Schlussbericht zu Nr. 3.2

Zuwendungsempfänger: Technische Universität München, Institut für Medizinische Mikrobiologie
Projektleiter: Univ.-Prof. Dr. med. Georg Häcker

Förderkennzeichen: 0313935B

Vorhabenbezeichnung: ERA-Net PathoGenoMics: ECIBUG – Molekulare Aufklärung der Wechselwirkung von Chlamydien und menschlichen Wirtszellen durch genomische Ansätze

Laufzeit des Vorhabens: 1. 2. 2007 – 31. 1. 2010

Berichtszeitraum: 1. 2. 2007 – 31. 1. 2010

I. Kurzdarstellung

1. Aufgabenstellung

Chlamydien, das sind medizinisch bedeutsame, in menschlichen Zellen parasitierende Bakterien, vermehren sich in einer membranumschlossenen Vakuole in der menschlichen Zelle. Obwohl sie daher vom Zellstoffwechsel abgeschlossen sind, interagieren sie massiv mit den Signaltransduktions- und Stoffwechselvorgängen des Wirtes. Startpunkt des Vorhabens war das zunehmende Wissen um bakterielle Komponenten, die die Wirtszelle beeinflussen können. Der Inhalt dieses Projektes war es, die zellbiologischen Konsequenzen der Expression solcher bakterieller Proteine (mit besonderem Schwerpunkt Apoptoseinhibition und Zelltodinduktion) zu verstehen.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Projekt war Teil des europäischen ERA-NET Verbundes European Consortium to Fight Chlamydial Infections through Unbiased Genomics (ECIBUG). Dieses Projekt war damit eingebettet in Strukturen, deren Aufgabe die Identifizierung bakterieller Effektorproteine war und Projekten, die die Möglichkeiten der therapeutischen Interferenz mit diesen Wegen suchten.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Planung sah vor, zunächst bereits identifizierte Kandidatenproteine zu analysieren, dann im weiteren Verlauf diejenigen Proteine, die als sezernierte Effektoren von Konsortialpartner gefunden wurden. Diese Planung wurde eingehalten. Das bereits identifizierte Chlamydienprotein CPAF (Chlamydial Protease-like Activity Factor) wurde ausführlich charakterisiert. Eine Reihe von weiteren Kandidatenproteinen wurde innerhalb des Konsortiums getestet.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Das Projekt war in die internationale Wissenschaftslandschaft eingebettet und hierin mit einer großen Zahl von Linien verknüpft (die verfügbare Literatur zum Stichwort Chlamydia umfasst über 20,000 Stellen). Die Frage nach Schutzrechten war hier nicht relevant.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Mehrere Partner im Konsortium ECIBUG waren unmittelbare Kollaborationspartner. Hier sind insbesondere zu nennen:

- Dr. Agathe Subtil, Institut Pasteur, Paris, Frankreich
- Prof. Dr. Matthias Maass, Salzburger Landeskliniken, Salzburg, Österreich
- Prof. Dr. Johannes Hegemann, Biologie, Universität Düsseldorf

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und erzieltes Ergebnis

Die Zuwendung wurde für die Durchführung des Projektes „Molekulare Aufklärung der Wechselwirkung von Chlamydien und menschlichen Wirtszellen durch genomische Ansätze“ im Rahmen des Konsortiums ECIBUG (European Initiative to Fight Chlamydial Infections by Unbiased Genomics) im ERA-NET PathoGenoMics eingesetzt. Das Ziel des Konsortiums war es, durch genomisch orientierte Ansätze die Wechselwirkung zwischen Chlamydien (obligat intrazelluläre Bakterien, die als Infektionserreger des Menschen immense Bedeutung haben) zu verstehen. Innerhalb dieses Konsortiums war es Aufgabenstellung dieses Projektes, die Einflussnahme von in anderen Teilprojekten identifizierten, potentiell in die Zelle sezernierten Chlamydienproteinen auf definierte Aspekte des Wirtszellmetabolismus zu analysieren. Im Vordergrund stand hierbei die Analyse des Zelltods im Verlauf der Infektion. Es ist aus unseren Arbeiten und aus Arbeiten anderer Gruppen bekannt, dass die Infektion mit Chlamydien sowohl Zelltod durch Apoptose inhibieren als auch nicht-apoptotischen Zelltod induzieren kann. Diese Fähigkeiten sind sehr wahrscheinlich wichtig zum einen zur Etablierung einer längeren Infektion (chronische Infektionen sind das klinische Hauptproblem der Infektion durch Chlamydien), zum anderen für Fragen der Immunerkennung und möglicherweise der Freisetzung von Chlamydien. Des Weiteren wurde die Aktivierung und Deaktivierung des im Immunsystem wichtigen Transkriptionsfaktors NF-kappaB in einem ähnlichen Ansatz analysiert.

Zur Klärung dieser Fragen wurde zum einen Input aus anderen Teilprojekten des Konsortiums verwendet (identifizierte, nachgewiesene oder wahrscheinliche von Chlamydien in die Wirtszelle sezernierte Proteine sowie eine im Konsortium erstellte Genbank; die Genbank konnte aufgrund verspäteter Fertigstellung nicht mehr analysiert werden), zum anderen ein bereits früher nachgewiesener Effektor von Chlamydia (die Protease CPAF).

Der Hauptbefund des Projektes war der, dass sowohl die Inhibition durch Apoptose als auch die Induktion von nicht-apoptotischem Zelltod CPAF zugeordnet werden konnte. CPAF wurde bereits vor einigen Jahren identifiziert, und es war bekannt, dass diese Protease im Verlauf der Infektion durch Chlamydien aus dem membranumschlossenen „Einschluß“ (wo Chlamydien replizieren) in das Zytosol eingeschleust wird. Es war jedoch nicht möglich gewesen, CPAF in aktiver Form in menschlichen Zellen zu exprimieren, wodurch die Analyse der Protease praktisch unmöglich war. Es gelang uns im Rahmen dieses Projektes, aktives CPAF in menschlichen Zellen zu exprimieren. Dies wurde erreicht durch die induzierbare Dimerisierung der Protease mithilfe eines Fusionspartners. Wir hatten bereits in der Vergangenheit den proteolytischen Abbau der pro-apoptotischen BH3-only Proteine als zumindest einen Hauptmechanismus des chlamydialen anti-apoptotischen Mechanismus identifiziert. Wir konnten zeigen, dass CPAF diese Aktivität in menschlichen (nicht infizierten) Zellen rekapitulieren kann. Interessanterweise scheint dies jedoch keine unmittelbare Proteolyse durch CPAF zu sein, sondern ein durch eine Protease, die CPAF-abhängig in der Zelle aktiv ist, möglicherweise das zelluläre Proteasom. Weiterhin konnten wir zeigen, dass isolierte CPAF-Aktivität in menschlichen Zellen auch den während der Chlamydieninfektion sichtbaren, nicht apoptotischen Zelltod induzieren kann (veröffentlicht, Paschen et al. 2008). Im Rahmen dieser Studien wurde eine Reihe von weiteren CPAF-Substraten in offenen Screeningansätzen identifiziert (diese Daten sind unveröffentlicht; wir arbeiten derzeit an der weiteren Charakterisierung dieser Substrate).

Weiterhin wurde die Aktivität der von einem Partner des Konsortiums (Agathe Subtil, Institut Pasteur, Paris) zur Verfügung gestellten putativen Effektorproteinen von Chlamydia in einem Reportertestverfahren auf Induktion oder Inhibition der Aktivität von NF-kappaB analysiert. Obwohl beide Aktivitäten während der Infektion durch Chlamydien nachweisbar sind, waren wir nicht in der Lage, diese Aktivität konstant bei einem der etwa 15 isolierten Gene/Proteine nachzuweisen. Die Identifikation im Labor Subtil läuft weiter, und möglicherweise wird eine solche Aktivität im weiteren Verlauf (außerhalb des geförderten Projektes aber im Rahmen der hierdurch etablierten Kollaboration) nachweisbar sein. Es war jedoch möglich, eine Inhibition der Induzierbarkeit von NF-kappaB-Aktivität durch externe