths, R.S., Viratyosin, V., Brown, W.J., and Rockey, D.D. (2000). A

secondary structural motif predictor of protein localization to the chlamydial inclusion membrane. *Cell Microbiol* **2**: 35-48.

Barbieri, M.A., Li, G., Mayorga, L.S., and Stahl, P.D. (1996). Characterization of rab5:Q79L-

stimulated endosome fusion. *Arch Biochem Biophys* **326**: 64-72.

Barbieri, M.A., Hoffenberg, S., Roberts, R., Mukhopadhyay, A., Pomrehn, A., Dickey,

B.F., and Stahl, P.D. (1998). Evidence for a symmetrical requirement for Rab5-GTP in *in vitro* endosome-endosome fusion. *J Biol Chem* **273**: 25850-25855.

Bavoil, P.M., Hsia, R., and Ojcius, D.M. (2000). Closing in on *Chlamydia* and its intracellular

bag of tricks. *Microbiology* **146**: 2723-2731.

Beron, W., Gutierrez, M.G., Rabinovitch, M., and Colombo, M. (2002). Coxiella burnetii localizes in a rab7-labeled compartment with autophagic characteristics. *Infect Immun* **70**: 5816-5821.

Birkelund, S., Johnsen, H., and Christiansen, G. (1994). Chlamydia trachomatis serovar L2 induces protein tyrosine phosphorylation during uptake by HeLa cells. *Infect Immun* **62**: 4900-4908.

Blyth, W. A., and Taverne, J. (1972). Some consequences of the multiple infection of cell cultures by TRIC organisms. *J Hyg* **70**: 33-37.

Bock, J.B., Matern, H.T., Peden, A.A., and Scheller, R.H. (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* **409**: 839-841.

Boleti, H., Benmerah, A., Ojcius, D.M., Cerf-Bensussan, N., and Dautry-Varsat, A. (1999). Chlamydia infection of epithelial cells expressing dynamin and Eps15 mutants: clathrin-independent entry into cells and dynamin-dependent productive growth. *J Cell Sci* **112**: 1487-1496.

Bucci, C., Parton, R.G., Mather, I.H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B. and Zerial, M. (1992). The small GTPase Rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**:715-728.

Bucci, C., Lütcke, A., Steele-Mortimer, O., Olkkonen, V.M., Dupree, P., Chiariello, M., Bruni, C.B., Simons, K., and Zerial, M. (1995). Co-operative regulation of endocytosis by three RAB5 isoforms. *FEBS Lett* **366**: 65-71.

Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J., and van Deurs, B. (2000). Rab7: A key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* **11**: 467-480.

Byrne, G.I., and Moulder, J.W. (1978). Parasite-specified phagocytosis of Chlamydia psittaci and Chlamydia trachomatis by L and HeLa cells. *Infect Immun* **19**: 598-606.

Cantalupo, G., Alifano, P., Roberti, V., Bruni, C.B., and Bucci, C. (2001). Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the rab7 effector required for transport to lysosomes. *EMBO J* **20**: 683-693.

Carabeo, R.A., and Hackstadt, T. (2001). Isolation and characterization of a mutant Chinese hamster ovary cell line that is resistant to *Chlamydia trachomatis* infection at a novel step in the attachment process. *Infect Immun* **69**: 5899-5904.

Carabeo, R.A., Grieshaber, S.S., Fischer, E., and Hackstadt, T. (2002). *Chlamydia trachomatis* induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells. *Infect Immun* **70**: 3793-3803.

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

Ceresa, B.P., Lotscher, M., and Schmid, S.L. (2001). Receptor and membrane recycling can occur with unaltered efficiency despite dramatic rab5(Q79L)-induced changes in endosome geometry. *J Biol Chem* **276**: 9649-9654.

Chen, J.C., and Stephens, R.S. (1994). Trachoma and LGV biovars of *Chlamydia trachomatis* share the same glycosaminoglycan-dependent mechanism for infection of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **11**: 501-507.

Chavrier, P., Parton, R.G., Hauri, H.P., Simons, K., and Zerial, M. (1990). Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* **62**: 317-329.

Christoforidis, S., McBride, H.M., Burgoyne, R.D., and Zerial, M. (1999a). The rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**: 621-625.

Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S.-C., Waterfield, M.D., Backer, J.M., and Zerial, M. (1999b). Phosphatidylinositol-3-OH kinases are rab5 effectors. *Nat Cell Biol* **1**: 249-252.

- Clausen, J.D., Christiansen, G., Holst, H.U., and Birkelund, S.** (1997). Chlamydia trachomatis utilizes the host cell microtubule network during early events of infection. *Mol Microbiol* **25**: 441-449.
- Clemens, D.L., Lee, B.-L., and Horwitz, M.** (2000). Deviant expression of rab5 on phagosomes containing the intracellular pathogens Mycobacterium tuberculosis and Legionella pneumophila is associated with altered phagosomal fate. *Infect Immun* **68**: 2671-2684.
- Clifton, D.R., Fields, K.A., Grieshaber, S.S., Dooley, C.A., Fischer, E.R., Mead, D.J., Carabeo, R.A., and Hackstadt, T.** (2004). A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *PNAS* **101**: 10166-10171.
- Corsaro, D., Venditti, D., and Valassina, M.** (2002). New parachlamydial 16S rDNA phylotypes detected in human clinical samples. *Res Microbiol* **153**: 563-567.
- Daro, E., van der Sluijs, P., Galli, T., and Mellman, I.** (1996). Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 9559-9564.
- Davis, C.H., and Wyrick, P.B.** (1997). Differences in the association of Chlamydia trachomatis serovar E and serovar L2 with epithelial cells in vitro may reflect biological differences in vivo. *Infect Immun* **65**: 2914-2924.
- Desjardins, M.** (1995). Biogenesis of phagolysosomes: the `kiss and run` hypothesis. *Trends Cell Biol* **5**: 183-186.
- Eissenberg, L.G., and Wyrick, P.B.** (1981). Inhibition of phagolysosome fusion is localized to Chlamydia psittaci-laden vacuoles. *Infect Immun* **32**: 889-896.
- Eissenberg, L.G., Wyrick, P.B., Davis, C.H., and Rumpp, W.** (1983). Chlamydia psittaci elementary body envelopes: ingestion and inhibition of phagolysosome fusion. *Infect Immun* **40**: 741-751.

Everett, K.D.E., Bush, R.M., and Andersen, A.A. (1999). Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam.nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 415-440.

Fawaz, F.S., van Ooij, C., Homola, E., Mutka, S.C., and Engel, J.N. (1997). Infection with *Chlamydia trachomatis* alters the tyrosine phosphorylation and/or localization of several host cell proteins including cortactin. *Infect Immun* **65**: 5301-5308.

Feng, Y., Press, B., and Wandinger-Ness, A. (1995). Rab7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* **131**: 1435-1452.

Field, H., Farjah, M., Pal, A., Gull, K., and Field, M.C. (1998). Complexity of trypanosomatid endocytosis pathways revealed by rab4 and rab5 isoforms in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* **273**: 32102-32110.

Fields, K.A., and Hackstadt, T. (2000). Evidence for the secretion of *Chlamydia trachomatis* CopN by a type III secretion mechanism. *Mol Microbiol* **38**: 1048-1060.

Fields, K.A., Fischer, E., and Hackstadt, T. (2002). Inhibition of fusion of *Chlamydia trachomatis* inclusions at 32°C correlates with restricted export of IncA. *Infect Immun* **70**: 3816-3823.

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

Fields, K.A., Mead, D.J., Dooley, C.A., and Hackstadt, T. (2003). *Chlamydia trachomatis* type III secretion: evidence for a functional apparatus during early-cycle development. *Mol Microbiol* **48**: 671-683.

Fields, P., and Barnes, R.C. (1992). The Genus *Chlamydia*. The Prokaryotes, 2nd ed., Balrus et al., Springer-Verlag. 3691-3709.

- Fratti, R.A., Backer, J.M., Gruenberg, J., Corvera, S., and Deretic, V.** (2001). Role of phosphatidylinositol 3-kinase and rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol* **154**: 631-644.
- Friis, R.R.** (1972). Interaction of L cells and Chlamydia psittaci: entry of the parasite and host response to its development. *J Bacteriol* **110**: 706-721.
- Fudyk, T., Olinger, L., and Stephens, R.S.** (2002). Selection of mutant cell lines resistant to infection by Chlamydia trachomatis and Chlamydia pneumoniae. *Infect Immun* **70**: 6444-6447.
- Gabel, B.R., Elwell, C., van Ijzendoorn, S.C.D., and Engel, J.N.** (2004). Lipid Raft-mediated entry is not required for Chlamydia trachomatis infection of cultured epithelial cells. *Infect Immun* **72**: 7367-7373.
- Gille, G., Klapp, C., Diedrich, K., Schäfer, A., Motor, A., Griesinger, G., und Kirschner, R.** (2005). Chlamydien-eine heimliche Epidemie unter Jugendlichen. *Dtsch Arztebl* **102**: A 2021-2025 (Heft 28-29).
- Gorvel, J.-P., Chavrier, P., Zerial, M., and Gruenberg, J.** (1991). Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**: 915-925.
- Grieshaber, S.S., Grieshaber, N.A., and Hackstadt, T.** (2003). Chlamydia trachomatis uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process. *J Cell Sci* **116**: 3793-3802.
- Hackstadt, T., Scidmore, M.A., and Rockey, D.D.** (1995). Lipid metabolism in Chlamydia trachomatis-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 4877-4881.
- Hackstadt, T., Rockey, D.D., Heinzen, R.A., and Scidmore, M.A.** (1996). Chlamydia trachomatis interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *EMBO J* **15**: 964-977.

Hackstadt, T., Fischer, E.R., Scidmore, M.A., Rockey, D.D., and Heinzen, R.A. (1997). Origins and functions of the chlamydial inclusion. *Trends Microbiol* **5**: 288-293.

Hackstadt, T., Scidmore-Carlson, M.A., Shaw, E., Fischer, E. (1999a). The Chlamydia trachomatis IncA protein is required for homotypic vesicle fusion. *Cell Microbiol* **1**: 119-130.

Hackstadt, T. (1999b). Chlamydia: Intracellular biology, pathogenesis, and immunity. Edited by R.S. Stephens. American Society for Microbiology, Washington, D.C., S. 101-102 und S. 129.

Hammerschlag, M.R. (2002). The intracellular life of Chlamydiae. *Semin Pediatr Infect Dis* **13**: 239-248.

Hardt, W.-D., Chen, L.-M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R., and Galán, J.E. (1998). S. typhimurium encodes an activator of rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**: 815-826.

Hashim, S., Mukherjee, K., Raje, M., Basu, S.K., and Mukhopadhyay, A. (2000). Live Salmonella modulate expression of rab proteins to persist in a specialized compartment and escape transport to lysosomes. *J Biol Chem* **275**: 16281-16288.

Hatch, G.M., and McClarty, G. (1998). Phospholipid composition of purified Chlamydia trachomatis mimics that of the eucaryotic host cell. *Infect Immun* **66**: 3727-3735.

Hatch, T.P., Al-Hossainy, E., and Silverman, J.A. (1982). Adenine nucleotide and lysine transport in Chlamydia. *J Bacteriol* **150**: 662-670.

Heinzen, R.A., Scidmore, M.A., Rockey, D.D., and Hackstadt, T. (1996). Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of Coxiella burnetii and Chlamydia trachomatis. *Infect Immun* **64**: 796-809.

Higashi, N. (1965). Electron microscopic studies on the mode of reproduction of trachoma virus and psittacosis virus in cell cultures. *Exp Mol Pathol* **4**: 24-39.

Horiuchi, H., Lippé, R., McBride, H.M., Rubino, M., Woodman, P., Stenmark, H., Rybin, V., Wilm, M., Ashman, K., Mann, M., and Zerial, M. (1997). A novel rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* **90**: 1149-1159.

Hsia, R.C., Pannekoek, Y., Ingerowski, E., and Bavoil, P.M. (1997). Type III secretion genes identify a putative virulence locus of Chlamydia. *Mol Microbiol* **25**: 351-359.

Hueck, C. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.

Imamura, H., Takaishi, K., Nakano, K., Kodama, A., Oishi, H., Shiozaki, H., Monden, M., Sasaki, T., and Takai, Y. (1998). Rho and Rab small G proteins coordinately reorganize stress fibers and focal adhesions in MDCK cells. *Mol Biol Cell* **9**: 2561-2575.

Jordens, I., Fernandez-Borja, M., Marsman, M., Dusseljee, S., Janssen, L., Calafat, J., Janssen, H., Wubbolts, R., and Neefjes, J. (2001). The rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol* **11**: 1680-1685.

Jutras, I., Abrami, L., and Dautry-Varsat, A. (2003). Entry of the Lymphogranuloma venereum strain of Chlamydia trachomatis into host cells involves cholesterol-rich membrane domains. *Infect Immun* **71**: 260-266.

Kleba, B.J., Banta, E., Lindquist, E.A., and Stephens, R.S. (2002). Recruitment of mammalian cell fibronectin to the surface of Chlamydia trachomatis. *Infect Immun* **70**: 3935-3938.

Kornfeld, S., and Mellmann, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* **5**: 483-525.

Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J.E., and Aizawa, S.-I. (1998). Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Science* **280**: 602-605.

Kurzchalia, T.V., Gorvel, J.-P., Dupree, P., Parton, R., Kellner, R., Houthaeve, T., Gruenberg, J., and Simons, K. (1992). Interactions of rab5 with cytosolic proteins. *J Biol Chem* **267**: 18419-18423.

Li, G., Barbieri, A., Colombo, M.I., and Stahl, P.D. (1994). Structural features of the GTP-binding defective rab5 mutants required for their activity on endocytosis. *J Biol Chem* **269**: 14631-14635.

Li, G., D'Souza-Schorey, C., Barbieri, M.A., Roberts, R.L., Klippel, A., Williams, L.T., and Stahl, P.D. (1995). Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase as a regulator of endocytosis via activation of rab5. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 10207-10211.

Lundemose, A.G., Birkelund, S., Larsen, P.M., Fey, S.J., and Christiansen, G. (1990). Characterization and identification of early proteins in *Chlamydia trachomatis* Serovar L2 by two-dimensional gel electrophoresis. *Infect Immun* **58**: 2478-2486.

Majeed, M., and Kihlström, E. (1991). Mobilization of F-Actin and Clathrin during redistribution of *Chlamydia trachomatis* to an intracellular site in eucaryotic cells. *Infect Immun* **59**: 4465-4472.

Mallard, F., Tang, B.L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue, X., Antony, C., Hong, W., Goud, B., and Johannes, L. (2002). Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J Cell Biol* **156**: 653-664.

Matsumoto, A. (1982a). Electron microscopic observations of surface projections on *Chlamydia psittaci* reticulate bodies. *J Bacteriol* **150**: 358-364.

Matsumoto, A. (1982b). Surface projections of *Chlamydia psittaci* elementary bodies as revealed by freeze-deep-etching. *J Bacteriol* **151**: 1040-1042.

Matsumoto, A., Bessho, H., Uehira, K., and Suda, T. (1991). Morphological studies of the association of mitochondria with chlamydial inclusions and the fusion of chlamydial inclusions. *J Electron Microsc (Tokyo)* **40**: 356-63.

- Matyszak, M.K., Young, J.L., and Gaston, J.S.** (2002). Uptake and processing of Chlamydia trachomatis by human dendritic cells. *Eu J Immunol* **32(3)**: 742-751.
- McBride, H.M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R., and Zerial, M.** (1999). Oligomeric complexes link rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and Syntaxin 13. *Cell* **98**: 377-386.
- McLauchlan, H., Newell, J., Morrice, N., Osborne, A., West, M. and Smythe, E.** (1998). A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits. *Curr Biol* **8**:34-45.
- Mohrmann, K., and van der Sluijs, P.** (1999). Regulation of membrane transport through the endocytic pathway by rabGTPases. *Mol Membr Biol* **16**: 81-87.
- Moulder, J.W.** (1991). Interaction of Chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev* **55**: 143-190.
- Mukherjee, K., Siddiqi, S.A., Hashim, S., Raje, M., Basu, S.K., Mukhopadhyay, A.** (2000). Live Salmonella recruits N-Ethylmaleimide-sensitive fusion protein on phagosomal membrane and promotes fusion with early endosome. *J Cell Biol* **148**: 741-753.
- Mukhopadhyay, A., Funato, K., and Stahl, P.D.** (1997). Rab7 regulates transport from early to late endocytic compartments in Xenopus Oocytes. *J Biol Chem* **272**: 13055-13059.
- Nielsen, E., Severin, F., Backer, J.M., Hyman, A.A., Zerial, M.** (1999). Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nature Cell Biol* **1**: 376-382.
- Norkin, L.C., Wolfrom, S.A., and Stuart, E.S.** (2001). Association of Caveolin with Chlamydia trachomatis inclusions at early and late stages of infection. *Exp Cell Res* **266**: 229-238.
- Oates, P.J., and Touster, O.** (1976). In vitro fusion of Acanthamoeba phagolysosomes. *J Cell Biol* **68**: 319-338.

- Ojcius, D.M., Hellio, R., and Dautry-Varsat, A.** (1997). Distribution of endosomal, lysosomal, and major histocompatibility complex markers in a monocytic cell line infected with *Chlamydia psittaci*. *Infect Immun* **65**: 2437-2442.
- van Ooij, C., Apodaca, G., and Engel, J.N.** (1997). Characterization of the *Chlamydia trachomatis* vacuole and its interaction with the host endocytic pathway in HeLa cells. *Infect Immun* **65**: 758-766.
- van Ooij, C., Homola, E., Kincaid, E., and Engel, J.** (1998). Fusion of *Chlamydia trachomatis*-containing inclusions is inhibited at low temperatures and requires bacterial protein synthesis. *Infect Immun* **66**: 5364-5371.
- Plaunt, M.R., and Hatch, T.P.** (1988). Protein synthesis early in the developmental cycle of *Chlamydia psittaci*. *Infect Immun* **56**: 3021-3025.
- Prain, C.J., and Pearce, J.H.** (1989). Ultrastructural studies on the intracellular fate of *Chlamydia psittaci* (strain Guinea pig inclusion conjunctivitis) and *Chlamydia trachomatis* (strain Lymphogranuloma venereum 434): modulation of intracellular events and relationship with endocytic mechanism. *J Gen Microbiol* **135**: 2107-2123.
- Raulston, J.E., Davis, C.H., Paul, T.R., Hobbs, J.D., and Wyrick, P.B.** (2002). Surface accessibility of the 70-kilodalton *Chlamydia trachomatis* heat shock protein following reduction of outer membrane protein disulfide bonds. *Infect Immun* **70**: 535-543.
- Reynolds, D.J., and Pearce, J.H.** (1991). Endocytic mechanisms utilized by Chlamydiae and their influence on induction of productive infection. *Infect Immun* **59**: 3033-3039.
- Ridderhof, J.C., and Barnes, R.C.** (1989). Fusion of inclusions following superinfection of HeLa cells by two serovars of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* **57**: 3189-3193.
- Roberts, R.L., Barbieri, M.A., Pryse, K.M., Chua, M., Morisaki, J.H., and Stahl, P.D.** (1999). Endosome fusion in living cells overexpressing GFP-rab5. *J Cell Sci* **112**: 3667-3675.

Rockey, D.D., Heinzen, R.A., and Hackstadt, T. (1995). Cloning and characterization of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. *Mol Microbiol* **15**: 617-626.

Rockey, D.D., Fischer, E.R., and Hackstadt, T. (1996). Temporal analysis of the developing *Chlamydia psittaci* inclusion by use of fluorescence and electron microscopy. *Infect Immun* **64**: 4269-4278.

Rockey, D.D., Grosenbach, D., Hruby, D.E., Peacock, M.G., Heinzen, R.A., and Hackstadt, T. (1997). *Chlamydia psittaci* IncA is phosphorylated by the host cell and is exposed on the cytoplasmic face of the developing inclusion. *Mol Microbiol* **24**: 217-228.

Rockey, D.D., Lenart, J., and Stephens, R.S. (2000). Genome sequencing and our understanding of chlamydiae. *Infect Immun* **68**: 5473-5479.

Rzomp, K. A., Scholtes, L. D., Briggs, B. J., Whittaker, G. R., and Scidmore, M. A. (2003). Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner. *Infect Immun* **71**: 5855-5870.

Schachter, J. (1999). Infection and disease epidemiology, aus: *Chlamydia: Intracellular biology, pathogenesis, and immunity*. Edited by R.S. Stephens. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Scholz, A. (1976). The 100th birthday of Ludwig Halberstaedter (1876-1949). *Dermatol Monatsschr* **162**: 1015-1025.

Schramm, N. and Wyrick, P.B. (1995). Cytoskeletal requirements in *Chlamydia trachomatis* infection of host cells. *Infect Immun* **63**: 324-332.

Schramm, N., Bagnell, C.R., and Wyrick, P.B. (1996). Vesicles containing *Chlamydia trachomatis* serovar L2 remain above pH 6 within HEC-1B cells. *Infect Immun* **64**: 1208-1214.

- Scidmore, M.A., Fischer, E.R., and Hackstadt, T.** (1996a). Sphingolipids and glycoproteins are differentially trafficked to the *Chlamydia trachomatis* inclusion. *J Cell Biol* **134**: 363-374.
- Scidmore, M.A., Rockey, D.D., Fischer, E.R., Heinzen, R.A., and Hackstadt, T.** (1996b). Vesicular interactions of the *Chlamydia trachomatis* inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry. *Infect Immun* **64**: 5366-5372.
- Scidmore-Carlson, M.A., Shaw, E.I., Dooley, C.A., Fischer, E.R., and Hackstadt, T.** (1999). Identification and characterization of a *Chlamydia trachomatis* early operon encoding four novel inclusion membrane proteins. *Mol Microbiol* **33**: 753-765.
- Scidmore, M.A., Fischer, E.R., and Hackstadt, T.** (2003). Restricted fusion of *Chlamydia trachomatis* vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection. *Infect Immun* **71**: 973-984.
- Segal, A.W., Dorling, J., and Coade, S.** (1980). Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* **85**: 42-59.
- Simonsen, A., Lippé, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.-M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.-H., Murphy, C., Zerial, M., and Stenmark, H.** (1998). EEA1 links PI(3)K function to rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**: 494-498.
- Simons, K., and Toomre, D.** (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31-39.
- Singer-Krüger, B., Stenmark, H., Düsterhöft, A., Philippsen, P., Yoo, J.-S., Gallwitz, D., and Zerial, M.** (1994). Role of three rab5-like GTPases, Ypt51p, Ypt52p, and Ypt53p, in the endocytic and vacuolar protein sorting pathways of yeast. *J Cell Biol* **125**: 283-298.
- Singer-Krüger, B., Stenmark, H., and Zerial, M.** (1995). Yeast Ypt51p and mammalian rab5: counterparts with similar function in the early endocytic pathway. *J Cell Sci* **108**: 3509-3521.

Sönnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of rab4, rab5 and rab11. *J Cell Biol* **149**: 901-913.

Stenmark, H., Parton, R.G., Steele-Mortimer, O., Lutke, A., Gruenberg, J., and Zerial, M. (1994b). Inhibition of Rab5GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J* **13**: 1287-1296.

Stenmark, H., and Olkkonen, V.M. (2001). The rab GTPase family. *Genome Biol* **2**:reviews 3007.1.

Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., Koonin, E.V., and Davis, R.W. (1998). Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* **282**: 754-759.

Sturgill-Koszycki, S., Schaible, U.E., and Russell, D.G. (1996). *Mycobacterium*-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO J* **15**: 6960-6968.

Su, H., Zhang, Y.-X., Barrera, O., Watkins, N.G., and Caldwell, H.D. (1988). Differential effect of trypsin on infectivity of *Chlamydia trachomatis*: loss of infectivity requires cleavage of major outer membrane protein variable domains II and IV. *Infect Immun* **56**: 2094-2100.

Su, H., Raymond, L., Rockey, D.D., Fischer, E., Hackstadt, T., and Caldwell, H.D. (1996). A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 11143-11148.

Subtil, A., Parsot, C., and Dautry-Varsat, A. (2001). Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol Microbiol* **39**: 792-800.

Suchland, R.J., Rockey, D.D., Bannantine, J.P., and Stamm, W.E. (2000). Isolates of *Chlamydia trachomatis* that occupy nonfusogenic inclusions lack IncA, a protein localized to the inclusion membrane. *Infect Immun* **68**: 360-367.

Taraska, T., Ward, D.M., Ajioka, R.S., Wyrick, P.B., Davis-Kaplan, S.R., Davis, C.H., and Kaplan, J. (1996). The late chlamydial inclusion membrane is not derived from the endocytic pathway and is relatively deficient in host proteins. *Infect Immun* **64**: 3713-3727.

Ting, L.-M., Hsia, R.-C., Haidaris, C.G., and Bavoil, P.M. (1995). Interaction of outer envelope proteins of *Chlamydia psittaci* GPIC with the HeLa surface. *Infect Immun* **63**: 3600-3608.

Tisdale, E.J., Bourne, J.R., Khosravi-Far, R., Der, C.J., and Balch, W.E. (1992). GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the golgi complex. *J Cell Biol* **119**: 749-761.

Todd, W.J., and Caldwell, H.D. (1985). The interaction of *Chlamydia trachomatis* with host cells: ultrastructural studies of the mechanism of release of a biovar II strain from HeLa 229 cells. *J Infect Dis* **151**: 1037-1044.

Touchot, N., Chardin, P., and Tavitian, A. (1987). Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc Natl Acad Sci* **84**: 8210-8214.

Tran van Nhieu, G., Caron, E., Hall, A., and Sansonetti, P.J. (1999). IpaC induces actin polymerisation and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. *EMBO J* **18**: 3249-3262.

Uchiya, K., Barbieri, M.A., Funato, F., Shah, A.H., Stahl, P.D., and Groisman, E.A. (1999). A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J* **18**: 3924-3933.

Ullrich, O., Reinsch, S., Urbé, S., Zerial, M., and Parton, R.G. (1996). Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol* **135**: 913-924.

Via, L.E., Deretic, D., Ulmer, R.J., Hibler, N.S., Huber, L.A. and Deretic, V. (1997). Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem* **272**:13326-13331.

Webley, W.C., Norkin, L., and Stuart, E.S. (2004). Caveolin-2 associates with intracellular chlamydial inclusions independently of caveolin-1. *BMC Infect Dis* **4**: 23.

Wehrl, W., Brinkmann, V., Jungblut, P.R., Meyer, T.F., and Szczepek, A.J. (2004). From the inside out-processing of the chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells. *Mol Microbiol* **51**: 319-334.

Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B., and Salamero, J. (2000). Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-Golgi Network. *J Cell Biol* **151**: 1207-1220.

Wolf, K., Fischer, E., and Hackstadt, T. (2000). Ultrastructural analysis of developmental events in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells. *Infect Immun* **68**: 2379-2385.

Wolf, K., and Hackstadt, T. (2001). Sphingomyelin trafficking in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells. *Cell Microbiol* **3**: 145-152.

Wuppermann, F.N., Hegemann, J.H., and Jantos, C.A. (2001). Heparan sulfate-like glycosaminoglycan is a cellular receptor for *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* **184**: 181-187.

Wylie, J.L., Hatch, G.M., and McClarty, G. (1997). Host cell phospholipids are trafficked to and then modified by *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol* **179**: 7233-7242.

Wyrick, P.B., Choong, J., Davis, C.H., Knight, S.T., Royal, M.O., Maslow, A.S., and Bagnell, C.R. (1989). Entry of genital *Chlamydia trachomatis* into polarized human epithelial cells. *Infect Immun* **57**: 2378-2389.

Wyrick, P.B. (2000). Intracellular survival by *Chlamydia*. *Cell Microbiol* **2**: 275-282.

Yong, E.C., Chi, E.Y., and Kuo, C.C. (1987). Differential antimicrobial activity of human mononuclear phagocytes against the human biovars of *Chlamydia trachomatis*. *J Immunol* **139**: 1297-1302.

Zhang, J.P., and Stephens, R.S. (1992). Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. *Cell* **69**: 861-869.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
C	Celsius
C.	Chlamydia
CHO-Zellen	chinese hamster ovary cells
CO ₂	Kohlendioxid
CaCl ₂	Kalziumchlorid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
E. coli	Escherichia coli
EEA1	early endosome antigen 1
ER	endoplasmatisches Retikulum
FBS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GFP	green fluorescent protein (grünes fluoreszierendes Protein)
h	hour (Stunde)
HeLa	Zellen eines Zervixadenokarzinomes
h.p.i.	hours post infection (Stunden nach Infektion)
h.p.t.	hours post transfection (Stunden nach Transfektion)
IFU	inclusion forming unit (Einschlusskörper bildende Einheit)
LB	Luria-Bertani
LGV	Lymphogranuloma venereum
LPS	Lipopolysaccharid

7. Abkürzungen

µg	Mikrogramm
min.	Minute/n
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOI	Majority of infection
MOMP	major outer membrane protein (Hauptmembranoberflächenprotein)
PBS	Phosphate buffered saline
PenStrep	Penicillin+Streptomycin
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Zellkulturmedium, erfunden im Roswell-Park-Memorial-Institut
2-SP-Medium	2-Sucrose-P-Medium
pSFFV	Spleen Focus Forming Virus Enhancer Region
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment/acceptor receptor
Tab.	Tabelle
Tarp	translocated actin-recruiting phosphoprotein, chlamydiales Effektorprotein
TGN	trans-Golgi-Network
Transformation	Einbringung von DNA-Bruchstücken in Bakterien
TRITC	Tetrarodumisothiocyanat
TWAR-39	Taiwan acute respiratory-Stamm
wt	Wildtyp

8. Danksagung

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Corinna Barz für ihre Geduld, ihre Unterstützung, ihr Engagement und kritische Anregung.

Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am Max-von-Pettenkofer-Institut in München durchführen zu können.

Allen Kollegen der Arbeitsgruppe und der Forschungsabteilung möchte ich für gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Unterstützung danken.

Meinem Vater gebührt Dank für das Korrekturlesen. Außerdem möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre jahrelange Motivation und Unterstützung danken.

9. Lebenslauf

Name: Cornelia Schneider

Geburtsdatum: 17.11.1974

Geburtsort: München

Familienstand: ledig

Schulbildung:

09/1981-07/1985 Nadi-Grundschule, München

09/1985-07/1994 Oskar-von-Miller-Gymnasium, München, Abitur: 07/1994

Freiwilliges Soziales Jahr:

02/1995-08/1995 Stiftsklinik Augustinum, München

Studium:

05/1996-12/2002 Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München:
Physikum in München (03/1998)

1. Staatsexamen in München (03/1999)

2. Staatsexamen in München (08/2001)

10/2001-09/2002 Praktisches Jahr:

- Erstes Tertial: Chirurgie (Viszeralchirurgie und Traumatologie), King Edward Hospital, Durban, Südafrika

- Zweites Tertial: Innere Medizin (Allg. Innere Medizin und Rheumatologie), Schlosspark Klinik, Berlin

- und Innere Medizin (Allg. Innere Medizin), Kantonspital, St. Gallen, Schweiz

- Drittes Tertial: Pädiatrie (Kinderkardiologie und Ambulanz für Allgemeine Pädiatrie), Campus Virchow-Klinikum, Berlin

3. Staatsexamen in Berlin (12/2002)

Ärztin im Praktikum (ÄiP):

05/2003-09/2004 in der 1. Medizinischen Abteilung des Schwabinger Krankenhauses, München, Schwerpunkt Infektiologie

Approbation:

10/2004 erhalten durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin

Klinische Tätigkeit:

10/2004-03/2005 Assistenzärztin in der 1. Medizinischen Abteilung des Schwabinger Krankenhauses, München, Schwerpunkt Infektiologie
Seit 09/2005 Assistenzärztin in der Zentralen Internen Notaufnahme des Schwabinger Krankenhauses, München

München, 29.03.2007