

Analysen zu intrazellulären Bakterien im Kontext des One-Health-Ansatzes

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Sebastian Krannich

aus

Neuwied

Bonn, 2025

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Gutachterin/Betreuerin: Prof. Dr. rer. nat. Tanja Schneider

Gutachterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christiane Dahl

Tag der Promotion: 27.10.2025

Erscheinungsjahr: 2025

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	V
II.	Abbildungsverzeichnis	VIII
III.	Tabellenverzeichnis	XV
1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Die etwas andere Ordnung - Chlamydiales	2
2.2	Der chlamydiale Lebenszyklus	3
2.3	Peptidoglykan-Biosynthese in Chlamydien – ungewöhnliche Funktionen und Effekte der Inhibierung	4
2.4	LysM – ein Motiv, das die bakterielle Zellwand detektiert	10
2.5	Antibiotika – Verschwenderischer Einsatz und die dringliche Suche nach neuen Substanzen	11
2.6	Zoonosen und <i>emerging pathogens</i> – gesucht: ein holistischer Ansatz, um die Welt zu verstehen	12
2.7	Zoonotische Erkrankungen – viel mehr als nur Ebolafieber	16
3	Ziele dieser Arbeit	19
4	Material und Methoden	20
4.1	Materialien	20
4.1.1	Chemikalien	20
4.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	22
4.2.1	Kits	24
4.2.2	Antibiotika	25
4.3	Bakterienstämme, eukaryotische Zelllinien und Plasmide	25
4.3.1	Bakterienstämme	25
4.3.1.1	Bakterienstämme	25
4.3.1.2	Intrazelluläre Bakterien	26
4.3.2	Eukaryotische Zelllinien	26
4.3.2.1	Hep2, Subklon B (ATCC CCL-23)	26
4.3.2.2	McCoy (ATCC CRL-1696)	26

4.4	Mikrobiologische Methoden	27
4.4.1	Sterilisation	27
4.4.2	Kultivierung und Behandlung von eukaryotischen Hep2-Zellen	27
4.4.2.1	Vorbereitung von Zellkulturmedium	27
4.4.2.2	Amphotericin B, MEM Vitamin Lösung und L-Glutamin	28
4.4.2.3	Vorbereitung der Trypsin Lösung	28
4.4.2.4	Kultivierung der Hep2-Zellen	28
4.4.3	Kultivierung von Prokaryonten	29
4.4.3.1	Kultivierung von <i>Chlamydia trachomatis</i> D/UW-3/CX und Infektion von Hep2-Zellen	29
4.4.3.2	Kultivierung von <i>Staphylococcus aureus</i>	29
4.4.3.3	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> -Stämmen	30
4.4.4	Messen der optischen Dichte von Flüssigkulturen	31
4.4.5	Transformation in chemokompetente <i>E. coli</i> -Zellen	31
4.4.6	DNA-Isolierung	32
4.4.6.1	Isolation genomischer DNA	32
4.4.6.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	32
4.4.6.3	DNA-Isolierung aus Ektoparasiten	32
4.4.7	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von <i>S. aureus</i>	33
4.4.1	Biofilm	33
4.5	Klonierung	34
4.5.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
4.5.1.1	<i>Real-time</i> PCR (RT-PCR) zur Detektion von Chlamydien in der isolierten DNA aus dem Zeckenaufschluss	38
4.5.1.2	Schmelzkurvenanalyse auf Borrelien DNA	39
4.5.2	Agarose-Gelelektrophorese	39
4.5.3	Photometrische Beistimmung von DNA-Konzentration	40
4.5.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	41
4.5.5	Klonierung unter Verwendung des In-Fusion Kits	41
4.5.6	Sequenzierung	41
4.6	Biochemische Methoden	41
4.6.1	Überexpression, Überproduktion	41
4.6.1.1	Protein Überexpression Vortest	41
4.6.1.2	Protein Überproduktion	43

4.6.1.3	Aufbereitung von Proteinen.....	43
4.6.2	Analyse von Proteinen	44
4.6.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
4.6.2.2	PageBlue Färbung	45
4.6.2.3	Laktamase Spot-Assay	45
4.6.2.4	Peptidoglykan/ Chitin-Pulldown-Assay.....	46
4.6.2.5	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)	47
4.7	Experimente in der Zellkultur	48
4.7.1	Hämolyse-Assay	48
4.7.2	AlamarBlue Assay	49
4.7.3	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Chlamydien	49
4.7.4	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von chlamydialer Infektion mit Penicillin G induzierter Persistenz.....	50
5	Ergebnisse	51
5.1	Neue Einblicke in die Rolle von Chlamydien als Krankheitserreger und deren Verbreitung	51
5.1.1	Chlamydien und andere intrazelluläre bakterielle Erreger in Zecken von westafrikanischen Fledermäusen	51
5.1.2	Analysen zur Mutter-Kind-Übertragung von Chlamydien anhand von Stuhl-, Nabelschnurblut- und Plazentaprobe.....	60
5.1.3	Studie zu zoonotischen Krankheitserregern auf Madagaskar	64
5.2	Analysen zu neuartigen antibiotischen Substanzen	66
5.2.1	Zytotoxizität gegenüber eukaryotischen Zellen	66
5.2.1.1	Vergleichende Analysen zur Zytotoxizität der neuartigen synthetischen Zellhüll-Biosynthese inhibierenden Antibiotika DCAP und THCz.....	66
5.2.2	Analyse des hämolytischen Potentials von neuartigen Antibiotika gegenüber humanen Erythrozyten	78
5.2.2.1	DCAP hat im Gegensatz zum Ionophor CCCP keine lytische Aktivität gegenüber humanen Erythrozyten	78
5.2.2.2	Hypeptin hat ein geringeres hämolytisches Potenzial als Teixobactin.....	80
5.2.2.3	Epilancin A37 weist keine lytische Aktivität gegenüber humanen Erythrozyten auf	82
5.2.2.4	Naturstoffextrakte als antibiotische Substanzen	83

5.2.3	Biofilmanalysen zum Naturstoff Corallopyronin A	84
5.2.4	Beurteilung der Aktivität von Antibiotika auf aktive und persistierende Chlamydien-Infektionen in Zellkultur	88
5.2.4.1	Corallopyronin A.....	89
5.3	Funktionsanalysen putativer chlamydialer β -Laktamasen	95
5.4	Funktionelle Analysen zu LysM-Proteinen in <i>Chlamydiales</i>	100
5.4.1	Pulldown-Bindeexperimente mit Peptidoglykan und Chitin	101
5.4.2	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie Binde-Analysen	103
6	Diskussion	110
6.1	Bakterielle Erreger in Afrika	113
6.2	Testung möglicher neuer antibiotischer Substanzen	118
6.3	Neuer Einblick in die Funktionen chlamydialer LysM-Proteine	122
7	Literaturverzeichnis	130
8	Danksagungen	154
9	Anhang	155
9.1	Chlamydien und andere intrazelluläre bakterielle Erreger in Zecken von westafrikanischen Fledermäusen	155

I. Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
A	Ampere (Stromstärke)
A ₂₆₀	Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 260 nm
A ₂₈₀	Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 280 nm
AB	aberrant bodies
AG	Arbeitsgruppe
AHT	Anhydrotetrazyklin
AMP	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
AZM	Azithromycin
B.	<i>Borrelia</i>
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CAM	Chloramphenicol
CCCP	Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i> -Wert
<i>C. pneumoniae</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
Cef	Cefepime
CorA	Corallopyronin A
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCAP	2-((3-(3,6-dichloro-9H-carbazol-9-yl)-2-hydroxypropyl)amino)-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphat
DO	Doxycyclin
DTT	1,4-Dithiothreitol

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
EB	<i>elementary bodies</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
etc.	et cetera
h	<i>hours</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
h.p.i.	<i>hours post infection</i>
IMP	Imipenem
et al.	<i>et alii, et aliae</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molare Masse
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
ml	Milliliter
min	Minute
mol/l	Mol pro Liter
NaCl	Natriumchlorid
NTDs	<i>neglected tropical diseases</i>
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OXA	Oxacillin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PenG	Penicillin G
PG	Peptidoglycan
RA	Rifampicin
RB	reticulate bodies
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
RNase A	Ribonuklease A
RNAP	DNA-abhängige RNA-Polymerase
RT-PCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SNE	<i>Simkania negevensis</i>
spp.	<i>species pluralis</i>
STI	<i>sexually transmitted infections</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
Vgl.	Vergleich
z.B.	zum Beispiel
Wcw	<i>Waddlia chondrophila</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
μ	Mikro

Physikalische Größen und Einheiten wurden nach dem SI-System abgekürzt. Des Weiteren wurden Nukleotide und Aminosäuren gemäß der IUPAC-Regel verwendet.

II. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Phylogenetischer Baum der 16S rRNA des Phylums *Chlamydiae*. 3
- Abbildung 2: Biphasischer chlamydialer Lebenszyklus an dem Beispiel von *Chlamydia trachomatis*. Die Elementarkörperchen (EBs) sind infektiös und nahezu metabolisch inert. Im Gegensatz dazu sind die Retikularkörperchen (RBs) nicht infektiöse aber metabolisch aktive und vermehrungsfähige chlamydiale Zellen. Bei den aberranten Körperchen (ABs) handelt es sich um eine reversible persistierende Form, die bei Stress wie bspw. unter Zellwand-Antibiotikabehandlung ausgeprägt wird. Nach Anheftung und Invasion der EBs an die eukaryotische Wirtszelle (~1-2 Stunden nach Infektion), differenzieren sie sich in den Inklusionen innerhalb der ersten 12 Stunden zu RBs. Die entstandenen RBs vermehren sich, anschließend erfolgt die 2. Differenzierung der RBs zu EBs. Im letzten Schritt (ca. 48 Stunden nach Infektion) werden EBs und RBs durch Lyse oder Exozytose freigesetzt. Die freigesetzten EBs sind infektiös und können nun wieder Zellen infizieren und so den Zyklus erneut starten (Elwell *et al.*, 2016). 4
- Abbildung 3: PG-Lokalisation der Gattungen *Protochlamydia*, *Waddlia*, *Chlamydia*. Die gestrichelten/ gepunkteten Linien zeigen, wo die Lokalisation von PG vermutet wird, wohingegen die geschlossene blaue Linie nachgewiesenes PG-Vorkommen anzeigt (Klöckner *et al.*, 2018). 6
- Abbildung 4: Modell zur chlamydialen PG-Biosynthese/ Zellteilungsmaschinerie. Die Biosynthese von Lipid II findet im Zytoplasma statt und der PG-Vorläufer wird durch eine in der Zytoplasmamembran lokalisierte Flippase in den periplasmatischen Raum überführt. MurJ, FtsW und/ oder RodA könnten an diesem Transport beteiligt sein. Alle Pyrophosphorylasen, die für das Recycling des Bactoprenol-Trägers in *E. coli* verantwortlich sind, fehlen in *Chlamydia* und *Simkania*. Das Lipid II wird im Periplasma durch Penicillin-Bindeproteine (PBP) katalysierte Transpeptidierung quervernetzt. Die Ausstattung an Enzymen, die an den geschilderten Prozessen beteiligt sind, variiert je nach chlamydialer Gattung Ch (*Chlamydia*), Pa (*Parachlamydia*), Pr (*Protochlamydia*), Si (*Simkania*), Wa (*Waddlia*). Angriffsorte von Antibiotika und Inhibitoren sind gekennzeichnet durch BAC (Bacitracin), CA (Clavulansäure), CYC (D-Cycloserine), FOS (Fosfomycin) und PEN (Penicillin). OM: Äußere Membran; IM: Innere Membran (Klöckner *et al.*, 2018). 9

- Abbildung 5: In dieser Abbildung sind die 5 Klassen der Übertragungswege auf den Menschen am Beispiel von klassischen Infektionskrankheiten dargestellt (Wolfe, Dunavan and Diamond, 2007). 13
- Abbildung 6: Prävalenz intrazellulärer bakterieller Erreger in ghanaischen Zecken. Die Prävalenz von *Chlamydiales* ist mit 12 % am niedrigsten, gefolgt von *Borrelia* mit 34 % und *Rickettsia* mit 89 %. 53
- Abbildung 7: Co-Prävalenzen intrazellulärer bakterieller Erreger in Zecken aus Ghana. +: Erreger detektiert; -: Erreger nicht detektiert. 54
- Abbildung 8: CLUSTAL (MEGA7) phylogenetische Maximum Likelihood Analyse der detektierten Rickettsien. Die neuen Kandidaten konnten der Gattung *Rickettsia* zugeordnet werden. Dabei gehört GHTiROr Z26 zur Gruppe *Rickettsia honei* und GHTiROr Z93 zur Gruppe *Rickettsia lusitaniae* (Dr. Rita de Sousa; National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge). 60
- Abbildung 9: Strukturformel von DCAP (2-((3-(3, 6-dichloro-9H-carbazol-9-yl)-2-hydroxypropyl) amino)-2-(hydroxymethyl) propane-1, 3-diol) (Eun *et al.*, 2012). * Stereozentrum. 67
- Abbildung 10: AlamarBlue-Assay zur Bestimmung der Zytotoxizität von DCAP gegenüber den eukaryotischen Zelllinien Hep2 und McCoy. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen von DCAP in DMEM- oder RPMI-Medium für 2, 4, 6, 17 sowie 30 Stunden. Für *S. aureus* FRI 100 liegt die MHK bei Behandlung mit DCAP bei 20,66 µg/ml (Eun *et al.*, 2012). Viabilitätsassay mit der Substanz DCAP auf Hep2-Zellen in DMEM- (A) und RPMI-Medium (B) sowie für McCoy-Zellen in DMEM-Medium (C). 68
- Abbildung 11: Effekt von DCAP auf die Zellmorphologie. Mikroskopische Aufnahme von unbehandelten Hep2-Zellen (A) und DCAP-behandelten, sowie mit *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/CX infizierten Hep2-Zellen 30 Stunden nach Infektion. Deutlich zu erkennen ist, dass die eukaryotischen Zellen, welche mit 8 µg/ml DCAP (B) behandelt wurden, Rupturen (weiße Pfeile) im Zytoplasma aufweisen. Übereinstimmend zeigte der Zytotoxizitätsassay 30 Stunden nach Infektion (Abbildung 10 A, 30 Stunden) eine relative Viabilität der Zellen von 19 %. h.p.i.: Stunden nach Infektion. DAPI: Zellkern (blau), Evans blue: Zytoplasma (rot), Fluorescein: LPS von Chlamydien (grün). 69
- Abbildung 12: Strukturformel von CCCP (Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon). 70

Abbildung 13: AlamarBlue-Assay zur Untersuchung der Zytotoxizität von CCCP gegenüber Hep2 und McCoy- Zellen, die in DMEM- oder RPMI-Medium für 2, 4, 6 sowie 17 Stunden inkubiert wurden. Für *S. aureus* FRI 100 liegt die MHK bei Behandlung mit CCCP bei 0,26 µg/ml (Eun *et al.*, 2012). Viabilitätsassay mit der Substanz CCCP auf Hep2-Zellen in DMEM- (A) und RPMI-Medium (B) sowie für McCoy-Zellen in DMEM-Medium (C). 71

Abbildung 14: Assay zur Zytotoxizität von verschiedenen THCz R/S Enantiomer-Gemische (THCz-1, THCz-5, THCz-40, THCz-39) gegenüber Hep2-Zellen, der in DMEM-Medium für 30 Stunden durchgeführt wurde. Gezeigt wird die relative Viabilität im Verhältnis zu unbehandelten Zellen. Für die Substanzen THCz-5, THCz-39 ist kein zytotoxischer Effekt von 2 µg/ml erkennbar. Die zur Zytotoxizität korrelierenden MHK-Werte für *S. aureus* SG511 sind in Tabelle 25 zu finden. 74

Abbildung 15: Assay zur Zytotoxizität von (+)-(R)-THCz-40 und (-)-(S)-THCz-40 sowie dem der Enantiomere-Gemisch von THCz-40 auf Hep2-Zellen, der in DMEM-Medium für 6 Stunden durchgeführt wurde. Gezeigt wird die relative Viabilität im Verhältnis zu unbehandelten Zellen. Die Reinstoffe im Vergleich zu dem Gemisch zeigen keine Unterschiede im zytotoxischen Verhalten auf. 77

Abbildung 16: Dargestellt ist der lytische Effekt von DCAP (A) und CCCP (B) gegenüber humanen Erythrozyten nach 6, 17 und 30 Stunden Inkubationszeit. Negative Werte, die in Folge des Versuchsaufbaues zustande kommen, werden als 0 % dargestellt. Die Lyse ist im Verhältnis zu einer kompletten Lyse der humanen Erythrozyten durch Triton X-100 dargestellt (100 %). Für *S. aureus* FRI 100 liegt die MHK bei Behandlung mit DCAP bei 20,66 µg/ml und mit CCCP bei 0,26 µg/ml (Eun *et al.*, 2012). Für DCAP (A) konnte keine Hämolyse bis zur höchsten getesteten Konzentration von 128 µg/ml festgestellt werden. Für CCCP (B) konnte ein hämolytischer Effekt bei einer Inkubationszeit von 30 Stunden ab einer Konzentration von 64 µg/ml sowie bei einer 17- stündigen Inkubation bei 128 µg/ml festgestellt werden. 79

Abbildung 17: Strukturformel für Teixobactin (A) und Hypeptin (B) (Sherpa, Reese and Aliabadi, 2015; Crüsemann *et al.*, 2021). 80

Abbildung 18: Dargestellt ist der lytische Effekt für die Substanzen Hypeptin (A) und Teixobactin (B) in einem Konzentrationsbereich von 0 µg/ml bis 128 µg/ml gegenüber humanen Erythrozyten nach 6, 17 und 30 Stunden Inkubation. Negative Werte, die in Folge des Versuchsaufbaues zustande kommen, werden

nicht gezeigt und werden als 0 % dargestellt. Die Lyse ist im Verhältnis zu einer vollständigen Lyse der Erythrozyten durch Triton X-100 dargestellt. Für Hypeptin (A) konnte nach Inkubation für 17 und 30 Stunden ein geringer hämolytischer Effekt ab einer Konzentration von 64 µg/ml festgestellt werden. Bei einer Inkubationszeit von 17 und 30 Stunden mit Teixobactin (B) konnte ab einer Konzentration von 16 µg/ml ein hämolytischer Effekt von bis zu 75 % festgestellt werden. Für *S. aureus* LT-1334 (MRSA) liegt die MHK bei Behandlung mit Hypeptin bei 0.25 µg/ml (Crüsemann *et al.*, 2021). Bei der Behandlung von *S. aureus* ATCC 33591 mit Teixobactin liegt die MHK bei 0,16-0,31 µg/ml (Ling *et al.*, 2015).

81

Abbildung 19: Dargestellt ist der lytische Effekt gegenüber humanen Erythrozyten von A37 bei Konzentrationen von 0 bis 128 µg/ml nach Inkubationszeiträumen von 6, 17 und 30 Stunden. Negative Werte die in Folge des Versuchsaufbaues zustande kommen, werden nicht gezeigt und werden als 0 % dargestellt. Die Lyse ist im Verhältnis zu einer kompletten Lyse der Erythrozyten durch Triton X-100 dargestellt. Es konnte kein hämolytischer Effekt festgestellt werden. Für *Corynebacterium glutamicum* DSM 20300 liegt die MHK bei Behandlung mit A34 bei 1 µg/ml (Puls *et al.*, 2024).

82

Abbildung 20: Dargestellt ist der lytische Effekt von Oleacein (A) im Konzentrationsbereich von 0 µg/ml bis 128 µg/ml sowie von einem Naturstoffextrakt (B) im Konzentrationsbereich von 0 µg/ml bis 396,8 µg/ml jeweils nach 2 und 17 Stunden Inkubation. Negative Werte die in Folge des Versuchsaufbaues zustande kommen, werden nicht gezeigt und werden als 0% dargestellt. Die Lyse ist im Verhältnis zu einer kompletten Lyse der Erythrozyten durch Triton X-100 dargestellt. Für Oleacein konnte kein und für den Naturstoff konnte ein hämolytischer Effekt in einem Bereich von 198,4 µg/ml bis 396,8 µg/ml nach 17-stündiger Inkubation detektiert werden. Für *S. aureus* SG511 liegt die MHK bei Behandlung mit Oleacein bei >128 µg/ml und mit dem Naturstoff bei 64 µg/ml.

84

Abbildung 21: Strukturformel von Corallopyronin A (CorA) (Schäberle *et al.*, 2014). 85

Abbildung 22: Experiment zur Inhibierung der Biofilmbildung (MBIC) von *S. aureus* ATCC 25923 durch Rifampicin und CorA. Gezeigt sind die prozentualen Werte im Verhältnis zu der Wachstumskontrolle. Für Rifampicin und CorA konnte bei einer Konzentration von 2x MHK (Rifampicin 0,016 µg/ml; CorA 0,125 µg/ml)

eine vollständige Inhibition der Biofilmbildung (MBIC) beobachtet werden. In dieser Darstellung wurde für Rifampicin von einer 1x MHK = 0,008 µg/ml ausgegangen.

86

Abbildung 23: Experiment zur Eradikation (MBEC) eines von *S. aureus* ATCC 25923 produzierten Biofilms durch Rifampicin und CorA. Gezeigt sind die prozentualen Werte im Verhältnis zu einem unbehandelten Biofilm. Unter Gabe beider Substanzen für 24 Stunden nahm der Biofilm deutlich ab.

87

Abbildung 24: Verwendetes Behandlungsschema. Die Wirtszellen (McCoy) wurden für 72 Stunden kultiviert und anschließend mit *C. trachomatis* L SWFP- infiziert. A: 2 Stunden nach Infektion wurden die infizierten Zellen mit CorA behandelt. B: 12 Stunden nach Infektion wurde CorA auf die Zellen gegeben. C: Im Kontrollversuch wurden 2 Stunden nach Infektion 100 U/ml PenG und zeitgleich CorA hinzugegeben. D: 2 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit 100 U/ml PenG und anschließend nach Ausprägung der Penicillin-induzierten Persistenz nach 12 Stunden mit CorA behandelt. Alle Versuche wurden 30 h.p.i. fixiert, gefärbt und anschließend Fluoreszenz-mikroskopisch ausgewertet. h.p.i.: Stunden nach Infektion). CorA: Coralopyronin A; PenG: Penicillin G

90

Abbildung 25: Mikroskopiebilder zur MHK-Bestimmung von CorA gegenüber *C. trachomatis*. Zur Kontrolle dienten uninfizierte und infizierte Vehikel-Kontrollen sowie persistierenden Chlamydien nach Penicillin Behandlung. Abgebildet sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen bei der jeweiligen CorA MHK (Tabelle 26). h.p.i.: Stunden nach Infektion. Dargestellt sind die repräsentierenden Bilder von den einzelnen Kanälen zur Detektion der Zellkerne (blau), des Zytoplasmas (rot) und dem chlamydialen LPS (grün) sowie alle Kanäle zusammengeführt. Maßstabsleiste 20 µm. CorA: Coralopyronin A; PEN: Penicillin G

92

Abbildung 26: Mikroskopiebilder zur MHK-Bestimmung von Doxycyclin (DO), Azithromycin (AZM) und Rifampicin (RA) gegenüber *C. trachomatis*. Dargestellt sind die zusammengeführten Bilder sowie die einzelnen Kanäle zur Detektion der Zellkerne, des Zytoplasmas und der chlamydialen LPS. Penicillin G wurde 2 Stunden und die Substanzen 12 Stunden nach Infektion dazugegeben (Abbildung 24 D). h.p.i.: Stunden nach Infektion. Maßstabsleiste 20 µm.

94

Abbildung 27: Spot-Plate-Assays zur Detektion von β-Laktamaseaktivität. Die Konzentration der inokulierten Bakterienkulturen nimmt von links nach rechts ab

(serielle 1:10 Verdünnung). Dargestellt sind alle getesteten Varianten nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C auf LB-Medium. Die Experimente erfolgten jeweils in An- und Abwesenheit des Expressionsinduktors AHT (50 ng/ml), mit und ohne Präinkubation der Kulturen mit AHT (50ng/ml) sowie nach Zugabe unterschiedlicher β -Laktame. AHT: Anhydrotetracyclin, LB: *Lysogeny Broth*, CAM: Chloramphenicol, AMP: Ampicillin, OXA: Oxacillin. 99

Abbildung 28: Analysen zur Bindung verschiedener chlamydialer LysM II-Proteine an PG oder Chitin. Die aufgereinigten LysM II-Proteine wurden mit PG oder Chitin inkubiert. Das PG oder Chitin wurde durch Ultrazentrifugation pelletiert und einmal mit Puffer gewaschen. Die SDS-PAGE-Gele mit den jeweiligen Testprotein- und Polysaccharid-Ansätzen wurden gefärbt und zeigen die jeweilige Protein-Laufkontrolle, den Überstand und die Pelletfraktion. Der Pfeil auf der rechten Seite zeigt die Position des jeweiligen LysM II-Proteins an. Alle getesteten LysM II-Proteine (Ct_601) aus *C. trachomatis*, Cpn0780 aus *C. pneumoniae* und WCW0123 aus *W. chondrophila* binden PG und Chitin. Im Fall von PG bleiben bei allen LysM II-Homologen Teile des eingesetzten Proteins an langkettigen Einheiten des Polymers in den Taschen und dem oberen Bereich des Gels zurück. Dr. Melanie Brunke konnte für das LysM II-Homolog aus *C. pneumoniae* zeigen, dass es keine Präzipitation in Abwesenheit eines Substrates aufzeigt (Brunke, 2018). 102

Abbildung 29: SPR-Analyse zur Bindung von Glykogen an die LysM II-Proteine (Ct_601) aus *C. trachomatis* (A), Cpn0780 aus *C. pneumoniae* (B) und WCW0123 aus *W. chondrophila* (C). Die Signalstärke korreliert mit der Glykogen-Konzentration und nimmt mit steigender Konzentration zu. Nach Wegnahme der Testsubstanz (mit x gekennzeichnet) dissoziiert diese wieder. RU: resonance unit; M: mol/l; s: Sekunde. 104

Abbildung 30: SPR Analyse Bindung von Maltotriose an LysM II-Proteine (Ct_601) aus *C. trachomatis* (A), Cpn0780 aus *C. pneumoniae* (B) und WCW0123 aus *W. chondrophila* (C). Es wurde keine spezifische Bindung detektiert. RU: resonance unit; M: mol/l; s: Sekunde. 106

Abbildung 31: SPR Analyse Bindung von N,N',N''-Triacetylchitotriose an LysM II-Proteine (Ct_601) aus *C. trachomatis* (A), Cpn0780 aus *C. pneumoniae* (B) und WCW0123 aus *W. chondrophila* (C). Es wurde keine spezifische Bindung detektiert. RU: resonance unit; M: mol/l; s: Sekunde. 107

- Abbildung 32: SPR Analyse Bindung von D-(+)-Raffinose an LysM II-Proteine (Ct_601) aus *C. trachomatis* (A), Cpn0780 aus *C. pneumoniae* (B) und WCW0123 aus *W. chondrophila* (C). Es wurde keine spezifische Bindung detektiert. RU: resonance unit; M: mol/l; s: Sekunde. 108
- Abbildung 33: Interdisziplinäre Forschung im Rahmen des *One Health*-Ansatzes. Die Human-, und Tiergesundheit bilden zusammen mit der Umwelt drei untrennbar miteinander verbundene Säulen, auf welche wiederum viele einzelne Faktoren Einfluss nehmen (isglobal.org). 112
- Abbildung 34: 16S rRNA-basierter Stammbaum zur Einordnung von *Neochlamydia hartmannellae* (Horn *et al.*, 2000). 116
- Abbildung 35: A: Für das Protein AtlA aus *E. faecalis* konnten innerhalb der LysM-Domänen bereits Aminosäuren identifiziert werden, welche für die Bindung von PG wichtig sind (Mesnage *et al.*, 2014). In der Abbildung 35B sind diese Aminosäuren in gelb hinterlegt. Abbildung 35: B: Alignment (Madeira *et al.*, 2024) zwischen LysM-Domänen aus *E. faecalis* AtlA (EF_0799) und chlamydialen LysM II-Proteinen. Vorhersagen zur Sekundärstruktur wurden für die chlamydialen LysM II-Domänen mit Psipred angefertigt (Jones, 1999) und für AtlA der Studie von Mesnage *et al.*, 2014 entnommen (Unterstrichen: β -Faltblatt, Fett: α -Helix). Die für die Bindung von PG wichtigen Aminosäuren in AtlA aus *E. faecalis* sind gelb markiert (Mesnage *et al.*, 2014). Ct: *C. trachomatis*; Cpn: *C. pneumoniae*, Wcw: *W. chondrophila*; Ef1-6: *E. faecalis* AtlA (Mesnage *et al.*, 2014) 126
- Abbildung 36: A: Clustal-W-Alignment der drei LysM-Domänen von Ecp6 (Sánchez-Vallet *et al.*, 2013). Dargestellt ist die Verteilung der α -Helices (Helices) und β -Faltblätter (Pfeile). Die beiden Chitinbindestellen in LysM1 und LysM3 sind mit einer roten und einer grünen Linie unterlegt (Sánchez-Vallet *et al.*, 2013). Abbildung 36: B: Alignment (Madeira *et al.*, 2024) der LysM-Domänen aus *Cladosporium fulvum* Ecp6 und chlamydialen LysM II-Proteinen. Die Vorhersagen zur Sekundärstruktur wurden für die chlamydialen LysM II-Domänen mit Psipred (Jones, 1999) angefertigt und für *C. fulvum* Ecp6 von (Sánchez-Vallet *et al.*, 2013) entnommen (Unterstrichen: β -Faltblatt, Fett: α -Helix). Die für die Bindung von PG wichtigen Aminosäuren in den LysM-Domänen aus *C. fulvum* Ecp6 sind gelb markiert (Sánchez-Vallet *et al.*, 2013).

Ct: *C. trachomatis*; Cpn: *C. pneumoniae*, Wcw: *W. chondrophila*; Ecp6/1-3: *C. fulvum* Ecp6 (Sánchez-Vallet et al., 2013).

127

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien.	20
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.	22
Tabelle 3: Verwendete Kits.	24
Tabelle 4: Verwendete Antibiotika.....	25
Tabelle 5: Zusätze im Zellkulturmedium.	27
Tabelle 6: Medium für das Anziehen für <i>E. coli</i>	30
Tabelle 7: Ansatz-Schema für die PCR.	36
Tabelle 8: PCR-Programm: *Meist Temperaturbereich von 10°C.....	36
Tabelle 9: Verwendete Primer.....	36
Tabelle 10: <i>Chlamydiales</i> 16S rRNA <i>real-time</i> PCR Ansatz.	39
Tabelle 11: <i>Chlamydiales</i> 16S rRNA <i>real-time</i> PCR-Einstellungen.	39
Tabelle 12: Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese.....	40
Tabelle 13: Puffer für den Protein-Vortest.....	42
Tabelle 14: Puffer für die Protein-Aufbereitung.....	44
Tabelle 15: Puffer für den Peptidoglykan/ Chitin-Binde-Assay.	46
Tabelle 16: Puffer für die SPR-Analyse.	47
Tabelle 17: Puffer der für die chlamydiale MHK-Bestimmung verwendet wurde.	50
Tabelle 18: Zecken, in denen Co-Prävalenzen von mindestens zwei der Erregergruppen <i>Chlamydiales</i> , <i>Borrelia</i> und <i>Rickettsia</i> mittels <i>real-time</i> PCR nachgewiesen wurden. Alle Fledermäuse, bis auf die Fledermaus Nr. F3 (<i>Hipposideros cf. ruber</i>), gehören der Spezies <i>Nycteris macrotis</i> an. Die mit # (<i>Chlamydiales</i>) oder ° (<i>Rickettsia</i>) gekennzeichneten Proben wurden sequenziert. +: positiv getestete Proben; -: negativ getestete Proben.	55
Tabelle 19: Zecken, in denen ausschließlich <i>Chlamydiales</i> , <i>Borrelia</i> oder <i>Rickettsia</i> detektiert wurden. Alle Fledermäuse, bis auf die Fledermaus Nr. F3 (<i>Hipposideros cf. ruber</i>), gehören der Spezies <i>Nycteris macrotis</i> an. Die mit # (<i>Chlamydiales</i>) oder ° (<i>Rickettsia</i>) gekennzeichneten Proben wurden sequenziert. +: positiv getestete Proben; -: negativ getestete Proben.	56

Tabelle 20: Zecken, in denen keine <i>Chlamydiales</i> , <i>Borrelia</i> oder <i>Rickettsia</i> detektiert wurden. Die Fledermäuse gehören der Spezies <i>Nycteris macrotis</i> an. +: positiv getestete Proben; -: negativ getestete Proben.....	58
Tabelle 21: Ergebnisse der Mutter-Kind-Studie. Die Ergebnisse der Plazenta- sowie Nabelschnurblutproben wurden in dieser Arbeit, die restlichen Resultate bereits in der Dissertation von Dr. Melanie Brunke erarbeitet. In den Proben, welche mit # gekennzeichnet sind, konnten bereits mittels Sequenzierung <i>Chlamydia pneumoniae</i> sowie in der mit ° gekennzeichneten Probe <i>Waddlia chondrophila</i> nachgewiesen werden (Brunke, 2018). Proben mit * stammen von der Elfenbeinküste, alle anderen aus Ghana. +: positiv; -: negativ; ND: keine Proben vorhanden.....	62
Tabelle 22: Anhand der AlamarBlue-Zytotoxizitätsassays ermittelte IC ₅₀ Werte für die Substanz DCAP. ND: nicht durchgeführt.....	70
Tabelle 23: IC ₅₀ Werte der zytotoxischen AlamarBlue-Assays für die Substanz CCCP. ND: nicht durchgeführt	73
Tabelle 24: Strukturdifferenzen der in dieser Arbeit untersuchten THCz-Derivate (modifiziert nach Reithuber <i>et al.</i> , 2021). X ² : Stereozentrum	73
Tabelle 25: IC ₅₀ Werte der zytotoxischen AlamarBlue-Assays für die Enantiomer-Gemische THCz-1, THCz-5, THCz-39, THCz-40 im Vergleich zu den zytotoxischen Analysen sowie die korrelierenden MHK-Werte für <i>S. aureus</i> SG511 aus der Veröffentlichung Reithuber <i>et al.</i> , 2021. THCz Analoga lagen als R/S Enantiomer-Gemisch vor.....	76
Tabelle 26: Empfindlichkeit von <i>C. trachomatis</i> Serovar L in McCoy Wirtszellen gegenüber CorA unter verschiedenen Behandlungsschemata. Behandlungsschema Abbildung 24. h.p.i.: Stunden nach Infektion; CorA: Corallopyronin A; PEN: Penicillin G.....	89
Tabelle 27: In dieser Arbeit untersuchte putative chlamydiale β-Laktamasen und Konstrukte. ÜE: Überexpression; SAP: Spot-Plate-Assay	96
Tabelle 28: In dieser Arbeit analysierte chlamydiale LysM II-Proteine (Klößner, 2016; Brunke, 2018).....	101
Tabelle 29: Gesamtauswertung aller untersuchten ghanaischen Zecken. Es wurden 199 Zecken von 46 verschiedenen Fledermaus-Individuen auf <i>Rickettsien</i> , <i>Borrelien</i> und <i>Chlamydiales</i> untersucht. Die 51 Zecken der Fledermäuse F1- F4 wurden bereits in der Masterarbeit des Kandidaten untersucht (Krannich, 2017).	

Insgesamt wurden *Borrelia* in 67, *Chlamydiales* in 23 und *Rickettsia* in 178 Zecken detektiert. Alle Fledermäuse, bis auf die Fledermausspezies F3* *Hipposideros cf. ruber*, gehörten der Spezies *Nycteris macrotis* an. Die mit # (*Chlamydiales*) oder ° (*Rickettsia*) gekennzeichneten Proben wurden sequenziert. +: positiv getestete Proben; -: negativ getestete Proben. Farbkodierung (detektierte Erregerkombinationen): keine Farbe: keine Erreger; schwarz: *Chlamydiales*, *Borrelia* und *Rickettsia*; grau -> *Chlamydiales*; gelb -> *Rickettsia*; dunkel grün -> *Chlamydiales* und *Rickettsia*; hell grün: *Borrelia* und *Rickettsia*.155

1 Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurden intrazelluläre bakterielle Erreger in Bezug auf deren Ausbreitung, antibiotische Therapie und Biologie untersucht.

Der erste Teil der Arbeit befasste sich mit zoonotischen sowie neuartigen Erregern und konzentrierte sich auf epidemiologische Untersuchungen, darunter Analysen zu 199 Zecken aus Ghana. Diese parasitierten auf Fledermäusen und zeigten eine Durchseuchung mit *Rickettsia* (89 %), *Borrelia* (34 %) und *Chlamydiales* (12 %). Es wurden neue Kandidaten der Gattung *Rickettsia* und eine neue *Chlamydiales* Familie detektiert, welche zu den als sogenannten *emerging pathogens* beschriebenen *Chlamydia*-ähnliche Bakterien zählt. Der Nachweis von Chlamydien in ghanaischen Zecken liefert weitere Indizien dafür, dass Zecken eine Rolle in deren Übertragung haben könnten. Der Fund von Borrelien zeigt, dass diese in Afrika entgegen dem bisherigen Wissen auch südlich des Breitengrades von 13° Nord zu finden sind. Die vorliegende Arbeit trug auch zu einer interdisziplinären Studie in Madagaskar bei, welche u.a. das gesamte Spektrum zoonotischer Erreger, einschließlich intrazellulärer Bakterien, erfassen sollte. Hier wurden Parasiten von Ratten und Mäusen analysiert, wobei neben anderen Erregern *Parachlamydia acanthamoebae*, ein *Chlamydia*-ähnliches Bakterium nachgewiesen wurde.

Vor dem Hintergrund dringend benötigter neuartiger Therapiestrategien befassten sich weitere Arbeiten mit Testungen zu (neuen) antibiotischen Substanzen. Zytotoxizitätsanalysen zeigten Unterschiede je nach verwendeten Zelllinien, Medien und Inkubationszeiten und verdeutlichten, dass verschiedene Versuchsaufbauten für eine umfassende Bewertung der Zytotoxizität hilfreich sind. Studien zum Lyseverhalten von Cyclodepsipeptiden gegenüber humanen Erythrozyten ergaben günstigere Eigenschaften von Hypeptin im Vergleich zu Teixobactin. Der Naturstoff CorA zeigte gute Aktivität gegen klinisch problematische persistierende *C. trachomatis*-Infektionen und entstehende sowie etablierte *S. aureus*-Biofilme.

Abschließend sollte das Verständnis der ungewöhnlichen Biologie der Chlamydien vertieft werden. Mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie wurden erste Hinweise auf eine neuartige Glykogen-Bindefunktion von chlamydialen LysM-Proteinen gefunden, welche neue Bestandteile der Peptidoglykan-Ring-Biosynthesemaschinerie darstellen, die in Chlamydien als Penicillin-Zielstruktur dient.

2 Einleitung

2.1 Die etwas andere Ordnung - Chlamydiales

Chlamydien sind Bakterien, die sich nur innerhalb von Wirtszellen, d.h. obligat intrazellulär, vermehren können (Elwell *et al.*, 2016).

Entdeckt wurden diese besonderen Mikroorganismen von dem Radiologen Ludwig Halberstaedter und dem Zoologen und Parasitologen Stanislaus von Prowazek im Jahre 1907 (Halberstaedter and Prowazek, 1907; Ripa, 1982). Ursprünglich suchten die beiden Forscher den Erreger der Syphilis auf Java in Indonesien (Halberstaedter and Prowazek, 1907; Ripa, 1982). Dabei wiesen sie in Giemsa-gefärbten Bindehautzellen intrazytoplasmatische Vakuolen nach, welche heute als chlamydiale Inklusionen bezeichnet werden und benannten diese erstmals als *Chlamydozoa* - hergeleitet vom griechischen Begriff *chlamus* für Mantel (Halberstaedter and Prowazek, 1907; Ripa, 1982). Diese damals gefundenen Inklusionen beherbergen Krankheitserreger, welche zunächst fälschlicherweise als Viren und erst später als *Chlamydia trachomatis* beschrieben wurden (Ripa, 1982). Seit der Entdeckung der Chlamydien wurden einige neue Familien beschrieben (Abbildung 1) (Corsaro and Greub, 2006; Horn, 2008). So wurden neben den schon lange als humanpathogen „bekannten“ *Chlamydiaceae* auch die sogenannten *Chlamydia-related bacteria* (*Chlamydia*-ähnliche Bakterien) Familien *Waddliaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Criblamydiaceae*, *Rhabdochlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Clavochlamydiaceae* und *Piscichlamydiaceae* detektiert und als *emerging pathogens* eingestuft (Horn, 2008). Diese Chlamydien können sich nicht nur in Humanzellen, sondern auch in Eukaryoten wie z.B. in Amöben, Insektenzellen oder Fischzellen replizieren (Horn, 2008) und stellen daher ein nahezu unerschöpfliches potentiell Reservoir an zoonotischen Erregern dar. Hinzu kommt, dass die Datenlage bei den *Chlamydia*-ähnliche Organismen noch schwach ist und immer wieder neue Spezies gefunden werden.

notwendig und macht die Erforschung neuer Antibiotika mit Wirksamkeit gegenüber Chlamydien im Vergleich zu freilebenden Bakterien teuer und aufwendig.

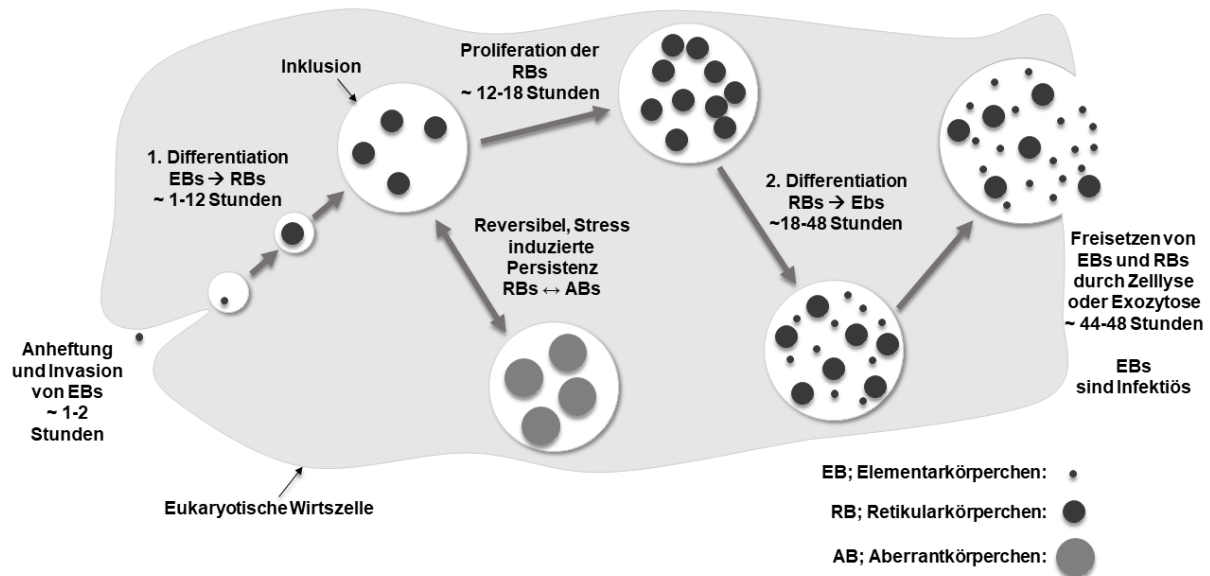


Abbildung 2: Biphasischer chlamydialer Lebenszyklus an dem Beispiel von *Chlamydia trachomatis*. Die Elementarkörperchen (EBs) sind infektiös und nahezu metabolisch inert. Im Gegensatz dazu sind die Retikularkörperchen (RBs) nicht infektiöse aber metabolisch aktive und vermehrungsfähige chlamydiale Zellen. Bei den aberranten Körperchen (ABs) handelt es sich um eine reversible persistierende Form, die bei Stress wie bspw. unter Zellwand-Antibiotikabehandlung ausgeprägt wird. Nach Anheftung und Invasion der EBs an die eukaryotische Wirtszelle (~1-2 Stunden nach Infektion), differenzieren sie sich in den Inklusionen innerhalb der ersten 12 Stunden zu RBs. Die entstandenen RBs vermehren sich, anschließend erfolgt die 2. Differenzierung der RBs zu EBs. Im letzten Schritt (ca. 48 Stunden nach Infektion) werden EBs und RBs durch Lyse oder Exozytose freigesetzt. Die freigesetzten EBs sind infektiös und können nun wieder Zellen infizieren und so den Zyklus erneut starten (Elwell *et al.*, 2016).

2.3 Peptidoglykan-Biosynthese in Chlamydien – ungewöhnliche Funktionen und Effekte der Inhibierung

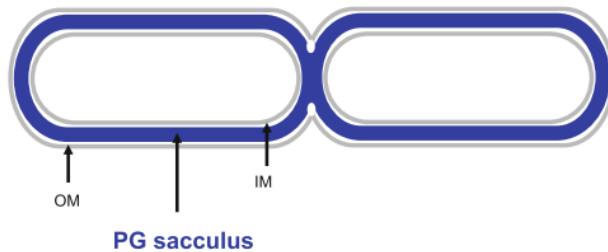
Im Gegensatz zu *Escherichia coli* brauchen Chlamydien als intrazelluläre Bakterien nicht permanent eine Zellwand, da sie keine osmotische Stabilisierung innerhalb von den Wirtszellen benötigen (Klößner *et al.*, 2018; Otten *et al.*, 2018). In *Escherichia coli* sorgt die Peptidoglykan (PG)- Schicht zwischen der äußeren und der inneren Membran für die Stabilisierung gegenüber dem osmotischen Druck (Klößner *et al.*, 2018; Otten *et al.*, 2018). PG besteht aus den beiden alternierenden

Aminozuckern N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) und ist über Pentapeptid-Seitenketten, welche an die MurNAc-Einheiten gebunden sind, vernetzt (Schleifer and Kandler, 1972; Höltje, 1998).

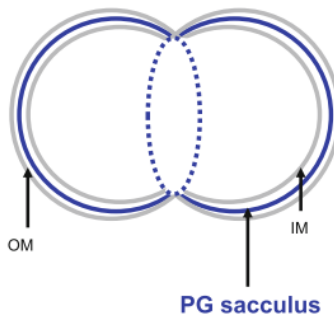
Lange Zeit konnte nicht erklärt werden, warum die genomisch stark reduzierten *Chlamydiaceae* die genetische Ausstattung für die Zellwandbiosynthese besitzen und dennoch keine Zellwand detektiert werden konnte (Klößner *et al.*, 2018; Otten *et al.*, 2018). Dieses Paradoxon wurde damals als Chlamydienanomalie bezeichnet.

Außerdem konnte für Antibiotika wie die β -Laktame, welche als Zielstruktur die Zellwandbiosynthese haben, ein deutlicher Effekt gegenüber Chlamydien detektiert werden, der durch die Ausbildung persistierenden ABs charakterisiert ist (Klößner *et al.*, 2018; Otten *et al.*, 2018). Die ABs können nach dem Ende der Antibiotika-Gabe wieder in den normalen Lebenszyklus zurückkehren (Abbildung 2). Die PG-Biosynthese ist wichtig während der chlamydialen Zellteilung, jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (Klößner *et al.*, 2018; Otten *et al.*, 2018; Liechti, 2021). Bei den pathogenen Chlamydien findet man PG ausschließlich innerhalb des sich replizierenden Zelltyps an der Teilungsebene (Abbildung 3) (Liechti, 2021). Aktuelle Studien haben ergeben, dass der ungewöhnliche Chlamydien-Teilungsprozess mit einer Knospung beginnt (Abdelrahman *et al.*, 2016; Cox, Abdelrahman and Ouellette, 2020; Liechti, 2021). Weiterhin ist eine evolutionäre Reduktion der PG-Strukturen sichtbar innerhalb der Chlamydien: Bei der Gattung *Chlamydia*, dem evolutionären jüngsten Vertreter der *Chlamydiales*, ist nur ein Peptidoglykan-Ring während der Teilung detektierbar, wohingegen bei den evolutionär älteren *Protochlamydia* auch ein PG-Sakkulus zwischen der inneren und äußeren Membran zu finden ist (Abbildung 3) (Klößner *et al.*, 2018; Liechti, 2021). Dadurch, dass in der Gattung *Chlamydia* PG nur in der Menge und in dem Zeitraum synthetisiert wird, der gerade notwendig ist, um die Zellteilung zu ermöglichen, wird Energie gespart. Zusätzlich wird durch die Reduktion der produzierten PG-Menge die Immunantwort des Wirtes auf immunogene PG-Komponenten reduziert (Klößner *et al.*, 2018).

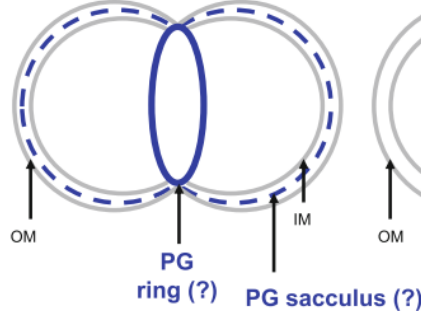
(a) Free-living bacteria (*E. coli*)



(b) *Protochlamydia*



(c) *Waddlia*



(d) *Chlamydia*

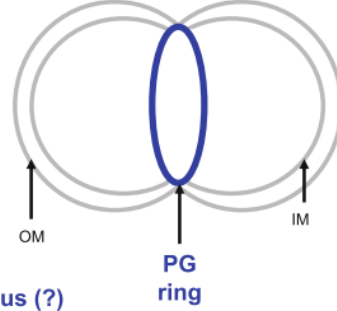


Abbildung 3: PG-Lokalisation der Gattungen *Protochlamydia*, *Waddlia*, *Chlamydia*. Die gestrichelten/ gepunkteten Linien zeigen, wo die Lokalisation von PG vermutet wird, wohingegen die geschlossene blaue Linie nachgewiesenes PG-Vorkommen anzeigt (Klößner *et al.*, 2018).

Noch nicht alle Schritte der chlamydialen PG-Biosynthese konnten bislang aufgeklärt werden (Abbildung 4). Ein tieferes Verständnis der chlamydialen PG-Biosynthese ist jedoch von besonderem Interesse, um neue Zielstrukturen für die Entwicklung antibiotischer Substanzen zu finden und mechanistisch aufzuklären, wie Zellwandantibiotika in Chlamydien Persistenz induzieren, anstatt - wie typischerweise in freilebenden Bakterien - eine bakterizide Wirkung auszuprägen. Der erste Schritt in der chlamydialen PG-Synthese ist das Zusammensetzen des Vorläufermoleküls Uridindiphosphat (UDP)-MurNAc-Pentapeptid im Zytoplasma (Klößner, 2016). Dabei wird der Zucker GlcNAc durch Zugabe von Enolpyruvat und der anschließenden Reduktion durch MurA und MurB in MurNAc umgewandelt (Heijenoort, 2001). Als nächstes wird die Pentapeptid-Seitenkette synthetisiert. Katalysiert wird der erste Schritt durch das Enzym MurC, das in *Chlamydia* fusioniert mit der Ligase Ddl vorliegt (McCoy and Maurelli, 2005). Dem Enzym MurC fehlt die Selektivität für Alanin (Hesse *et al.*, 2003). Dadurch kommt es vor, dass Glycin statt Alanin als erste Aminosäure der Pentapeptid-Seitenkette eingesetzt wird (Packiam *et al.*, 2015). An der zweiten Position des Pentapeptids liegt bei Chlamydien D-Glutaminsäure vor und wird durch MurD angeheftet (McCoy and Maurelli, 2006; Packiam *et al.*, 2015). Die Racemisierung von L-L-Diaminopimelinsäure (DAP) in meso-Diaminopimelinsäure

(mDAP) wird in *C. trachomatis* durch das bifunktionale Enzym DapF katalysiert. (Liechti *et al.*, 2018). Das Enzym MurE heftet die dritte Aminosäure meso-Diaminopimelinsäure (mDAP) an die Peptidseitenkette, ähnlich wie in *E. coli* (McCoy *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu *E. coli* wird mDAP über den Aminotransferase-Weg bereitgestellt, dieser Weg ist außerhalb der Chlamydien ausschließlich in Pflanzen vorhanden (Pavelka, 2007). Im nächsten Schritt wandelt das Enzym GlyA L-Alanin in D-Alanin um, eine Serinhydroxymethyltransferase, die in *E. coli* Serin zu Glycin umwandelt (Plamann and Stauffer, 1983; De Benedetti *et al.*, 2014). Durch die Ligase Ddl des Fusionsproteins MurC/Ddl werden zwei D-Alanin-Aminosäuren zu einem D-Alanyl-D-Alanin-Dipeptid verknüpft (McCoy and Maurelli, 2005). MurF vervollständigt die Seitenkette des UDP-MurNAc-Pentapeptids durch die Ligation des Dipeptids D-Ala-Ala an mDAP (Patin *et al.*, 2012). Die nachfolgenden Schritte werden durch Membranproteine katalysiert. Zunächst katalysiert das chlamydiale Enzym MraY die Übertragung des UDP-MurNAc-Pentapeptids auf den Membranträger Bactoprenol-Phosphat (C₅₅-P) und erzeugt dadurch den ersten membrangebundenen PG-Vorläufer Lipid I (Henrichfreise *et al.*, 2009). Wie in *E. coli* bindet MurG im nächsten Schritt den zweiten Zucker GlcNAc an Lipid I und synthetisiert Lipid II (Henrichfreise *et al.*, 2009). Der Transfer von Lipid II in das Periplasma könnte durch die drei integralen Membranproteine Proteine FtsW, MurJ oder RodA katalysiert werden, da es sich bei diesen um mutmaßliche Flippasen handelt, welche alle in Chlamydien konserviert sind (Young, 2014; Klöckner *et al.*, 2018). Die SEDS Proteine (shape, elongation, division and sporulation) RodA und FtsW besitzen in anderen Organismen Transglykosylierungsaktivität und könnten diese Aufgabe auch in Chlamydien übernehmen (Henrichfreise, Brunke and Viollier, 2016). Chlamydien besitzen drei Penicillin-bindende Proteine (PBP) (Klöckner *et al.*, 2018). Die beiden *high-molecular-weight* Enzyme PBP2 und PBP3 (FtsI) sind Homologe monofunktioneller Transpeptidasen, die in *E. coli* an der Quervernetzung von PG-Strängen beteiligt sind (Barbour *et al.*, 1982; McCoy *et al.*, 2006; Ouellette *et al.*, 2012; Packiam *et al.*, 2015). PBP6 aus *C. pneumoniae* ist ein *low-molecular-weight* PBP, das als Penicillin-sensitive DD-Carboxypeptidase das terminale D-Alanin von der Pentapeptidseitenkette des Lipid II Vorläufers entfernt (Otten *et al.*, 2015).

Alle an der PG-Synthese beteiligten Enzyme müssen räumlich und zeitlich exakt mit und während der Zellteilung koordiniert werden, da der PG-Ring in *Chlamydia* vorwiegend zur Unterstützung dieses zellulären Prozesses synthetisiert wird. Das für

die Rekrutierung der Zellteilungsproteine in *E. coli* wichtige Tubulin-Homolog FtsZ fehlt in *Chlamydia*, wird jedoch funktionell durch das Aktin-Homolog MreB und den zugehörigen Regulator RodZ ersetzt (Gaballah *et al.*, 2011; Ouellette *et al.*, 2012; Liechti *et al.*, 2016). Zu den bislang beschriebenen Interaktionspartnern von MreB und RodZ gehören die oben genannten Enzyme MurF, evtl. auch MraY und MurG in *C. pneumoniae*, sowie RodA und das Zellteilungsprotein FtsK (Klöckner *et al.*, 2018). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass FtsK mit dem chlamydialen PBP2 interagiert, welches wiederum mit PBP3 interagiert (Ouellette *et al.*, 2012). In den Genomen von *Chlamydiaceae* fehlen mehrere ansonsten für die Teilung essentielle Gene. Jedoch besitzen *Chlamydiaceae* einen rudimentären Satz von Zellteilungsproteinen, bestehend aus FtsK, FtsQ, FtsL, FtsW und FtsI (PBP3) (Jacquier, Viollier and Greub, 2015; Ouellette *et al.*, 2015). Koordiniert mit der Konstriktion und Trennung der Tochterzelle erfolgt die Verringerung des PG-Ringdurchmessers durch PG-Abbauprozesse (Liechti *et al.*, 2016). Kürzlich wurde ein SpoIID Homolog als lytische Transglykosylase in Chlamydien charakterisiert (Jacquier *et al.*, 2019). Bis heute konnte keine Endopeptidase gefunden werden, jedoch gibt es erste Hinweise zu einer Endopeptidasefunktion des LysM-Proteins NlpD aus *Waddlia* (Frandi *et al.*, 2014). Chlamydien besitzen im Gegensatz zu *E. coli* nur eine Zellteilungsamidase (AmiA) (Klöckner *et al.*, 2014). In *C. pneumoniae* kann AmiA nicht nur PG sondern auch Lipid II als Substrat verwenden und fungiert als bifunktionelle Amidase und Penicillin-sensitive DD-Carboxypeptidase (Klöckner *et al.*, 2014).

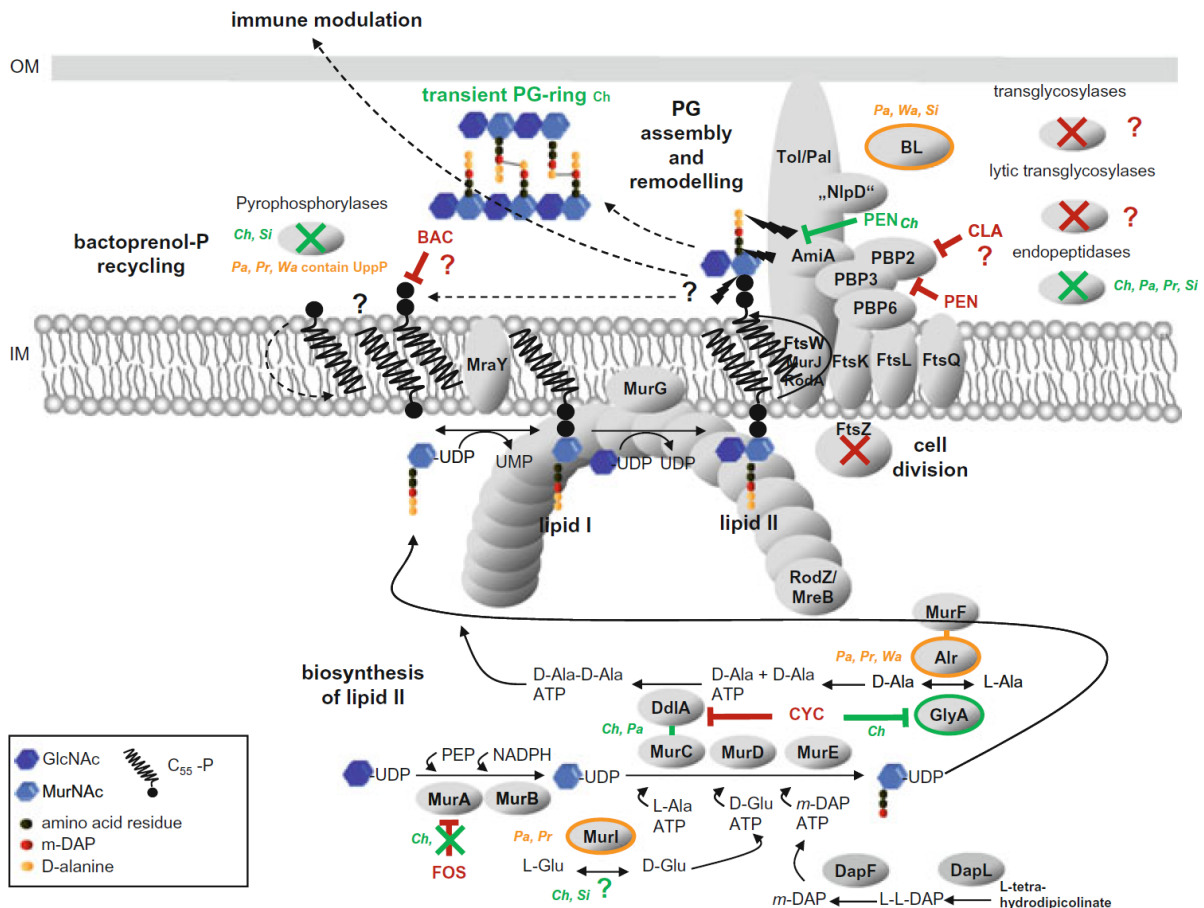


Abbildung 4: Modell zur chlamydialen PG-Biosynthese/ Zellteilungsmaschinerie. Die Biosynthese von Lipid II findet im Zytoplasma statt und der PG-Vorläufer wird durch eine in der Zytoplasmamembran lokalisierte Flippase in den periplasmatischen Raum überführt. MurJ, FtsW und/ oder RodA könnten an diesem Transport beteiligt sein. Alle Pyrophosphorylasen, die für das Recycling des Bactoprenol-Trägers in *E. coli* verantwortlich sind, fehlen in *Chlamydia* und *Simkania*. Das Lipid II wird im Periplasma durch Penicillin-Bindeproteine (PBP) katalysierte Transpeptidierung quervernetzt. Die Ausstattung an Enzymen, die an den geschilderten Prozessen beteiligt sind, variiert je nach chlamydialer Gattung Ch (*Chlamydia*), Pa (*Parachlamydia*), Pr (*Protochlamydia*), Si (*Simkania*), Wa (*Waddlia*). Angriffsorte von Antibiotika und Inhibitoren sind gekennzeichnet durch BAC (Bacitracin), CA (Clavulansäure), CYC (D-Cycloserine), FOS (Fosfomycin) und PEN (Penicillin). OM: Äußere Membran; IM: Innere Membran (Klößner *et al.*, 2018).

2.4 LysM – ein Motiv, das die bakterielle Zellwand detektiert

Es gibt einige biologische Prozesse in denen die Detektion und Bindung von Kohlenhydraten wichtig sind, wie beispielsweise die angeborene Immun-Antwort gegenüber Bakterien oder die bakterielle Zellteilung (Buist *et al.*, 2008; Visweswaran *et al.*, 2014).

LysM (**Lysin Motiv**)-Proteine sind in den Reichen der Eukaryoten sowie der Bakterien zu finden (Buist *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2015) und binden mittels LysM-Domänen Polysaccharide, die N-Acetylglukosamin (GlcNAc) enthalten. GlcNAc kommt in Peptidoglykan und Chitin vor. Diese polymeren Moleküle werden durch PG-Hydrolasen und Chitinasen abgebaut (Buist *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2015). Bakterien, wie beispielsweise *E. coli*, recyceln Peptidoglykan (Park and Uehara, 2008). Die Abbauprodukte, die bei der Prozessierung von Peptidoglykan entstehen, sind multifunktional. Sie dienen beispielsweise dem Bakterium als Signalmoleküle zur Regulierung der Zellwandbiosynthese und dem Wirt zur Immundetektion oder wirken als Toxin (Cloud and Dillard, 2002; Uehara *et al.*, 2010; Boudreau, Fisher and Mobashery, 2012; Wolf and Underhill, 2018).

Bei den intrazellulären Chlamydien ist ein sorgfältiges Recycling von PG-Material besonders wichtig, um nicht von den NOD-ähnlichen zytosolischen Rezeptoren der Wirtszelle erkannt zu werden und so eine Immunantwort auszulösen (Kavathas *et al.*, 2013; Otten *et al.*, 2018). Somit kann der Prozess des PG-Recyclings zur Pathogenität der Chlamydien beitragen.

Bei Insekten, Säugetieren und Pflanzen dienen LysM-Proteine der Detektion von Erregern (Buist *et al.*, 2008). In der Arbeitsgruppe Henrichfreise konnten bereits *in silico* drei verschiedene Gruppen von LysM-Proteinen in *Chlamydiales* gefunden und erste Versuche zu deren Charakterisierung durchgeführt werden (Klößner, 2016; Brunke, 2018). Des Weiteren wurde für ein LysM-Protein aus *Waddlia* eine Endopeptidasefunktion postuliert (Frandi *et al.*, 2014). Die exakten Funktionen von chlamydialen LysM-Proteinen sind jedoch noch weitestgehend unerforscht.

2.5 Antibiotika – Verschwenderischer Einsatz und die dringliche Suche nach neuen Substanzen

Die Detektion und Entwicklung neuer antibiotischer Substanzen sind so wichtig wie noch nie. Durch den hohen und häufig falschen oder nicht zielgerichteten Einsatz von Antibiotika in der Human- und der Tiermedizin, sowie im landwirtschaftlichen Bereich stehen wir vor enormen Problemen durch die bedrohliche Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen (Levy and Marshall, 2004). Auch im Abwasser, besonders von Krankenhäusern, können auf Grund der Einleitung von Antibiotika-haltigen Stoffwechselendprodukten hohe Mengen an Resistenzgenen detektiert werden (Karkman *et al.*, 2018). Seit der Entdeckung und dem erstmaligen Einsatz von Antibiotika (Fleming, 1929; Lobanovska and Pilla, 2017) entwickeln sich Antibiotika-Resistenzen rasant (Davies and Davies, 1996). Das Problem wird noch zusätzlich durch die Vernachlässigung der Antibiotikaforschung in Pharmaunternehmen verstärkt (Levy and Marshall, 2004; Fabbretti, Gualerzi and Brandi, 2011). Für viele multiresistente Erreger gibt es nur noch wenige Antibiotika, wie beispielsweise Daptomycin oder Linezolid, die als letzte Behandlungsoption eingesetzt werden können, doch auch gegenüber diesen Reserve-Antibiotika wurden bereits Resistenzen gefunden (Bender *et al.*, 2018; Heidary *et al.*, 2018; Grein *et al.*, 2020). Neben spezifischen Resistenzmechanismen schützt auch die Ausbildung von Biofilmen bakterielle Krankheitserreger gegenüber Antibiotika, sowie zusätzlich gegenüber der Abwehr durch das Immunsystem des Wirts (Roy *et al.*, 2018; Bisht and Ann Wakeman, 2019; Vestby *et al.*, 2020). Biofilm-assoziierte Erkrankungen sind im Gehör-, Herzkreislauf-, Verdauungs-, Haut-, Fortpflanzung-, Atmung- und Harnsystem beschrieben und können insbesondere bei einer Einbringung von Fremdkörpern wie zum Beispiel von Kathetern und künstlichen Gelenken auftreten (Roy *et al.*, 2018; Vestby *et al.*, 2020). Nur selten gelingt es, neuartige Antibiotika zu entwickeln, wie beispielsweise Teixobactin, welches in ersten Experimenten ein großes Potential beweist (Ling *et al.*, 2015; Sherpa, Reese and Aliabadi, 2015) und sich in der präklinischen Entwicklungsphase befindet (NovoBiotic Pharmaceuticals, 2025). Das Finden neuer antibiotischer Substanzen stellt sich unter anderem deshalb als komplexe Aufgabe heraus, da sich viele Bakterien, welche als Produzenten neuartiger Antibiotika dienen könnten, nicht im Labor kultivieren lassen (Nichols *et al.*, 2010; Sherpa, Reese and Aliabadi, 2015). Ein Lösungsansatz, um solche Bakterien

kultivieren zu können, ist der iChip (*isolation* Chip). Dieser wird mit verdünnter Erdsuspension inokuliert, sodass statistisch eine Zelle pro Kavität vorliegt (Nichols *et al.*, 2010; Sherpa, Reese and Aliabadi, 2015; Berdy *et al.*, 2017). Anschließend wird der Chip mit den isolierten und in kleinen Kammern vereinzelter Bakterien durch eine Membran verschlossen und zurück in das ursprüngliche Habitat gelegt, wobei durch die Membran nur die benötigten Nährstoffe zu den eingeschlossenen Bakterien gelangen (Nichols *et al.*, 2010; Sherpa, Reese and Aliabadi, 2015; Berdy *et al.*, 2017). Durch diese Technik konnten bereits Teixobactin und Clovibactin entdeckt werden, sowie Hypeptin wiederentdeckt (Ling *et al.*, 2015; Sherpa, Reese and Aliabadi, 2015; Crüsemann *et al.*, 2021; Shukla *et al.*, 2023). Neuartige antibiotische Substanzen müssen diverse Tests erfolgreich bestehen, um als Therapeutikum zugelassen zu werden. Zu den ersten Untersuchungen zählen die Bestimmung der toxischen Wirkung gegenüber eukaryotischen Zellen sowie der Lyse von Erythrozyten, da eine ausgeprägte Zytotoxizität und/ oder Hämolyse für den späteren humanen oder veterinären Einsatz fatal wäre.

2.6 Zoonosen und *emerging pathogens* – gesucht: ein holistischer Ansatz, um die Welt zu verstehen

One Health ist ein junger Bereich der interdisziplinären Forschung und die Definition ist noch nicht endgültig determiniert (Mackenzie and Jeggo, 2019; van Herten, Bovenkerk and Verweij, 2019), sodass jede Forschung in Richtung *One Health* einen Beitrag zur Konkretisierung darstellt. Der Vorläuferterminus *One Medicine* wurde bereits seit 1984 verwendet und ging nach dem SARS Ausbruch 2003 und der H5N1 Pandemie langsam zu der Begrifflichkeit *One Health* über (Zinsstag *et al.*, 2012; Mackenzie and Jeggo, 2019). Die Quintessenz von *One Health* beschreibt das komplexe Zusammenspiel von Menschen und Tieren als biotische Faktoren mit der Umwelt als abiotischem Faktor in all ihren Facetten.

Über 60 % der Erreger, die Krankheiten beim Menschen verursachen, haben einen tierischen Ursprung (Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific, 2010; Rahman *et al.*, 2020). Es gibt verschiedene Übertragungswege von Pathogenen auf den Menschen, welche in 5 Klassen aufgeteilt werden (Abbildung 5) (Wolfe, Dunavan and Diamond, 2007).

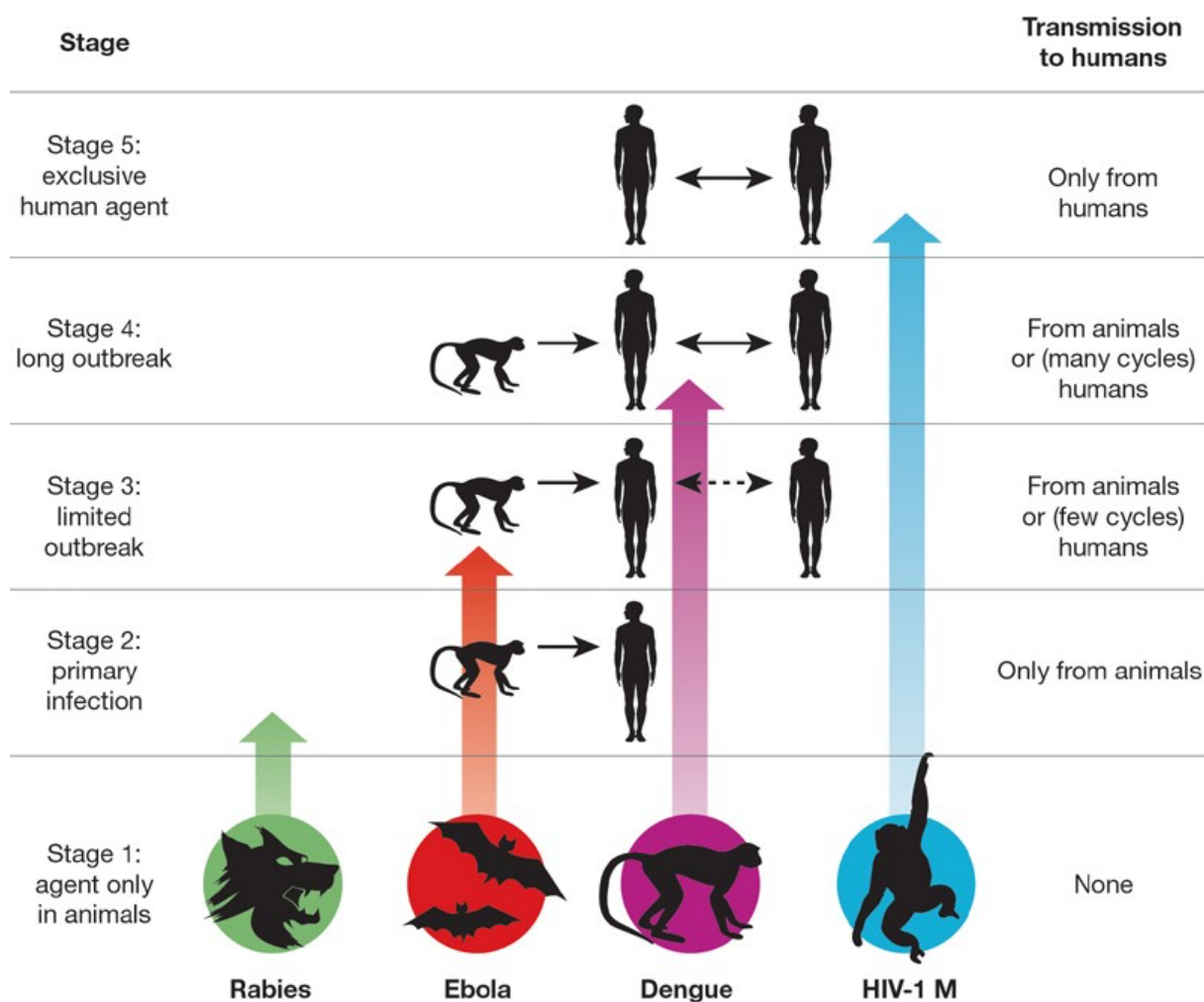


Abbildung 5: In dieser Abbildung sind die 5 Klassen der Übertragungswege auf den Menschen am Beispiel von klassischen Infektionskrankheiten dargestellt (Wolfe, Dunavan and Diamond, 2007).

Übertragungen der ersten Stufe finden nur unter Tieren statt. Bei der zweiten und dritten Stufe wird der Erreger von dem Hauptwirt auf weitere Tiere und dann auch auf den Menschen übertragen, wobei es bei der dritten Stufe gelegentlich zu Mensch-Mensch-Übertragungen kommen kann. In der vierten Stufe kommt es, nach der Übertragung vom Hauptwirt auf Tiere, zu häufigeren Mensch-zu-Mensch-Übertragungen. In der letzten Stufe kommt es ausschließlich zu direkten Mensch-zu-Mensch-Übertragungen und der Erreger manifestiert sich in der Gesellschaft.

Am Beispiel von Fledertieren bedeutet dies, dass diese sowohl Erreger auf viele Tiere, als auch auf den Menschen übertragen können und als Träger von hochpathogenen Erregern wie beispielsweise Filoviren, die das Ebolafieber- oder Marburgfieber auslösen, oder auch Coronaviren gelten (Drexler *et al.*, 2012; O'Shea *et al.*, 2014; Allocati *et al.*, 2016). Der Übertragungsweg dieser Erreger vom Fledertier auf den

Menschen wird den Stufen 3 und 4 zugeordnet. Trotz den zunehmenden Erkenntnissen ist über das Zusammenspiel von den Erregern und dem Fledertier-Immunsystems weiterhin nur wenig bekannt (O'Shea *et al.*, 2014; Banerjee *et al.*, 2020). Eine Hypothese besagt, dass die Kernkörpertemperatur der Fledertiere beim Fliegen regelmäßig auf 38°C - 41°C ansteigt – einem Temperaturbereich, welcher Fieber bei Säugetieren entspricht. Dies erhöht die Antwort des angeborenen und adaptiven Immunsystems bei einer gleichzeitigen Aktivierung des Metabolismus und verhindert so ein Ausbrechen der Krankheit in den Tieren (O'Shea *et al.*, 2014). Weiterhin stehen Fledertiere in enger evolutionärer und ökologischer Nähe zu Vögeln, wodurch das Evolvieren und Verbreiten von Erregern erleichtert wird (Drexler *et al.*, 2012; Nabi *et al.*, 2021).

Generell werden Krankheitserreger häufig über Arthropoden übertragen, daher auch der Fachausdruck der Arboviren, unter dem Viren zusammengefasst werden, die sich in Wirbeltieren vermehren und sich durch blutsaugende Arthropoden (Moskitos, Sandfliegen, Zecken) verbreiten (Simpson, 1972; Modrow *et al.*, 2010). Auch Zecken gehören, nach Moskitos, zu den häufigsten Vektoren der Arboviren (De La Fuente *et al.*, 2008). Zecken zeichnen sich durch ihre Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen und ein relativ hohes Körpervolumen aus. Durch Zecken verursachte Infektionen werden häufig spät erkannt; zum einen wird der Einstich selbst zu spät bemerkt und zum anderen vergeht zwischen dem Einstich und dem Auftreten einer klaren Symptomatik einige Zeit (Brouqui *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2008).

In den letzten Jahren haben einzelne Studien ergeben, dass Bakterien aus der Ordnung *Chlamydiales* in Zecken nachweisbar sind (Croxatto *et al.*, 2014; Hokynar *et al.*, 2016; Rochat *et al.*, 2020). Dies gibt bei noch schwacher Datenlage erste Hinweise darauf, dass Zecken somit auch als Überträger von Chlamydien bei Human- sowie bei Veterinärinfektionen dienen könnten (Croxatto *et al.*, 2014; Hokynar *et al.*, 2016; Radomski *et al.*, 2016; Rochat *et al.*, 2020).

Innerhalb der *Chlamydiales* zählen die bereits lang bekannten wichtigsten human-pathogenen Spezies *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* und *Chlamydia psittaci* zur Gattung *Chlamydia*. Für diese gibt es bis heute noch keinen effektiven Impfstoff (Elwell *et al.*, 2016). *Chlamydia trachomatis* Serotypen A, B, Ba, und C infizieren die Epithelzelloberfläche des Auges, wodurch es zu einer Keratokonjunktivitis kommt und das namensgebende Trachom ausgebildet wird, welches bei fehlender Behandlung zur Erblindung führt (Köhler *et al.*, 2001; Wright, Turner and

Taylor, 2007; Kayser *et al.*, 2010). *Chlamydia trachomatis* Serovar D, welches auch in dieser Arbeit verwendet wurde, gehört zu den wichtigsten Erregern von sexuell übertragbaren Krankheiten (STDs) (Köhler *et al.*, 2001; Kayser *et al.*, 2010; Elwell *et al.*, 2016). Die Infektion des Genitaltraktes ist meist asymptomatisch und kann zu Unfruchtbarkeit, inflammatorischen Krankheiten sowie Eileiterschwangerschaften und Geburtskomplikationen führen (Elwell *et al.*, 2016; Ammerdorffer *et al.*, 2017). Die Serotypen L1, L2 und L3 verursachen das *Lymphogranuloma venereum*, eine sexuell übertragbare Infektion, die je nach Kontaktstelle zur Ausbildung von genitalen, rektalen oder oralen Geschwüren und stark angeschwollenen Lymphknoten bis hin zu Lymphödemen führt (Köhler *et al.*, 2001; Kayser *et al.*, 2010; Robert Koch-Institut, 2010). *Chlamydia pneumoniae* wird über Tröpfchen übertragen und führt meist zu leicht verlaufenden Infektionen der Respirationsorgane (Köhler *et al.*, 2001; Kayser *et al.*, 2010). Die natürlichen Wirte des Zoonose-Erregers *Chlamydia psittaci* sind Vögel und die Inhalation des erregerhaltigen Vogelkots führt zu Fieber, Kopfschmerzen bis hin zur atypischen Pneumonie (Köhler *et al.*, 2001; Kayser *et al.*, 2010).

Neben den „klassischen“ Chlamydien der Gattung *Chlamydia* zählen auch die *Chlamydia*-ähnliche Bakterien zur Ordnung *Chlamydiales*. `Emerging pathogens` unter den *Chlamydia*-ähnlichen Bakterien, welche für diese Arbeit eine wichtige Rolle spielen, werden im Folgenden näher charakterisiert. Diese kommen meist in Amöben vor und es besteht die Möglichkeit der Übertragung auf den Menschen, wie beispielsweise durch kontaminierte Pfützen, Klimaanlage und Luftbefeuchter (Corsaro and Greub, 2006; Greub, 2009).

Waddlia chondrophila und *Parachlamydia acanthamoebae* führen bei Wiederkäuern und beim Menschen zu Fehlgeburten und beim Menschen zusätzlich zu respiratorischen Erkrankungen (Corsaro and Greub, 2006; Borel *et al.*, 2007; Greub, 2009; De Barsey and Greub, 2013; Baud *et al.*, 2014).

Bei Gorillas und Schimpansen (*Gorilla gorilla gorilla*, *Pan troglodytes troglodytes*), die aufgrund der evolutiven Nähe ein dem Menschen ähnliches Immunsystem besitzen, konnten *Chlamydia*-ähnliche Erreger der Gattung *Waddlia* und *Rhabdochlamydia* detektiert werden (Klößner *et al.*, 2016).

In westafrikanischen Malaria-Endemiegebieten dominieren Plasmodien als Verursacher von Fieber-assoziierten Infektionskrankheiten bei Kindern, während bei 41 % der Fälle andere Erreger verantwortlich sind oder zu Co-Infektionen beitragen (Bühl *et al.*, 2018; Hogan *et al.*, 2018). Unter diesen Erregern konnten, neben

klassischen *Chlamydiaceae* wie *C. pneumoniae*, auch *Chlamydia*-ähnliche Bakterien der Gattungen *Protochlamydia* und *Parachlamydia* identifiziert werden (Bühl *et al.*, 2018; Hogan *et al.*, 2018).

Unser Wissen zu *Chlamydia*-ähnlichen Bakterien in Bezug auf Vorkommen, Verbreitung und Pathogenität steht noch am Anfang, jedoch zeigen die oben genannten Beispiele die Relevanz dieses Forschungsgebiets.

2.7 Zoonotische Erkrankungen – viel mehr als nur Ebolafieber

Neben den Chlamydien, für die erst kürzlich Hinweise auf eine mögliche Übertragung durch Zecken gefunden wurden, gibt es eine Vielzahl weiterer Bakterien, bei denen Zecken als Vektoren eine Rolle spielen. Dazu zählen unter anderem die, den Spirochäten zugeordneten, Borrelien (Köhler *et al.*, 2001; Kayser *et al.*, 2010; Dworkin *et al.*, 2013). Subpopulationen von Borrelien können sich nach der Aufnahme in Phagosomen der intrazellulären Prozessierung entziehen und intrazellulär in Makrophagen überleben (Woitzik and Linder, 2021). Borrelien sind Auslöser verschiedener Infektionserkrankungen, wie zum Beispiel des Rückfallfiebers, dessen Erreger-Reservoir Nagetiere darstellen (Köhler *et al.*, 2001; Kayser *et al.*, 2010). Bislang wurden 15 Borrelienarten identifiziert, wie z.B. *Borrelia duttonii*, die endemisch in Afrika, Zentral-Asien, im Mittleren Osten, Zentral- und Südamerika auftritt und das Rückfallfieber auslösen kann (Köhler *et al.*, 2001; Kayser *et al.*, 2010; Dworkin *et al.*, 2013; Madison-Antenucci *et al.*, 2020). Für *Borrelia recurrentis*, einem weiteren Verursacher des Rückfallfiebers, ist bekannt, dass dieser nicht nur in Zecken, sondern auch in der Kleiderlaus vorkommen kann (Köhler *et al.*, 2001; Kayser *et al.*, 2010). Namensgebend für das Rückfallfieber sind intervallartige Fieberschübe, welche dadurch verursacht werden, dass die Borrelien immer wieder mit geänderter Antigenstruktur in den Blutkreislauf eintreten (Köhler *et al.*, 2001; Kayser *et al.*, 2010). Eine weitere durch Borrelien verursachte Krankheit ist die Lyme-Borreliose, welche in den USA, Europa, Asien und Japan vorkommt (Madison-Antenucci *et al.*, 2020). Als Auslöser für diese Krankheit sind zurzeit 4 Erreger bekannt, zu denen *Borrelia burgdorferi* und *Borrelia garinii* zählen. Die Lyme-Borreliose verläuft unbehandelt in 3 Stufen ab (Köhler *et al.*, 2001; Kayser *et al.*, 2010). Im Stadium 1 (früh lokalisiert) entsteht häufig bei der Eintrittsstelle ein roter, nach außen wandernder Ring

(*Erythema migrans*) (Köhler *et al.*, 2001; Kayser *et al.*, 2010; Eldin *et al.*, 2019; Madison-Antenucci *et al.*, 2020). Im zweiten Stadium (früh disseminiert) entsteht die Meningoradikulitis (Nervenzurwzelschmerzen in wechselnden Körperregionen) und im dritten Stadium (spät disseminiert) wird eine Lyme-Arthritis ausgeprägt (Köhler *et al.*, 2001; Kayser *et al.*, 2010; Eldin *et al.*, 2019; Madison-Antenucci *et al.*, 2020).

Weitere Erreger, die in Zecken vorkommen, sind die Anaplasmen, Ehrlichien, Coxiella und die intrazellulären Rickettsien (Ericsson *et al.*, 2004; Kayser *et al.*, 2010; Fang, Blanton and Walker, 2017; Portillo *et al.*, 2017; Sothmann *et al.*, 2017). Rickettsien sind z.B. verantwortlich für das Rocky Mountain Fleckfieber, welches durch *Rickettsia rickettsii* verursacht wird oder das Afrikanische Zeckenbiss-Fleckfieber, das durch *Rickettsia africae* hervorgerufen wird (Brouqui *et al.*, 2004; Ericsson *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2008; Kayser *et al.*, 2010; Fang, Blanton and Walker, 2017) und nach 10-14 Tagen Inkubationszeit ausbricht (Köhler *et al.*, 2001; Parola *et al.*, 2013). Oft tritt an der Eintrittsstelle ein nekrotisches Hautareal (Eschar) auf (Brouqui *et al.*, 2004; Ericsson *et al.*, 2004; Parola *et al.*, 2013; Fang, Blanton and Walker, 2017; Portillo *et al.*, 2017). Fleckfieber ist gekennzeichnet durch mehrere Fieberphasen über 10-20 Tage, in denen Temperaturen von über 40°C auftreten (Köhler *et al.*, 2001; Parola *et al.*, 2013). Die namensgebenden Flecken sind makulöse Exantheme (Rickettsiose), die nach 7 Tagen entstehen und anschließend vom Rumpf in die Extremitäten wandern (Köhler *et al.*, 2001; Parola *et al.*, 2013). Das Exanthem geht später in petechiale Läsionen (stecknadelkopfgroße Blutungen) über (Köhler *et al.*, 2001; Eldin and Parola, 2018) und die Letalität beträgt 5% bis 50% (Köhler *et al.*, 2001).

Neben der Vielzahl an bekannten Erregern, die in Zecken und Fledertieren beschrieben sind, werden immer neue potentiell pathogene Erreger detektiert. Diese Daten sind besonders wichtig, um einem möglichen Ausbrechen von Krankheiten entgegenzuwirken und können als Frühwarnsystem fungieren. Des Weiteren ist nicht gänzlich aufgeklärt, ob bei Krankheiten, wie dem Afrikanischen Zeckenbissfieber, das Erregerspektrum vollständig charakterisiert wurde, oder auch weitere bislang unerkannte Erreger zum Infektionsgeschehen beitragen (Tsai *et al.*, 2008; Althaus *et al.*, 2010; Mediannikov and Fenollar, 2014; Brook and Dobson, 2015).

Ein weiteres, klassisches Beispiel für eine durch Vektoren übertragbare Infektionskrankheit ist die Pest, deren Erreger, das gramnegative Bakterium *Yersinia pestis* als Bioterrorismus-Erreger der Kategorie A eingestuft wird (Yang, 2018; Glatter and Finkelman, 2020). Dieser Erreger lebt fakultativ intrazellulär in

Makrophagen und Neutrophilen (Ke, Chen and Yang, 2013). Die DNA des Pesterregers konnte bereits an Skeletten der Bronzezeit (ca. 3800 Jahre alt) gefunden werden und im Laufe der Menschheitsgeschichte starben mehr als 200 Millionen Menschen an der Pest (Glatter and Finkelman, 2020). Endemisch ist die Pest heutzutage noch insbesondere auf Madagaskar, in der Demokratischen Republik Kongo und in Peru (Glatter and Finkelman, 2020). Der natürliche Lebenszyklus von *Y. pestis* findet in Nagetieren statt, die sich untereinander durch Flöhe anstecken (Yang, 2018). Damit es zu einem humanen Pest-Ausbruch kommt, müssen infizierte Flöhe oder kontaminierte Aerosol-Tröpfchen aus der Lunge weitere Menschen infizieren (Yang, 2018). Die Inkubationszeit beträgt im Normalfall 2 bis 3 Tage, dabei treten Anfangssymptome wie hohes Fieber, Unwohlsein, Schüttelfrost und Kopfschmerzen auf (Köhler *et al.*, 2001; Yang, 2018). In 90 % der Pestfälle entwickelt sich die Bubonenpest (Beulenpest) (Köhler *et al.*, 2001; Kayser *et al.*, 2010). Bei der Bubonenpest bilden sich regional rote, trockene und sich heiß anfühlende Hautpartien aus und es treten begleitend starke Schmerzen an der Bissstelle des Flohes und geschwollene Lymphknoten (Beulen) auf (Kayser *et al.*, 2010; Yang, 2018). Unbehandelt führt dies bei 50% bis 90% der Fälle zu einer Sepsis, Organversagen, Meningitis und gangränöse Hautnekrosen, deren Ausbildung die Pest den Trivialnamen Schwarzer Tod zu verdanken hat (Köhler *et al.*, 2001; Kayser *et al.*, 2010).

Bei der Lungenpest entwickeln Patienten eitrigen, schaumigen und, im Endstadium, blutigen Husten (Pechous *et al.*, 2016; Glatter and Finkelman, 2020). Die Lungenpest besitzt unbehandelt eine Letalität von 100% (Kayser *et al.*, 2010). Die Heilungschancen sind höher, je früher mit einer Antibiotikatherapie begonnen wird (Yang, 2018). Normalerweise sprechen bei Erwachsenen Streptomycin und Gentamicin als Therapie an, jedoch wurden auf Madagaskar bereits multi-resistente Stämme gefunden (Köhler *et al.*, 2001; Yang, 2018), welche resistent gegenüber Streptomycin, Chloramphenicol, Ampicillin, Spectinomycin, Kanamycin, Tetracyclin, Sulfonamid und Minocyclin sind (Yang, 2018). Für ein Land wie Madagaskar wissen wir noch viel zu wenig über das neben *Y. pestis* vorkommende Spektrum an Krankheitserregern. Für eine empirische Therapie ist es aber sehr wichtig, die vor Ort vorkommenden Erregerspezies inklusive möglicher Resistenzen zu kennen.

3 Ziele dieser Arbeit

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, im Sinne des One-Health-Ansatzes Einblicke in die Epidemiologie, die antibiotische Therapie und die Biologie intrazellulärer bakterieller Krankheitserreger zu gewinnen. Der erste Teil dieser Arbeit trug zum Verständnis zoonotischer Erreger und neuartiger sogenannter Emerging Pathogens bei und konzentrierte sich auf epidemiologische Untersuchungen, in deren Rahmen unter anderem ghanaische Zecken analysiert wurden. Diese Parasiten wurden von Fledermäusen geerntet und sollten mittels real-time PCR und Schmelzkurvenanalyse auf das Vorhandensein von intrazellulären bakteriellen Erregern wie Rickettsien, Borrelien und Chlamydien, inklusive der als emerging pathogens eingestuften sogenannten *Chlamydia*-ähnlichen Bakterien, hin untersucht werden. Eine weitere Studie untersuchte mögliche chlamydiale Infektionen im Zusammenhang mit Geburten bei Müttern und Neugeborenen in Afrika. Mithilfe der real-time PCR sollten Nabelschurblut- sowie Plazentaprobe auf Chlamydien, einschließlich *Chlamydia*-ähnlichen Bakterien, untersucht werden, für die eine beeinträchtigende Rolle im Kontext von Schwangerschaft und Geburt diskutiert wird. Darüber hinaus sollte diese Arbeit dazu beitragen, auf Madagaskar die Infektionswege der dort endemischen Pest nachzuvollziehen und zugleich ein Verständnis des lokalen zoonotischen Erregerspektrums, inklusive intrazellulärer Bakterien, zu gewinnen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf Untersuchungen von (neuartigen) antibiotischen Substanzen hinsichtlich potenziell negativer Eigenschaften, wie einer lytischen Wirkung auf humane Erythrozyten oder zytotoxischen Effekte auf eukaryotische Zellen in Zellkultur, um frühzeitig abschätzen zu können, ob diese einem therapeutischen Einsatz dieser Substanzen hinderlich sein könnten. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und Zellkulturexperimenten sollte weiterhin untersucht werden, inwieweit (neuartige) antibiotische Substanzen eine Aktivität, gegenüber persistierende Infektionen mit *Chlamydia trachomatis*, haben.

Zuletzt sollte durch diese Arbeit das Verständnis zu der ungewöhnlichen Biologie chlamydialer Erreger beigetragen werden. Hierzu sollten sog. LysM-Proteine als neuartige Komponenten der PG-Ring-Biosynthesemaschinerie, welche in Chlamydien als Penicillin-Target dient, mittels Pulldown- und Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie-Versuchen, untersucht werden, um Hinweise darauf zu finden, welche Substrate diese binden können.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien

In Tabelle 1 sind die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien und Puffer aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien.

Firma	Chemikalie
Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland)	Ampuwa (reinst H ₂ O)
Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)	Columbia Agarplatten mit 5 % Schafsblut
Biotium (Cologne, Deutschland)	GelRed Nucleic acid stain 10000X in DMSO
Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)	N,N',N''-Triacetylchitotriose
Eurogentec S.A. (Seraing, Belgien)	Primer für die real-time PCR
Alfa Aesar/Fermentas/Thermo Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)	GeneRuler 1 kb DNA Ladder; PageRuler Plus Ladder; PageBlue; Pierce 4x LDS sample buffer; Tris-Hepes-SDS-running buffer; T4-DNA-Ligase; 10x Ligation Puffer; Bradford Reagent (ready-to-use); PMSF; Proteaseinhibitor Tablette; Maltotriose; D-(+)-Raffinose pentahydrate; Triton X-100;
GenScript (Piscataway, USA)	Tris-MOPS-SDS Running Buffer Powder
IBA GmbH (Göttingen, Deutschland)	Strep-Tactin Sepharose

Firma	Chemikalie
Gibco/Thermo Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)	Dulbeo's Modified Eagle Medium (DMEM); Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI); MEM non Essential Amino Acids (100x); Hanks Balanced Salt Solution (HBSS); MEM Vitamins Solution (100x); Fungizone; Gentamicin; Fetales Kälber Serum; L-Glutamin; Trypsin; AlamarBlue Cell Viability Assay
Merck (Schwalbach, Deutschland)	Magnesiumsulfat; Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (TSB)
New England Biolabs (Ipswich, USA)	Desoxynukleotide (dNTPs); Q5 DNA Polymerase; Restriktionsenzyme; BL21; DH5α
Operon (Ebersberg, Deutschland)	Oligonukleotide (Primer)
Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)	1,4-Dithiothreitol (DTT)
Roth (Karlsruhe, Deutschland)	Agarose NEEO ultra quality; Glycerol; Glycin; Glukose; Natriumchlorid; Lactose; Hefeextrakt; Magnesiumchlorid (MgCl ₂); N-N Dimethylformamide (DMF); Ethanol Rotipuran 99,8 %; Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄); Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄); 96 % Ethanol; Albumine; β-Mercaptoethanol; Eisessig; Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄); CHAPS; Lysozym; β-Mercaptoethanol
Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)	Benzonase; Dimethylsulfoxid (DMSO); Lysozym; 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI); Proteinase K; Tris Base; DCAP; CCCP; Peptidoglykan <i>Bacillus subtilis</i> ; 1 %ige Kristallviolett Lösung
MP Biomedicals (Santa Ana, USA)	Tryptone
Xantec (Düsseldorf, Deutschland)	Borate Elution Buffer

4.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Materialien sind in Tabelle 2 gelistet.

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Firma	Gerät
AEG (Berlin, Deutschland)	Micromate
Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)	Avanti JXN-26
Binder GmbH (Tuttlingen, Deutschland)	CO ₂ Inkubator
Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)	UV Tisch TI 1
BioRad Laboratories (München, Deutschland)	T100 Thermal Cycler; CFX Connect Real-Time PCR Detection System; Molecular Imager GelDoc XR+; Image Lab Software Version 2.0.1
Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)	Dstroy-SR-15
Branson	Sonifier Cell Distruptor B15
Cytiva Europe GmbH; Freiburg, Deutschland	Biacore T100 (T200 Sensitivity Enhanced); X100 Kontroll- und Evaluationssoftware
Corning (New York, USA)	25 ml, 10 ml, 5 ml serologische Pipetten; Zellscharber
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	MiniSpin Microfuge; 2,5 µl Pipette; 1,5 ml/ 2 ml Reaktionsgefäße
GenScript (Piscataway, USA)	ExpressPlus PAGE Gels, 4-20%, 12 + 15 wells
Gesellschaft für Labortechnik (GFL, Burgwedel, Deutschland)	Wasserbad 1083
Gilson (Middelton, USA)	Pipetten: 2 µl- 20 µl/ 20 µl- 200 µl/ 200 µl- 1000 µl
Grant Instruments (Cambridge, UK)	Heizblock QBH2
Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)	Zellkulturflasche 25, 75 cm ² ; Petrischalen; schwarze 96 Well Platte FLUOTRAC; 96 Well Platte U-Boden

Firma	Gerät
G&P Kunststofftechnik GbR (Kassel, Deutschland)	Horizontale Gelkammer
HAIn Lifescience (Nehren, Deutschland)	GenoXtract; FluoroCycler 12, Fluoro-Software IVD
Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland)	Pipetus (elektronische Pipettierhilfe)
Heraeus Gestigkeit GmbH (Düsseldorf, Deutschland) ⁹	37 °C Inkubator
Heraeus Instruments GmbH (Hanau, Deutschland)	Lamin Air HB2448 (Sterilwerkbank)
Ibidi (Planegg / Martinsried, Deutschland)	µ-Plate 96 well
Implen (München, Deutschland)	Nanophotometer 7122v1.6.1
INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal, Deutschland)	Mediaclave, Mehrkanalpipette VIAFLO II; GripTips 1250 µl
LaboGene ApS (Allerød, Dänemark)	Scanlaf, Mars Safety Classe 2
Promega (Madison, USA)	GloMax
Sarstedt AG und Co (Nümbrecht, Deutschland)	Pipettenspitzen; 2,5 µl Pipette; 1,5 ml/ 2 ml Reaktionsgefäße; Halb-Mikro-Küvette, PS; Filtropur V50 500 ml 0.22 µm; TC 96 Well Platte
Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)	Replikationsplattierer; 3 mm Borsilikatperlen
Nalgene/Thermo Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)	Biofuge 28RS Zentrifuge; Heraeus Megafuge 40R Zentrifuge; Sovall MX120; 37 °C Inkubator; XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System; Zentrifugenröhrchen Oak Ridge
Tecan (Männerdorf, Schweiz)	Spark 10M (Mikrotiterplatteauslesegerät); SparkControl Software

Firma	Gerät
Thermo Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)	Nunc™ Edge 2.0™ 96-Well- Mikrotiterplatte, Nunclon Delta- behandelt, mit flachem Boden
Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)	GloMax Explorer
VWR/Pall (Darmstadt, Deutschland)	Power Source 300V; Acrodisc 25 mm Syringe Filter 0,2 µm
Xantec (Düsseldorf, Deutschland)	Chip HC1500M

4.2.1 Kits

In Tabelle 3 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kits zusammengefasst.

Tabelle 3: Verwendete Kits.

Firma	Kit
BioRad Laboratories (München, Deutschland)	Pathfinder, Chlamydia Culture Conformation System
Cytiva Europe GmbH; Freiburg, Deutschland	Amine Coupling Kit
Fermentas/Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)	GeneJET Gel Extraction kit; GeneJET Plasmid Miniprep Kit
IBA GmbH (Göttingen, Deutschland)	Strep-Tag starter kit
HAIn Lifescience (Nehren, Deutschland)	GenoXtract; FluoroLyse; GenoType DNA Isolation Kit; FluoroType Borrelia;
Qiagen (Hilden, Deutschland)	DNeasy Blood and Tissue
Takara (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)	In-Fusion HD Cloning Plus

4.2.2 Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Firma	Besonderheiten
Ampicillin (AMP)	ratiopharm GmbH (Ulm, Deutschland)	In H ₂ O gelöst
Anhydrotetracyclin (AHT)	IBA GmbH (Göttingen, Deutschland)	In Dimethylformamid gelöst
Azithromycin (AZM)	Merck (Schwalbach, Deutschland)	In DMSO gelöst
Chloramphenicol (CAM)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)	In Ethanol gelöst
Doxycyclin (DO)	Thermo Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)	In H ₂ O gelöst
Oxacillin (OXA)	Merck (Schwalbach, Deutschland)	In H ₂ O gelöst
Penicillin G (PenG)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)	In H ₂ O gelöst
Rifampicin (RA)	Merck (Schwalbach, Deutschland)	In H ₂ O gelöst

4.3 Bakterienstämme, eukaryotische Zelllinien und Plasmide

4.3.1 Bakterienstämme

4.3.1.1 Bakterienstämme

Für die Arbeit wurden die *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme DH5α sowie BL21 New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet. Zusätzlich wurde der *E. coli* Stamm DC2 verwendet (Coli Genetics Stock Center, Yale), der sehr sensitiv gegenüber Zellwand Antibiotika ist. Für die Biofilm-Experimente wurde mit dem *Staphylococcus aureus* Stamm ATCC 25923 gearbeitet.

4.3.1.2 Intrazelluläre Bakterien

4.3.1.2.1 *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/CX (ATCC-VR-885)

Chlamydia trachomatis D/UW-3/CX ist verantwortlich für humane Urogenitalinfektionen. Dieser Stamm wurde in der Hep2 Zelllinie kultiviert.

4.3.1.2.2 *Chlamydia trachomatis* L SWFP- (Persson et al., 1996)

Chlamydia trachomatis F SWFP- ist ein Plasmid defizienter Stamm, der in einer McCoy Zelllinie kultiviert wurde.

4.3.2 Eukaryotische Zelllinien

4.3.2.1 Hep2, Subklon B (ATCC CCL-23)

Die adhärente Zelllinie Hep2 ist ein Derivat von HeLa-Zellen. Der Name HeLa setzt sich aus dem Namen der Afroamerikanerin Frau Henrietta Lacks zusammen, die an einem sehr aggressiven cervikalen Karzinom litt (Beskow, 2014). Als Besonderheit trägt dieses Derivat ein stilles Humanes Papillomavirus. In dieser Zelllinie lassen sich Chlamydien gut kultivieren. Durch die große Oberfläche sind diese Zellen besonders gut für die Mikroskopie geeignet.

4.3.2.2 McCoy (ATCC CRL-1696)

Die adhärente McCoy Zelllinie stammt aus Mausfibroblasten. Diese Zelllinie wird für die Kultivierung von Chlamydien empfohlen, besonders für den *Chlamydia trachomatis* L SWFP- Stamm (Persson et al., 1996).

4.4 Mikrobiologische Methoden

4.4.1 Sterilisation

Glaswaren wurden für 5 Stunden 200°C heißer Luft ausgesetzt. Bakterielle Kulturmedien, Puffer, Pipettenspitzen und Zentrifugationsröhrchen wurden autoklaviert. Kontaminierte Gegenstände wurden bei 121°C für 40 min und saubere Gegenstände bei 121°C für 20 min autoklaviert. Hitzesensitive Substanzen wie Antibiotika und Zucker wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm).

4.4.2 Kultivierung und Behandlung von eukaryotischen Hep2-Zellen

4.4.2.1 Vorbereitung von Zellkulturmedium

Für die Kultivierung von eukaryotischen Hep2-Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) oder Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 (RPMI) mit Zusätzen (Tabelle 6) versetzt. Für die AlamarBlue Assays sowie für die Mikroskopie wurde Medium ohne den Zusatz von Amphotericin B und Gentamycin angefertigt. Alle verwendeten Materialien wurden von dem Hersteller Gibco/Thermo Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland) bezogen.

Tabelle 5: Zusätze im Zellkulturmedium.

Zusatz	Volumen (ml)	Finale Konzentration
Fetales Kälberserum	50	10%
MEM-Vitaminlösung	5	1x
Amphotericin B	5	1x
Nicht-essentielle Aminosäuren	5	1x
Gentamycin	0,5	50 µg/ml
Bei RPMI: L-Glutamin	5	2 mM

4.4.2.2 Amphotericin B, MEM Vitamin Lösung und L-Glutamin

Das Fungizid Amphotericin B, die MEM Vitamin Lösung sowie das L-Glutamin wurden in 5 ml Ansätzen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

4.4.2.3 Vorbereitung der Trypsin Lösung

2,5 ml Trypsin wurden in 47,5 ml *Hank's Balanced Salt* Lösung (HBSS) (Gibco/Thermo Scientific GmbH; Schwerte, Deutschland) verdünnt und bis zum Verbrauch bei 4°C gelagert.

4.4.2.4 Kultivierung der Hep2-Zellen

Um einen geschlossenen Hep2-Zellenrasen zu gewährleisten, mussten diese alle 3-4 Tage auf neue Zellkulturfalschen (75 cm²/ 25 cm²; Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) aufgeteilt werden. Die Flaschen (75 cm²) mit einer kohärenten Monoschicht wurden für die Infektion mit Chlamydien verwendet. Nach 4 Tagen wurde aus einer bewachsenen Flasche das Medium entnommen und mit 10 ml HBSS gewaschen, um eine Inaktivierung von Trypsin durch das Medium zu verhindern. Im nächsten Schritt wurden 5 ml Trypsin (4.4.2.3) hinzugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich die Zellen von der Flaschenoberfläche gelöst hatten. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 5 ml frisches Medium dazugegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C, 150 x g für 10 min abzentrifugiert, die geringe Zentrifugationsgeschwindigkeit ist notwendig, da sonst die eukaryotischen Zellen zerstört werden können. Zerstörte Zellen können sich nicht mehr vermehren und wachsen. Das Pellet wurde in 7 ml frischem Medium, durch auf und ab pipettieren, resuspendiert. In jede neue Flasche wurden 15 ml frisches Medium vorgelegt, sowie 0,6 ml der Zellsuspension gegeben. Die Zellsuspension wurde auch zum Einsähen für verschiedene Platten z.B. Mikroskopierplatten, verwendet. Die frisch ausgesäten Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ für 3 Tage inkubiert.

4.4.3 Kultivierung von Prokaryonten

4.4.3.1 Kultivierung von *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/CX und Infektion von Hep2-Zellen

Die Hep2-Zellen wurden 48 Stunden nach der Infektion von der Zellkulturfasche abgeschabt und in ein Röhrchen (Oak Ridge; Nalgene/ Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) mit 3 mm Borsilikatperlen (Sigma Aldrich; Steinheim, Deutschland) gegeben. Durch 30 sec vortexen, wurden die eukaryotischen Zellen aufgeschlossen und die EBs freigesetzt. Die Zentrifugation in Zentrifugenröhrchen (Oak Ridge; Nalgene/ Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) bei 4°C, 1497 x g für 10 min trennt die Zelltrümmer von den Chlamydien. Der Überstand, in dem die Chlamydien enthalten sind, wurde für Infektion von Hep2-Zellen verwendet. Für eine Infektion wurden Flaschen mit einer Hep2-Zellen Monoschicht (2.3.2.5) benötigt. Alle 3-4 Tage wurde eine neue Infektion mit *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/CX gestartet. Die mit einer Hep2-Zellen Monoschicht bewachsenen Flasche wurde das alte Medium abgenommen und mit 8 ml frischem Medium sowie 6 ml Chlamydien-Überstand befüllt. Die Suspension wurde für 3 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, damit die Chlamydien im Medium die eukaryotischen Zellen infizieren können. Danach wurde das Medium abgenommen und durch 15 ml frisches Medium ersetzt. Um die chlamydiale Infektion zu begünstigen, wurde die eukaryotische Proteinsynthese mit Hilfe von Cycloheximid (1,2 µg/ml) (Sigma Aldrich; Steinheim, Deutschland) gehemmt. Cycloheximid inhibiert die eukaryotische Proteinsynthese (Ripa and Mårdh, 1977), was zu einer höheren ATP Ausschüttung führt und so größeren Chlamydien Inclusions entstehen können. Die infizierten Zellen inkubierten anschließend bei 37°C und 5 % CO₂.

4.4.3.2 Kultivierung von *Staphylococcus aureus*

S. aureus wurde auf Columbia Agarplatten mit 5% Schafsblut (Becton Dickinson GmbH; Heidelberg, Deutschland) ausgestrichen und in TSB-Medium (Merck; Schwalbach, Deutschland) kultiviert.

4.4.3.3 Kultivierung von *Escherichia coli*-Stämmen

4.4.3.3.1 Herstellen von *Escherichia coli* Dauerkulturen

Für Dauerkulturen wurde 500 µl einer Übernachtskultur 1:1 mit sterilem 100 % Glycerol gemischt und bei -70°C gelagert.

4.4.3.3.2 Zusammensetzung der Medien und Kultivierung von *Escherichia coli*

Die verwendeten autoklavierten Medien die zur Kultivierung sowie Proteinüberexpression von *E. coli* genutzt wurden, sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Medium für das Anziehen für *E. coli*.

Medium	Zusammensetzung
<i>Lysogeny Broth</i> (LB) nach Miller	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Natriumchlorid (NaCl)
LB ohne Salz	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt
<i>Super optimal Broth</i> Medium (SOB)	20,0 g/l Trypton 5,0 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl 0,02 mol/l Glukose 0,01 mol/l MgCl ₂ 0,01 mol/l MgSO ₄ 0,002 mol/l KCl Steril filtrieren
<i>Potassium</i> Puffer	0,17 mol/l KH ₂ PO ₄ 0,72 mol/l K ₂ HPO ₄

Medium	Zusammensetzung
<i>Terrific Browth</i> (TB)	12 g/l Trypton 24 g/l Hefextrakt 4 ml/l Glycerin Ad 900 ml H ₂ O Nach dem Autoklavieren: 100 ml Potassium Puffer 0,01 mol/l MgSO ₄ 0,01 mol/l MgCl ₂ 0,5 g/l Glucose 2 g/l Lactose

} steril-
filtriert

Die Kultivierung von *E. coli* wurde auf LB-Medium und LB Agar mit Antibiotika bei 37°C durchgeführt. Flüssigkulturen wurden zusätzlich bei 200 rpm geschüttelt. Bewachsene Platten wurde bei 4°C gelagert und nach 1 Woche überimpft.

4.4.4 Messen der optischen Dichte von Flüssigkulturen

Um das Wachstum von Bakterien nachzuvollziehen wurde die optischen Dichte mit einem Spektrophotometer (Implen; München, Deutschland) in Küvetten (Sarstedt, Deutschland) gemessen. Dabei wurde die Suspension bei 600 nm (OD₆₀₀) gemessen, wobei steriles Medium als Referenz verwendet wurde.

4.4.5 Transformation in chemokompetente *E. coli*-Zellen

Die chemokompetenten *E. coli* Zellen wurden zur Transformation auf Eis aufgetaut und mit 10 ng Plasmid DNA oder 5 µl Ligationsansatz versetzt. Der Ansatz wurde im nächsten Schritt für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend wurde bei 42°C für 90 sec ein Hitzeschock durchgeführt. Nachdem die Suspension 2 min auf Eis inkubiert und 1 ml SOB-Medium (Tabelle 6) hinzugegeben wurde, konnte der Ansatz bei 37°C für 1 Stunde bei 120 rpm inkubiert werden. Nach einer Stunde wurde der Ansatz abzentrifugiert, das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert, auf LB-Platten mit 34 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

4.4.6 DNA-Isolierung

4.4.6.1 Isolation genomischer DNA

Die genomische DNA von *Parachlamydia acanthamoebae* UV-7, sowie *Simkania negevensis* wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Matthias Horn (Universität Wien) isoliert. Die genomische DNA von *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/CX war bereits zu Beginn dieser Arbeit von Mitgliedern der Arbeitsgruppe Henrichfreise isoliert worden und stand für die wissenschaftlichen Experimente im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit zur Verfügung.

4.4.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid DNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe des GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific; Schwerte, Deutschland) isoliert, dabei wurde das Herstellerprotokoll eingehalten. Die Methode beruht auf der Grundlage von Birnboim und Doly (Birnboim H.C. und Doly, 1979). Durch eine alkalische Lyse werden die Bakterien lysiert. Durch den alkalischen pH-Wert denaturieren DNA und RNA. Phospholipide werden durch ein anionisches Detergens denaturiert. Anschließend wird das Lysat neutralisiert und eine hohe Salzkonzentration begünstigt die Bindung der DNA an eine Silikamembran. Nach dem Waschen der DNA wird diese mit 50 µl Elutionspuffer eluiert. Eluierte Plasmid DNA wird bei -20°C gelagert oder sofort weiterverwendet.

4.4.6.3 DNA-Isolierung aus Ektoparasiten

Um molekularbiologische Untersuchungen an der DNA durchzuführen, wurde zuerst die DNA aus den Ektoparasiten isoliert. Die Ektoparasiten die in dieser Arbeit aufgeschlossen wurden, waren Zecken der Gattung *Argas* und Flöhe der Gattung *Xenopsylla*. Die harte, kaum durchdringbare Außenhülle der Ektoparasiten aus Chitin wurde mit Hilfe eines Mikropistills (Biozym Scientific GmbH; Hessisch Oldendorf, Deutschland) in dem jeweils ersten Puffer in einem Reaktionsgefäß gemörsert bzw. aufgeschlossen. Das ist notwendig, da die Pathogene im Darm, in der Hämolymphe, Speicheldrüse und in den Ovarien vorkommen können (Munderloh and Kurtti, 1995).

Das Blood and Tissue Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) wurde nur testweise für Zecken verwendet (Krannich, 2017) ansonsten wurde ausschließlich das GenoType DNA-Isolation Kit von HAIN Lifescience (Nehren, Deutschland) verwendet. Das FluoroLyse Kit von HAIN Lifescience kommt ohne eine Membran aus, da die DNA an magnetische Körner bindet. Nach der Lyse der Ektoparasiten mit einer Inkubation über Nacht bei 55°C wurde die DNA mit Hilfe dem vollautomatisierten DNA Extraktionsroboter GenoXtract (HAIN Lifescience; Nehren, Deutschland) aufgereinigt und isoliert. Der GenoXtract bindet die DNA an magnetische Kügelchen und löst die DNA automatisch in 50 µl Elutionpuffer. Der Vorteil des Roboters ist, dass durch den automatisierten Ablauf Pipettierfehler und die Gefahr von Kontaminationen verringert werden. Alle Kits wurden nach den Herstellerprotokollen angewendet.

4.4.7 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von *S. aureus*

Die minimale Hemmkonzentration von *S. aureus* ATCC 25923 wurde bestimmt um für die Biofilmmexperimente (4.4.1) einen Konzentrationsbereich zu determinieren. In einer 96 Well Platte mit U-förmigen Vertiefungen (Greiner bio-one; Frickenhausen, Deutschland) wurde zuerst eine serielle Verdünnung der zu Testenden Substanzen angefertigt. Als Kontrollen wurden die Mediumkontrolle, Wachstumskontrolle angefertigt. In einem nächsten Schritt wurde die Zellsuspension vorbereitet in dem 2 Kolonien in 5 ml Medium resuspendiert und die Absorption von 600 nm vermessen und auf eine OD₆₀₀ von 0,09 eingestellt. Von der verdünnten Suspension wurden 50 µl in 4,95 ml Medium gegeben und dann auf die vorbereiteten 96 Well Platte gegeben. Nach 24 Stunden bei 37°C wurde die MHK abgelesen und entspricht die niedrigste Substanzkonzentration in der kein Wachstum mehr sichtbar ist (Andrews, 2001).

4.4.1 Biofilm

Um die Wirkung von Substanzen auf einen Biofilm zu testen wurden zwei verschiedene Experimentanordnungen etabliert.

In dem ersten Experiment wurde erst ein Biofilm gebildet und anschließend behandelt. Hierfür wurde eine Vorkultur mit den *S. aureus* Stamm ATCC 25923 angefertigt. Nach

der Inkubation über Nacht wurde eine 1:100 Verdünnung in TSB mit 0,5 % Glukose hergestellt und auf eine 96 Well Platte, mit flachem Boden (Thermo Scientific GmbH; Schwerte, Deutschland), pipettiert. Gegen die Austrocknung der äußeren Wells wurde Wasser in die außen liegende Kavität gegeben. Der Ansatz wurde für 37°C für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Substanzen in einer seriellen Verdünnung, mit frischem Medium, auf dem bestehenden Biofilm pipettiert.

In dem zweiten Experiment wurden die Bakterien direkt mit den Substanzen inkubiert, um eine Inhibierung der Biofilmbildung zu detektieren. Dabei wurde erst die serielle Verdünnung der Substanzen angefertigt. Im folgenden Schritt wurde die Kultur 1:50 verdünnt und auf die Vertiefungen pipettiert.

Für beide Experimente wurde nach der Inkubation für 24 Stunden die Platte mit 1x PBS gewaschen und mit 95 %igen Ethanol fixiert. Im nächsten Schritt wurde die Platte 5 min. mit 1 % Kristallviolett gefärbt und mit Wasser gewaschen. Entfärbt wurde die Platte mit 30 %ige Eisessigsäure und in eine neue 96 Well Platte, mit flachem Boden (Thermo Scientific GmbH; Schwerte, Deutschland), überführt und bei 560 nm die Absorption vermessen (GloMax Explorer, Promega GmbH; Walldorf, Deutschland). Je dicker der Biofilm ist, umso höher ist die Absorption. Die Absorptionswerte wurden in % in Bezug auf 100 % unbehandelten Biofilm angegeben.

4.5 Klonierung

4.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die für die Lebenswissenschaften, der medizinischen Diagnostik und Biowissenschaften wichtige Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde von Kary Mullis entwickelt (Mullis *et al.*, 1986), dabei können DNA-Abschnitte spezifisch amplifiziert werden. Für eine klassische PCR-Reaktion werden zwei, dem zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankierende Primer, freie Desoxynukleotide (dNTPs) und eine DNA-Polymerase benötigt. Die dNTPs sind die Nukleotide Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin.

Die Amplifizierung läuft in 3 Schritten ab:

1. DNA-Denaturierung: Die DNA-Doppelstränge werden bei 95°C separiert.
2. Primerhybridisierung: Die Temperatur wird auf 50-70°C (je nach Länge der Primer) gesenkt. Nun können die Primer an die Zielsequenz binden.
3. Elongation: Die Temperatur wird auf 72°C erhöht. Die DNA-Polymerase fügt die zum Gegenstrang passenden Desoxynukleotide ein. Je länger die Amplifizierungssequenz ist, desto länger dauert diese Phase.

Die Schritte 1-3 werden bis zu 30-mal wiederholt, dabei wird die DNA-Sequenz exponentiell amplifiziert.

In dieser Arbeit wurde die Q5 Polymerase von New England Biolabs (NEB) verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 7 sowie die verwendeten Primer in Tabelle 9 aufgelistet. Die Einstellungsparameter für die PCR Maschine T100 Thermal Cycler (BioRad Laboratories; München, Deutschland) sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die Ansätze wurden auf 25 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

Die Primerhybridisierungstemperatur wurde mit Hilfe folgender Formel

$$T_A = [n*(Adenin, Thymin) \times 2 \text{ }^{\circ}\text{C} + n*(Guanin, Cytosin) \times 4 \text{ }^{\circ}\text{C}] - 4 \text{ }^{\circ}\text{C}]$$

sowie mit dem NEB-Internetprogramm (tmcalculator.neb.com) berechnet. Um die praktisch beste Primerhybridisierungstemperatur zu determinieren, wurde eine sogenannte Gradienten-PCR angewendet, dabei wird für den 2. Schritt der PCR ein ganzer Temperaturbereich getestet und anschließend anhand eines Agarosegel ausgewertet (siehe 4.5.2).

Tabelle 7: Ansatz-Schema für die PCR.

Lösung	Endkonzentrationen
5x Q5 Reaktionspuffer	1x
dNTP-Mix	0,2 mM
Primer 1	0,5 µM
Primer 2	0,5 µM
Template DNA	Genomische DNA: 1 ng-1 µg Plasmid DNA: 1 pg-1 ng
DMSO	0,75 µl in 25 µl Gesamtansatz
Q5 Polymerase	0,02 U/µl

Tabelle 8: PCR-Programm: *Meist Temperaturbereich von 10°C.

Schritt	Dauer	Temperatur in °C
Initiale Denaturieren	30 sec	98
Denaturieren	10 sec	98
Primerhybridisierung	30 sec	*
Elongation	45 sec pro 1 kb	72
Finale Elongation	2 min	72
Lagerung	∞	10

30 Zyklen



Tabelle 9: Verwendete Primer.

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Herkunft
PCR-Primer		
UV7-ampC-A F	AGCCTAGGTTAATTATTAATTTCCAAACTTTTGATAGGCG	Diese Arbeit
UV7-ampC-A R	TTCGAAAAGGGTGCAATGCGTGTTATACCAGAAAAAGATC	Diese Arbeit
UV7-oxa-9 F	AGCCTAGGTTAATTATTATGGCATTATATGAAGAGCAGT	Diese Arbeit
UV7-oxa-9 R	TTCGAAAAGGGTGCAAGATACGATGCAGGAATCTTAAAGG	Diese Arbeit

PCR-Primer		
WCW-amp F	AGCCTAGGTTAATTACTATTCTTTAACCGGTAAAAAGAC	Diese Arbeit
WCW-amp R	TTCGAAAAGGGTGCAGAAAGATCTATTTTTTTGTTATTCTG	Diese Arbeit
SNE-amp F	AGCCTAGGTTAATTATCATGACTTTTCCTGATCAAG	Diese Arbeit
SNE-amp R	TTCGAAAAGGGTGCAAAACTAAACTCTTCTTTTTTTTC	Diese Arbeit
Takara cam F	TTGGTCATGACCTATTGATCGGCACGTAAGAGGTTCC	Diese Arbeit
Takara cam R	ACTTGGTCTGACAGTTTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCG	Diese Arbeit
PCR-Primer		
Takara CAM-Vektor F Δ ampc	ACTGTCAGACCAAGTTTACTCA	Diese Arbeit
Takara CAM-Vektor R Δ ampc	ATAGGTCATGACCAAATCCCTT	Diese Arbeit
Takara Vektor Primer F	TGCACCCTTTTCGAACTGCG	Diese Arbeit
Takara Vektor Primer R	TAATTAACCTAGGCTGCTGCCACC	Diese Arbeit
Real-time PCR-Primer		
Pan16F2	CCGCCAACACTGGGACT	(Lienard <i>et al.</i> , 2011)
Pan16R2	GGAGTTAGCCGGTGCTTCTTTAC	(Lienard <i>et al.</i> , 2011)
S-pan-Chlam (Sonde)	FAMCTACGGGAGGCTGCAGTCGAGA ATC-BHQ-1	(Lienard <i>et al.</i> , 2011)

4.5.1.1 *Real-time* PCR (RT-PCR) zur Detektion von Chlamydien in der isolierten DNA aus dem Zeckenaufschluss

Mit einer *real-time* Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ist es möglich schnell, effizient Erbgutbereiche gezielt nachzuweisen und beruht dabei auf einer klassischen PCR (4.5.1). Der Unterschied zur klassischen PCR ist, dass die Amplifikation der DNA durch ein messbares Fluoreszenzsignal in Echtzeit visuell sichtbar gemacht werden kann. Hierbei wird eine Oligonukleotidsonde (Sonde), welche komplementär zu einer Zielsequenz ist eingesetzt. Die Sonde besitzt ein Fluorophor sowie ein Quencher, die während der Elongation durch die DNA-Polymerase getrennt werden, durch die Trennung wird ein nachweisbares Fluoreszenzsignal emittiert. Bei dieser Methode korreliert die Anzahl der Kopien direkt an die Intensität des Fluoreszenzsignals. Für eine Quantifizierung (*cq value*) wird die Zykluswiederholungen benötigt bei der ein Fluoreszenzsignal über einer festgelegten Schwelle gelangt. Die Zykluswiederholung in der das Fluoreszenzsignal über den Schwellenwert gelangt wird anschließend in Bezug auf bekannte Kopien Anzahl getestete Standard Kontrollen gebracht. Als Negativ Kontrolle wird statt der Probe Wasser hinzugefügt.

Die aus Zecken isolierte DNA (siehe 4.4.6.3), wurde mit dieser Methode auf die Gattung *Chlamydiales* untersucht (Lienard *et al.*, 2011). Hierbei wurde in den Proben die 16S rRNA-DNA der Gattung detektiert. Wie für eine klassische PCR werden Primer verwendet, die in der Tabelle 9 gelistet sind sowie der angewendete Ansatz/ Einstellungen in Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellt sind. Die RT-PCR wurde im CFX Connect Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories; München, Deutschland) durchgeführt und mit der Bio-Rad CFX Manager 3.1 Software ausgewertet.

Tabelle 10: *Chlamydiales* 16S rRNA *real-time* PCR Ansatz.

Lösung	Konzentration	Volumen in µl
Primer pan16F2	100 nM	0.2
Primer pan16R2	100 nM	0.2
Sonde	100 nM	0.2
iTaq Universal Probe Supermix (BioRad Laboratories; München, Deutschland)		10
DNA-Probe		5
Wasser (Ampuwa)		Ad 20

Tabelle 11: *Chlamydiales* 16S rRNA *real-time* PCR-Einstellungen.

Schritt	Dauer	Temperatur in °C
Initiale Denaturieren	3 min	95
Denaturieren	15 sec	95
Primerhybridisierung	15 sec	67
Elongation	15 sec	72
Platte auslesen		



4.5.1.2 Schmelzkurvenanalyse auf Borrelien DNA

Die Borrelien-DNA wurde mit dem FluoroType Borrelia Kit und dem FluoroCycler 12 von HAIN Lifescience (Nehren, Deutschland) verwendet. Das Protokoll des Herstellers wurde eingehalten. Bei der Entwicklung des Herstellers konnte das Kit (FlouroTyp *Borrelia*) *B. afzelii*, *B. anserina*, *B. bavariensis* Serovar 4, *B. bissettii*, *B. burgdorferi sensu stricto* Serovar 1, *B. duttonii*, *B. garinii* Serovar 3, 5, 6, 7 und 8, *B. hermsii*, *B. japonica*, *B. lusitaniae*, *B. miyamotoi*, *B. parkeri*, *B. recurrentis*, *B. spielmanii*, *B. turicatae* und *B. valaisiana* detektieren.

4.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese wurde zum Überprüfen der Konzentration, Größe und der Reinheit von DNA-Fragmenten, PCR-Produkten und Plasmid-DNA

angefertigt. Die Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein 1 %iges Agarose-Gel mit GelRed (Biotium; Ferment, USA) aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer (Tabelle 12) verwendet. Der Ladepuffer dient zur Beschwerung der DNA sowie als visuelle Laufkontrolle durch die bläuliche Färbung. Zur Bestimmung der Größen wurde zusätzlich ein Größenstandard (*GeneRuler 1kb DNA Ladder* von ThermoScientific; Schwerte, Deutschland) aufgetragen. Mit Hilfe der angelegten Spannung von ca. 115 V wurde die DNA entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA ist aufgrund ihres Phosphatdesoxyribose Rückgrates negativ geladen und läuft im Agarose-Gel in Richtung der Anode, so wird die DNA nach ihrer Größe aufgetrennt (Sambrook, 1989). GelRed interkaliert zwischen den Basenbausteine von Nukleinsäuren, sodass die Banden unter UV-Licht sichtbar werden (Mülhardt, 2009). Die Gele wurden unter UV-Licht im ChemiDoc XR+ (BioRad, München) fotografiert und digitalisiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Bilder wurden zur besseren Darstellung invertiert.

Tabelle 12: Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

Puffer	Komponenten	Konzentration	pH-Wert
1x TAE Puffer	Tris/HCl	40 mM	7,6
	Essigsäure	20 mM	
	EDTA	1 mM	

4.5.3 Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Nanophotometers (Implen; München, Deutschland) bestimmt, dabei wird die Absorption bei 260 nm gemessen. Umso mehr UV-Licht absorbiert wird, je höher ist die DNA-Konzentration. Gemessen wird die Absorption der DNA bei 260 und 280 nm. Dabei entspricht ein Absorptionswert von 1 bei einer Messung bei 260 nm einem Gehalt von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Der gebildete Quotient aus A_{260}/A_{280} gibt die Reinheit der präparierten DNA an. Liegt der Quotient aus A_{260}/A_{280} bei 1,8, gilt die DNA als rein. Verwendet wurde die DNA zwischen den Werten von 1,8 bis 2,0. Ein Wert über 2,0 deutet auf eine Verunreinigung mit RNA hin. Liegt der Wert jedoch unter 1,8 weist die Probe eine Verunreinigung mit Proteinen auf. Das Nanophotometer errechnete selbstständig Konzentration (ng/µl) und Reinheit der Probe.

4.5.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Eine Aufreinigung ist notwendig, um aus PCR- und Restriktionsansätzen störende Substanzen wie Salze, Enzyme oder Primer zu entfernen. Auch um DNA aus Agarose Gelen zu entfernen wurde diese Methode angewendet. Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurden mit dem GeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas/Thermo Scientific; Schwerte, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt, eluiert wurde in 30 µl Reinstwasser (Ampuwa; Fresenius Kabi; Bad Homburg, Deutschland).

4.5.5 Klonierung unter Verwendung des In-Fusion Kits

Für die Klonierung in den sowie die Herstellung des pet52bCAM wurde das Kit In-Fusion HD Cloning Plus (Takara; Saint-Germain-en-Laye, Frankreich), nach dem Herstellerprotokoll verwendet. Dabei werden mit Hilfe der PCR jeweils an Vektor und Insert passenden Überhängen amplifiziert und anschließend ligiert. Bei diesem Kit wurde sich an die Herstellerangaben gehalten. Zum Anfertigen der Primer wurde ein vom Hersteller angefertigtes Internetprogramm verwendet. In dem Programm werden der Insertbereich des Vektors und die Insertsequenz angegeben, daraus werden automatisch die benötigten Primer berechnet.

4.5.6 Sequenzierung

Zur Überprüfung einer korrekten Klonierung wurde eine Sanger Sequenzierung bei einem externen Dienstleister durchgeführt (GATC; Konstanz, Deutschland).

4.6 Biochemische Methoden

4.6.1 Überexpression, Überproduktion

4.6.1.1 Protein Überexpression Vortest

Die Überproduktion von Proteinen hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab und ist ebenfalls von dem entsprechenden Protein abhängig. Zum Beispiel sind Produktionsstämme, Produktionstemperatur und der Zeitpunkt der Induzierung der

Überproduktion anpassbar. Zur Überproduktion wurde der Bakterienstamm BL21 verwendet. 10 ml TB-Medium (4.4.3.3.2) mit 34 µg/ml Chloramphenicol wurden 1 %ig (v/v) mit einer Über Nacht Kultur inokuliert, die das Konstrukt enthält. Danach wurden die Kulturen bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde abzentrifugiert und das Pellet bei -20°C für weitere Versuche aufbewahrt oder direkt weiterverwendet. Das Pellet wurde in 10 ml LSL-Puffer (Tabelle 13) resuspendiert und mit 1 mM PMSF (Thermo Scientific; Schwerte, Deutschland), einer Protease-Inhibitor Tablette (Thermo Scientific; Schwerte, Deutschland), 1 U/ml Benzonase (Sigma Aldrich; Steinheim, Deutschland), 1 mg/ml Lysozym (Roth; Karlsruhe, Deutschland) und 2 mg/ml Polymyxin B versehen. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Sonifizierung aufgeschlossen (10 x 30 Sekunde, 60 Sekunden auf Eis kühlen). 3 mal 1 ml von der Sonifizierung wurden bei 2500000 x g, 4°C für 30 Minuten (Sorvall MX120) abzentrifugiert. Für eine SDS-Analyse wurde eine Probe des Überstandes abgenommen. Alle 3 Pellets wurden in 1 ml HSE-Puffer (Tabelle 13) PMSF und Proteaseinhibitor resuspendiert. Anschließend wurde je ein Pellet mit 2 % N-Lauroylsarcosine oder 2 % DDM oder 0.5 % CHAPS behandelt. Die verschiedenen Ansätze wurden über Nacht bei 4°C geschüttelt. Nach einer Zentrifugation bei 2500000 x g, 4°C für 30 Minuten wurde wieder eine Probe des Überstandes für eine SDS-Analyse abgenommen. Abschließend wurde das Pellet mit 1 ml 1 % SDS und 5 % β-Mercaptoethanol (Roth; Karlsruhe, Deutschland) resuspendiert und für 10 min bei 80°C erhitzt. Von allen abgenommenen Proben und ebenfalls dem letzten Schritt wurden je 10 l für die SDS-Page verwendet und anschließend ausgewertet.

Tabelle 13: Puffer für den Protein-Vortest.

Puffer	Komponenten	Konzentration	pH-Wert
2X LSL-buffer	MOPS	50 mM	7.2
	NaCl	200 mM	
	MgCl ₂	4 mM	
2X HSE-buffer	MOPS	50 mM	7.2
	NaCl	2 M	
	MgCl ₂	4 mM	

4.6.1.2 Protein Überproduktion

Die Überexpression im Vektor pET52bCAM wurde in dem *E. coli* Stamm BL21 durchgeführt. Dabei wurden 4 l TB-Medium (Tabelle 6) mit 10 mmol/l MgCl_2 sowie 10 mmol/l MgSO_4 verwendet und 1 %ig aus einer Vorkultur beimpft. Die Inkubation wurde über Nacht bei 37°C durchgeführt, da die Überexpression autoinduziert abläuft (Studier, 2005). Nach der Inkubation wurde die Kultur bei 4500 rpm, 14°C für 15 Minuten (Beckman Coulter GmbH; Krefeld, Deutschland) abzentrifugiert und das Pellet bei -20°C aufbewahrt oder direkt weiter aufgereinigt.

4.6.1.3 Aufbereitung von Proteinen

Für die Proteinaufreinigung wurden verschiedene Puffer getestet, diese werden im Ergebnisteil näher beschreiben. Die verwendeten Puffer sind in der Tabelle 14 aufgelistet. Die im Teil 4.6.1.2 entstandenen Pellets wurden in 50 ml Puffer A, 1 U/ml Benzonase (Sigma Aldrich; Steinheim, Deutschland), 2 mg/ml Polymyxin B, 1mM PMSF (Thermo Scientific; Schwerte, Deutschland) resuspendiert. Nach 50 Minuten Zellaufschluss durch Ultraschall (Branson, Sonifier Cell Disruptor B15) wurde 0,25 % CHAPS Roth (Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben und für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Zellaufschluss bei 45000 rpm, 4°C für 1 Stunde abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Strep-Tactin (IBA GmbH; Göttingen, Deutschland) Säule gegeben. Die Säule wurde mit 1 ml Filtermaterial gefüllt und mit 5 ml Buffer B equilibriert. Nach dem der Durchfluss des Extraktes durchgeflossen ist, wurde die Säule fünfmal mit Puffer C je 2 ml gewaschen und sechsmal mit je 500 µl eluiert (Puffer Elution). Die Eluate wurden in separaten Reaktionsgefäßen gelagert. Anschließend wurden je 10 µl Eluat mit 100 µl Bradfordreagenz (Fermentas; Schwerte, Deutschland) vermischt und für 5 min inkubiert. Die Eluatansätze mit den stärksten Blaufärbungen wurden vereint und dialysiert (Puffer Dialyse). Um Salze zu entfernen, wurde bei 4°C in 1 l Dialyse Puffer dialysiert und nach 1 Stunde wurde der Puffer erneuert. Das Dialysieren dauerte über Nacht. Von allen Aufreinigungsschritten wurde ein Bradford angefertigt, die Zusammensetzung entspricht wie oben genannt, jedoch wird mit BSA eine Kalibrierungsgrade angefertigt und mit Hilfe des GloMax Explorer (Promega GmbH; Walldorf, Deutschland) bei einer Absorption bei 595 nm vermessen.

Zur Lagerung bis zu den Experimenten wurden die Proteine in 50 µl Ansätze aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Tabelle 14: Puffer für die Protein-Aufbereitung.

Puffer	Komponenten	Konzentration	pH-Wert
Puffer A	MOPS	25 mM	7.5
	NaCl	150 mM	
Puffer B	MOPS	25 mM	7.5
	NaCl	1000 mM	
	MgCl ₂	2 mM	
	N-Lauroylsarcosin	2 %	
Puffer C	MOPS	25 mM	7.5
	NaCl	500 mM	
	MgCl ₂	2 mM	
	Glycerol	10 %	
	N-Lauroylsarcosin	0,5 %	
Puffer Elution	MOPS	25 mM	7.5
	NaCl	150 mM	
	MgCl ₂	2 mM	
	Glycerol	10 %	
	Biotin	50 mM	
	N-Lauroylsarcosin	0,5 %	
Puffer Dialyse	MOPS	25 mM	7.5
	NaCl	300 mM	
	MgCl ₂	2 mM	
	Glycerol	10 %	
	N-Lauroylsarcosine	0,5 %	

4.6.2 Analyse von Proteinen

4.6.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde eine SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese durchgeführt. Im Sammelgel (grobporig) werden die Proteine konzentriert und im Trenngel (feinporig) nach ihrem Molekulargewicht

aufgetrennt (LAEMMLI, 1970; Kremer and Bannwarth, 2018). Für die SDS-Page wurden fertige Gele der Firma GenScript (Piscataway, USA) im XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System der Firma Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland) verwendet. Als Marker wurde der Protein Standard *PageRuler* (Thermo Scientific; Schwerte, Deutschland) verwendet. 10 µl der Probe wurde mit 2,5 Pierce 4x SDS-Puffer und 1 µl Dithiotreitol (DTT) versetzt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Dabei werden durch das Kochen nicht kovalente Proteinbindungen aufgelöst und das SDS lagert sich gleichmäßig an die Oberfläche der gestreckten Proteine an und die Proteine werden so negativ geladen (Kremer and Bannwarth, 2018). Für die Elektrophorese wurde ein 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) Puffer verwendet und das Gel einer Spannung von 125 V für die Dauer von 75 min ausgesetzt.

4.6.2.2 PageBlue Färbung

SDS-Gele aus 4.6.2.1 wurden mit einer PageBlue Proteinfärbelösung (ThermoScientific; Schwerte, Deutschland) angefärbt und anschließend so lange mit Wasser entfärbt, bis Proteinbanden im Gel deutlich sichtbar wurden. Das gefärbte Gel wurde zum Schluss mit dem ChemiDoc XR+ (BioRad, München) fotografiert und digitalisiert.

4.6.2.3 Laktamase-Spot-Assay

Bei diesem Versuch wurden zuerst Vorkulturen der zu testenden Konstrukte angefertigt. Es gab Ansätze (vorinkubiert), die nach der Inkubation über Nacht 1 Stunde mit 50 ng/ml Anhydrotetracyclin (AHT) inkubiert wurden. Die Kulturen ohne und mit Vorinkubation wurden anschließend photometrisch (siehe 4.4.4) vermessen und auf eine optische Dichte von 1 verdünnt. In einer 96 Platte wurden die Kulturen seriell verdünnt (1:2), anschließend wurden die Proben mit einem Replikationsplattierer (Sigma; Steinheim, Deutschland) auf die vorbereiteten Platten plattiert. Es wurden LB-Platten mit unterschiedlicher Zusammensetzung angefertigt, dabei wurden die verschiedenen Platten mit und ohne AHT angefertigt. Des Weiteren enthielten die LB-Platten verschiedene Antibiotika in unterschiedlichen Konzentrationen. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht wurden von den Platten

zur Auswertung mit dem ChemiDoc XR+ (BioRad, München) fotografiert und digitalisiert. Sichtbare Kolonien werden als resistent oder unempfindlich angenommen

4.6.2.4 Peptidoglykan/ Chitin-Pulldown-Assay

Mit diesem Experiment wurde die Bindung von Enzymen an Peptidoglykan (PG) bzw. Chitin nachgewiesen. Dafür wurde 1 ml einer PG/Chitin Suspension von 2 mg/ml angefertigt und bei 2500000 x g, 4°C für 30 Minuten (Sovall MX120; Thermo Scientific; Schwerte, Deutschland) abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml Puffer 2 (Tabelle 15) resuspendiert.

Für einen Reaktionsansatz wurden 100 mg Polysaccharid-Suspension verwendet. Die Enzyme wurde in Puffer 1 (Tabelle 15) zu 100 µl einer 6 µM Lösung verdünnt und bei 2500000 x g, 4°C für 30 Minuten abzentrifugiert. 50 µl Überstand der Enzyme sowie 50 µl PG/Chitin wurden zusammengegeben und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde der Ansatz bei 2500000 x g, 4°C für 30 Minuten abzentrifugiert. Die ungebundene Fraktion (Überstand) wurde gesammelt. Das Pellet wurde in einer 200 µl 1:1 Mischung Puffer 1 und Puffer 2 resuspendiert. Nach der Zentrifugation bei 2500000 x g, 4°C für 30 Minuten wurde die Waschfraktion (Überstand) abgenommen. Das Pellet wurde in 20 µl 1x LDS-Ladepuffer und 1 µl β-Mercaptoethanol (Roth; Karlsruhe, Deutschland) resuspendiert. Von dem Überständen wurden jeweils 20 µl abgenommen und mit 1x LDS-Ladepuffer und β-Mercaptoethanol mit einer finalen Endkonzentration von 1 % versetzt. Nach dem Erhitzen bei 100°C für 10 min wurden die Proben auf ein SDS-Gel gegeben (siehe 4.6.2.1). Nach dem Färben mit PageBlue (siehe 4.6.2.2) wurden die Gele visuell ausgewertet, dabei zeigen sich Banden, wenn das Enzym an das PG/Chitin gebunden hat.

Tabelle 15: Puffer für den Peptidoglykan/ Chitin-Binde-Assay.

Puffer	Komponenten	Konzentration	pH-Wert
Puffer 1	MOPS	25 mM	7.5
	NaCl	150 mM	
	MgCl ₂	2 mM	
Puffer 2	MOPS	25 mM	7.5
	NaCl	450 mM	
	MgCl ₂	2 mM	

4.6.2.5 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)

Bei der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie können Proteine in Flusszellen auf eine Oberfläche gebunden werden. Anschließend können Substanzen, aber auch Proteine, über die gebundenen Proteine fließen. Tritt dabei eine Bindung auf, wird diese als Kurve sichtbar. Verwendet wurde das Gerät Biacore T200 mit der X100 Kontroll- und Evaluationssoftware (Cytiva Europe GmbH; Freiburg, Deutschland) und dem Chip HC1500M (Xantec; Düsseldorf, Deutschland). Der Chip besitzt eine Polycarboxylate Oberfläche. Um die Proteine auf die Oberfläche zu binden, wurde wie folgt vorgegangen (entsprechend den Herstellerangaben des Chips):

Das Aufbringen der Proteine auf den Chip erfolgt automatisch. Dabei wird der Chip mehrmals mit dem Elutionspuffer und Reinstwasser gewaschen. Zum Binden der Proteine wurde 10 mM Natriumacetat pH 4,5 und Borat Elutionspuffer (Xantec; Düsseldorf, Deutschland) verwendet. Das Gerät bestimmt dann die zum Aufbringen optimale Proteinmenge. Um die Proteine anschließend irreversibel zu binden wird Ethanolamin auf die Proteine gegeben (Amine Coupling Kit; Cytiva Europe GmbH, Freiburg, Deutschland). Nach dem erfolgreichen Aufbringen der Proteine wurde mit dem SPR-Puffer bis zu einer konstanten Basislinie gewaschen. Die zu testenden Substanzen wurden direkt in einer Platte mit 96 Vertiefungen verdünnt.

Tabelle 16: Puffer für die SPR-Analyse.

Puffer	Komponenten	Konzentration	pH-Wert
SPR-Puffer	MOPS	25 mM	7.5
	NaCl	300 mM	
	Tween20	0,005 %	

4.7 Experimente in der Zellkultur

4.7.1 Hämolysse-Assay

Mit diesem Assay wurden Testsubstanzen auf Erythrozyten gegeben, um eine Hämolysse von Erythrozyten feststellen zu können. Für diesen Versuch wurde eigen Blut, das mit dem Antikoagulant EDTA versetzt wurde, verwendet. Die Erythrozyten wurden mithilfe von dreimaligem Waschen mit 1x PBS pH 7.4 (Tabelle 17) mit anschließender Zentrifugation von 10 min bei 2000x g bei 20°C und dem jeweiligen Verwerfen des Überstandes isoliert. Die aufgereinigten Erythrozyten wurden 10 %ig mit 1x PBS pH 7.4 verdünnt. Anschließend wurde die 10 %ige Erythrozytensuspension 1:2 verdünnt. Die Erythrozyten dürfen nicht auf Eis bzw. unter 0° Celsius gelagert werden, da sie sonst lysieren. Für die Hämolysse-Bestimmung wurde eine Platte mit 96 U-förmigen Vertiefungen verwendet. In jeder Vertiefung wurden 50 µl 1x PBS pH 7,4 hinzugefügt, jedoch nicht in den Kontrollen. Als Kontrollen wurden nur die Testsubstanzen in 1x PBS, DMSO (Substanzkonzentration) in 1x PBS und 1x PBS mit Erythrozyten mit 10 µl 10 % Triton X-100 (100 % Lyse) angefertigt. In den ersten Vertiefungen der Spalten, in denen die Testsubstanzen verdünnt wurden, wurde zusätzlich 50 µl 1x PBS pH 7,4 gegeben. Anschließend wurden die Testsubstanzen dazugegeben und eine serielle Verdünnung hergestellt. In jeder Vertiefung wurde 50 µl von der 1:2 verdünnten Erythrozytensuspension hinzugefügt. Nach der Inkubation wurde die Platte bei 1500x g für 10 Minuten zentrifugiert. 40 µl des Überstands wurden zu 160 µl 1x PBS pH 7,4 in einer neuen Platte mit 96 flachen Vertiefungen hinzugefügt und die Extinktion bei 405 nm gemessen (GloMax Explorer, Promega GmbH; Walldorf, Deutschland). Bei 405 nm wird bei der Lyse freiwerdende Hämoglobin gemessen. Die Absorptionswerte wurden in % in Bezug auf 100 % Lyse angegeben. Negative Werte die in Folge des Versuchsaufbaues zustande kommen, werden nicht gezeigt und werden als 0 % dargestellt.

4.7.2 AlamarBlue Assay

Um zu detektieren, in wieweit Substanzen zytotoxisch sind, wurde ein AlamarBlue Assay (Osaka und Hefty, 2013) angefertigt. Dabei wurde eine TC-Platte mit 96 Vertiefungen (Sarstedt AG und Co; Nümbrecht, Deutschland) mit Hep2-Zellen (~ 1500 Zellen/ Vertiefung) versehen und 48 Stunden inkubiert. Nach den unterschiedlichen Inkubationszeiten mit den zu testenden, seriell verdünnten Substanzen wurden die Vertiefungen mit HBSS zweifach gewaschen. Als Kontrollen wurden zusätzlich die Testsubstanzen in 1x PBS und das Lösungsmittel auf den Erythrozyten vermessen. Im nächsten Schritt wurde in jede Vertiefung 100 µl HBSS und 10 µl AlamarBlue Lösung (Life Technologies GmbH; Darmstadt, Deutschland) pipettiert und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Lebende Zellen besitzen die Fähigkeit die dunkelblaue Lösung Resazurin in eine pinke Lösung Resorufin zu reduzieren, tote Zellen haben diese Möglichkeit nicht aufgrund des fehlenden Stoffwechsels. Die Toxizität wurde über eine Fluoreszenzmessung (Spark 10M; Tecan, Schweiz) in schwarzen Platten mit 96 flachen Vertiefungen (FLUOTRAC; Greiner bio-one in Frickenhausen, Deutschland) bestimmt. Die Exzitation wurde bei 570 nm (Bandenweite 20) erregt und die Emission wurde bei 595 nm (Bandenweite 20) gemessen. Anschließend wurde aus den Rohwerten, die IC₅₀ Wert (Prism 5.01, GraphPad) bestimmt.

4.7.3 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Chlamydien

Um festzustellen, ob Substanzen eine antibiotische Wirkung gegen intrazelluläre Chlamydien besitzen, wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt. Nach dem Passagieren der eukaryotischen Zellen (4.4.2.4) wurden diese mit einer Thoma Kammer unter dem Mikroskop gezählt und anschließend mit ~ 1500 Zellen je Vertiefung in eine sterile 15µ Mikroskopieplatte 96 Well ibiTreat (IBIDI; Planegg / Martinsried, Deutschland) pipettiert und 48 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Hep2 Zellen mit 50 µl Chlamydien-Suspension infiziert (Überstand aus 4.4.3.1). Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde das infektiöse Medium abgenommen und 100 µl frisches Medium in jede Vertiefung gegeben. Im nächsten Schritt wurden die zu testenden Substanzen in einer seriellen

Verdünnung auf die Platte gebracht und für weitere 30 Stunden bei 37°C bei 5 % CO₂ inkubiert. Nach 30 Stunden werden die Zellen für 5 min mit eiskaltem Methanol fixiert und bei -70°C gelagert. Die chlamydialen Lipopolysaccharide wurden mit Fluorescein Konjugat Antikörpern, aus dem Pathfinder *Chlamydia Conformation System*, gefärbt (BioRad; München, Deutschland). In dem Kit enthalten ist auch ein Antikörper, der die eukaryotischen Zellen anfärbt, enthalten. Die Lösung wurde 1:5 mit 1x PBS (Tabelle 17) verdünnt. Je Vertiefung wurde 100 µl der Lösung pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurde für 1 min 3 mg/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) hinzugeben. DAPI färbt gezielt DNA an und somit werden die eukaryotischen Zellkerne angefärbt. Nach 2-maligen Waschen mit 1x PBS für je 10 min wurden die Platten mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie (Axio observer Z.1 Fluoreszenzmikroskop; Carl Zeiss Microscopy GmbH; Göttingen, Deutschland) und der dazugehörigen Zen2-Software (Blaue Edition) ausgewertet. Dabei entspricht die MHK den Wert, in dem weniger als 5 % Chlamydien mikroskopisch nachgewiesen werden können.

Tabelle 17: Puffer der für die chlamydiale MHK-Bestimmung verwendet wurde.

Puffer	Komponenten	Konzentration
1x PBS	KCl	0,2 g/l
	NaCl	8 g/l
	Na ₂ HPO ₄	1,42 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,27 g/l

4.7.4 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von chlamydialer Infektion mit Penicillin G induzierter Persistenz

Bei dieser speziellen Form der MHK wurden die Chlamydien durch die Zugabe von Penicillin G in ihre Resistenzform gebracht, um so die Wirkung der Substanz auf die fast inaktiven Chlamydien zu begutachten. 2 Stunden nach der Infektion werden die Zellen mit 100 U/ml Penicillin G für 2 Stunden behandelt. Das weitere Vorgehen entspricht der MHK Bestimmung die in Abschnitt 4.7.3 beschrieben ist. Die zu testende Substanz wurde 2 Stunden und 12 Stunden nach der Infektion inkubiert.

5 Ergebnisse

5.1 Neue Einblicke in die Rolle von Chlamydien als Krankheitserreger und deren Verbreitung

5.1.1 Chlamydien und andere intrazelluläre bakterielle Erreger in Zecken von westafrikanischen Fledermäusen

Fledertiere und Zecken sind wohlbekannte Vektoren und Reservoir für viele virale und bakterielle Krankheitserreger. Die Rolle von Zecken als Wirtsorganismen und potenzielle Überträger von Chlamydien ist noch weitestgehend unerforscht. Ziel dieser Studie war es, Zecken aus dem westafrikanischen Staat Ghana, die von Fledermäusen gesammelt wurden, auf Chlamydien, Borrelien und Rickettsien zu untersuchen. Weiterhin sollten die Zusammenhänge zwischen dem Vorkommen von Chlamydien und anderen intrazellulären Erregern und deren Verteilung in Zecken näher betrachtet werden. Mit Hilfe von zielgerichteten Sequenzierungen wurden ausgewählte positiv-getestete Proben bis auf das Spezieslevel hin analysiert.

Hierfür wurden 47 Fledermäuse, die im Rahmen einer Studie des Institutes für Tropische Ökologie von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Marco Tschapka der Universität Ulm während einer Expedition in Ghana gefangen und bestimmt wurden, näher untersucht. Die morphologische Bestimmung ergab, dass 46 Fledermäuse der Spezies *Nycteris macrotis* angehörig waren und eine der Spezies *Hipposideros cf. ruber* zugeordnet wurde. Im Anschluss an die Bestimmung der Fledermäuse wurden von diesen Fledermäusen insgesamt 199 Zecken im Nymphenstadium isoliert (Tabelle 29). Inwieweit die Zecken sich „festgebissen“ oder „lose“ auf den Fledermäusen befanden, wurde im Feld nicht differenziert, jedoch wurden beide Varianten gesammelt.

Alle gesammelten Zecken wurden anhand morphologischer und genetischer Merkmale der Spezies *Argas boueti* zugeordnet. Die morphologischen Untersuchungen wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Marco Tschapka an der Universität Ulm durchgeführt und die phylogenetische Zuordnung erfolgte anhand mitochondrialer 16S-rRNA-Gensequenzanalysen und wurde von Dr. Rita de Sousa (Portugiesisches Referenzlabor für Magen-Darm-Infektionen und Zoonosen; National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge) übernommen. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Zecken der Art *Argas boueti* wurden erstbeschrieben in

Ägypten (Hoogstraal, 1955; Roshdy and Hoogstraal, 1974). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte die Verbreitung dieser Zeckenart in den Ländern Ägypten, Südafrika, und Marokko bestätigt werden, wo sie unter anderem auf 14 Fledermausarten, einschließlich *Nycteris thebaica* gefunden wurde (Hoogstraal, 1955; Roshdy and Hoogstraal, 1974; Mans *et al.*, 2019; Sándor *et al.*, 2021). Mit dieser Studie konnte erstmals das Vorkommen von *Argas boueti* in Ghana auf der Fledermausart *Nycteris macrotis* und *Hipposideros cf. ruber* gezeigt werden. Zuerst wurde die DNA aus Zecken extrahiert und anschließend zur Detektion von Chlamydien, Rickettsien und Borrelien verwendet. Zur Isolation der DNA wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem jede einzelne Zecke mit Hilfe eines Mörsers zunächst mechanisch aufgeschlossen und danach biochemisch lysiert wurde. Dieses aufwändige Verfahren war notwendig, um das rigide Exoskelett aufzubrechen und die DNA isolieren zu können. Die anschließende Extraktion der DNA erfolgte vollautomatisiert. Die 51 Zecken der Fledermäuse 1-4 (Tabelle 29) wurden bereits in der Masterarbeit des Kandidaten (Krannich, 2017) aufgeschlossen und vorläufig untersucht. Alle weiteren 148 Zecken wurden in dieser Dissertation auf das Vorhandensein von intrazellulären bakteriellen Erregern hin untersucht. Durch unterschiedliche *real-time*-PCR Analysen und Schmelzkurvenanalysen konnten in den aufbereiteten Proben Chlamydien, Borrelien und Rickettsien detektiert werden.

Bei der Schmelzkurvenanalyse zur Detektion von Borrelien wird zuerst die Zielsequenz mittels klassischer PCR und fluoreszenz-markierter Sonden amplifiziert (HAIN Lifescience; Nehren). Im ungebundenen Zustand wird keine Fluoreszenzemission frei, wohingegen durch die Hybridisierung der Sonde an die Ziel-DNA (erregerspezifische DNA-Sequenz, nicht kommuniziert, da Unternehmen internes Wissen) die Messung der Fluoreszenz möglich wird. Bei der anschließenden Schmelzkurvenanalyse dissoziiert die Doppelstrang-DNA durch Wärme in die beiden Einzelstränge. Dadurch werden die Sonden inaktiv und die Fluoreszenz nimmt ab (HAIN Lifescience; Nehren). Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe der Borrelien-Schmelzkurvenanalyse (4.5.1.2) gezeigt werden, dass 67 von 199 Proben positiv auf *Borrelia* waren (Tabelle 29). Diese Prävalenz von 34 % (Abbildung 6) untermauert die ersten Hinweise aus der Masterarbeit (Krannich, 2017), dass Borrelien in Afrika auch südlich des Breitengrades von 13° Nord zu finden sind (Pappas *et al.*, 2006; Trape *et al.*, 2013). Die Detektion der Chlamydien wurde mit der pan-Chlamydiales *real-time* PCR durchgeführt, die darauf basiert das chlamydiale 16S-RNA-Gen zu amplifizieren

(Lienard *et al.*, 2011). Das Besondere an dieser Methode ist, dass nicht nur *Chlamydia*, sondern die gesamte Ordnung *Chlamydiales* detektiert wird, sodass nicht nur bereits charakterisierte Spezies, sondern auch noch unbekannte *Chlamydia* und *Chlamydia*-ähnliche Spezies nachgewiesen und nach einer weiteren Sequenzierung der amplifizierten DNA charakterisiert werden können (Lienard *et al.*, 2011). Mit Hilfe der pan-*Chlamydiales* *real-time*-PCR (4.5.1.1) wurden in 23 von 199 Proben Vertreter der Ordnung *Chlamydiales* gefunden (Tabelle 29), was einer Prävalenz von 12 % entspricht (Abbildung 6) und erstmalig das Vorkommen von *Chlamydiales* in Zecken von Fledermäusen in Ghana belegt.

Des Weiteren wurden die in dieser Arbeit hergestellten DNA-Extrakte aus ghanaischen Zecken für die Detektion von dem Gen *gltA* aus *Rickettsia* spp. bereitgestellt. Diese Nachweise erfolgten mit Hilfe von *real-time* PCR-Analysen (Sothmann *et al.*, 2017) und wurden am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM) in der Abteilung für Infektionsepidemiologie von Prof. Dr. Jürgen May in der Arbeitsgruppe von Dr. Daniel Eibach, im Rahmen einer Kooperation, durchgeführt (Tabelle 29). Von den 199 analysierten Proben enthielten 178 *Rickettsia*-DNA. Somit wiesen die Rickettsien mit 89 % (Abbildung 6) eine enorm hohe Prävalenz in den getesteten Zecken auf.

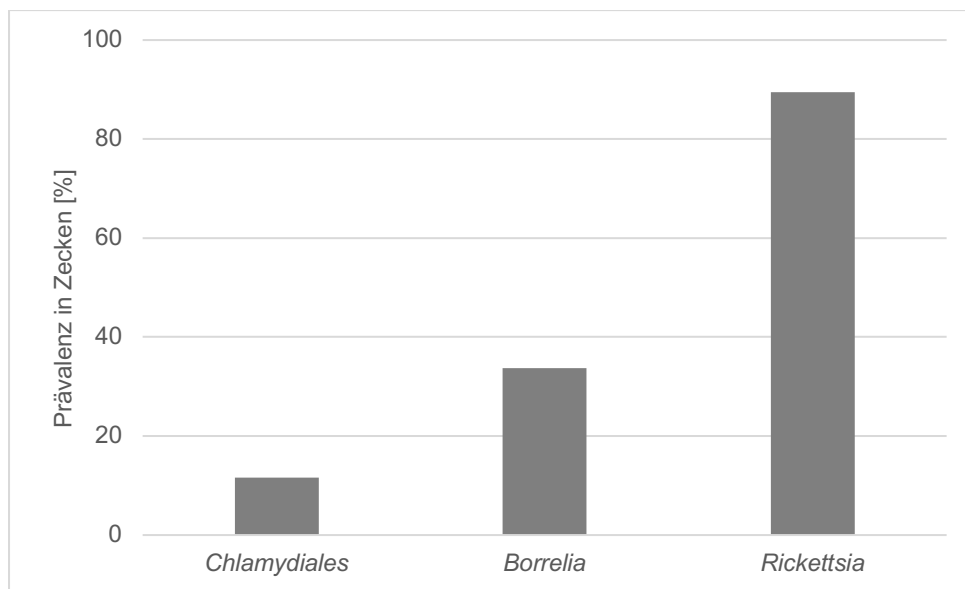


Abbildung 6: Prävalenz intrazellulärer bakterieller Erreger in ghanaischen Zecken. Die Prävalenz von *Chlamydiales* ist mit 12 % am niedrigsten, gefolgt von *Borrelia* mit 34 % und *Rickettsia* mit 89 %.

Im folgenden Schritt wurden Co-Prävalenzen für die detektierten intrazellulären bakteriellen Erreger in den analysierten Zecken von ghanaischen Fledermäusen bestimmt. In 10 % (19 von 199 Zecken) der Zecken wurden keine der drei Erreger nachgewiesen (Abbildung 7, Tabelle 20). Eine Co-Prävalenz von *Chlamydiales*, *Borrelia* und *Rickettsia* wurde in 6 % der analysierten Zecken detektiert (Abbildung 7, Tabelle 18). In jeweils einer Zecke wurde ausschließlich *Chlamydiales*- bzw. *Borrelia*-DNA detektiert (Abbildung 7, Tabelle 19). In 101 von 199 Zecken, entsprechend 51 %, konnten ausschließlich Rickettsien nachgewiesen werden (Abbildung 7, Tabelle 19). Ein ausschließliches Auftreten von *Chlamydiales* und *Borrelia* konnte in keiner Zecke nachgewiesen werden. In 6 % der Zecken traten Rickettsien in Kombination mit *Chlamydiales* und in 28 % in Kombination mit Borrelien auf (Abbildung 7, Tabelle 18).

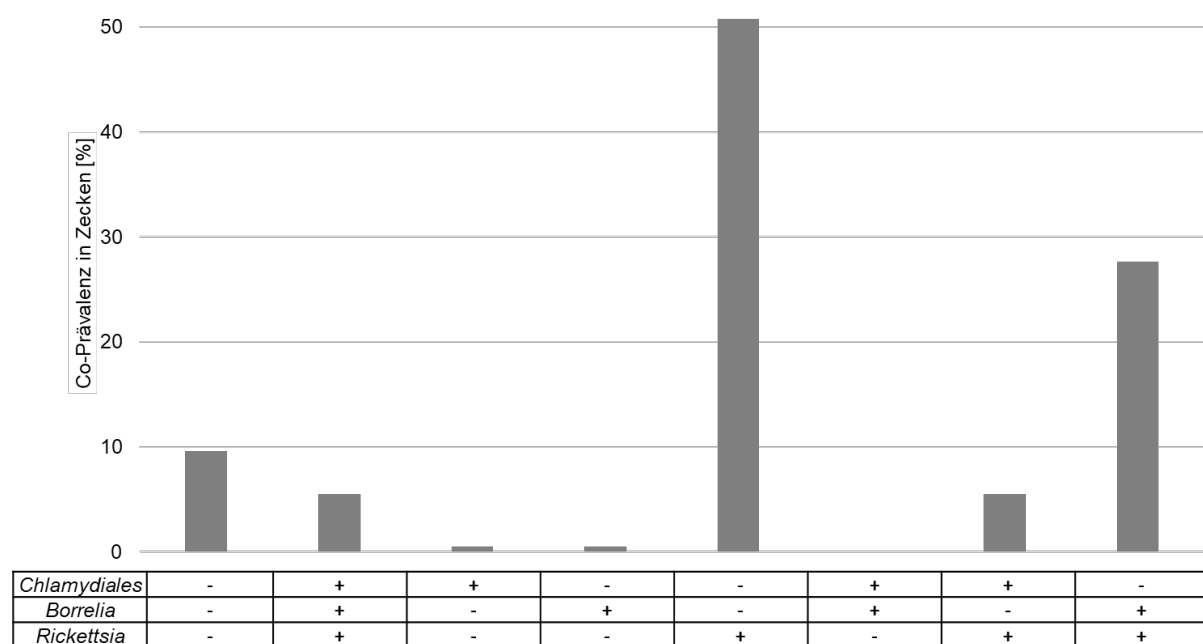


Abbildung 7: Co-Prävalenzen intrazellulärer bakterieller Erreger in Zecken aus Ghana.
+: Erreger detektiert; -: Erreger nicht detektiert.

Tabelle 18: Zecken, in denen Co-Prävalenzen von mindestens zwei der Erregergruppen *Chlamydiales*, *Borrelia* und *Rickettsia* mittels *real-time* PCR nachgewiesen wurden. Alle Fledermäuse, bis auf die Fledermaus Nr. F3 (*Hipposideros cf. ruber*), gehören der Spezies *Nycteris macrotis* an. Die mit # (*Chlamydiales*) oder ° (*Rickettsia*) gekennzeichneten Proben wurden sequenziert. +: positiv getestete Proben; -: negativ getestete Proben.

Fledermaus [Proben- nummer]	positiv befundet gegenüber			
	Zecken	<i>Chlamydiales</i>	<i>Borrelia</i>	<i>Rickettsia</i>
F1	Z13	+	+	+
	Z18	+	+	+°
	Z29	+	+	+°
	Z31	+	+	+
	Z33	+	+	+
	Z01	-	+	+
	Z02	-	+	+
	Z03	-	+	+
	Z04	-	+	+
	Z05	-	+	+
	Z06	-	+	+
	Z08	-	+	+
	Z09	-	+	+
	Z10	-	+	+
	Z12	-	+	+
	Z14	-	+	+
	Z16	-	+	+
	Z17	-	+	+
	Z19	-	+	+
	Z20	-	+	+
	Z21	-	+	+
	Z22	-	+	+
	Z23	-	+	+
	Z24	-	+	+
	Z25	-	+	+
	Z26	-	+	+°
	Z27	-	+	+
	Z28	-	+	+
	Z30	-	+	+
	Z32	-	+	+
F2	Z35	+	+	+°
	Z36	+	+	+
	Z37	+	+	+
	Z34	-	+	+
F3 <i>Hipposideros</i> <i>cf. ruber</i>	Z38	+	-	+
	Z39	+	-	+°
	Z40	+	-	+
	Z41	+	-	+
F4	Z50	+	+	+°
	Z47	+	-	+
	Z51	+	-	+
	Z48	-	+	+
F7	Z58	-	+	+°
F9	Z60	-	+	+
	Z62	-	+	+
F11	Z64	-	+	+°
F13	Z70	-	+	+°
F14	Z72	-	+	+
	Z73	-	+	+°
F15	Z74	-	+	+°
F16	Z75	-	+	+°
F17	Z76	-	+	+°
F18	Z78	-	+	+°
F29	Z120	-	+	+°
F30	Z122	-	+	+
F31	Z124	-	+	+°
F32	Z129	-	+	+
	Z131	-	+	+
	Z133	-	+	+°
F33	Z137	-	+	+°

F36	Z150	-	+	+°
F38	Z168	-	+	+°
	Z169	-	+	+
F39	Z171	-	+	+°
	Z179	-	+	+°
F40	Z180	+#	-	+
	Z181	+#	-	+°
	Z182	+#	-	+
F41	Z184	+#	-	+°
F44	Z190	+	+	+°
	Z192	+	-	+
	Z191	-	+	+
	Z194	-	+	+
	Z196	-	+	+
F45	Z197	-	+	+°
	Z198	-	+	+
F46	Z199	+	+	+°

Tabelle 19: Zecken, in denen ausschließlich *Chlamydiales*, *Borrelia* oder *Rickettsia* detektiert wurden. Alle Fledermäuse, bis auf die Fledermaus Nr. F3 (*Hipposideros cf. ruber*), gehören der Spezies *Nycteris macrotis* an. Die mit # (*Chlamydiales*) oder ° (*Rickettsia*) gekennzeichneten Proben wurden sequenziert. +: positiv getestete Proben; -: negativ getestete Proben.

Fledermaus [Probennummer]	Zecken	positiv befundet gegenüber		
		<i>Chlamydiales</i>	<i>Borrelia</i>	<i>Rickettsia</i>
F1	Z07	-	-	+
	Z11	-	-	+
	Z15	-	-	+
F3*	Z42	-	-	+
F4	Z43	-	-	+
	Z44	-	-	+
	Z45	-	-	+
	Z46	-	-	+
	Z49	-	-	+
F5	Z52	-	-	+
	Z53	-	-	+
	Z54	-	-	+
	Z55	-	-	+°
F6	Z56	-	-	+
	Z57	-	-	+°
F8	Z59	-	-	+°
F9	Z61	-	-	+
F10	Z63	-	-	+°
F12	Z65	-	-	+°
	Z66	-	-	+
	Z67	-	-	+
F13	Z68	-	-	+
	Z69	-	-	+
F14	Z71	-	-	+
F18	Z77	-	-	+
	Z79	-	-	+
	Z80	-	-	+
	Z81	-	-	+
F19	Z88	-	+	-
F22	Z92	-	-	+°
F23	Z93	-	-	+°
F24	Z94	-	-	+
	Z95	-	-	+
	Z96	-	-	+
	Z97	-	-	+°
	Z98	-	-	+
	Z99	-	-	+
	Z100	-	-	+
F25	Z101	-	-	+
	Z102	-	-	+
	Z103	-	-	+
	Z104	-	-	+
	Z105	-	-	+
	Z106	-	-	+°

F27	Z113	-	-	+
	Z114	-	-	+
	Z115	-	-	+°
	Z116	-	-	+
	Z117	-	-	+
F28	Z118	-	-	+°
F29	Z119	-	-	+
	Z121	-	-	+
F30	Z123	-	-	+°
F31	Z125	-	-	+
F32	Z127	-	-	+°
	Z128	-	-	+
	Z130	-	-	+
	Z132	-	-	+
	Z134	-	-	+
	Z135	-	-	+
	Z136	-	-	+
F33	Z138	-	-	+
	Z139	-	-	+
	Z140	-	-	+
F34	Z141	-	-	+°
F35	Z142	-	-	+
	Z143	-	-	+°
F36	Z144	-	-	+
	Z145	-	-	+
	Z147	-	-	+
	Z148	-	-	+
	Z149	-	-	+
F37	Z152	-	-	+°
	Z153	-	-	+
	Z154	-	-	+
	Z155	-	-	+
	Z156	-	-	+
	Z157	-	-	+
	Z159	-	-	+
	Z160	-	-	+
	Z161	-	-	+
	Z162	-	-	+
	Z163	-	-	+
	Z164	-	-	+
	Z165	-	-	+
	Z166	-	-	+
	Z167	-	-	+
F39	Z170	-	-	+
	Z172	-	-	+
	Z173	-	-	+
	Z174	-	-	+
	Z175	-	-	+
	Z176	-	-	+
	Z177	-	-	+
	Z178	-	-	+
F40	Z183	+#	-	-
F42	Z185	-	-	+°
F43	Z186	-	-	+
	Z187	-	-	+
	Z188	-	-	+
	Z189	-	-	+°
F44	Z193	-	-	+
	Z195	-	-	+

Tabelle 20: Zecken, in denen keine *Chlamydiales*, *Borrelia* oder *Rickettsia* detektiert wurden. Die Fledermäuse gehören der Spezies *Nycteris macrotis* an. +: positiv getestete Proben; -: negativ getestete Proben.

Fledermaus [Probennummer]	Zecken	positiv befundet gegenüber		
		<i>Chlamydiales</i>	<i>Borrelia</i>	<i>Rickettsia</i>
F19	Z82	-	-	-
	Z83	-	-	-
	Z84	-	-	-
	Z85	-	-	-
	Z86	-	-	-
	Z87	-	-	-
	Z89	-	-	-
F20	Z90	-	-	-
F21	Z91	-	-	-
F26	Z107	-	-	-
	Z108	-	-	-
	Z109	-	-	-
	Z110	-	-	-
	Z111	-	-	-
	Z112	-	-	-
F31	Z126	-	-	-
F36	Z146	-	-	-
F37	Z151	-	-	-
	Z158	-	-	-

Zusätzlich gelang es unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Gilbert Greub am Institut für Mikrobiologie der Universität Lausanne für fünf Zecken, welche positiv auf *Chlamydiales* getestet wurden, die amplifizierten chlamydialen 16S RNA-Genabschnitte zu sequenzieren (Anhang: Tabelle 29, gekennzeichnet mit #). Vier der sequenzierten Amplifikate stammten von Zecken (Z180-Z183), welche von demselben Fledermausindividuum der Spezies *Nycteris macrotis* (Probennummer F40) isoliert wurden. Ein weiteres sequenziertes Amplifikat stammte von der Zecke Z184, welche von einer Fledermaus derselben Spezies entnommen wurde (*Nycteris macrotis* (Probennummer F41)). In allen 5 Zecken konnte eine neue Familie innerhalb der Ordnung *Chlamydiales* mit 86 %iger Sequenzidentität zu *Neochlamydia hartmannellae* detektiert werden. Für *Neochlamydia hartmannellae* konnte bis dato keine Pathogenität belegt werden (Corsaro and Greub, 2006). Weitere Forschungsarbeiten sind erforderlich, um das pathogene Potenzial dieser Spezies sowie der in dieser Arbeit neu identifizierten Chlamydien zu bestimmen.

Neben der Charakterisierung von chlamydialen Proben wurden auch erste weitergehende Untersuchungen an den detektierten Rickettsien durchgeführt. Insgesamt gelang es, 45 der 178 auf Rickettsien positiv getesteten Proben phylogenetisch zu analysieren. Diese Arbeiten wurden von unserer Kooperationspartnerin Dr. Rita de Sousa im portugiesischen Referenzlabor für Magen-Darm-Infektionen und Zoonosen am National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge

übernommen (Anhang: Tabelle 29, gekennzeichnet mit °). Die 45 Proben stammten von Zecken, welche von 40 verschiedenen Fledermaus-Individuen der Spezies *Nycteris macrotis* isoliert wurden und von einer Zecke, die von der Fledermaus der Spezies *Hipposideros cf. ruber* entnommen wurde. Für die phylogenetischen Analysen wurden die Gene *gltA*, *ompA* und *ompB* sequenziert und jede Sequenz individuell mit der GenBank abgeglichen. Durch diese Analysen konnten im Rahmen dieser Studie zwei neue Kandidaten der Gattung *Rickettsia*, aus zwei verschiedenen Zecken Z26 und Z29 von zwei verschiedenen Fledermaus-Individuen (Fledermaus Nr. F1 und F23), detektiert werden (Abbildung 8). Durch die phylogenetische Nähe von GHTiROr Z26 (GH: Ghana, Ti: Ticks, R: *Rickettsia*, Or: *Ornithodoros*) zu *Rickettsia honei* ist davon auszugehen, dass GHTiROr Z26 ebenso wie *R. honei* in die *spotted fever* Gruppe einzuordnen ist (Parola *et al.*, 2013). Der gefundene Kandidat GHTiROr Z93 steht in enger Verwandtschaft zu *R. lusitaniae*. Für *R. lusitaniae* ist noch recht wenig über die Pathogenität bekannt (Kim *et al.*, 2021).

Bezüglich der Verteilung der Erreger unter den Zecken, die jeweils von einer Fledermaus entnommen wurden, zeigte sich eine hohe Varianz (Tabelle 18 bis Tabelle 20; Anhang: Tabelle 29). So konnte beispielsweise von der Fledermaus Nr. F4 eine Zecke (Z50) isoliert werden, in der alle drei intrazellulären Erreger nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren konnten in dieser Fledermaus 2 Zecken (Z47 und Z51) mit der Kombination der Erreger *Chlamydiales* und *Rickettsia* sowie eine Zecke (Z48) mit *Borrelia* und *Rickettsia* detektiert werden. Weiterhin wurden von der Fledermaus F4 zusätzlich 5 Zecken isoliert, in denen ausschließlich Rickettsien (Z43, Z44, Z45, Z46 und Z49) gefunden wurden. Daraus ergibt sich, dass es wichtig ist, pro Fledermaus immer mehrere Zecken als mögliche Vektoren bzw. Träger zu untersuchen, um möglichst viele der vorkommenden Erreger zu erfassen.

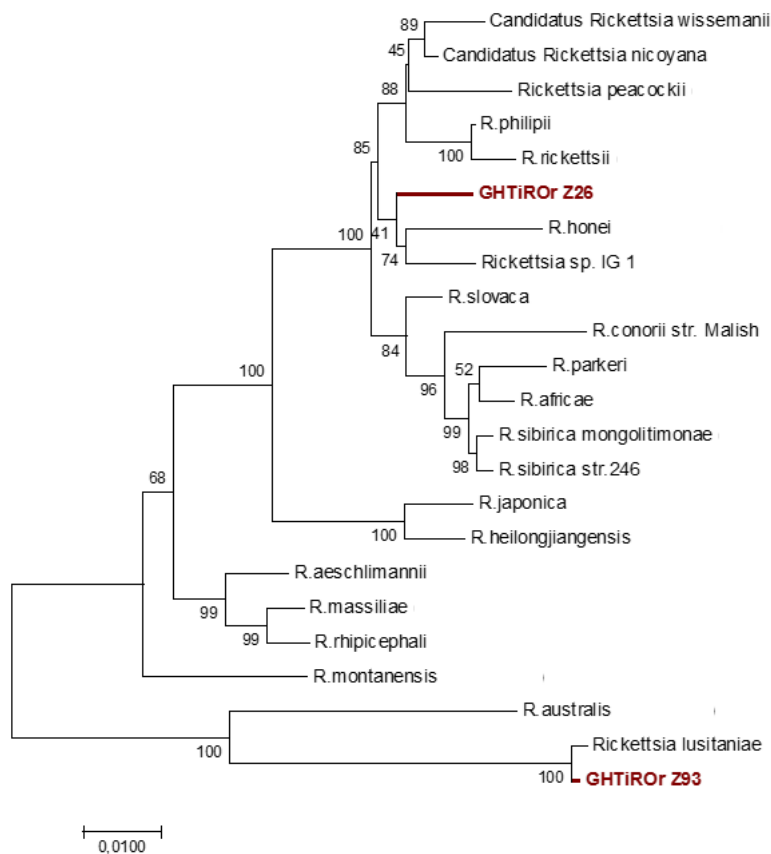


Abbildung 8: CLUSTAL (MEGA7) phylogenetische Maximum Likelihood Analyse der detektierten Rickettsien. Die neuen Kandidaten konnten der Gattung *Rickettsia* zugeordnet werden. Dabei gehört GHTiROr Z26 zur Gruppe *Rickettsia honei* und GHTiROr Z93 zur Gruppe *Rickettsia lusitaniae* (Dr. Rita de Sousa; National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge).

5.1.2 Analysen zur Mutter-Kind-Übertragung von Chlamydien anhand von Stuhl-, Nabelschnurblut- und Plazentaprobe

Infektionen verursacht durch *Chlamydia trachomatis* sind die am häufigsten diagnostizierten, sexuell übertragbaren Infektionen und werden als möglicher Grund für Frühgeburten diskutiert. Zudem gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Infektionen mit *C. trachomatis* und Fehl- sowie Totgeburten (Rours and Hammerschlag, 2013; Reid *et al.*, 2017). Gleiches gilt für *Parachlamydiaceae* und *Waddliaceae*. Anhand von DNA-Auswertungen konnte eine mögliche Beteiligung für Fehlgeburten gezeigt werden (Baud, Regan and Greub, 2008; Rours and

Hammerschlag, 2013; Reid *et al.*, 2017). Jedoch ist die Datenlage über die Prävalenz und Bedeutung von *Chlamydiales*-Infektionen während der Schwangerschaft, beim Geburtsvorgang und im frühen Säuglingsalter unzureichend. Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersuchten Proben bieten hierzu eine einmalige Gelegenheit, um die Datenlage zu erweitern.

Für diese Studie wurden in den beiden westafrikanischen Staaten Elfenbeinküste und Ghana Stuhlproben von Kindern im Alter von 7, 12, 18 und 24 Monaten, sowie zuvor von deren Müttern im dritten Trimester der Schwangerschaft genommen. Die Studie umfasste Stuhlproben der Kinder sowie Stuhl-, Nabelschnurblut- und Gewebeproben von Plazentas der Mütter aus den beiden westafrikanischen Staaten.

Die Stuhlproben von Kindern im Alter von 7, 12, 18 und 24 Monaten sowie von deren Müttern im dritten Trimester der Schwangerschaft wurden bereits von Dr. Melanie Brunke auf das Vorhandensein von *Chlamydiales* untersucht und bei einem positiven Befund teilweise zur weiteren Speziesidentifizierung sequenziert (Brunke, 2018). In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich Nabelschnur- und Plazentagewebeproben analysiert. Dazu wurde die DNA aus insgesamt 31 Nabelschnurblutproben und 20 Plazentagewebeproben durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Anna Maria Eis-Hübinger (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Bonn) isoliert. In 13 Fällen lagen Nabelschnurblut- und Plazentaproben als Datensatz von denselben Patientinnen vor (Tabelle 21). Insgesamt stammen die analysierten Nabelschnurblut- und Plazentagewebeproben von 30 *Chlamydiales* positiv-getesteten Müttern, 4 Müttern aus der Kontrollgruppe mit negativem *Chlamydiales*-Nachweis und 3 Müttern ohne Stuhlprobe (Tabelle 21).

In dieser Arbeit wurden alle DNA-Proben (n=31) mit Hilfe der pan-*Chlamydiales* *real-time* PCR (Lienard *et al.*, 2011) (4.5.1.1) auf *Chlamydiales* getestet. Von den 31 Proben konnten in einer Plazentagewebeprobe sowie in 8 Nabelschnurblutproben Erreger der Ordnung *Chlamydiales* nachgewiesen werden (Tabelle 21). Die Sequenzierung zur Identifikation auf Spezieslevel der positiven Proben steht noch aus.

Mutter (Stuhl)	Plazenta	Nabel- schnurblut	Kind (Stuhl)			
			7 Monate	12 Monate	18 Monate	24 Monate
+	+	-	+	ND	+	ND
+	-	+	+	-	ND	ND
+	ND	+	+	-	ND	ND
+	ND	+	+	-	ND	ND
+	ND	+	+	ND	-	ND
+#	ND	+	+	-	ND	ND
+#	ND	+	+	-	ND	ND
+	-	+	-	+	ND	ND
+	ND	+	ND	ND	ND	+
+	-	-	ND	ND	ND	+
+	-	-	+	ND	ND	ND
+	-	-	-	+	ND	ND
+	-	-	+	+	ND	ND
+	-	-	ND	+	ND	ND
+	-	-	+	-	ND	ND
+	-	-	-	+	ND	ND
+	-	-	-	+	ND	ND
+	-	-	-	+	ND	ND
+	-	-	-	+	ND	ND
++	-	ND	+	-	+	-
++	-	ND	+	+	ND	-
++	-	ND	+	+°	-	-
+	-	ND	-	+	+	-
+	ND	-	-	ND	+	ND
+	ND	-	+	-	ND	ND
+	ND	-	+	ND	ND	ND
+	ND	-	ND	-	+	ND
+	ND	-	+	ND	ND	ND
+#	ND	-	ND	ND	+	ND
+	ND	-	+	+	ND	ND
+	ND	-	+	-	ND	ND
-	ND	-	ND	+	-	ND

-	ND	-	+	ND	+	ND
-	-	-	ND	+	-	ND
-	-	ND	-	ND	ND	ND
ND*	-	ND	-	ND	+	-
ND	ND	-	ND	-	+	ND
ND	-	-	+	-	ND	ND

Des Weiteren konnte in der negativ-getesteten Kontrollgruppe weder in den Nabelschnurblutproben noch in der Plazentagewebeproben chlamydiale Erreger nachgewiesen werden (Tabelle 21). In den Stuhlproben der mit # gekennzeichneten 3 Müttern konnte bereits *Chlamydia pneumoniae* sowie in der mit ° gekennzeichneten Kinderprobe, die 12 Monate nach Geburt beprobt wurde, *Waddlia chondrophila* bestimmt werden (Brunke, 2018) (Tabelle 21). Dr. Melanie Brunke konnte für weitere Kinder und Mütter ohne Plazenta- oder Nabelschnurblutproben (nicht Teil dieser Arbeit) durch Sequenzierung zusätzlich *Rhabdochlamydia*-ähnliche Chlamydien, *Neochlamydia* und *Parachlamydia* detektieren (Brunke, 2018). Diese einzigartige westafrikanische Mutter-Kind-Studie zeigt für 7 Mütter und deren Kinder, dass *Chlamydiales*-DNA parallel im Stuhl, im Nabelschnurblut oder in der Plazenta der Mutter, sowie zusätzlich in den Stuhlproben der Kinder bei der ersten Beprobung nach der Geburt vorliegt (Tabelle 21; gelb, blau). Es wurde bereits gezeigt, dass *Chlamydia trachomatis* in der Plazenta und im Nabelschnurblut vorliegen kann (Gencay *et al.*, 1997; Hou, Chen and Lee, 2006), jedoch gibt es bis jetzt nur wenige Indizien dafür, dass *Chlamydia* und *Chlamydia*-like Organismen bereits während der Schwangerschaft und nicht erst während des Geburtsvorganges übertragen werden könnten und somit für Fehl- und Totgeburten verantwortlich sein könnten (Baud, Regan and Greub, 2008; Rours and Hammerschlag, 2013). Bisher wurden bei den *Chlamydia*-ähnliche Organismen nur für *Parachlamydiaceae* und *Waddliaceae* mit Komplikationen verlaufende Schwangerschaftsverläufe beschrieben (Baud, Regan and Greub, 2008).

Die Daten dieser Studie liefern Indizien dafür, dass bei einzelnen Mutter-Kind-Paaren möglicherweise Übertragungsereignisse *in utero* stattgefunden haben. Für *Treponema pallidum*, dem Erreger der Syphilis, ist eine diaplazentare Übertragung in der Schwangerschaft sowie das Vorkommen in der Plazenta und im Nabelschnurblut bereits bekannt (Köhler *et al.*, 2001; Kayser *et al.*, 2010; Peeling *et al.*, 2017). Damit ist eine Übertragung prinzipiell auch für Vertreter der Ordnung *Chlamydiales* über die

Plazenta und Nabelschnur möglich, auch wenn diese zur Familie der *Chlamydiaceae* und nicht wie *Treponema pallidum* zur Familie der *Spirochaetaceae* gehören. Die Kinder in dieser Studie, welche bei der ersten Beprobung nach der Geburt positiv getestet wurden, könnten sich aber auch, wie gängiger Weise für Chlamydien beschrieben, während des Geburtsvorgangs mit Chlamydien angesteckt haben (McGregor and French, 1991; Silveira *et al.*, 2009). Nur wenige *Chlamydiales*-positive Mütter mit positiv-befundeten Kindern wurden ebenfalls bei den Plazenta- oder Nabelschnurblutproben positiv getestet. Es könnte sein, dass sich die Kinder des Weiteren durch den Kontakt mit dem Intestinaltrakt (Schmierkontamination) der *Chlamydiales*-positiven Müttern, infizierten. Außerdem wird in dieser Arbeit durch die positive Beprobung von Stuhlproben die Hypothese unterstützt, dass der menschliche Intestinaltrakt ein Chlamydien-Reservoir ist (Rank and Yeruva, 2014). Aufgrund des Studiendesigns standen nur geringe Mengen von Stuhl, Nabelschnurblut sowie Plazentagewebe zur Verfügung. Die daraus resultierenden Einschränkungen bei der Durchführung von Experimenten lässt ein fehlerhaftes Detektieren mit falsch-negativen Ergebnissen durch zu wenige Kopien der chlamydialen 16S RNA-Gene nicht ausschließen. Durch Sequenzierungen sollte weiterhin geprüft werden, ob eine Bestimmung auf Speziesebene möglich ist, um so mögliche Verknüpfungen zu den bereits erhaltenden Ergebnissen von Mutter-Kind-Paaren zu schließen bzw. weiter zu validieren.

5.1.3 Studie zu zoonotischen Krankheitserregern auf Madagaskar

Anlass dieser Studie war die Analyse der relevanten Faktoren für die regelmäßigen Pestausbrüche in Madagaskar, sowie das Erstellen eines umfassenden Gesamtbildes bakterieller und viraler Erreger inklusive deren Vektoren auf diesem Inselstaat vor der Südostküste Afrikas. An dieser interdisziplinären Studie waren unter anderem die Universitäten Bonn, Brunn, Hamburg und Münster beteiligt, sowie auch das Institut für Virologie der Charité Universitätsmedizin Berlin und das Hamburger Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM). Die Durchführung der Studie erfolgte im November 2018 in Madagaskar.

Im Zuge der Studie wurden insgesamt 116 Mäuse (*Mus*) und Ratten (*Rattus*) gefangen und bestimmt. Nach dem Fangen mittels Lebendfallen wurden Alter und Geschlecht der Tiere bestimmt. Weiterhin wurde die umgrenzende Geographie (Tal, Berg, Fluss)

und auch der Fangort näher beschrieben (bei Gebäuden das Geschoss und die Raumnutzung, bei Freifängen die Landschaftsnutzung). Zu allen Fangorten wurden die GPS-Koordinaten ermittelt und diese für weitere Analysen archiviert.

Es wurden von den Tieren Blut- und Gewebeproben (auch Föten und organische Veränderungen wie Leberzysten) entnommen. Außerdem wurden die Ektoparasiten aller gefangenen Tiere durch Auskämmen gesammelt – im Durchschnitt ein Parasit pro Tier. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA (Abschnitt 4.4.6.3) der Ektoparasiten präpariert. Die DNA der Parasiten wurde anschließend mit Hilfe der Tiefensequenzierung, bei der jedes DNA-Fragment sequenziert wird, von Dr. Thorsten Thye am Hamburger Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM) analysiert. Die in dieser Arbeit präparierte DNA wies meist nur sehr geringe Konzentrationen auf die häufig unterhalb der photometrischen Nachweisgrenze lag, sodass nicht auszuschließen ist, dass Erreger mit niedriger Ausgangsmenge in den Proben möglicherweise nicht detektiert wurden. Bei den Parasiten, welche von den gefangenen Mäusen und Ratten abgesammelt wurden, handelte es sich um *Xenopsylla cheopis* (Rattenfloh). Weiterhin wurde in einer Probe *Pieris rapae* (Kleiner Kohlweißling) nachgewiesen, bei welchem es sich um eine Umweltkontamination handelte. Bislang wurden durch Tiefensequenzierung der aus den Parasiten extrahierten DNA-Proben folgende Erreger gefunden: 2 Proben wurden positiv auf *Rickettsia*, eine Probe positiv auf *Streptococcus* sowie eine weitere Probe positiv auf *Yersinia pestis* getestet. Für die Ordnung *Chlamydiales* wurde explizit nach *Waddlia chondrophila*, *Parachlamydia acanthamoebae*, *Neochlamydia hartmannellae*, *Protochlamydia amoebophila*, *Simkania negevensis*, *Chlamydia abortus*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia pneumoniae* gesucht. Dabei konnte in einer Probe ein Sequenzabschnitt von *Parachlamydia acanthamoebae* detektiert werden. In dieser Arbeit konnte somit bestätigt werden, dass *Parachlamydia acanthamoebae* im Rattenfloh vorkommen kann, wie auch *Protochlamydia* und *Metachlamydia* aus der Familie der *Parachlamydiaceae* bereits detektiert wurden (Croxatto et al., 2014). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass der Floh ein potentieller Träger von *Chlamydiales* ist und diese auch über Stich- und Saugkontakte übertragen könnte. Hinsichtlich viraler Erreger konnte der Kooperationspartner Prof. Dr. Felix Drexler von dem Institut für Virologie der Charité Berlin in 3 Gewebeproben aus Ratten eine hämorrhagische Variante des Hantavirus (Variante Thailandvirus) sowie in einer weiteren Ratte Hepatitis-E-Virus

detektieren. Durch diese Pilotstudie konnte gezeigt werden, wie wichtig holistische Feldstudien für die Erforschung von Zoonosen sind.

5.2 Analysen zu neuartigen antibiotischen Substanzen

5.2.1 Zytotoxizität gegenüber eukaryotischen Zellen

Eine elementare Anforderung an antimikrobielle Substanzen ist, dass sie eine selektive Aktivität gegenüber dem Krankheitserreger aufweisen und nicht toxisch wirken, d.h. den zu therapierenden Patienten nicht schädigen. Eine Methode, die bereits am Anfang der Entwicklung neuer Substanzen einen ersten wichtigen Einblick zur Zytotoxizität vermittelt, ist der AlamarBlue-Assay. Dieser Resazurin-basierte kolorimetrische Assay funktioniert über eine Reduktion von Resazurin (blau) zu Resorufin (pink) durch das in lebenden Zellen vorhandene Coenzym NADH. Die Zellviabilität kann mit Hilfe des AlamarBlue-Assays zeitsparend und quantitativ bestimmt werden. Morphologische Veränderungen werden durch diese Methode allerdings nicht erfasst, können aber zusätzlich mittels Fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen analysiert werden.

5.2.1.1 Vergleichende Analysen zur Zytotoxizität der neuartigen synthetischen Zellhüll-Biosynthese inhibierenden Antibiotika DCAP und THCz

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die synthetischen Substanzen DCAP (2-((3-(3, 6-dichloro-9H-carbazol-9-yl)-2-hydroxypropyl) amino)-2-(hydroxymethyl) propane-1, 3-diol) und THCz (Tetrahydrocarbazol) sowie verschiedene Derivate mit Hilfe des AlamarBlue-Assays hinsichtlich möglicher zytotoxischer Effekte evaluiert.

DCAP (Abbildung 9) wurde als synthetisches Antibiotikum beschrieben, dessen antimikrobielle Wirkung bislang ausschließlich einer Membrandepolarisierung und einer erhöhten Membranpermeabilität bei grampositiven und gramnegativen Bakterien zugeschrieben wurde (Eun *et al.*, 2012; Hurley *et al.*, 2015). Am Institut für Pharmazeutische Mikrobiologie konnte gezeigt werden, dass DCAP zusätzlich mit Undecaprenyl-Pyrophosphat-gekoppelten Zellhüllvorläufer interagiert und somit die Peptidoglykansynthese- und Zellteilungsmaschinerie beeinträchtigt (Ludwig *et al.*, 2024).

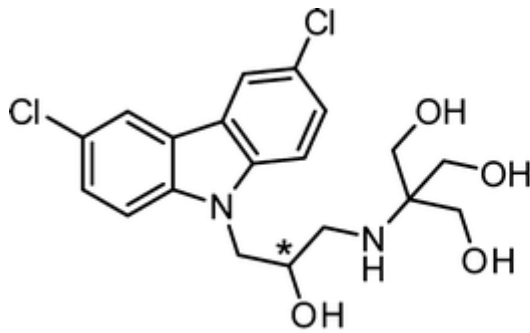


Abbildung 9: Strukturformel von DCAP (2-((3-(3, 6-dichloro-9H-carbazol-9-yl)-2-hydroxypropyl) amino)-2-(hydroxymethyl) propane-1, 3-diol) (Eun *et al.*, 2012). * Stereozentrum.

Zur Untersuchung der zytotoxischen Aktivität von DCAP mittels des AlamarBlue-Assays wurden verschiedenen Inkubationszeiträume (2, 4, 6, 17 und 30 Stunden), verschiedene eukaryotische Zelllinien (Hep2 und McCoy) und verschiedene Zellmedien (RPMI und DMEM) verwendet. Um den toxischen Effekt einer Substanz gegenüber eukaryotischen Zellen zu ermitteln, wurde die Viabilität von unbehandelten Kontrollzellen als Referenzpunkt auf 100 % gesetzt. Werte über 100 % können durch biologische Varianz bzw. durch eine theoretisch mögliche wachstumsanregende Wirkung der Testsubstanz zustande kommen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Zytotoxizitätsanalysen mit DCAP zeigten erwartungsgemäß, dass der zytotoxische Effekt sowohl von der Inkubationszeit als auch der Konzentration der Substanz abhängig ist. Das therapeutische Fenster einer neuen antibiotischen Substanz beschreibt den Bereich zwischen der minimal wirksamen Konzentration (MHK) und der toxischen Konzentration beim Menschen oder eukaryotische Zelle. Es ist entscheidend für die Sicherheit und Wirksamkeit eines Medikaments. Für die weitere Entwicklung einer Substanz sollte das therapeutische Fenster mindestens das 20- bis 100-Fache der MHK haben. Bei Verwendung der Zelllinie Hep2 in dem Medium DMEM konnte bei DCAP-Konzentrationen von 1 µg/ml bis 4 µg/ml für alle Inkubationszeiten kein zytotoxischer Effekt detektiert werden (Abbildung 10 A). Bei einer Inkubationszeit für 2 Stunden ist bis zu einer Konzentration von 16 µg/ml keine Abnahme der Reduktion von Resazurin zu Resofurin zu erkennen (100 %ige relative Viabilität). Eine deutliche Abnahme der Zellviabilität auf 19 % ist nach einer 30-stündigen Inkubation von 8 µg/ml DCAP auf Hep2-Zellen erkennbar. Unter diesen Bedingungen konnte der zytotoxische Effekt von DCAP sowohl durch das verminderte Reduktionpotential als auch durch Rupturen des Zytoplasmas festgestellt werden (Abbildung 10 und Abbildung 11, weiße Pfeile). Im Vergleich dazu die MHK für *S. aureus* FRI 100 mit DCAP bei 20,66 µg/ml

(Eun et al., 2012). Die letzteren mikroskopischen Ergebnisse zur morphologischen Schädigung der eukaryotischen Zellen wurden unter Chlamydien-Infektion gewonnen und sollten erneut ohne eine chlamydiale Infektion verifiziert werden.

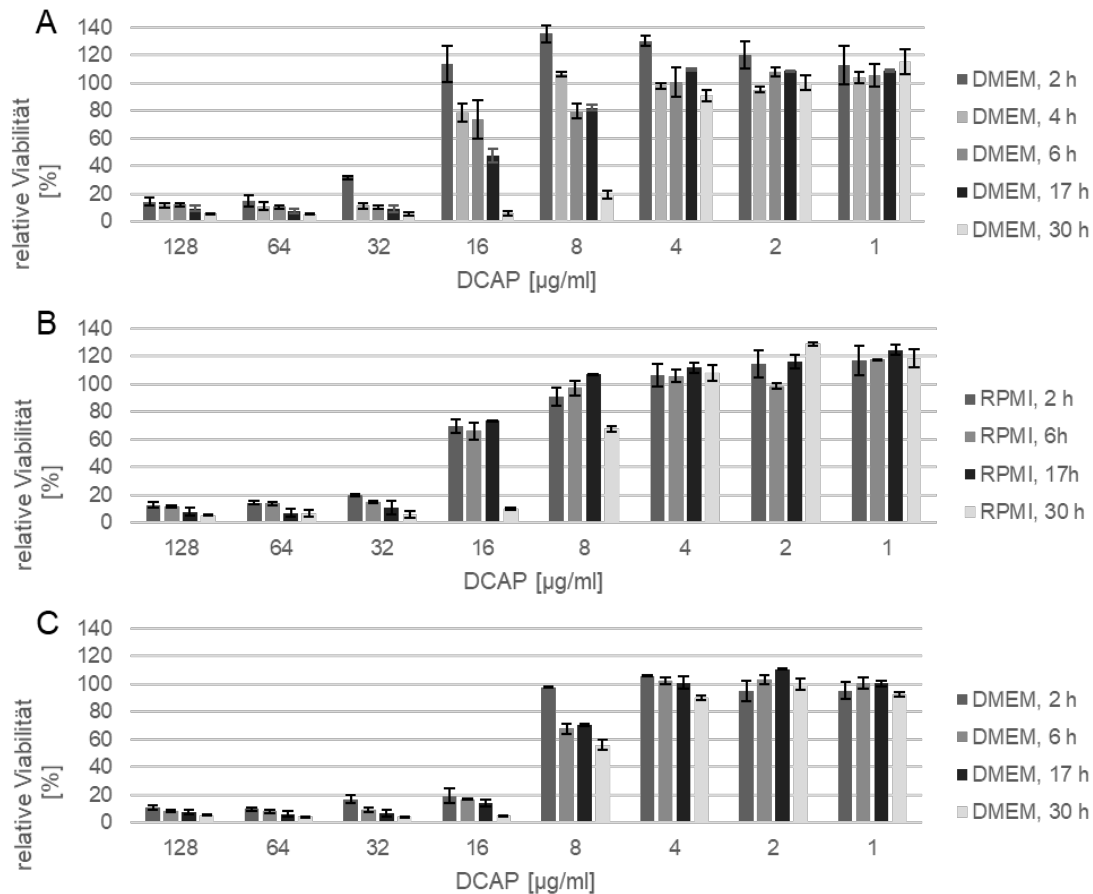


Abbildung 10: AlamarBlue-Assay zur Bestimmung der Zytotoxizität von DCAP gegenüber den eukaryotischen Zelllinien Hep2 und McCoy. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen von DCAP in DMEM- oder RPMI-Medium für 2, 4, 6, 17 sowie 30 Stunden. Für *S. aureus* FRI 100 liegt die MHK bei Behandlung mit DCAP bei 20,66 µg/ml (Eun et al., 2012). Viabilitätsassay mit der Substanz DCAP auf Hep2-Zellen in DMEM- (A) und RPMI-Medium (B) sowie für McCoy-Zellen in DMEM-Medium (C).

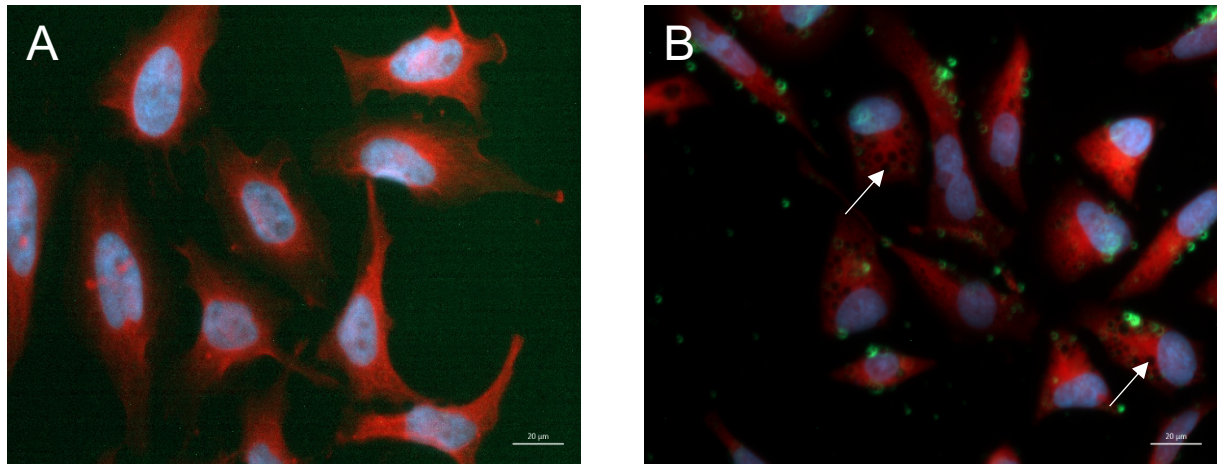


Abbildung 11: Effekt von DCAP auf die Zellmorphologie. Mikroskopische Aufnahme von unbehandelten Hep2-Zellen (**A**) und DCAP-behandelten, sowie mit *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/CX infizierten Hep2-Zellen 30 Stunden nach Infektion. Deutlich zu erkennen ist, dass die eukaryotischen Zellen, welche mit 8 µg/ml DCAP (**B**) behandelt wurden, Rupturen (weiße Pfeile) im Zytoplasma aufweisen. Übereinstimmend zeigte der Zytotoxizitätsassay 30 Stunden nach Infektion (Abbildung 10 A, 30 Stunden) eine relative Viabilität der Zellen von 19 %. h.p.i.: Stunden nach Infektion. DAPI: Zellkern (blau), Evans blue: Zytoplasma (rot), Fluorescein: LPS von Chlamydien (grün).

Um die gewonnenen Daten auf einer breiteren Basis zu analysieren und mögliche Effekte verschiedener Zelllinien und Medien auf die gewonnenen Ergebnisse zur Zytotoxizität zu erkennen, wurden ein weiteres Kulturmedium (RPMI) und neben der human Krebszelllinie Hep2 eine Fibroblasten-Zelllinie aus Mäusen (McCoy) vergleichend getestet. Dazu wurde im nächsten Schritt die relative Viabilität von Hep2-Zellen, die in RPMI angezogen wurden, bestimmt (Abbildung 10 B). Bei einer Konzentration von bis zu 4 µg/ml DCAP war für alle Inkubationszeiten kein zytotoxischer Effekt im AlamarBlue-Assay detektierbar (Abbildung 10 B). Für die Inkubationszeiten von 2, 6 sowie 17 Stunden wurde eine Viabilität von über 90 % bis zu einer Konzentration von 8 µg/ml gezeigt (Abbildung 10 B). Weiterhin wurde der Effekt auf die McCoy Maus-Fibroblasten in DMEM-Medium untersucht (Abbildung 10 C). Eine relative Viabilität von ca. 100 % konnte bei allen Inkubationszeiten von 1 µg/ml bis 4 µg/ml festgestellt werden. Ab einer Konzentration von 8 µg/ml ist bei 2 Stunden Inkubation eine Abnahme der Viabilität sichtbar (Abbildung 10 C). Mit Hilfe der gewonnen AlamarBlue Assay-Daten wurden zusätzlich IC₅₀-Werte bestimmt. Der IC₅₀-Wert gibt an, bei welcher Substanzkonzentration noch 50 % der getesteten Zellen lebendig sind. Die für DCAP berechneten IC₅₀ Werte bestätigen wie erwartet die oben beschriebenen Daten und variieren entsprechend je nach verwendetem Medium, Zelllinie und

Inkubationszeit (Tabelle 22). Höhere Konzentrationen und längere Inkubationszeiten ergaben auch hier eine höhere Zytotoxizität. DCAP zeigte gegenüber McCoy Maus-Fibroblasten eine höhere Zytotoxizität als gegenüber humanen Hep2 Krebszellen in DMEM-Medium. Eine 30-stündige Inkubation von DCAP auf McCoy-Zellen ist weniger zytotoxisch als auf Hep2 in DMEM-Medium. Weiterhin wirkt DCAP unterschiedlich auf gleiche Zelllinien in unterschiedlichen Medien.

So konnte gegenüber der humanen Hep2 Krebszelllinie in RPMI-Medium im Vergleich zu DMEM-Medium ein 10x niedrigerer IC_{50} Wert für DCAP nach 30-stündiger Inkubation bestimmt werden.

Tabelle 22: Anhand der AlamarBlue-Zytotoxizitätsassays ermittelte IC_{50} Werte für die Substanz DCAP. ND: nicht durchgeführt

DCAP	IC_{50} [μ g/ml (Mittelwert) $\pm$ Standardabweichung]				
Zelltyp, Medium	2 Stunden	4 Stunden	6 Stunden	17 Stunden	30 Stunden
Hep2, RPMI	24,44 $\pm$ 1,26	ND	20,79 $\pm$ 1,26	21,76 $\pm$ 1,39	10,62 $\pm$ 1,39
Hep2, DMEM	40,97 $\pm$ 1,51	21,21 $\pm$ 1,28	20,69 $\pm$ 1,23	15,65 $\pm$ 1,27	1,03 $\pm$ 1,22
McCoy, DMEM	13,17 $\pm$ 1,28	ND	11,34 $\pm$ 1,23	10,09 $\pm$ 1,27	8,22 $\pm$ 1,22

Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon (CCCP) ist eine schwache hydrophobe Säure, die als Ionophor agiert und das Membranpotential zerstört (Orlov *et al.*, 1994; Eun *et al.*, 2012). Da auch DCAP eine Aktivität gegenüber Membranen zugeschrieben wird, wurde CCCP für vergleichende Analysen bei den Experimenten mitgeführt (Abbildung 12).

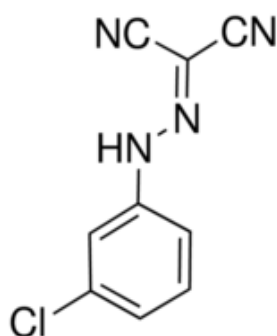


Abbildung 12: Strukturformel von CCCP (Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon).

Die Versuche wurden, genauso wie zuvor für DCAP beschrieben, in unterschiedlichen Kulturmedien (DMEM und RPMI), für unterschiedliche Inkubationszeiträume

(2, 4, 6, 17 und 30 Stunden) und in verschiedenen eukaryotischen Zelllinien durchgeführt. Bei kürzeren Inkubationszeiten von 2 und 4 Stunden in dem Medium DMEM, ist eine hohe relative Viabilität von über 77 % bis hin zu einer CCCP-Konzentration von 64 µg/ml zu erkennen (Abbildung 13 A). Nach einer 6- sowie 17- stündigen Inkubation ist eine hohe Viabilität von über 80 % bis hin zu 16 µg/ml CCCP festzustellen, wo hingegen bei einer 30- stündigen Inkubation nur bis hin zur Konzentration von 8 µg/ml keine ausgeprägten zytotoxischen Effekte (Viabilität ≥ 80 %) erkennbar sind (Abbildung 13 A). Die Wirksamkeit (MHK) gegenüber *S. aureus* FRI 100 liegt mit CCCP bei 0,26 µg/ml (Eun et al., 2012).

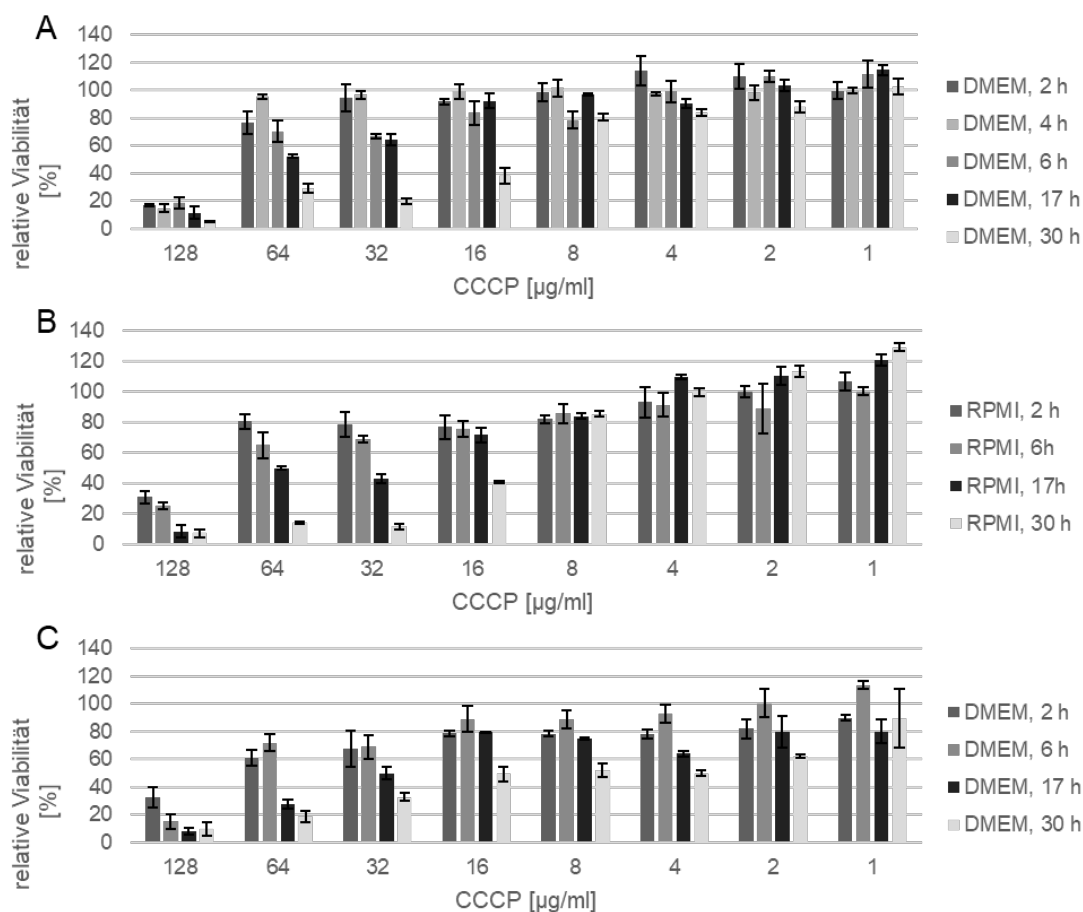


Abbildung 13: AlamarBlue-Assay zur Untersuchung der Zytotoxizität von CCCP gegenüber Hep2 und McCoy- Zellen, die in DMEM- oder RPMI-Medium für 2, 4, 6 sowie 17 Stunden inkubiert wurden. Für *S. aureus* FRI 100 liegt die MHK bei Behandlung mit CCCP bei 0,26 µg/ml (Eun et al., 2012). Viabilitätsassay mit der Substanz CCCP auf Hep2-Zellen in DMEM- (A) und RPMI-Medium (B) sowie für McCoy-Zellen in DMEM-Medium (C).

Analysen mit Hep2-Zellen in RPMI-Medium ergaben nach 2-stündiger Inkubation ab einer Konzentration von 128 µg/ml ausgeprägte zytotoxische Effekte (Abbildung 13 B). Bei einer 6- und 17-stündigen Inkubationsdauer war eine deutliche Abnahme des Reduktionspotentials und somit eine Abnahme der Viabilität ab einer Konzentration von 32 µg/ml zu erkennen (Abbildung 13 B). Bei einer 30-stündigen Inkubation war ein deutlicher zytotoxischer Effekt, gekennzeichnet durch eine Abnahme der Viabilität auf 41 % bereits ab einer Konzentration von 16 µg/ml erkennbar (Abbildung 13 B).

Bei Testung von CCCP gegenüber McCoy Maus-Fibroblasten in DMEM-Medium konnte nach einer Inkubationsdauer von 2, 6 sowie 17 Stunden ab einer Konzentration von 32 µg/ml eine erste zytotoxische Aktivität mit Viabilitätswerten von 50 % bis 69 % festgestellt werden (Abbildung 13 C). Hingegen ist für eine Inkubationszeit von 30 Stunden bereits ab einer Konzentration von 2 µg/ml eine ausgeprägte Reduktion der Viabilität auf 62 % zu erkennen (Abbildung 13 C).

Zusammenfassend zeigen die Experimente zur Zellviabilität unter DCAP- und CCCP-Behandlung, dass bei kürzeren Inkubationszeiten (2, 4 und 6 Stunden) CCCP die Viabilität der Zelllinien weniger beeinträchtigt als DCAP, wohingegen bei längeren Inkubationszeiten CCCP zu einer größeren Beeinträchtigung der Viabilität führt (Ludwig *et al.*, 2024).

Betrachtet man die zytotoxischen Assays, ist bei einer Inkubationsdauer von 2, 4 und 6 Stunden CCCP weniger zytotoxisch als DCAP und bei längeren Inkubationszeiten von 17 und 30 Stunden CCCP zytotoxischer als DCAP. Außerdem zeigt CCCP eine höhere Zytotoxizität gegenüber McCoy-Zellen als bei Hep2-Zellen. Zudem ist CCCP zytotoxischer als DCAP gegenüber McCoy Zellen. Die Ergebnisse zeigen, wie wichtig die individuelle Testung und Beurteilung jeder Substanz mit unterschiedlichen Assay-Parametern ist. Die durchgeführten Experimente können jedoch nur einen kleinen Hinweis auf die Zytotoxizität geben, denn andere Zelllinien, Medien oder experimentellen Systeme zur Bestimmung der Zytotoxizität könnten zu abweichenden Ergebnissen führen. Wie bereits bei den Ergebnissen zu DCAP konnte bestätigt werden, dass durch unterschiedliche Zelllinien und verschiedene Medien die Ergebnisse variieren (Tabelle 23). Natürlich kann sich darüber hinaus die Wirkung in einem komplexeren *in vivo*-Modell (bspw. Maus- oder Humanmodell) im Vergleich zu den eukaryotischen Zelllinien anders ausprägen, da diverse Aspekte, die zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik einer Substanz beitragen, inklusive

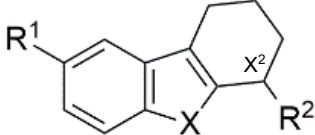
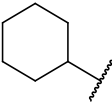
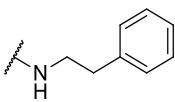
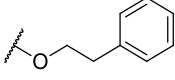
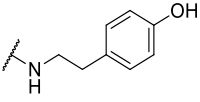
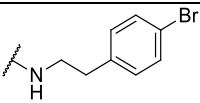
biochemischer Um- und Abbauprozesse in der Zellkultur nicht oder nur unzureichend repräsentativ abgebildet werden können.

Tabelle 23: IC₅₀ Werte der zytotoxischen AlamarBlue-Assays für die Substanz CCCP. ND: nicht durchgeführt

CCCP	IC ₅₀ [µg/ml (Mittelwert) ± Standardabweichung]				
Zelltyp, Medium	2 Stunden	4 Stunden	6 Stunden	17 Stunden	30 Stunden
Hep2, RPMI	91,23 ± 1,2	ND	63,79 ± 1,15	37,14 ± 1,24	18,89 ± 1,34
Hep2, DMEM	111,4 ± 1,32	136 ± 1,37	70,83 ± 1,19	46 ± 2,21	14,49 ± 1,14
McCoy, DMEM	67,03 ± 1,19	ND	73,85 ± 1,21	24,94 ± 1,20	9,43 ± 1,17

Neben dem Membran-aktiven CCCP wurde eine weitere synthetische Substanz-Gruppe zu vergleichenden Toxizitätsanalysen mit DCAP herangezogen, die Tetrahydrocarbazol (THCz) Analoga THCz-1, THCz-5, THCz-39 und THCz-40. Diese synthetischen kleinen Moleküle besitzen alle dasselbe Grundgerüst mit einer Amingruppe und unterscheiden sich durch die angehängten Reste R¹ und R² (Tabelle 24).

Tabelle 24: Strukturunterschiede der in dieser Arbeit untersuchten THCz-Derivate (modifiziert nach Reithuber *et al.*, 2021). X²: Stereozentrum

			
THCz-	R ¹	X	R ²
1		NH	
5		NH	
39		NH	
40		NH	

Für THCz-Analoga mit zwei zentralen Amingruppen konnte bereits durch die AG Schneider und Kollaborationspartner eine bakterizide Aktivität gegen ein breites Spektrum grampositiver und ausgewählter gramnegativer Pathogene im niedrigen mikromolaren Bereich festgestellt werden (Reithuber *et al.*, 2021). Die in der vorliegenden Arbeit generierten Daten zur Zytotoxizität dienten als erste Grundlage dieser Studie für weitere Struktur-Aktivitäts/Toxizitäts-Analysen und wurden in die Danksagung der zugehörigen Publikation aufgenommen (Reithuber *et al.*, 2021). Analysen zur antimikrobiellen Wirkungsweise zeigten, dass THCz die Synthese der Zellhülle hemmt, indem es wie für DCAP postuliert mit Undecaprenylpyrophosphat gekoppelten Zellhüll-Intermediaten sowie mit dem freien Undecaprenylpyrophosphat-Carrier (C55-PP) interagiert und somit die Biosynthese des Peptidoglykans, der Teichonsäuren und der Polysaccharidkapsel hemmt (Reithuber *et al.*, 2021) ohne wie für DCAP gezeigt, zusätzlich Aktivität gegenüber der Zellmembran auszuprägen (Hurley *et al.*, 2015). Die in dieser Arbeit generierten Daten zur Zytotoxizität wurden mit Hep2-Zellen in DMEM-Medium nach einer Inkubationszeit von 30 Stunden gewonnen. Für die Substanzen THCz-5 und THCz-39 war ab einer Konzentration von 4 µg/ml ein zytotoxischer Effekt nachweisbar (Abbildung 14). THCz-1 war toxischer und wies ab einer Konzentration von 2 µg/ml ausgeprägte Zytotoxizität mit einer verbleibenden Zellviabilität von 14 % auf. Für die Substanz THCz-40 war die höchste Zytotoxizität zu verzeichnen und über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich von 1 µg/ml bis 128 µg/ml ein zytotoxischer Effekt zu erkennen.

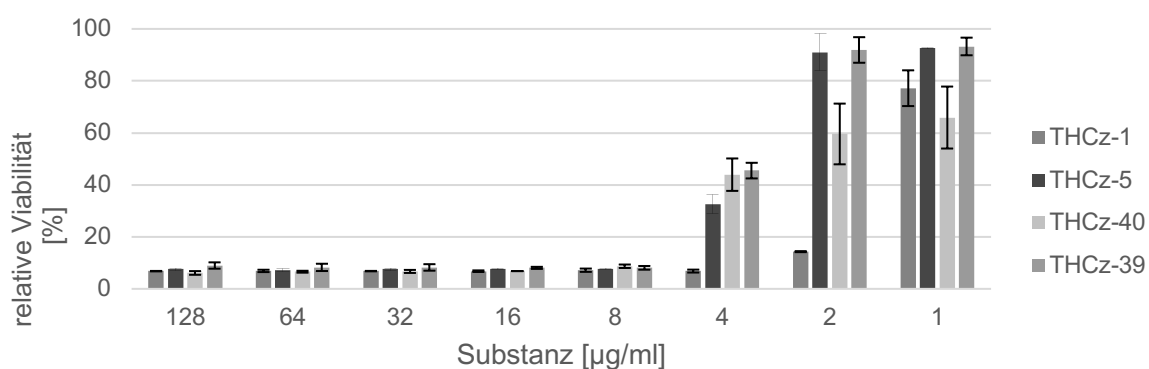


Abbildung 14: Assay zur Zytotoxizität von verschiedenen THCz R/S Enantiomer-Gemische (THCz-1, THCz-5, THCz-40, THCz-39) gegenüber Hep2-Zellen, der in DMEM-Medium für 30 Stunden durchgeführt wurde. Gezeigt wird die relative Viabilität im Verhältnis zu unbehandelten Zellen. Für die Substanzen THCz-5, THCz-39 ist kein zytotoxischer Effekt von 2 µg/ml erkennbar. Die zur Zytotoxizität korrelierenden MHK-Werte für *S. aureus* SG511 sind in Tabelle 25 zu finden.

Die zusätzliche Berechnung des IC_{50} ergab Werte von 1,01 $\mu\text{g/ml}$ (für THCz-1), 4,18 $\mu\text{g/ml}$ (für THCz-5), 4,8 $\mu\text{g/ml}$ (für THCz-39) und 2,25 $\mu\text{g/ml}$ (für THCz-40) und zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die THCz-Substanzen schon in niedrigen Konzentrationen zu starken Beeinträchtigungen der Zellviabilität führten (Tabelle 25). Die Studie von Reithuber *et al.*, 2021 bestätigte die in dieser Arbeit nachgewiesene Zytotoxizität (Tabelle 25). Im direkten Vergleich waren die IC_{50} -Werte dieser Arbeit jedoch deutlich niedriger als die IC_{50} -Werten aus der Veröffentlichung Reithuber *et al.*, 2021 (Tabelle 25), wobei jeweils andere Zelllinien verwendet wurden (Reithuber *et al.*, 2021).

Des Weiteren konnte der ausgeprägte Unterschied zur Zytotoxizität zwischen THCz-5 und THCz-39 (IC_{50} $41 \pm 4,9$ versus IC_{50} $10,7 \pm 1,9$), welcher mit dem Einführen einer Methylgruppe (R¹) sowie einer Amingruppe und einer Hydroxygruppe in R² einherging, in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (IC_{50} THCz-5 $4,18 \pm 1,34$ versus IC_{50} THCz-39 $4,80 \pm 1,32$) (Tabelle 25). Auch die von Reithuber *et al.*, 2021 beobachtete 10-fache Verringerung der zytotoxischen Aktivität, einhergehend mit dem Entfernen von R¹ und dem Austausch der Amingruppe durch eine Ketogruppe in R² (THCz-1 versus THCz-5), war mit einer 4-fachen Reduktion in dieser Arbeit weniger ausgeprägt.

Diese Unterschiede könnten insbesondere darauf zurückzuführen sein, dass unterschiedliche Ziellinien, Medien und Inkubationszeiten verwendet wurden. So verwendeten Reithuber *et al.*, 2021 Lungen-Epithelzellen A549 anstatt Hep2-Zellen, RPMI 1640-Medium anstatt DMEM-Medium, sowie eine kürzere Inkubationszeit (19 Stunden anstatt 30 Stunden) (Reithuber *et al.*, 2021). Diese Unterschiede verdeutlichen weiterhin wie auch oben zu DCAP beschrieben, dass die verwendeten experimentellen Bedingungen einen Einfluss auf die Zytotoxizitätsanalysen haben können und Ergebnisse möglichst in unterschiedlichen Systemen zu generieren sind. Hinsichtlich struktureller Unterschiede zwischen den getesteten Varianten wurde in der vorliegenden Arbeit hingegen, in Einklang mit den Daten von Reithuber *et al.*, 2021 zur antimikrobiellen und zytotoxischen Aktivität gezeigt, dass der Austausch der Hydroxylgruppe (THCz-39) gegen Brom (THCz-40) in R² keinen Einfluss auf die Zytotoxizität hatte. Gegenüber *S. aureus* SG511 zeigen die Substanzen THCz-1 sowie THCz-40 in MHK-Versuchen eine bessere Wirksamkeit zu haben als THCz-5 und THCz-39 (Tabelle 25) (Reithuber *et al.*, 2021).

Tabelle 25: IC₅₀ Werte der zytotoxischen AlamarBlue-Assays für die Enantiomer-Gemische THCz-1, THCz-5, THCz-39, THCz-40 im Vergleich zu den zytotoxischen Analysen sowie die korrelierenden MHK-Werte für *S. aureus* SG511 aus der Veröffentlichung Reithuber *et al.*, 2021. THCz Analoga lagen als R/S Enantiomer-Gemisch vor.

Substanz	IC ₅₀ [µg/ml (Mittelwert) ± Standartabweichung] Hep2-Zellen	IC ₅₀ [µg/ml (Mittelwert) ± Standartabweichung] A549-Zellen (Reithuber <i>et al.</i> , 2021)	MHK <i>S. aureus</i> SG511 [µg/ml] (Reithuber <i>et al.</i> , 2021)
THCz-1	1,01 ± 1,28	4,9 ± 1,2	2
THCz-5	4,18 ± 1,34	41 ± 4,9	>16
THCz-39	4,80 ± 1,32	10,7 ± 1,9	16
THCz-40	2,25 ± 1,14	10,7 ± 1,6	4

THCz enthält ein Stereozentrum und die in dieser Arbeit analysierten THCz Analoga lagen als R/S Enantiomer-Gemisch vor. Für die Substanz THCz-40 standen zusätzlich die Reinformen beider Enantiomere ((+)-(R)-THCz-40 und (-)-(S)-THCz-40) für weitere Zytotoxizitätsassays zur Verfügung (Abbildung 15). Es konnte interessanterweise gezeigt werden, dass zwischen den beiden Enantiomeren nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden keine signifikanten Unterschiede in der Zytotoxizität bestehen (Abbildung 15). Diese Beobachtung, dass die R und S Enantiomere keine unterschiedlichen Effekte ausprägen wurde auch für alle hier analysierten Analoga von Reithuber *et al.*, 2021 hinsichtlich der antimikrobiellen Aktivität beobachtet (Reithuber *et al.*, 2021). Dies spiegelt sich auch in den MHK-Werten für *S. aureus* SG511 wider, da lag die MHK für das Gemisch und für die (+)-(R)-Orientierung bei 4 µg/ml sowie für die (-)-(S)-Orientierung bei 2 µg/ml (Reithuber *et al.*, 2021). Prinzipiell kann für die Wirkung einer Substanz nicht nur die Struktur, sondern auch die Stereochemie von größter Wichtigkeit sein. Bei einem Gemisch aus zwei Enantiomeren im Molverhältnis 1:1 handelt es sich um ein Racemat (Mortimer and Müller, 2007). Arzneistoffe sollten in Reinform als R oder S Enantiomer vorliegen, oder eine gleiche Wirksamkeit und Eigenschaften experimentell bestätigt werden (Ridings, 2013). Die Wichtigkeit der Orientierung am Stereozentrum zeigte sich in der Contergan-Tragödie, denn das (+)-(R)-Enantiomer von Thalidomid (Contergan) ist für das Schlafeinleiten verantwortlich und zeigt keine teratogene Aktivität wohingegen das (-)-(S)-Enantiomer eine signifikante teratogene Aktivität aufweist (Eriksson *et al.*, 2010; Ridings, 2013).

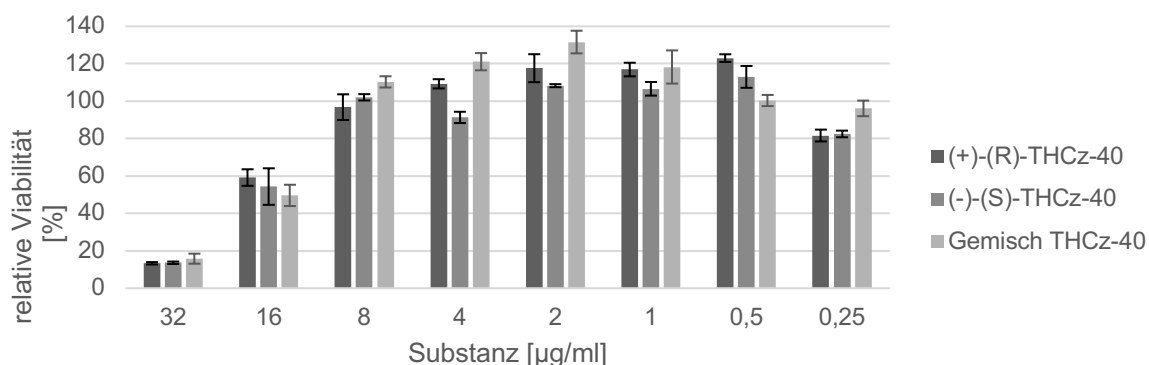


Abbildung 15: Assay zur Zytotoxizität von (+)-(R)-THCz-40 und (-)-(S)-THCz-40 sowie dem der Enantiomere-Gemisch von THCz-40 auf Hep2-Zellen, der in DMEM-Medium für 6 Stunden durchgeführt wurde. Gezeigt wird die relative Viabilität im Verhältnis zu unbehandelten Zellen. Die Reinstoffe im Vergleich zu dem Gemisch zeigen keine Unterschiede im zytotoxischen Verhalten auf.

Der IC_{50} Wert lag für (+)-(R)-THCz-40 bei $23,44 \mu\text{g/ml} \pm 1,43$, für (-)-(S)-THCz-40 bei $22,27 \mu\text{g/ml} \pm 1,32$ sowie für das Enantiomer-Gemisch THCz-40 bei $28,96 \mu\text{g/ml} \pm 1,53$. In diesem Versuch lagen die IC_{50} -Werte deutlich höher als in der Studie von Reithuber *et al.*, 2021, vermutlich insbesondere deshalb, weil die Inkubation mit 6 Stunden deutlich kürzer war. Hinsichtlich der Zielstruktur von THCz in eukaryotischen Zellen wurde postuliert, dass die beobachtete Zytotoxizität durch eine mögliche Inhibierung der humanen P-Typ ATPase erfolgen könnte (Reithuber *et al.*, 2021).

Die getesteten THCz-Analoga wiesen eine vergleichbar hohe Zytotoxizität wie DCAP auf (IC_{50} $1,01 \pm 1,28$ bis $4,80 \pm 1,32$ versus IC_{50} $1,03 \pm 1,22$ unter denselben experimentellen Bedingungen in Hep2-Zellen mit DMEM-Medium und einer Inkubationszeit von 30 Stunden).

THCz haben den Vorteil, dass diese kleinen Moleküle gut zu synthetisieren und modifizieren sind und könnten somit als eine molekulare Plattform für die Entwicklung neuer bakterieller Zellwandinhibitoren dienen (Reithuber *et al.*, 2021). Die hier verwendeten Varianten waren jedoch ebenso wie DCAP aufgrund der recht hohen Zytotoxizität gegenüber Zelllinien, die zur Kultivierung von Chlamydien verwendet werden, nicht geeignet für weitere Experimente zur antimikrobiellen Aktivität gegenüber Chlamydien und wurden daher in dieser Arbeit nicht weitergehend analysiert.

5.2.2 Analyse des hämolytischen Potentials von neuartigen Antibiotika gegenüber humanen Erythrozyten

Ein weiterer Parameter für die Einschätzung zur Sicherheit von Pharmazeutika ist das Hämolyseverhalten gegenüber roten Blutkörperchen (Chapman and Buxser, 2002). Zur Testung des hämolytischen Potentials neuartiger Antibiotika wurde in dieser Arbeit ein Hämolyse-Assay etabliert. Viele Routinemethoden verwenden zu diesem Zweck Kaninchen-Erythrozyten. Um einen besseren Einblick zur späteren Nutzung am Menschen zu erzielen, wurde in diesem Testsystem die Eigenschaft von Substanzen untersucht, humane Erythrozyten zu lysieren (4.7.1).

5.2.2.1 DCAP hat im Gegensatz zum Ionophor CCCP keine lytische Aktivität gegenüber humanen Erythrozyten

Die beiden Substanzen DCAP und CCCP sind gegenüber Bakterienmembranen aktiv (Orlov *et al.*, 1994; Eun *et al.*, 2012). Dem neuartigen Antibiotikum DCAP wird eine Membranpotential-reduzierende und Permeabilität-steigernde Wirkung zugeschrieben und CCCP ist eine häufig eingesetzte Kontrollsubstanz, welche als Protonophor fungiert und als schwach hydrophobe Säure Protonen und Kationen durch die Membran transportiert und so zu einer Verringerung des Membranpotential führt (Orlov *et al.*, 1994; Eun *et al.*, 2012). In diesem Versuch soll für DCAP in vergleichenden Experimenten mit CCCP überprüft werden, ob gegenüber humanen Erythrozytenmembranen eine lytische Aktivität vermittelt wird. Bei dem verwendeten Hämolyse-Assay wurde die Lyse von humanen Erythrozyten in Relation zu einer vollständigen Lyse durch Triton X-100 dargestellt (Abbildung 16 A). Die Substanz DCAP wies nach 6, 17 und 30 Stunden Inkubationszeit keinen lytischen Effekt gegenüber humanen Erythrozyten im getesteten Konzentrationsbereich von 1 µg/ml bis 128 µg/ml auf (Abbildung 16 A).

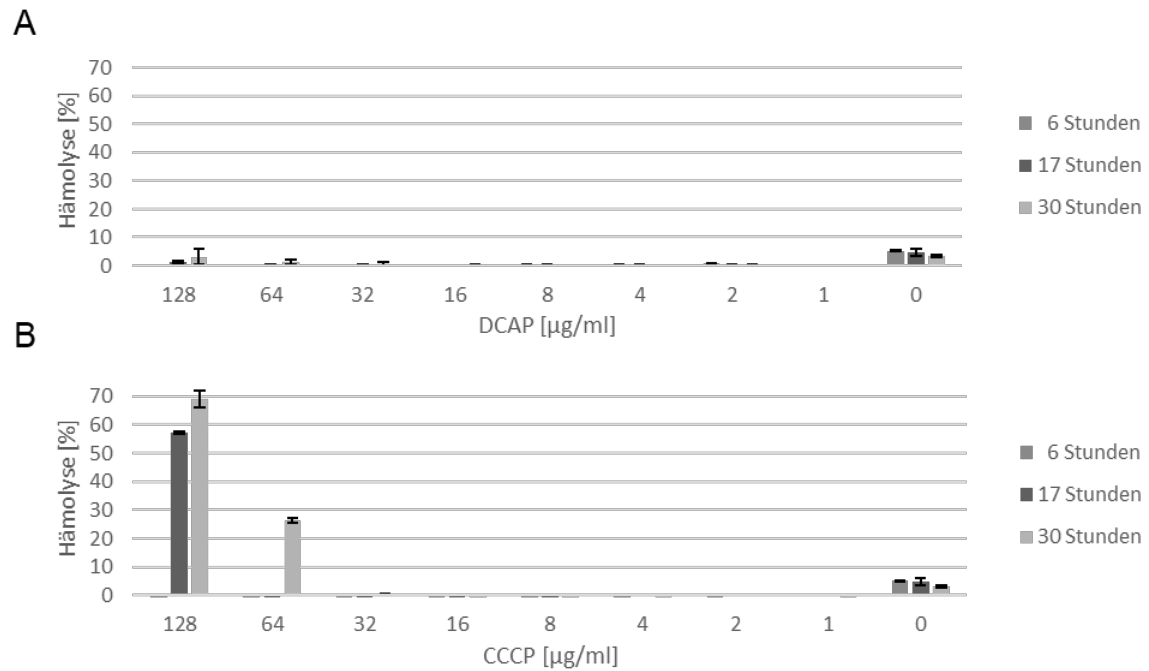


Abbildung 16: Dargestellt ist der lytische Effekt von DCAP (**A**) und CCCP (**B**) gegenüber humanen Erythrozyten nach 6, 17 und 30 Stunden Inkubationszeit. Negative Werte, die in Folge des Versuchsaufbaues zustande kommen, werden als 0 % dargestellt. Die Lyse ist im Verhältnis zu einer kompletten Lyse der humanen Erythrozyten durch Triton X-100 dargestellt (100 %). Für *S. aureus* FRI 100 liegt die MHK bei Behandlung mit DCAP bei 20,66 µg/ml und mit CCCP bei 0,26 µg/ml (Eun *et al.*, 2012). Für DCAP (**A**) konnte keine Hämolyse bis zur höchsten getesteten Konzentration von 128 µg/ml festgestellt werden. Für CCCP (**B**) konnte ein hämolytischer Effekt bei einer Inkubationszeit von 30 Stunden ab einer Konzentration von 64 µg/ml sowie bei einer 17-stündigen Inkubation bei 128 µg/ml festgestellt werden.

Als Positivkontrolle wurde der Assay zusätzlich mit dem Ionophor CCCP durchgeführt (Abbildung 16 B). Im Gegensatz zu DCAP führte CCCP zu einer Hämolyse (Ludwig *et al.*, 2024). Ab einer CCCP-Konzentration von 64 µg/ml und einer 30- stündigen Inkubation kam es zu einer Lyse von 25 % der Erythrozyten. Bei höheren Konzentrationen und längeren Inkubationszeiten wurde sogar eine Lyse von über 65 % erreicht (Abbildung 16 B). Im Gegensatz dazu konnte unter den getesteten Bedingungen bis zur höchsten getesteten Konzentration von 128 µg/ml DCAP keine Lyse der humanen Erythrozyten detektiert werden (Ludwig *et al.*, 2024). Im Vergleich liegt für *S. aureus* FRI 100 die MHK mit DCAP bei 20,66 µg/ml und mit CCCP bei 0,26 µg/ml (Eun *et al.*, 2012). Bekannt ist, dass DCAP bei bakteriellen Membranen das Membranpotential reduziert und die Permeabilität erhöht, aber inert gegenüber Kaninchen-Erythrozytenmembranen ist (Eun *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass DCAP nicht nur gegenüber Kaninchen-Erythrozyten, sondern auch gegenüber humanen Erythrozyten keine lytische Aktivität hat (Ludwig *et al.*, 2024).

5.2.2.2 Hypeptin hat ein geringeres hämolytisches Potenzial als Teixobactin

Die Substanz Hypeptin, ist ein Cyclodepsipeptid-Antibiotikum, das strukturell ähnlich zu dem bekannten Teixobactin ist (Abbildung 17) (Ling *et al.*, 2015; Crüsemann *et al.*, 2021). Beide Substanzen wurden mittels der iChip-Technologie aus nicht kultivierbaren Bakterien isoliert und sind Antibiotika, welche die Zellwandbiosynthese blockieren, indem sie eine Vielzahl an Undecaprenyl-Pyrophosphat enthaltenden Biosynthese-Intermediaten binden und sind somit robust gegenüber Resistenzentwicklung (Ling *et al.*, 2015; Crüsemann *et al.*, 2021). Hypeptin wurde durch die iChip-Methode wiederentdeckt und bereits 1989 erstmals beschrieben (Shoji *et al.*, 1989). In dieser Arbeit wurden beide Naturstoffe hinsichtlich ihrer Hämolyseaktivität untersucht. In der vorausgegangenen Masterarbeit (Krannich, 2017) konnte bereits mit Hilfe von AlamarBlue-Assays gezeigt werden, dass Hypeptin bei einer 30-stündigen Inkubation auf Hep2-Zellen in DMEM-Medium bis zu einer Konzentration von 64 µg/ml keine sowie bei einer Konzentration von 128 µg/ml nur eine schwache zytotoxische Aktivität aufweist (Crüsemann *et al.*, 2021).

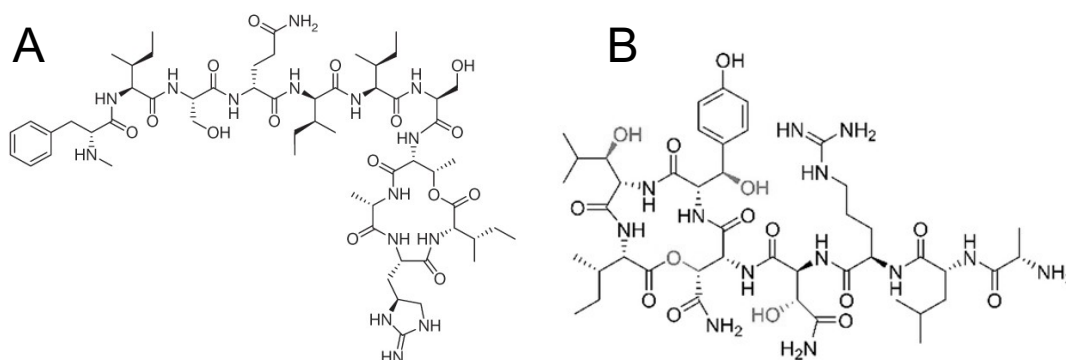


Abbildung 17: Strukturformel für Teixobactin (A) und Hypeptin (B) (Sherpa, Reese and Aliabadi, 2015; Crüsemann *et al.*, 2021).

Hier konnte für Hypeptin erst bei höheren Konzentrationen ab 64 µg/ml und längeren Inkubationszeiten von 17 und 30 Stunden eine geringe Hämolyseaktivität nachgewiesen werden (Abbildung 18 A).

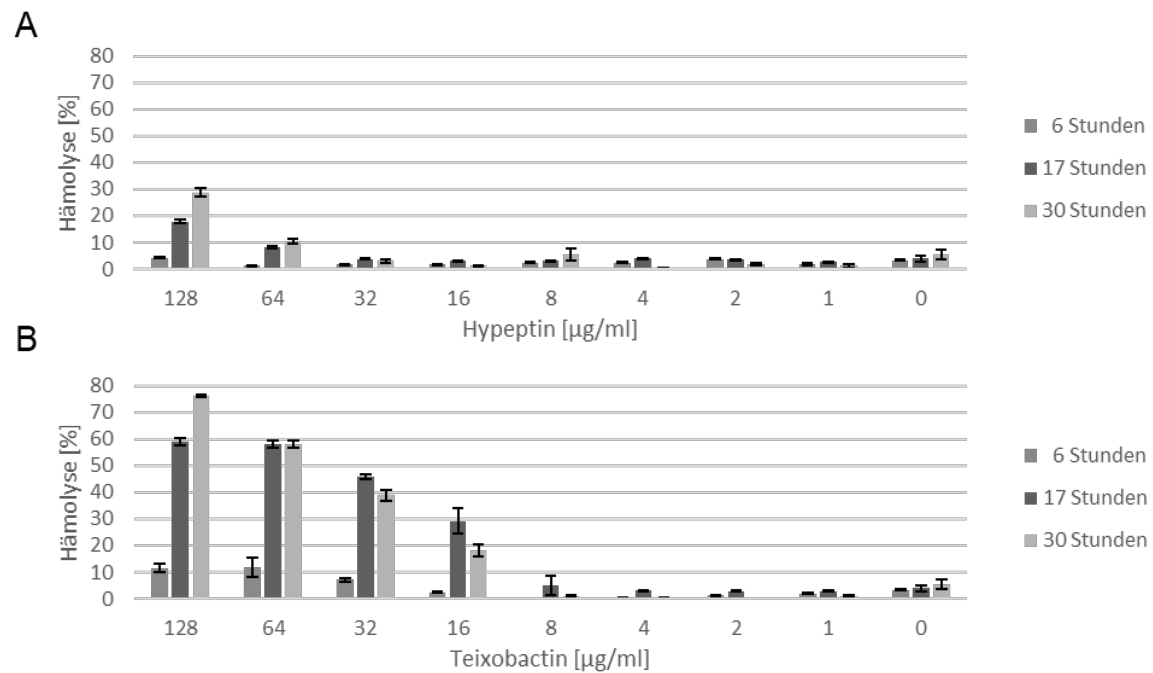


Abbildung 18: Dargestellt ist der lytische Effekt für die Substanzen Hypeptin (**A**) und Teixobactin (**B**) in einem Konzentrationsbereich von 0 µg/ml bis 128 µg/ml gegenüber humanen Erythrozyten nach 6, 17 und 30 Stunden Inkubation. Negative Werte, die in Folge des Versuchsaufbaues zustande kommen, werden nicht gezeigt und werden als 0 % dargestellt. Die Lyse ist im Verhältnis zu einer vollständigen Lyse der Erythrozyten durch Triton X-100 dargestellt. Für Hypeptin (**A**) konnte nach Inkubation für 17 und 30 Stunden ein geringer hämolytischer Effekt ab einer Konzentration von 64 µg/ml festgestellt werden. Bei einer Inkubationszeit von 17 und 30 Stunden mit Teixobactin (**B**) konnte ab einer Konzentration von 16 µg/ml ein hämolytischer Effekt von bis zu 75 % festgestellt werden. Für *S. aureus* LT-1334 (MRSA) liegt die MHK bei Behandlung mit Hypeptin bei 0.25 µg/ml (Crüsemann *et al.*, 2021). Bei der Behandlung von *S. aureus* ATCC 33591 mit Teixobactin liegt die MHK bei 0,16-0,31 µg/ml (Ling *et al.*, 2015).

Bei 17- und 30- stündiger Inkubation mit Teixobactin hingegen lysierten humane Erythrozyten bereits im geringen Umfang ab einer Konzentration von 16 µg/ml und höhere Konzentrationen zeigten eine ausgeprägte Hämolyse bis hin zu 75 % bei der höchsten getesteten Konzentration von 128 µg/ml (Abbildung 18 B). Kürzere Inkubationszeiten (6 Stunden) hingegen verursachten auch bei hohen Konzentrationen nur ca. 10 % Lyse (Abbildung 18 B).

Zusammenfassend zeigte Hypeptin gegenüber humanen Erythrozyten im Vergleich zu Teixobactin eine wesentlich geringere lytische Aktivität. Somit weist Hypeptin gegenüber Teixobactin in Bezug auf sein Hämolyseverhalten die günstigeren Eigenschaften auf.

5.2.2.3 Epilancin A37 weist keine lytische Aktivität gegenüber humanen Erythrozyten auf

Bei der Substanz handelt es sich um ein neu isoliertes Typ A Lantibiotikum, welches in dieser Arbeit bezüglich seines Hämolyseverhaltens untersucht wurde. Isoliert wurde das Epilancin A37 aus *Staphylococcus epidermidis*, es wirkt gegen grampositive Bakterien und besitzt im Gegensatz zu anderen Typ A Lantibiotika kein typisches Lipid II Bindemotiv (Cooper, Li and Donk, 2010; Puls *et al.*, 2024). Für A37, welches aktuell hinsichtlich seines antibiotischen Wirkmechanismus am Institut für Pharmazeutische Mikrobiologie untersucht wird, gibt es experimentelle Hinweise auf die bakterielle Membran gerichtete Aktivität (Puls *et al.*, 2024). Gegenüber humanen Erythrozyten konnte für das neuartige Epilancin keine Lyse bis zur höchsten getesteten Konzentration von 128 µg/ml und höchsten Inkubationszeit von 30 Stunden beobachtet werden (Abbildung 19).

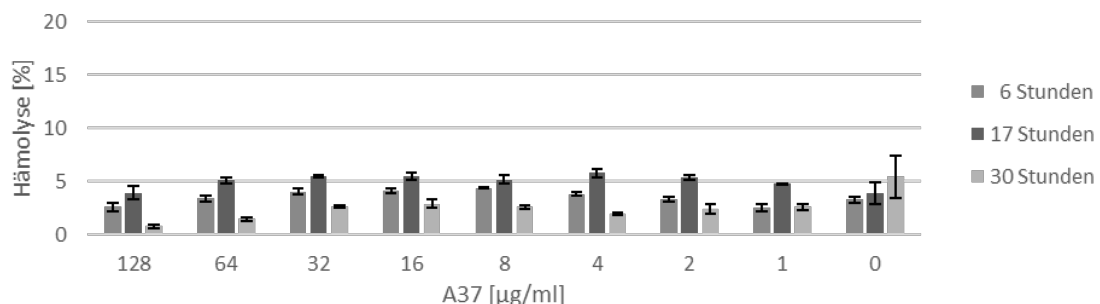


Abbildung 19: Dargestellt ist der lytische Effekt gegenüber humanen Erythrozyten von A37 bei Konzentrationen von 0 bis 128 µg/ml nach Inkubationszeiträumen von 6, 17 und 30 Stunden. Negative Werte die in Folge des Versuchsaufbaues zustande kommen, werden nicht gezeigt und werden als 0 % dargestellt. Die Lyse ist im Verhältnis zu einer kompletten Lyse der Erythrozyten durch Triton X-100 dargestellt. Es konnte kein hämolytischer Effekt festgestellt werden. Für *Corynebacterium glutamanicum* DSM 20300 liegt die MHK bei Behandlung mit A34 bei 1 µg/ml (Puls *et al.*, 2024).

5.2.2.4 Naturstoffextrakte als antibiotische Substanzen

In diesem Experiment wurde in einem Lösungsmittel gelöster Naturstoff aus einer CO₂-Olivenblatt-Extraktion sowie die käufliche Substanz Oleacein auf eine hämolytische Aktivität untersucht. Oleacein ist die Dialdehydform der decarboxylierten Methylenolsäure in Verbindung mit Hydroxytyrosol, auch 3,4-DHPEA-EDA genannt, einem Secoiridoid, das hauptsächlich in nativem Olivenöl vorkommt (Huang *et al.*, 2024).

Im Mundraum konnte für Oleacein nur eine geringe antibiotische Wirkung detektiert werden (Karygianni *et al.*, 2019) und in dieser Arbeit konnte für die Substanz keine hämolytische Aktivität nach Inkubationszeiten von 2 und 17 Stunden im jeweils getesteten Konzentrationsbereich von 1 µg/ml bis 128 µg/ml beobachtet werden (Abbildung 20 A), auch liegt die MHK für SG511 mit Oleacein bei >128 µg/ml (mündliche Kommunikation mit Dr. Marvin Rausch). Für den getesteten Naturstoff-Extrakt wurde bei Konzentrationen bis zu 99,2 µg/ml keine hämolytische Aktivität festgestellt (Abbildung 20 B). Nach einer 17-stündigen Inkubation konnte ab einer Konzentration von 198,4 µg/ml eine erste hämolytische Aktivität beobachtet werden, welche bei der höchsten getesteten Konzentration von 396,8 µg/ml stark ausgeprägt war (Abbildung 20 B). Diese lytische Aktivität könnte durch die Inhaltsstoffe des Extraktes hervorgerufen (Abbildung 20 B), da die MHK für *S. aureus* SG511 mit dem Extrakt bei 64 µg/ml (mündliche Kommunikation mit Dr. Marvin Rausch) liegt.

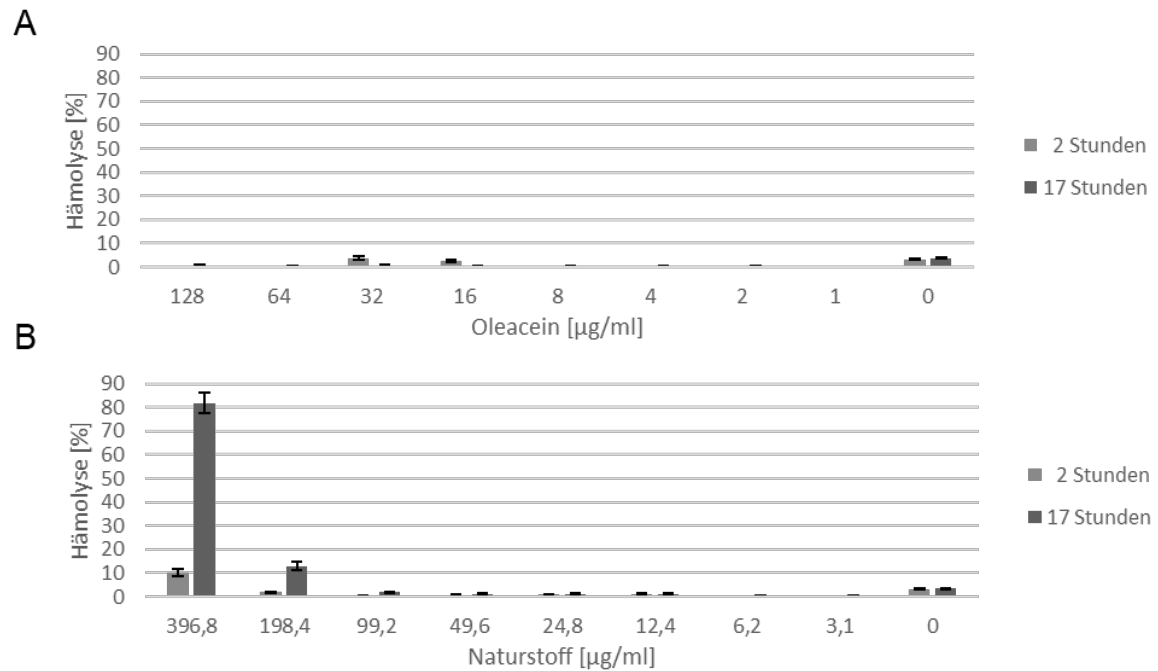


Abbildung 20: Dargestellt ist der lytische Effekt von Oleacein (A) im Konzentrationsbereich von 0 µg/ml bis 128 µg/ml sowie von einem Naturstoffextrakt (B) im Konzentrationsbereich von 0 µg/ml bis 396,8 µg/ml jeweils nach 2 und 17 Stunden Inkubation. Negative Werte die in Folge des Versuchsaufbaues zustande kommen, werden nicht gezeigt und werden als 0 % dargestellt. Die Lyse ist im Verhältnis zu einer kompletten Lyse der Erythrozyten durch Triton X-100 dargestellt. Für Oleacein konnte kein und für den Naturstoff konnte ein hämolytischer Effekt in einem Bereich von 198,4 µg/ml bis 396,8 µg/ml nach 17-stündiger Inkubation detektiert werden. Für *S. aureus* SG511 liegt die MHK bei Behandlung mit Oleacein bei >128 µg/ml und mit dem Naturstoff bei 64 µg/ml.

5.2.3 Biofilmanalysen zum Naturstoff Corallopyronin A

Biofilme sind eine Matrix aus Biopolymeren (EPS) und werden von verschiedenen Bakterien produziert, um sich vor Stressfaktoren wie zum Beispiel Desinfektionsmitteln, Antibiotika oder mechanische Noxen zu schützen (Koo *et al.*, 2017).

In diesem Versuch soll die Wirkung von Corallopyronin A (CorA) (Abbildung 21) sowohl auf die Bildung eines Biofilms als auch auf einen bestehenden Biofilm untersucht werden. CorA ist ein Polyketid-abgeleitetes α -Pyrone, welches aus *Coralloccoccus coralloides* c127 isoliert wurde (Irschik *et al.*, 1985).

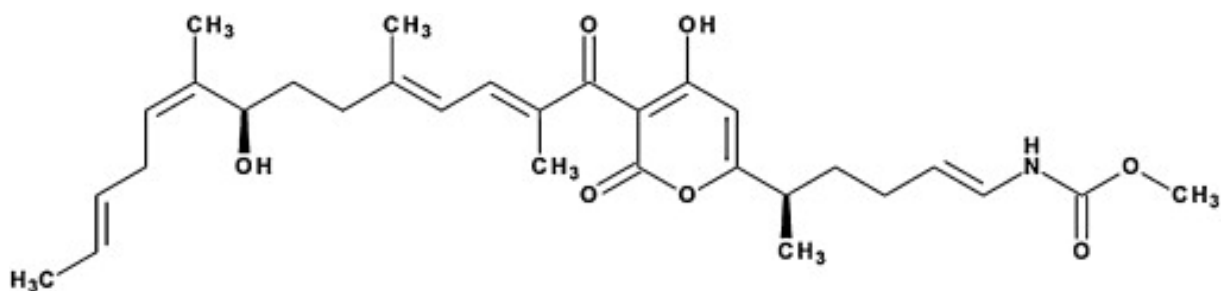


Abbildung 21: Strukturformel von Corallopyronin A (CorA) (Schäberle *et al.*, 2014).

Rifampicin wird als Kontrolle verwendet, da es eine ähnliche Zielstruktur wie CorA an der bakteriellen DNA-abhängigen RNA-Polymerase besitzt (Schiefer *et al.*, 2012; Koo *et al.*, 2017). Anders als Rifampicin bindet jedoch CorA an die sogenannte „Switch Region“ der bakteriellen DNA-abhängige RNA-Polymerase und zeigt somit auch gegenüber Rifampicin-resistenten Erregern Aktivität (Mukhopadhyay *et al.*, 2008; Kock *et al.*, 2018).

Vorbereitend auf die Biofilmbexperimente wurde eine MHK-Bestimmung mit dem, für diese Versuche verwendeten, *Staphylococcus aureus* Stamm ATCC 25923 in TSB-Medium in An- und Abwesenheit von 0,5 % Glukose für die beiden Testsubstanzen durchgeführt. Die Auswertung der MHK-Bestimmung erfolgte nach 16 Stunden. Für CorA wurde eine MHK von 0,0625 µg/ml und für Rifampicin von ≤0,008 µg/ml bestimmt. Die Zugabe von 0,5 % Glukose hatte keinen Einfluss auf die MHK-Werte beider Substanzen. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* innerhalb von 24 Stunden einen Biofilm bildet und es bei Anwesenheit von 0,5 % Glukose zu einer gesteigerten Biofilmbindung kommt. Im nächsten Schritt wurden zwei verschiedene Biofilmbexperimente etabliert: Im ersten Experiment zur Bestimmung der minimalen Biofilm-inhibitorischen Konzentration (MBIC) wurde CorA mit der Bakteriensuspension gemeinsam 24 Stunden inkubiert, um zu testen, ab welcher Konzentration kein Biofilm mehr gebildet wird. Im Gegensatz dazu wurde im zweiten Biofilmbexperiment für die Bestimmung der minimalen Biofilm-eradizierende Konzentration (MBEC) die Wirkung von CorA auf einen bestehenden Biofilm getestet. Hierbei wurde der Biofilm zuerst produziert und anschließend mit CorA behandelt. Nach 24 Stunden wurde das Medium mit CorA abgenommen, das Wachstum abgestoppt und der Biofilm mit 1 % Kristallviolett gefärbt und für 5 min. inkubiert. Das positiv geladene Kristallviolett bindet unspezifisch aufgrund der gegensätzlichen Ladung an den negativ geladenen Biofilm. Mittels Eisessigs kann das gebundene

Kristallviolett gelöst und die Absorption bei 560 nm gemessen werden, da die Stärke der Absorption mit der Biofilmmasse korreliert.

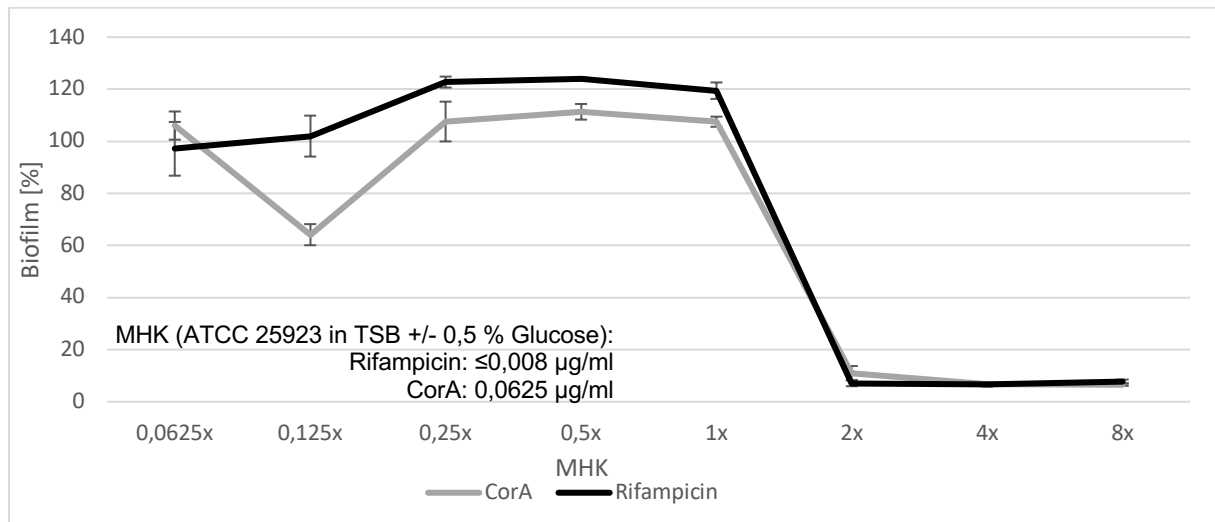


Abbildung 22: Experiment zur Inhibierung der Biofilmbildung (MBIC) von *S. aureus* ATCC 25923 durch Rifampicin und CorA. Gezeigt sind die prozentualen Werte im Verhältnis zu der Wachstumskontrolle. Für Rifampicin und CorA konnte bei einer Konzentration von 2x MHK (Rifampicin $0,016 \mu\text{g/ml}$; CorA $0,125 \mu\text{g/ml}$) eine vollständige Inhibition der Biofilmbildung (MBIC) beobachtet werden. In dieser Darstellung wurde für Rifampicin von einer 1x MHK = $0,008 \mu\text{g/ml}$ ausgegangen.

Die minimalen Biofilm-inhibitorischen Konzentration betrug für Rifampicin bei einer Konzentration von $0,016 \mu\text{g/ml}$ und für CorA bei $0,125 \mu\text{g/ml}$ (beides 2x MHK) bestimmt werden (Abbildung 22). Die minimalen Biofilm-eradizierende Konzentration konnte weder mit Rifampicin noch mit CorA bestimmt werden, jedoch war eine deutliche Abnahme des Biofilms durch CorA-Behandlung ab 0,5x MHK ($0,031 \mu\text{g/ml}$) und durch Rifampicin-Behandlung bei 2x MHK ($0,016 \mu\text{g/ml}$) sichtbar (Abbildung 23). Für CorA konnte eine maximale Reduktion des Biofilms auf ca. 49 % mittels einer Konzentration von $0,125 \mu\text{g/ml}$ (2x MHK) erreicht werden. Bei Rifampicin konnte bei 4x MHK ($0,031 \mu\text{g/ml}$) eine maximale Reduktion des Biofilms auf ca. 42 % erzielt werden.

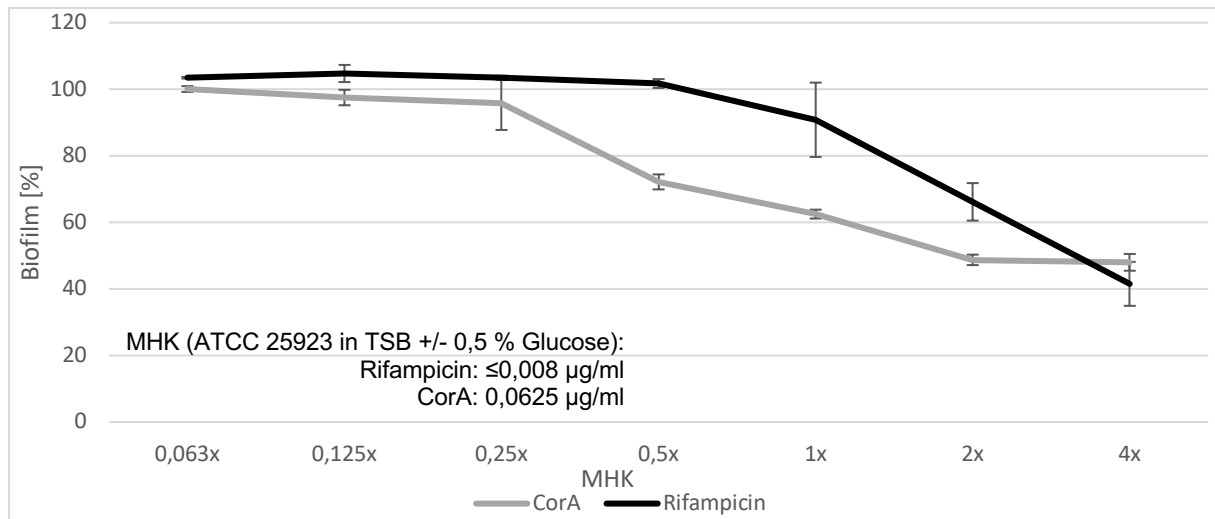


Abbildung 23: Experiment zur Eradikation (MBEC) eines von *S. aureus* ATCC 25923 produzierten Biofilms durch Rifampicin und CorA. Gezeigt sind die prozentualen Werte im Verhältnis zu einem unbehandelten Biofilm. Unter Gabe beider Substanzen für 24 Stunden nahm der Biofilm deutlich ab.

Die Anwendung von höheren Konzentrationen könnte zu einer weiteren Dezimierung des Biofilmes führen. Außerdem sollte untersucht werden, ob eine gleichzeitige Behandlung von Rifampicin und CorA einen synergetischen Effekt zeigt. In diesen Experimenten konnte eine gute Wirksamkeit von CorA gegen Biofilme gezeigt werden. Jedoch sollten in zukünftigen Versuchen weitere *S. aureus* Stämme getestet werden, da Studien gezeigt haben, dass die Nutzung unterschiedlicher *S. aureus* Stämme zu abweichenden Ergebnissen hinsichtlich der Behandlung von Biofilmen führen kann (Shukla and Rao, 2017). Bei *S. aureus* ATCC 25923 handelt es sich um einen Methicillin-sensiblen *Staphylococcus aureus* (MSSA), daher sollten auch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) Stämme sowie zusätzliche klinische Stämme, die Biofilme ausbilden können und beispielsweise zu Infektionen an Kathetern und künstlichen Gelenken führen, getestet werden. Spannend wäre auch die Testung von „community-acquired“ MRSA, da diese in der breiten Bevölkerung vorkommen und für das Gesundheitssystem kostenintensiv sind (Lauderdale *et al.*, 2010).

5.2.4 Beurteilung der Aktivität von Antibiotika auf aktive und persistierende Chlamydien-Infektionen in Zellkultur

Der Goldstandard zur Detektion der antimikrobiellen Aktivität von Substanzen ist die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK). Die MHK gibt die Konzentration an, die *in vitro* unter standardisierten Bedingungen ausreicht, um das sichtbare Wachstum von Bakterien zu verhindern (Andrews, 2001). Allerdings ist die Methode begrenzt, da der obligat intrazelluläre Lebensstil der Chlamydien und die damit einhergehenden Schwierigkeiten einer wirtszellfreien Kultivierung eine klassische MHK-Bestimmung unmöglich macht. Zudem kann es neben einer aktiven Chlamydien-Infektion auch noch eine chlamydiale Persistenzform geben, bei der sich morphologisch aberrante, zellteilungsinactive Zellen (Aberrantkörperchen, ABs) ausgeprägt werden und somit eine Auswertung der MHK erschweren. Aufgrund dieser Besonderheiten ist die Definition der chlamydialen MHK leicht modifiziert:

Die MHK gegenüber Chlamydien ist die niedrigste Konzentration, in der keine Inklusionen oder keine Persistenzformen mehr gebildet werden (Welsh, Gaydos and Quinn, 1992; Storey and Chopra, 2001). Zur Bestimmung der MHK werden Chlamydien in der Zellkultur mit den zu testenden Antibiotika oder anderweitig noxischen Substanzen inkubiert und anschließend biochemisch behandelt, um den Effekt der Antibiotika auf den chlamydialen Lebenszyklus mittels Mikroskopie zu analysieren. Ein Fluorescein Konjugat-Antikörper färbt die chlamydialen Lipopolysaccharide von Retikularkörperchen (RBs), Elementarkörperchen (EBs) und Aberrantkörperchen (ABs) an, wodurch deren Morphologie, Größe und Form sichtbar wird. Zusätzlich werden mit Evans Blue das Wirtszellzytoplasma und die DNA mit DAPI angefärbt, dadurch können mögliche zytotoxische Effekte bestimmt werden. Im Folgenden werden antibakterielle Substanzen auf ihre antichlamydiale Aktivität untersucht, um so neue Therapien speziell gegenüber persistierenden Chlamydien-Infektionen zu finden.

5.2.4.1 Corallopyronin A

Corallopyronin A (CorA) ist ein α -Pyrone Antibiotikum, das an die bakterielle DNA-abhängige RNA-Polymerase bindet und effektiv gegen über grampositiven und gramnegativen intrazellulären Bakterien wie bspw. *Wolbachia*, *Chlamydia* spp., *Orientia tsutsugamushi* wirksam ist (Shima *et al.*, 2018). Obwohl die Aktivität von CorA gegenüber aktiven Chlamydien schon bestimmt wurde, ist bislang nur wenig über die Wirkung auf persistierende Chlamydien-Infektionen bekannt. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde der Effekt von CorA auf *Chlamydia trachomatis* Serovar L SWFP untersucht. Dafür wurde die eukaryotischen Zelllinie McCoy mit Chlamydien infiziert, danach wurden die Chlamydien mittels Inkubation mit Penicillin G in einen Persistenzzustand überführt und anschließend einer Behandlung mit CorA unterzogen. Die MHK von CorA wurde im Anschluss an das beschriebene Prozedere mikroskopisch bestimmt (Tabelle 26, Abbildung 24, Abbildung 25).

Tabelle 26: Empfindlichkeit von *C. trachomatis* Serovar L in McCoy Wirtszellen gegenüber CorA unter verschiedenen Behandlungsschemata. Behandlungsschema Abbildung 24. h.p.i.: Stunden nach Infektion; CorA: Corallopyronin A; PEN: Penicillin G

Behandlungsschema	MHK [$\mu\text{g/ml}$]
(A) CorA 2 h.p.i.	1
(B) CorA 12 h.p.i.	2
(C) PenG 2 h.p.i. + CorA 2 h.p.i.	2
(D) PenG 2 h.p.i. + CorA 12 h.p.i.	2

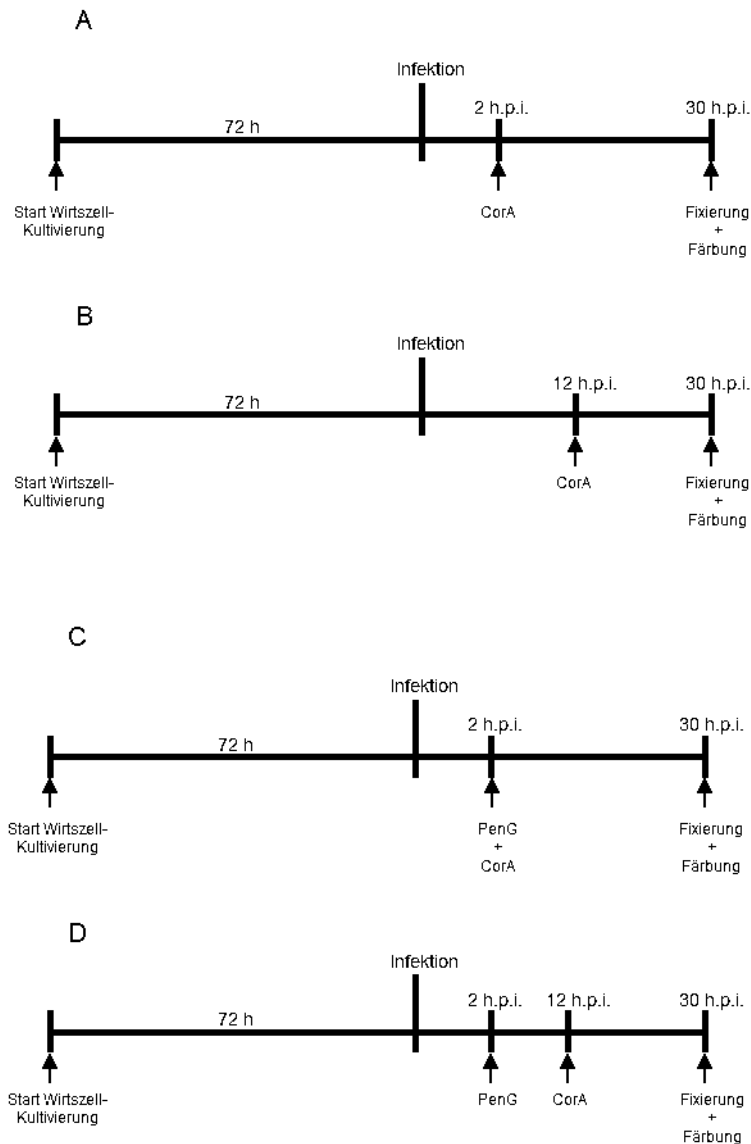


Abbildung 24: Verwendetes Behandlungsschema. Die Wirtszellen (McCoy) wurden für 72 Stunden kultiviert und anschließend mit *C. trachomatis* L SWFP- infiziert. **A:** 2 Stunden nach Infektion wurden die infizierten Zellen mit CorA behandelt. **B:** 12 Stunden nach Infektion wurde CorA auf die Zellen gegeben. **C:** Im Kontrollversuch wurden 2 Stunden nach Infektion 100 U/ml PenG und zeitgleich CorA hinzugegeben. **D:** 2 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit 100 U/ml PenG und anschließend nach Ausprägung der Penicillin-induzierten Persistenz nach 12 Stunden mit CorA behandelt. Alle Versuche wurden 30 h.p.i. fixiert, gefärbt und anschließend Fluoreszenz-mikroskopisch ausgewertet. h.p.i.: Stunden nach Infektion). CorA: Corallopyronin A; PenG: Penicillin G

Die MHK gegenüber einer Infektion mit *C. trachomatis* Serovar L SWFP- auf McCoy Zellen nach Zugabe von CorA unmittelbar nach Infektion (2 h.p.i.; MHK: 1 µg/ml) bzw. auf eine bereits etablierte Infektion 12 h.p.i. (MHK: 2 µg/ml), konnte bereits veröffentlichte Daten bestätigen (Shima *et al.*, 2018; Loeper *et al.*, 2019), die eine MHK für *C. trachomatis* L2 in HeLa-Zellen von 0,5 µg/ml ergaben, wobei die Daten sich auf eine HeLa-Zelllinie beziehen.

Bislang war unklar, ob CorA auch ähnlich potent gegenüber persistierenden Chlamydien ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CorA mit einer MHK von 2 µg/mL eine (ähnlich starke) antichlamydiale Aktivität gegenüber Penicillin-induzierten persistenten Chlamydien aufweist. Hierbei ist es unabhängig ob die Zellen mit Penicillin und CorA zeitgleich inkubiert oder CorA erst 12 Stunden nach Infektion auf Penicillin behandelte Zellen gegeben wurde.

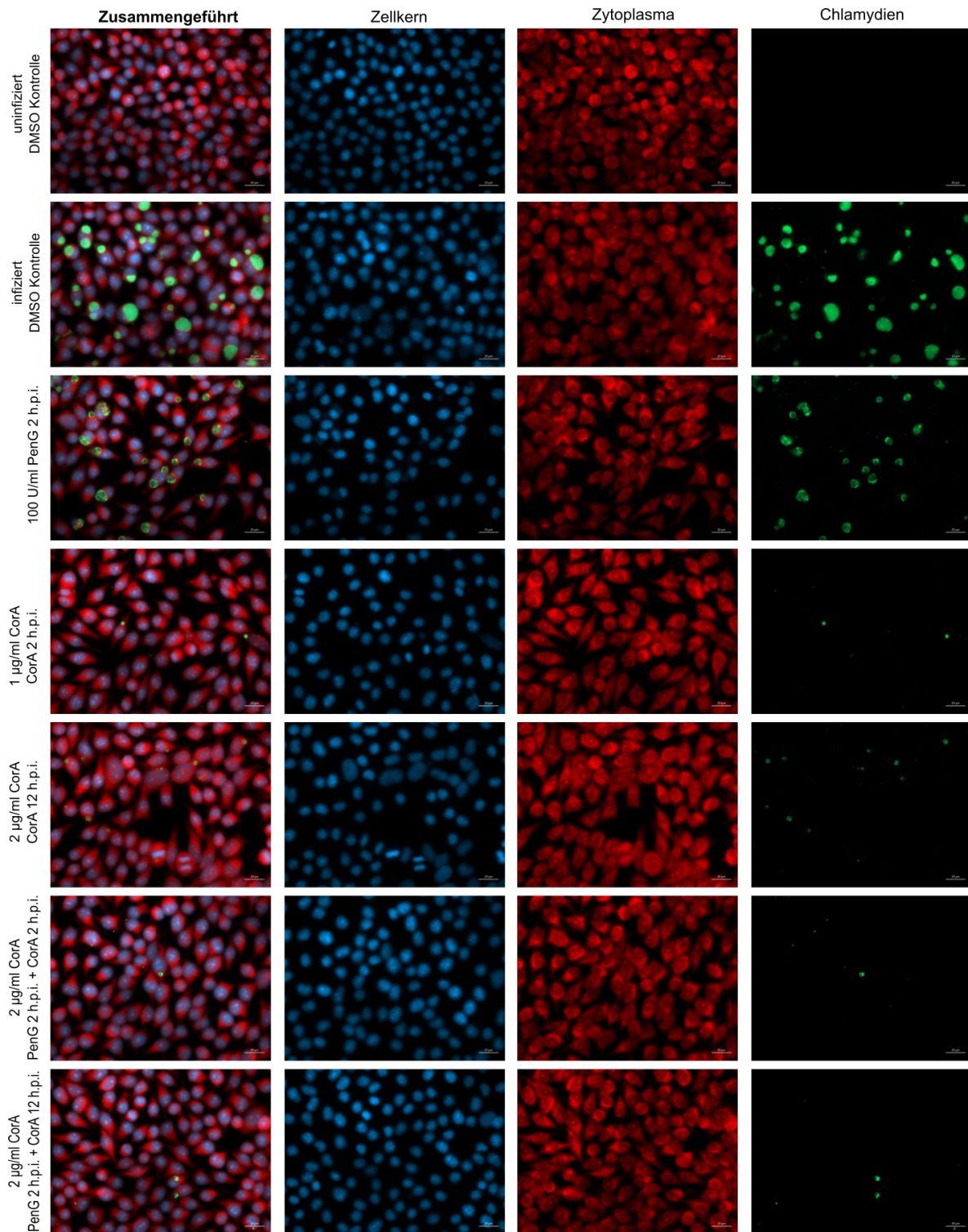


Abbildung 25: Mikroskopiebilder zur MHK-Bestimmung von CorA gegenüber *C. trachomatis*. Zur Kontrolle dienten uninfizierte und infizierte Vehikel-Kontrollen sowie persistierenden Chlamydien nach Penicillin Behandlung. Abgebildet sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen bei der jeweiligen CorA MHK (Tabelle 26). h.p.i.: Stunden nach Infektion. Dargestellt sind die repräsentierenden Bilder von den einzelnen Kanälen zur Detektion der Zellkerne (blau), des Zytoplasmas (rot) und dem chlamydialen LPS (grün) sowie alle Kanäle zusammengeführt. Maßstabsleiste 20 µm. CorA: Corallopyronin A; PEN: Penicillin G

Das *Centers for Disease Control and Prevention* empfiehlt für die Behandlung von Infektionen, die durch *C. trachomatis* verursacht sind, die Gabe von Azithromycin oder Doxycyclin (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2006, 2007). Bei einer unkomplizierten genitalen Chlamydien-Infektion wird einmalig 1 g Azithromycin peroral gegeben (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2006, 2007). Weiterhin kann als alternative auch eine Behandlung mit Doxycyclin 100 mg 2x1 oder Erythromycin 500 mg 4x1 oder Ofloxacin 300 mg 2x1 oder Levofloxacin 500 mg 1x1 jeweils für 7 Tage durchgeführt werden (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2006, 2007).

Um die Wirksamkeit von CorA im Kontext mit gängigen Therapien gegenüber Chlamydien-Infektionen zu setzen, wurden zum Vergleich die Aktivitäten von Azithromycin, Doxycyclin und Rifampicin auf persistierende Chlamydien getestet. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Azithromycin, Doxycyclin und Rifampicin nicht nur wirksam gegen aktive chlamydiale Infektionen sind, sondern auch einen Schutz gegen persistierende bieten und CorA die gleiche Wirkung *in vitro* besitzt (Abbildung 25, Abbildung 26). CorA könnte somit ein vielversprechender Kandidat für die Behandlung von aktiven und persistierenden Chlamydien-Infektionen in der Zukunft sein.

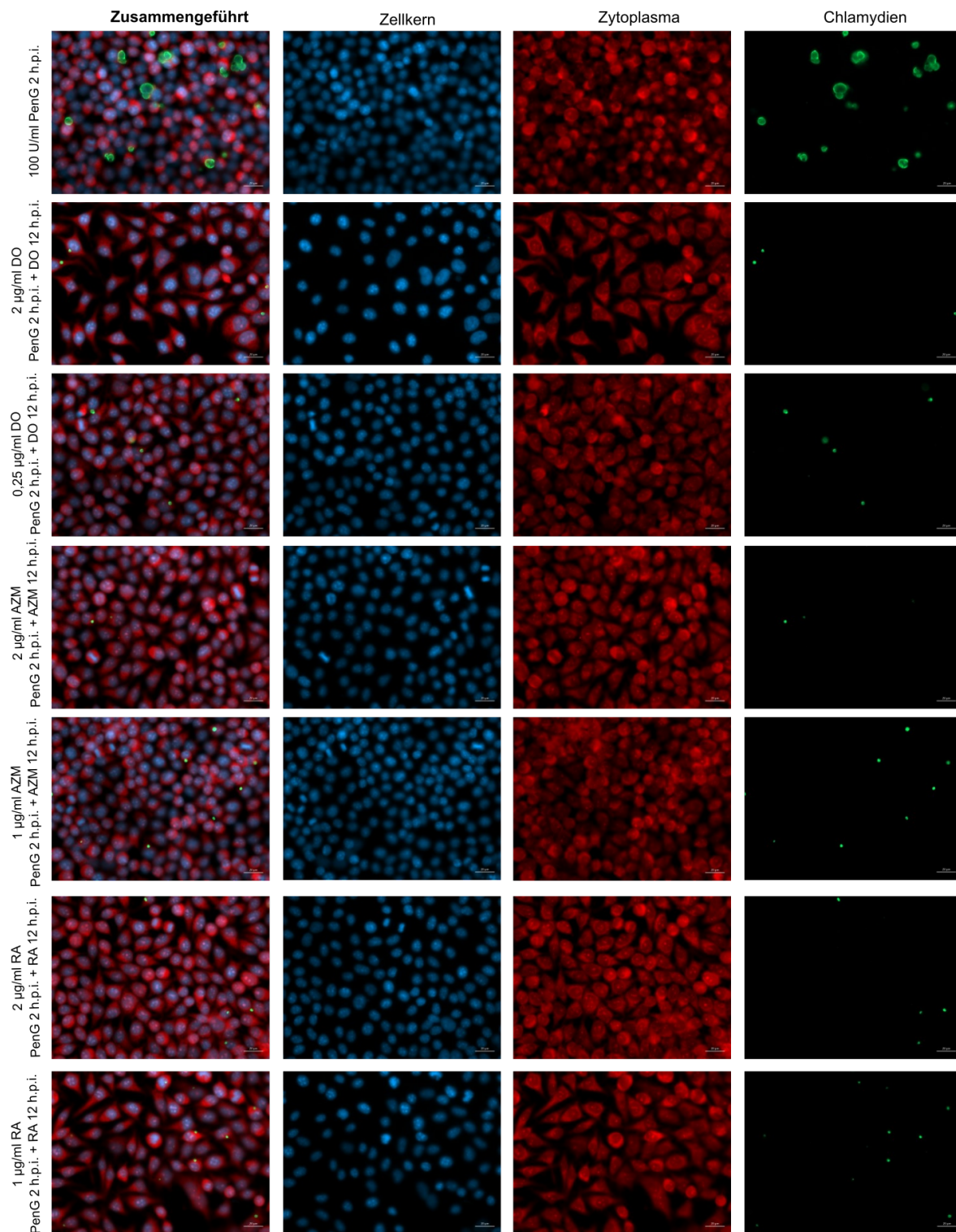


Abbildung 26: Mikroskopiebilder zur MHK-Bestimmung von Doxycyclin (DO), Azithromycin (AZM) und Rifampicin (RA) gegenüber *C. trachomatis*. Dargestellt sind die zusammengeführten Bilder sowie die einzelnen Kanäle zur Detektion der Zellkerne, des Zytoplasmas und der chlamydialen LPS. Penicillin G wurde 2 Stunden und die Substanzen 12 Stunden nach Infektion dazugegeben (Abbildung 24 D). h.p.i.: Stunden nach Infektion. Maßstabsleiste 20 µm.

5.3 Funktionsanalysen putativer chlamydialer β -Laktamasen

Unter Behandlung mit β -Laktam-Antibiotika wird bei den obligat intrazellulären Chlamydien ein besonderer, reversibler Zustand der Persistenz induziert, welcher durch die Bildung von vergrößerten in der Zellteilung blockierten aberranten Körperchen charakterisiert ist (Klöckner *et al.*, 2018).

Neben Untersuchungen von Substanzen auf ihre antibiotischen Eigenschaften, ist es auch unabdingbar, die Bakterienphysiologie besser zu verstehen. Ein tieferes Verständnis der Abläufe in Bakterienzellen ist unabdingbar für die Entwicklung neuer antibiotische Strategien. Die putativen chlamydialen β -Laktamasen, könnten bei näherer Charakterisierung ein neues, weiteres kleines Puzzleteil in der Erforschung der zellulären Prozesse in Chlamydien darstellen. Somit könnte das Erforschen der Funktion der putativen β -Laktamasen in Chlamydien das Wissen über diesen β -Laktam-induzierten Zustand der Persistenz sowie die chlamydialen Peptidoglykanbiosynthese- und Zellteilungsmechanismen erweitern.

Inwieweit die putativen chlamydialen β -Laktamasen in ihrer aktiven Form nach heterologer Expression in *E. coli* aufzureinigen sind (Tabelle 27), wurden dazu bereits erste Untersuchungen, in der Masterarbeit des Kandidaten (Krannich, 2017), begonnen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten diese Arbeiten nun fortgeführt werden, um biochemische Funktionsanalysen der Proteine zu ermöglichen. Spezies der Gattung *Chlamydia* sowie *Chlamydia*-ähnliche Bakterien kodieren für Homologe von putativen Metallo- β -Laktamasen, für die in *Bacillus* Funktionen im Zellwandmetabolismus und der Koordination von Zellteilung und DNA-Replikation postuliert wurden (Biller *et al.*, 2011). Darüber hinaus wurden in Genomen von Vertretern der *Chlamydia*-ähnliche Bakterien Gene identifiziert, welche für putative Serin- β -Laktamasen kodieren, deren Aktivität die Empfindlichkeit gegenüber β -Laktamen modulieren könnte.

In einem ersten Ansatz wurde bereits in der Masterarbeit versucht, die putativen chlamydialen β -Laktamasen in einem tet-Vektor-basierten System mit Chloramphenicol-Resistenzmarker in Fusion mit einem C-terminalen Strep-Tag (pASK_Iba2c) in *Escherichia coli* im Periplasma zu exprimieren und anschließend aufzureinigen. Die Überexpression und Aufreinigung der Proteine war jedoch nicht möglich, auch der Versuch, die Expression und Aufreinigung in aktiver Form über die Zugabe stabilisierender Co-Solventien (Otten *et al.*, 2015) zu ermöglichen, war nicht

erfolgreich. Auf dieser Basis wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein anderer, zielführender Ansatz gesucht. Hier wurden die β -Laktamase-Gene in ein T7-Vektor System mit N-terminalen Strep-Tag und Chloramphenicol-Resistenzmarker (pET-52bCamR) kloniert. Alle Klonierungen wurden mittels Sequenzierung (4.5.6) verifiziert. Eine Überproduktion mit dieser Strategie wurde für alle putativen β -Laktamasen (Tabelle 27), nicht erfolgreich. Das Aufreinigen von Proteinen aus Chlamydien in *E. coli* ist generell schwierig, da beide Organismen evolutionär weit entfernt sind und an unterschiedliche Lebensbedingungen angepasst sind (Otten 2015). Zukünftig könnte für die Überproduktion auf ein zellfreies oder auf ein eukaryotisches Überexpressionssystem zurückgegriffen werden.

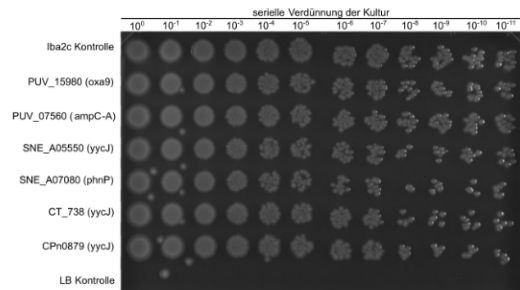
Da eine biochemische Charakterisierung ohne, in ausreichender Menge und in ihrer aktiven Form aufgereinigte, Proteine nicht möglich war, wurde im nächsten Schritt ein alternativer Lösungsansatz verfolgt.

Tabelle 27: In dieser Arbeit untersuchte putative chlamydiale β -Laktamasen und Konstrukte. ÜE: Überexpression; SAP: Spot-Plate-Assay

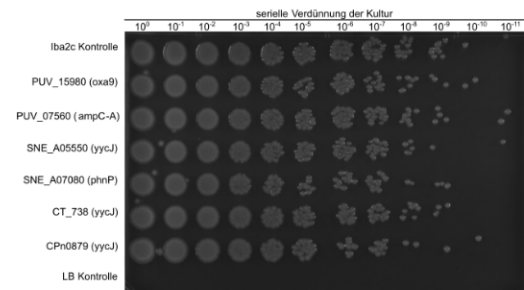
Name	Spezies	β -Laktamase Klasse	Locus tag	Vektor	Experiment	Referenz
PhnP	<i>Simkania negevensis</i>	Metallo- β -Laktamase	SNE_A07080	pASK_lba2c	ÜE SAP	Krannich, 2017
YycJ	<i>Simkania negevensis</i>	Metallo- β -Laktamase	SNE_A05550	pASK_lba2c	ÜE SAP	Krannich, 2017
YycJ	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Metallo- β -Laktamase	CT_738	pASK_lba2c	ÜE SAP	Krannich, 2017
YycJ	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Metallo- β -Laktamase	CPn0879	pASK_lba2c	ÜE SAP	Krannich, 2017
Oxa9	<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	Serin- β -Laktamase	PUV_15980	pASK_lba2c	ÜE SAP	Krannich, 2017
AmpC-A	<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	Serin- β -Laktamase	PUV_07560	pASK_lba2c	ÜE SAP	Krannich, 2017
YycJ	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Metallo- β -Laktamase	Ct_738	pET-52bCamR	ÜE	diese Arbeit
Oxa9	<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	Serin- β -Laktamase	PUV_15980	pET-52bCamR	ÜE	diese Arbeit
AmpC-A	<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	Serin- β -Laktamase	PUV_07560	pET-52bCamR	ÜE	diese Arbeit

Dazu wurden die putativen β -Laktamasen in *E. coli* exprimiert und *in vivo* hinsichtlich einer möglichen hydrolytischen Aktivität gegenüber β -Laktamen getestet. Es wurde versucht über einen sogenannte Spot-Plate-Assay (Abbildung 27) unter Verwendung subinhibitorischer Konzentrationen der Testantibiotika eine mögliche hydrolytische Aktivität gegenüber β -Laktamen nachzuweisen, welche sich in einer Reduktion der Empfindlichkeit des verwendeten *E. coli* Stammes widerspiegeln würde. In diesem Assay wurden die Konstrukte (Tabelle 27) unter Kontrolle eines *tet*-Promoters (pASK_lba2c) verwendet, welcher eine gute Kontrolle und Modulation der Expression auf niedrigem Niveau ermöglicht. Als Testantibiotika wurden die klassischen β -Laktamantibiotika Ampicillin und Oxacillin gewählt, weil die beiden gewählten Penicillinderivate nicht zu Behandlung von Chlamydien-Infektionen eingesetzt werden. Ampicillin gehört zum Substratspektrum einer Vielzahl an β -Laktamasen, inklusive der AmpC-, OXA- und Metallo- β -Laktamasen für die Homologe in Chlamydien gefunden wurden und in dieser Arbeit analysiert wurden. Die Phyre-Vorhersage (Kelley *et al.*, 2015) ergab eine hohe strukturelle Übereinstimmung zur Carbapenemase OXA-48 (Convidence 100 % und Coverage 89 %). Oxacillin war von Interesse, da dieses nicht nur von Metallo- β -Laktamasen, sondern auch von Carbapenemasen des OXA-Typs mit Serin im aktiven Zentrum hydrolysiert wird. In dieser Arbeit durchgeführte *in silico* Analysen zur Vorhersage der Proteinstruktur (Phyre Prediction (Kelley *et al.*, 2015)) ließen darauf schließen, dass insbesondere für das Protein PUV_15980 aus *Parachlamydia acanthamoebae*, annotiert als Oxa9, ein Effekt gegenüber Oxacillin erwartet werden könnte. Die Kulturen der Expressionsstämme, welche die unterschiedlichen Konstrukte beherbergten, wurden verdünnt und auf die vorbereiteten Platten getropft. Dabei nahm, von links nach rechts, die inokulierte Zellzahl durch eine serielle 1:10 Verdünnung ab (Abbildung 27).

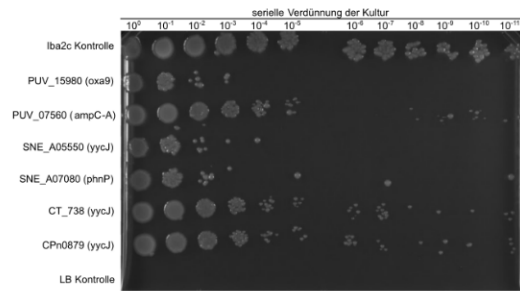
Kontrolle



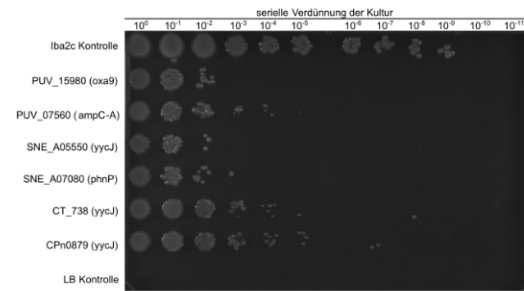
Präinkubation



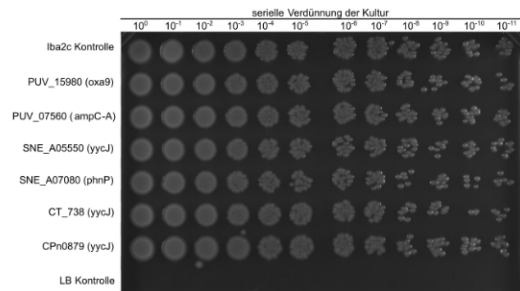
Induktor AHT



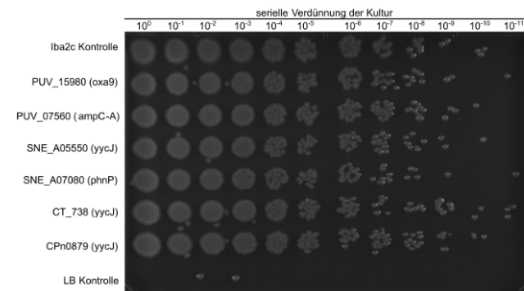
Induktor AHT, + Präinkubation



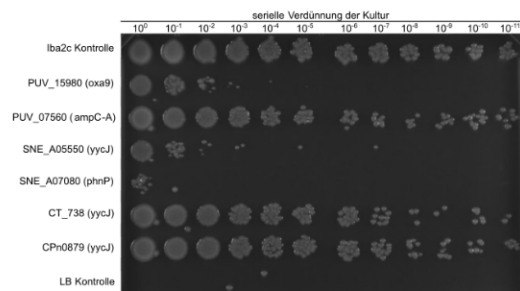
CAM 34 µg/ml



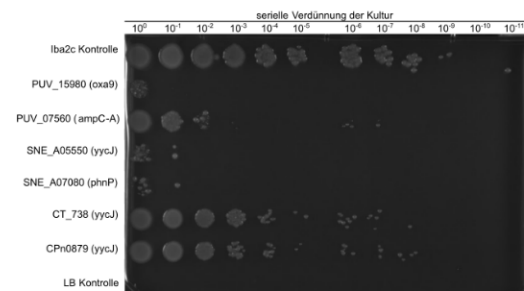
CAM 34 µg/ml, + Präinkubation



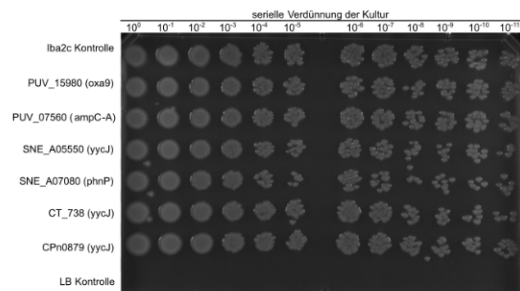
CAM 34 µg/ml, + Induktor AHT



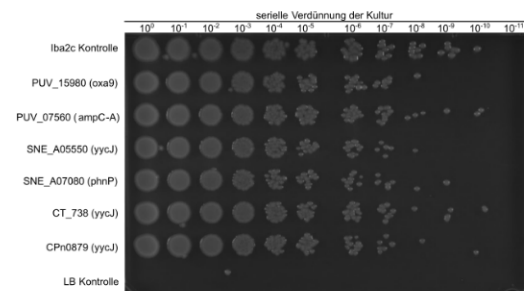
CAM 34 µg/ml, + Induktor AHT, + Präinkubation



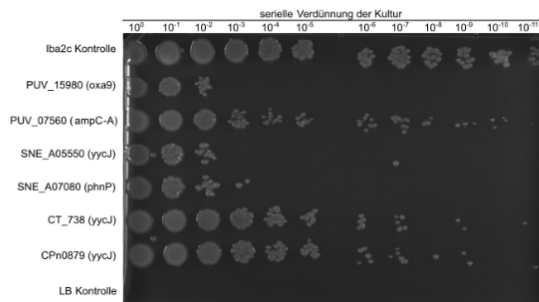
AMP 0,5 µg/ml



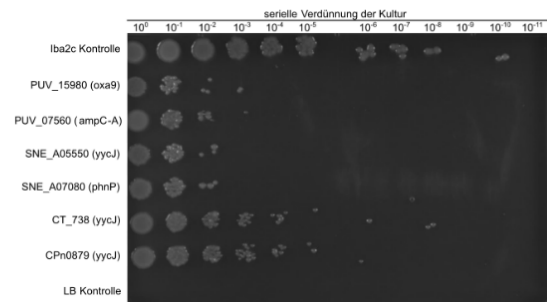
AMP 0,5 µg/ml, + Präinkubation



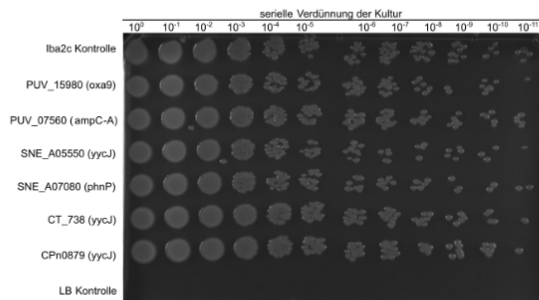
AMP 0,5 µg/ml, + Induktor AHT



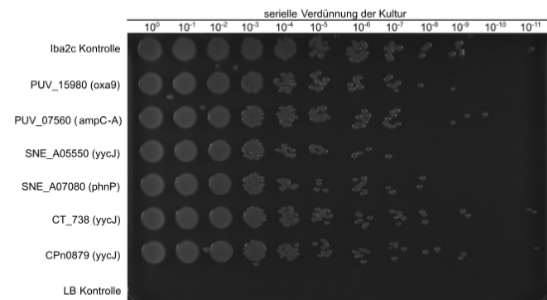
AMP 0,5 µg/ml, + Induktor AHT, + Präinkubation



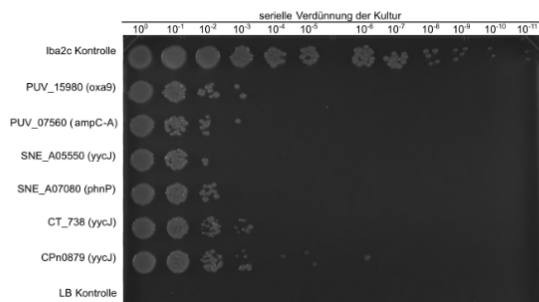
AMP 1 µg/ml



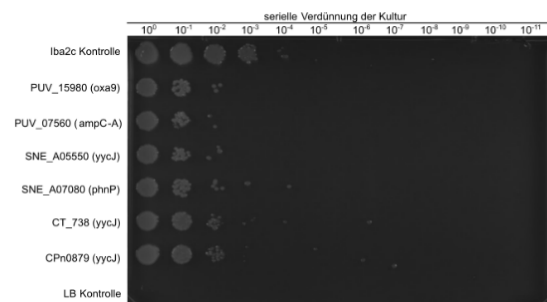
AMP 1 µg/ml, + Präinkubation



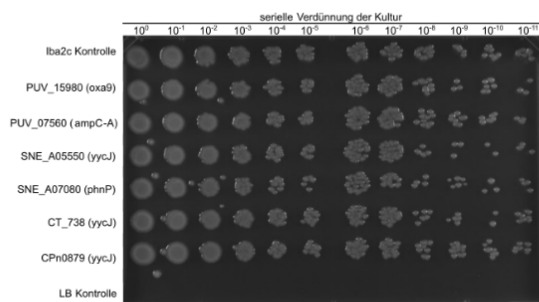
AMP 1 µg/ml, + Induktor AHT



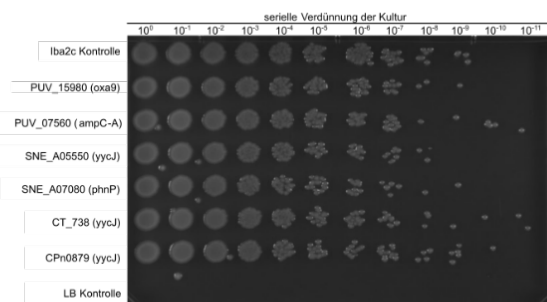
AMP 1 µg/ml, + Induktor AHT, + Präinkubation



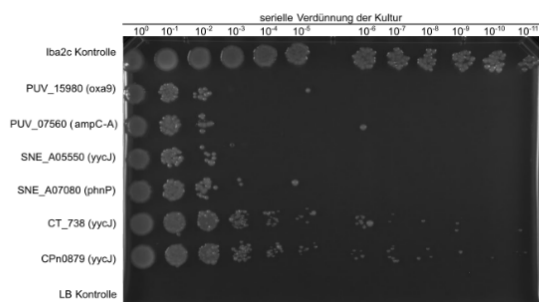
OXA 4 µg/ml



OXA 4 µg/ml, + Präinkubation



OXA 4 µg/ml, + Induktor AHT



OXA 4 µg/ml, + Induktor AHT, + Präinkubation

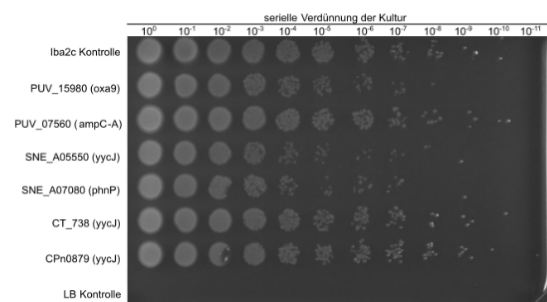


Abbildung 27: Spot-Plate-Assays zur Detektion von β -Laktamaseaktivität. Die Konzentration der inokulierten Bakterienkulturen nimmt von links nach rechts ab (serielle 1:10 Verdünnung).

Dargestellt sind alle getesteten Varianten nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C auf LB-Medium. Die Experimente erfolgten jeweils in An- und Abwesenheit des Expressionsinduktors AHT (50 ng/ml), mit und ohne Präinkubation der Kulturen mit AHT (50ng/ml) sowie nach Zugabe unterschiedlicher β -Laktame. AHT: Anhydrotetracyclin, LB: *Lysogeny Broth*, CAM: Chloramphenicol, AMP: Ampicillin, OXA: Oxacillin.

Mit Hilfe des Spot-Plate-Assays konnten keine Effekte detektiert werden, die auf eine β -Laktamase-Aktivität der analysierten putativen chlamydialen β -Laktamasen hindeuten, da die Expressionsstämme mit leeren Vektoren auch in Anwesenheit der getesteten β -Laktame besseres Wachstum aufwiesen als die Stämme, welche für die chlamydialen Proteine kodierten. Im Fall der putativen Carbapenemase PUV_15980 (*oxa9*) sowie den putativen Metallo-Enzymen SNE_A05550 (*yycJ*) und SNE_A07080 (*phnP*) war das Wachstum unter Expression der Konstrukte besonders stark beeinträchtigt. Dies deutet darauf hin, dass die Genprodukte evtl. eine Toxizität gegenüber *E. coli* aufweisen. Zusammenfassend konnte auch auf diesem Weg kein Hinweis darauf gefunden werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten putativen β -Laktamasen als funktionale β -Laktam-hydrolysierende Enzyme in den chlamydialen Genomen konserviert wurden.

5.4 Funktionelle Analysen zu LysM-Proteinen in *Chlamydiales*

LysM-Proteine kommen in Viren, Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Säugetieren vor (Buist *et al.*, 2008) und können Polysaccharide wie Peptidoglykan und Chitin binden, welche N-Acetylglucosamin-Untereinheiten enthalten (Buist *et al.*, 2008; Mesnage *et al.*, 2014). Für freilebende Bakterien wurde gezeigt, dass LysM-Proteine unter anderem zur Regulierung der Zellwandbiosynthese und Zellteilung beitragen (Mesnage *et al.*, 2014). In eukaryotischen Wirtsorganismen können sie wiederum durch Bindung von PG der Detektion von Bakterien dienen (Buist *et al.*, 2008; Mesnage *et al.*, 2014). In Chlamydien sind drei verschiedene LysM-Proteintypen zu finden, deren Funktion weitestgehend unerforscht ist, LysM I, LysM II und LysM III. Die LysM I-Proteine weisen 2 C-terminale LysM-Domänen auf und dienen in *C. pneumoniae* und *W. chondrophila* als Lipid II/ PG-Hydrolasen (Henrichfreise, Brunke and Viollier, 2016; Brunke, 2018). Die LysM III-Proteine besitzen mit Ausnahme des Homologs von *C.*

trachomatis eine C-terminale LysM-Domäne und sind gänzlich unerforscht (Brunke, 2018).

Die in dieser Arbeit untersuchten chlamydialen LysM II-Proteine besitzen C-terminal eine LysM-Domäne und werden mit Ausnahme des *Waddlia*-Homologs innerhalb des Tol/Pal-Operons kodiert (Tabelle 28) (Brunke, 2018). Für die fälschlicherweise als AmiB annotierten LysM II-Proteine wurde *in silico* eine Sekretion in das Periplasma vorhergesagt (Klößner, 2016; Brunke, 2018). Erste Untersuchungen in der AG Henrichfreise an dem Homolog aus *C. pneumoniae* deuten auf eine schwache Bindekapazität für PG und Interferenz mit der Zellteilung in *E. coli* hin (Brunke, 2018). Auf der Basis dieser Hinweise auf eine Rolle in der chlamydialen PG- und Zellteilungsmaschinerie sollen in dieser Arbeit die chlamydialen LysM II-Proteine weiterführend funktional analysiert werden. Dazu werden die Homologe aus den humanpathogenen Spezies *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* sowie aus dem „emerging pathogen“ *W. chondrophila* gewählt.

Tabelle 28: In dieser Arbeit analysierte chlamydiale LysM II-Proteine (Klößner, 2016; Brunke, 2018).

Protein	Organismus	Signalpeptid	LysM-Domäne	Locus tag	Operon
LysM II Ctr	<i>Chlamydia trachomatis</i>	sec	1x C-terminal	Ct_601	Tol/Pal
LysM II Cpn	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	sec	1x C-terminal	Cpn0780	Tol/Pal
LysM II Wch	<i>Waddlia chondrophila</i>	sec	1x C-terminal	WCW_0123	anderer genomischer Kontext

5.4.1 Pulldown-Bindeexperimente mit Peptidoglykan und Chitin

In diesen Experimenten soll zunächst untersucht werden, ob die LysM II-Proteine aus *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* und *W. chondrophila* funktionelle LysM-Bindedomänen aufweisen. Der Pulldown-Assay macht sich zu Nutze, dass die Testproteine im Fall einer Substrat-Bindung gemeinsam mit dem unlöslichen PG oder Chitin nach einem Zentrifugationsschritt im Pellet detektiert werden können.

Für alle Analysen wurden mittels eines C-terminalen Strep-Tag aufgereinigte LysM II-Proteine verwendet, die freundlicher Weise von Dr. Christian Otten aus der AG Henrichfreise zur Verfügung gestellt wurden. Die LysM II-Homologe aller untersuchten chlamydialen Spezies wurden in Pulldown-Assays teilweise oder vollständig in der jeweiligen Pellet-Fraktion mittels SDS-PAGE detektiert und weisen somit eine Bindung gegenüber den Biopolymeren PG und Chitin auf (Abbildung 28). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die LysM II-Homologe aus *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, und *W. chondrophila* eine funktionale LysM-Domäne aufweisen.

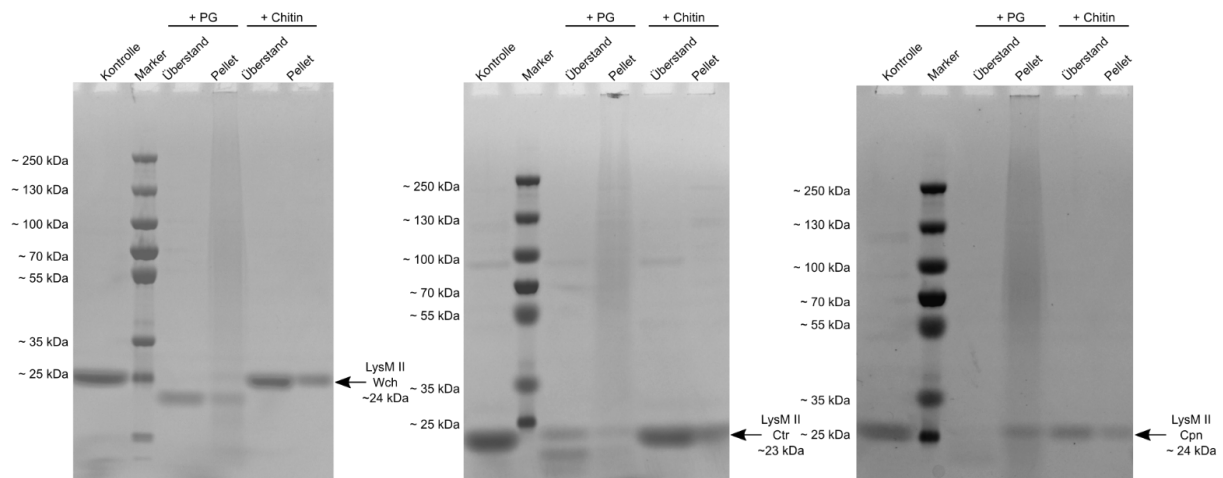


Abbildung 28: Analysen zur Bindung verschiedener chlamydialer LysM II-Proteine an PG oder Chitin. Die aufgereinigten LysM II-Proteine wurden mit PG oder Chitin inkubiert. Das PG oder Chitin wurde durch Ultrazentrifugation pelletiert und einmal mit Puffer gewaschen. Die SDS-PAGE-Gele mit den jeweiligen Testprotein- und Polysaccharid-Ansätzen wurden gefärbt und zeigen die jeweilige Protein-Laufkontrolle, den Überstand und die Pelletfraktion. Der Pfeil auf der rechten Seite zeigt die Position des jeweiligen LysM II-Proteins an. Alle getesteten LysM II-Proteine (Ct_601) aus *C. trachomatis*, Cpn0780 aus *C. pneumoniae* und WCW0123 aus *W. chondrophila* binden PG und Chitin. Im Fall von PG bleiben bei allen LysM II-Homologen Teile des eingesetzten Proteins an langkettigen Einheiten des Polymers in den Taschen und dem oberen Bereich des Gels zurück. Dr. Melanie Brunke konnte für das LysM II-Homolog aus *C. pneumoniae* zeigen, dass es keine Präzipitation in Abwesenheit eines Substrates aufzeigt (Brunke, 2018).

5.4.2 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie Binde-Analysen

Zur weiteren Charakterisierung der LysM II-Proteine wurde die hoch sensitive Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)-Analyse angewandt. Für SPR-Analysen müssen die zu testenden potentiellen Bindepartner in Puffer gelöst vorliegen. Um die Bindeeigenschaften der chlamydialen Proteine weiter zu definieren und erste Einblicke in die Substratspezifität zu gewinnen wurden nicht näher definiertes Glykogen, Maltotriose, D-(+)-Raffinose sowie N,N',N''-Triacetylchitotriose verwendet. Glykogen besteht aus verzweigten Glukose-Untereinheiten, die α -1,4-glykosidisch und vereinzelt α -1,6-glykosidisch miteinander vernetzt sind und in unterschiedlichen Kettenlängen vorliegen. Vergleichend zu dem heterogenen Polymer Glykogen wurde dessen Untereinheit Maltotriose eingesetzt, welche aus drei α -1,4-glykosidisch verbundenen Glukoseeinheiten besteht. Für diese Substrate wurde keine Bindung erwartet, da sich bisher die Substitution mit einer Amidgruppe in der C'2 Position der Saccharide als erforderlich erwiesen hatte. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde D-(+)-Raffinose eingesetzt, ein Trisaccharid bestehend aus Galaktose, Glukose und Fruktose, für das aufgrund der geringen Ähnlichkeit zu N-Acetylglucosamin-Untereinheiten ebenfalls keine Bindung an die getesteten LysM II-Proteine erwartet wurde. Ergänzend zum unlöslichen Polymer Chitin aus den Pulldown-Experimenten wurde die lösliche Chitin-Untereinheit N,N',N''-Triacetylchitotriose verwendet, welche aus drei β -1,4-glykosidisch verknüpften N-Acetylglucosamin-Untereinheiten besteht. Für die SPR-Analysen wurden die chlamydialen LysM II-Proteine aus *C. trachomatis* (Ct_601), *C. pneumoniae* (Cpn0780) und *Waddlia chondrophila* (WCW0123) zunächst auf einem Polycarboxylat-Chip kovalent gebunden, dessen Matrix aus linearen unverzweigten, unhydroxylierten Polycarboxylaten besteht und dafür entwickelt wurde, unspezifische Interaktionen mit Kohlenhydraten zu minimieren (Rücksprache mit dem Hersteller). Im nächsten Schritt wurden die Proteine mit verschiedenen Konzentrationen der der Test-Saccharide-Lösung überschichtet. Eine mögliche Bindung der Saccharide an den Proteinen sowie deren anschließende Dissoziation wurde anhand der Änderung des Oberflächen-Plasmonenresonanz-Signals detektiert. Überraschenderweise ergaben die Experimente, dass für die getesteten chlamydialen LysM II-Proteine aus *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* und *Waddlia chondrophila* eine Bindung von Glykogen und anschließend dessen vollständige Dissoziation beobachtet werden konnte (Abbildung 29).

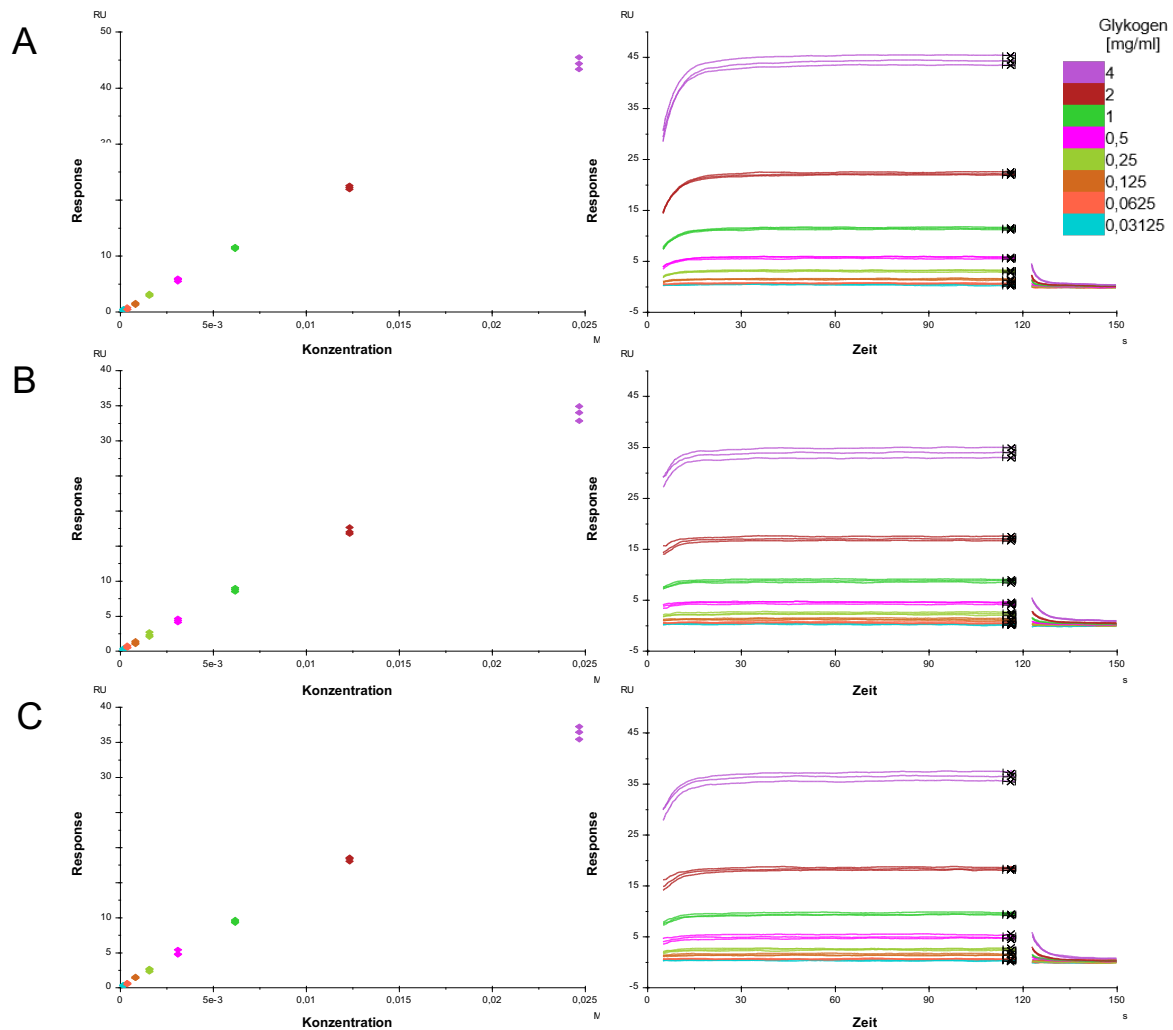


Abbildung 29: SPR-Analyse zur Bindung von Glykogen an die LysM II-Proteine (Ct_601) aus *C. trachomatis* (A), Cpn0780 aus *C. pneumoniae* (B) und WCW0123 aus *W. chondrophila* (C). Die Signalstärke korreliert mit der Glykogen-Konzentration und nimmt mit steigender Konzentration zu. Nach Wegnahme der Testsubstanz (mit x gekennzeichnet) dissoziiert diese wieder. RU: resonance unit; M: mol/l; s: Sekunde.

Bei Betrachtung der trimeren Zucker Maltotriose, D-(+)-Raffinose und N,N',N''-Triacetylchitotriose ergab sich ein anderes Bild. Für alle Testproteine Ct_601, Cpn0780 und Wcw0123 konnte weder für Maltotriose (Abbildung 30), noch für N,N',N''-Triacetylchitotriose (Abbildung 31) und D-(+)-Raffinose (Abbildung 32) eine ausgeprägte Bindung nachgewiesen werden. Das für die Immobilisierung der Proteine verwendete Matrixmaterial aus Polycarboxylaten vermochte, trotz seiner Entwicklung für die Reduktion von Interaktionen mit Kohlenhydraten, wie sie etwa mit Dextran-Matrixmaterialien auftreten (Hersteller Aussage), in geringem Umfang unspezifisch mit den Test-Kohlenhydraten zu interagieren. Dies spiegelte sich bei den Experimenten

wider in einer Bindung aller drei getesteten Trimeren Kohlenhydrate an die Referenzzelle, an deren Matrix keine Test-Proteine gebunden wurden, und führte zu einer Ausgabe negativer SPR-Messsignale (Abbildung 30, Abbildung 31, Abbildung 32). Diesen Effekten könnte in zukünftigen Experimenten entgegengewirkt werden durch das Beschichten der Referenzzelle mit einem inerten Referenzprotein, welches nachweislich keinerlei Interaktionen mit den zu testenden Zuckern ein geht. Zusammenfassend deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass die Wechselwirkungen der hier getesteten Zucker-Trimere mit den chlamydialen LysM II-Proteinen geringer sind als die unspezifischen Interaktionen mit der Polycarboxylat-Matrix der verwendeten Chips und somit vermutlich nicht von biologischer Relevanz sein dürften.

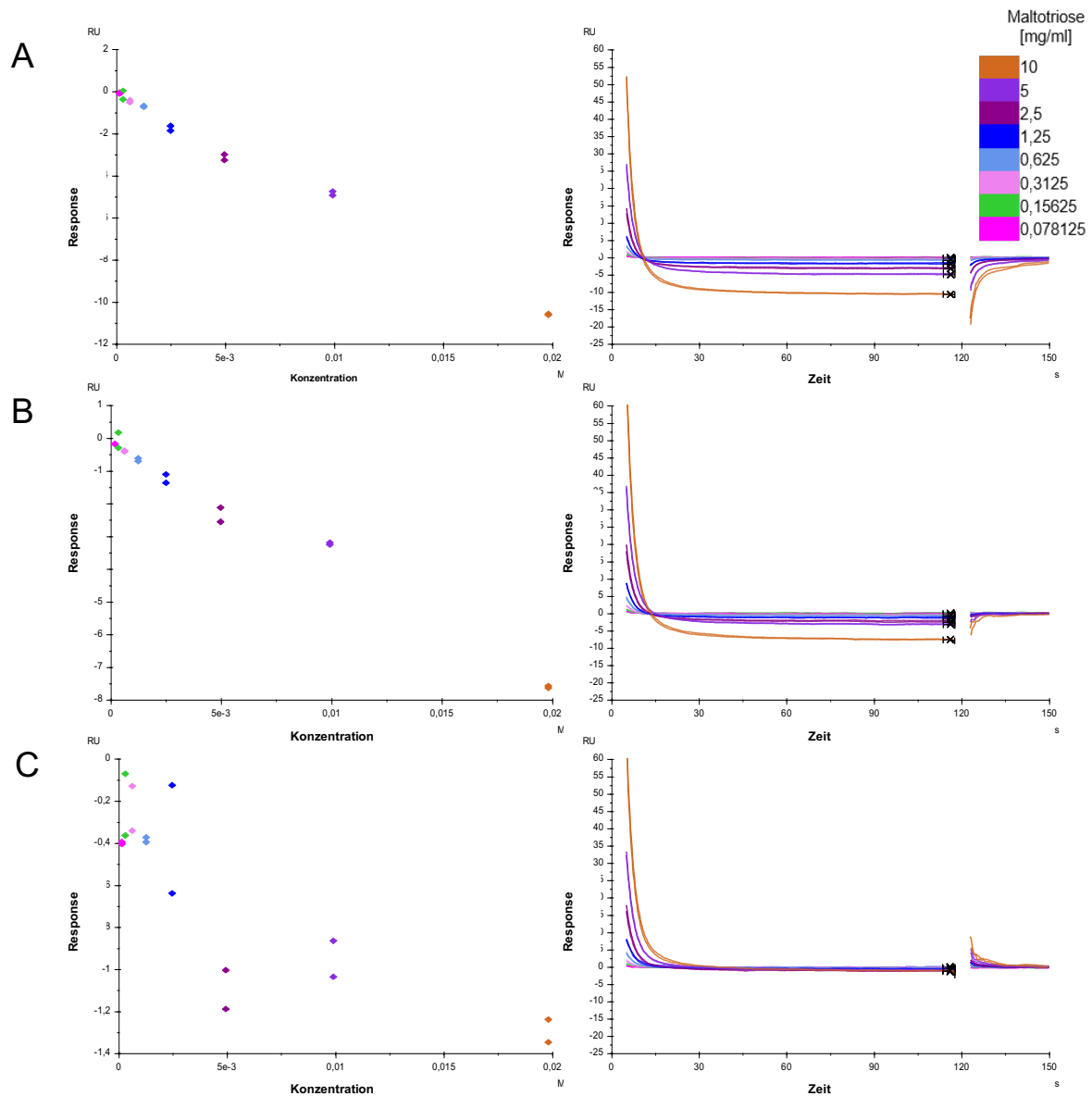


Abbildung 30: SPR Analyse Bindung von Maltotriose an LysM II-Proteine (Ct_601) aus *C. trachomatis* (A), Cpn0780 aus *C. pneumoniae* (B) und WCW0123 aus *W. chondrophila* (C). Es wurde keine spezifische Bindung detektiert. RU: resonance unit; M: mol/l; s: Sekunde.

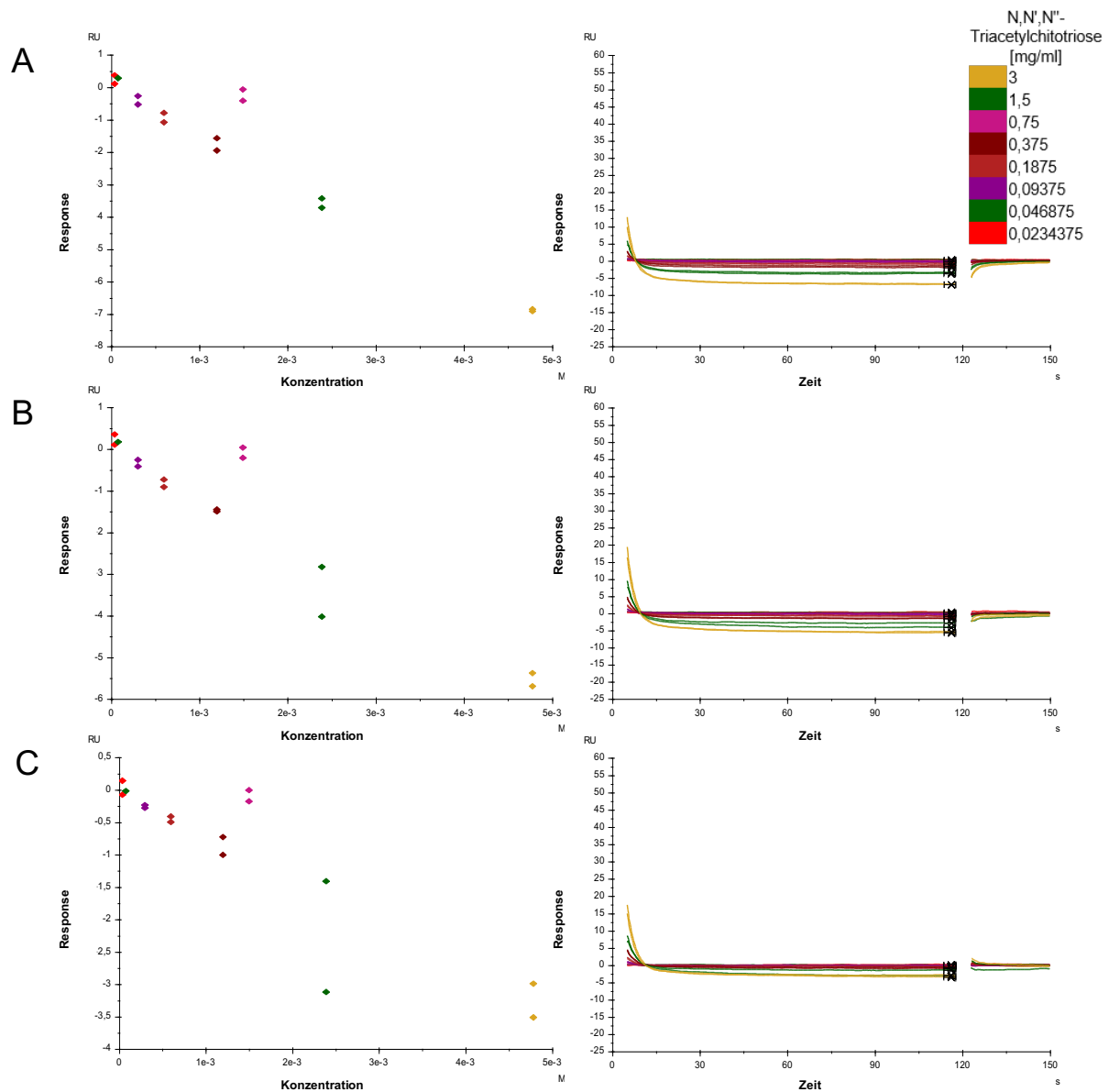


Abbildung 31: SPR Analyse Bindung von N,N',N''-Triacetylchitotriose an LysM II-Proteine (Ct_601) aus *C. trachomatis* (A), Cpn0780 aus *C. pneumoniae* (B) und WCW0123 aus *W. chondrophila* (C). Es wurde keine spezifische Bindung detektiert. RU: resonance unit; M: mol/l; s: Sekunde.

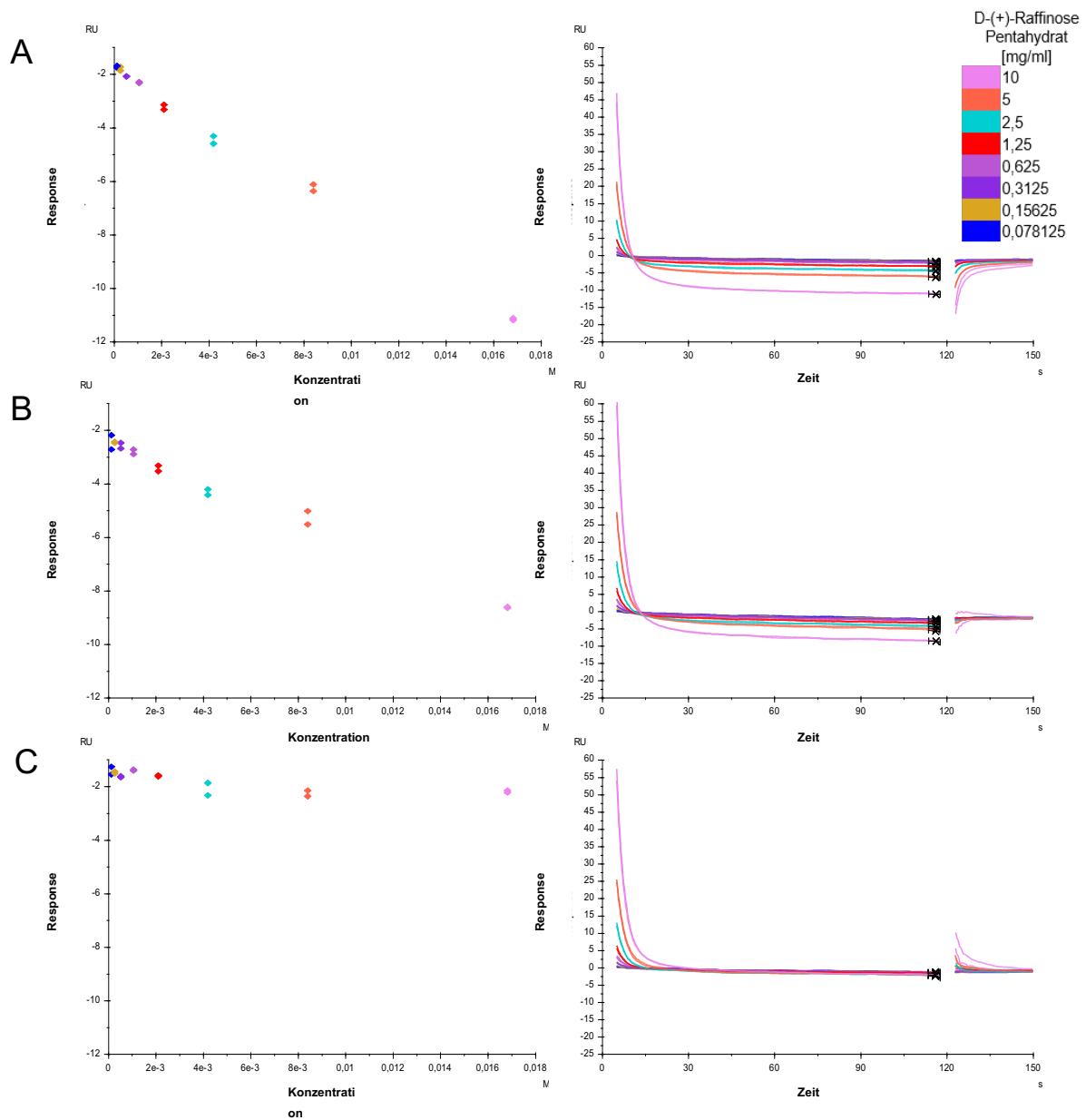


Abbildung 32: SPR Analyse Bindung von D-(+)-Raffinose an LysM II-Proteine (Ct_601) aus *C. trachomatis* (A), Cpn0780 aus *C. pneumoniae* (B) und WCW0123 aus *W. chondrophila* (C). Es wurde keine spezifische Bindung detektiert. RU: resonance unit; M: mol/l; s: Sekunde.

Von besonderem Interesse ist das Ergebnis, dass für die getesteten chlamydialen LysM II-Proteine Ct_601, Cpn0780 und WCW0123 aus *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* und *W. chondrophila* erstmals eine reversible Bindung an Glykogen, und somit generell die Möglichkeit von LysM-Proteinen Glykogen als Substrat zu verwenden, gezeigt werden konnte (Abbildung 29). Diese Funktion von LysM-Proteinen ist neu, da bisherige Analysen ergaben, dass LysM-Proteine bei der Substratbindung auf acetylierte Zucker angewiesen sind, wie das N-Acetylglucosamin in PG oder Chitin (Buist *et al.*, 2008; Mesnage *et al.*, 2014). Außerdem konnte in dieser Arbeit keine Bindung von Maltotriose, als Glykogentrioseuntereinheit, gezeigt werden, was nahelegt, dass für eine Bindung der chlamydialen LysM II-Proteine Ketten von mehr als 3 Untereinheiten benötigt werden (Abbildung 30). Bekräftigt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass in der SPR-Analyse keine Bindung von N,N',N''-Triacetylchitotriose gezeigt werden konnte (Abbildung 31), obwohl im Pulldown-Assay eine Bindung an Chitin nachweisbar war (Abbildung 28), welches aus langen β -1,4-glykosidisch verknüpften N-Acetylglucosamin-Ketten besteht. Für das LysM-Protein AtlA aus *Enterococcus faecalis* ist bekannt, dass dieses neben der Amidgruppe in der C2' Position des N-Acetylglucosamin mindestens 3 Saccharid-Untereinheiten für eine detektierbare Bindung benötigt (Mesnage *et al.*, 2014).

6 Diskussion

Das fragile Gleichgewicht von Ökosystemen wird seit den beiden vergangenen Jahrhunderten massiv gestört und die Globalisierung, der anthropogen-verursachte Klimawandel und Veränderungen im individuellen Lebenswandel stellen uns in der Infektiologie vor neue Herausforderungen. Zu diesen Herausforderungen zählt eine Zunahme von *Emerging Infectious Diseases* (Baker *et al.*, 2022). Der Klimawandel begünstigt das Vorkommen und die Ausbreitung von tropischen Erkrankungen weltweit (Caminade, McIntyre and Jones, 2019; Baker *et al.*, 2022). Dies wird am Beispiel von Denguefieber besonders deutlich. Seit der ersten Erwähnung der Krankheit in der Jin-Dynastie (in den Jahren 265 – 420 nach Christus) und der Erstisolation des Erregers im Jahr 1970 ist eine Verbreitung des Dengue-Virus hauptsächlich durch seinen Vektor *Aedes aegypti* weltweit zu beobachten, insbesondere in der Neuen Welt (Vasilakis and Weaver, 2008; Gubler, 2011; Caminade, McIntyre and Jones, 2019). Ehemals erregerefreie Habitate werden mehr und mehr durch den Vektor und den viralen Erreger besiedelt – so gibt es mittlerweile autochthone Fälle von Denguefieber in Südfrankreich (Guzman *et al.*, 2010; Succo *et al.*, 2016; ECDC, 2018).

Eine weitere große Herausforderung stellen Antibiotikaresistenzen dar, welche unter anderem in der westlichen Hemisphäre durch die unbedachte Verordnung und Einnahme von Antibiotika bei vermeintlich bakteriellen Infektionen (Machowska and Lundborg, 2019) oder in der östlichen und südlichen Hemisphäre durch direkten „*over the counter*“ Verkauf eigentlich verschreibungspflichtiger Medikamente zunehmen (Bilal, 2016; Aslam *et al.*, 2020). Nicht nur im humanmedizinischen Bereich werden Antibiotika eingesetzt, sondern auch in der Veterinärmedizin und insbesondere in der Massentierhaltung. In der Massentierhaltung werden Antibiotika nach wie vor auch als Wachstumsbeschleuniger verfüttert sowie gegen mögliche Infektionen prophylaktisch eingesetzt (Wegener *et al.*, 1999; Castanon, 2007). Resultierend aus dem massiven Einsatz von Antibiotika und einer Vernachlässigung der Antibiotikaforschung, verstärkt sich die Bildung von Resistenzen und so werden therapeutischen Optionen fortschreitend eingeschränkt (Levy and Marshall, 2004; Murray *et al.*, 2022). Es zeigt sich immer deutlicher, wie wichtig der verantwortungsvolle Umgang mit Antibiotika sowie die Entwicklung neuer antibiotischer Substanzen ist (Murray *et al.*, 2022).

Die Ausbreitung von Krankheitserregern wird durch die Globalisierung und den damit einhergehenden erhöhten Flug- sowie Warenverkehr sowie eine falschen Landnutzung begünstigt (Gubler, 2011; Guzman *et al.*, 2016; Brancalion *et al.*, 2020; Baker *et al.*, 2022). So konnte sich der Covid-19 Ausbruch mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit über Wuhan (China) über China, Nordamerika, Australien und Westeuropa und schließlich weltweit ausbreiten (Baker *et al.*, 2022; Tsiotas and Tselios, 2022).

Durch Abholzung und Urbanisierung natürlicher Lebensräume schrumpft der Lebensraum der Tiere, sodass diese gezwungen werden, sich näher an urbanen Gebieten aufzuhalten oder auf immer kleineren Flächen zusammenzuleben (Gubler, 2011; Schwind *et al.*, 2014; Khalil *et al.*, 2016; Brancalion *et al.*, 2020). In diesem Zusammenhang wurde auch festgestellt, dass sich die Erregerdichte antiproportional zur Artenvielfalt verhält, was unter dem Begriff „dilution effect“ zusammengefasst wird (Khalil *et al.*, 2016). Des Weiteren wurden in den letzten drei Dekaden über 30 neue humane Erreger detektiert, von denen 75 % zoonotischen Ursprungs waren (Jones *et al.*, 2008).

Diese Punkte zeigen, dass das Monitoring von *Emerging Infectious Diseases* an der Schnittstelle zwischen Mensch, Tier und Umwelt bedeutend ist.

Es ist notwendig, dass infektionsrelevante Fragestellungen interdisziplinär bearbeitet werden, um diese in Gänze zu verstehen (Cunningham, Daszak and Wood, 2017). Als Oberbegriff verwendet man für ein solches holistisches Vorgehen den *One Health-Ansatz*.

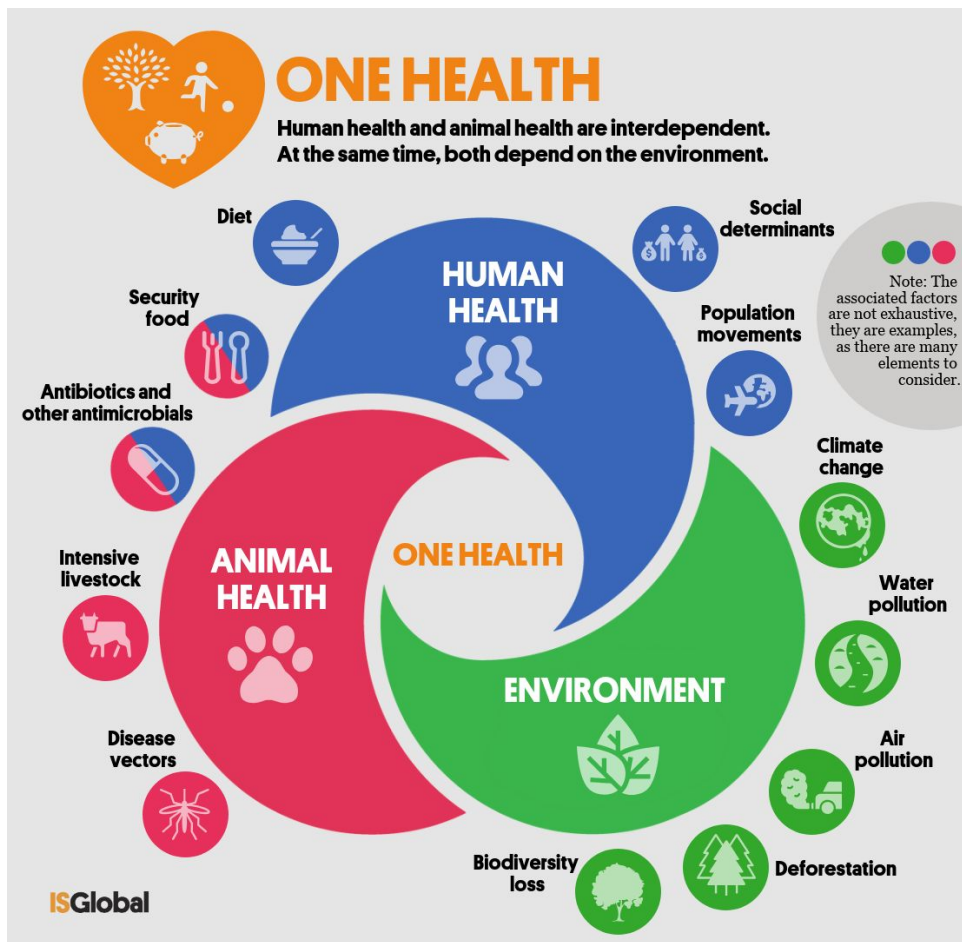


Abbildung 33: Interdisziplinäre Forschung im Rahmen des *One Health*-Ansatzes. Die Human-, und Tiergesundheit bilden zusammen mit der Umwelt drei untrennbar miteinander verbundene Säulen, auf welche wiederum viele einzelne Faktoren Einfluss nehmen (isglobal.org).

Der *One Health* (Eine Gesundheit)-Ansatz (Abbildung 33) beruht darauf, dass die Gesundheit von Menschen, Tieren und Ökosystemen untrennbar zusammenhängt und umfasst alle Faktoren wie bspw. Landwirtschaft, medizinische Versorgung/ Forschung und Verhaltensweisen, die auf die Gesundheit direkt oder indirekt einwirken können (Abbildung 33) und sich wechselseitig beeinflussen (Lerner and Berg, 2015). Elementar ist, dass nicht nur die einzelnen Fachbereiche betrachtet werden, sondern insbesondere auch die Schnittmengen dieser miteinander. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene zum *One Health*-Ansatz beitragende Disziplinen und Aspekte miteinander verbunden und aufgezeigt, wie detailliert *One Health* betrachtet werden kann und wie wichtig das Verständnis der relevanten Faktoren vom kleinen Einzelbeispiel hin zum globalen Konzept ist.

6.1 Bakterielle Erreger in Afrika

Die Biodiversität von *Chlamydiales* wurde lange massiv unterschätzt und die Bedeutung dieser Gruppe obligat intrazellulärer Bakterien ist noch immer nicht gänzlich aufgeklärt (Horn, 2008). Lange Zeit wurden nur die Vertreter der *Chlamydiaceae* als humanpathogene Erreger betrachtet, mit der bekanntesten Spezies *C. trachomatis*, welche ausschließlich Menschen infiziert. Studien haben aufgrund der molekularen Uhr berechnet, dass die Abspaltung von *C. trachomatis* von den anderen *Chlamydiaceae* vor ca. 6 Millionen Jahren stattgefunden hat (Steiper and Young, 2006; Nunes and Gomes, 2014). Es gibt jedoch neue Hinweise, die ein pathogenes Potenzial auch für *Chlamydia*-ähnliche Bakterien belegen (Corsaro and Greub, 2006), so beispielsweise für die Familien der *Simkaniaceae* und *Parachlamydiaceae*. Diese stehen im Verdacht, den Respirationstrakt und Bronchiolitis zu verursachen (Friedman, Dvoskin and Kahane, 2003; Greub, 2009). Ein anderes Beispiel ist für die Familie der *Waddliaceae* belegt, die zu Fehlgeburten führen können und außerdem im Verdacht stehen, zoonotisch übertragen werden zu können (Baud *et al.*, 2007, 2014).

Die in dieser Arbeit durchgeführte Mutter-Kind-Studie zeigt auf, dass die Untersuchungen von chlamydialen Infektionen während der Schwangerschaft weiter erforscht werden sollten. Dabei erhärtet sich der Verdacht, dass der gastrointestinale Trakt des Menschen ein Reservoir für *Chlamydia* darstellt (Rank and Yeruva, 2014). Die Infektion mit Chlamydien oder anderen sexuell übertragbaren Erregern stellen im Rahmen der Reproduktionsgesundheit und insbesondere während der Schwangerschaft und der Geburt ein hohes Risiko dar. In den Industriestaaten stellt dies durch Routineuntersuchungen, gute Behandlungsmöglichkeiten und Aufklärung kein derart eminentes Problem dar, wie in Ländern der Entwicklungszusammenarbeit in Afrika, Südamerika oder Indien (Korenromp *et al.*, 2017; Joseph Davey, Shull and Billings, 2020). Die Industriestaaten erleben jedoch ebenfalls eine Zunahme der sexuell übertragbaren Krankheiten, da das Risiko einer Infektion als vernachlässigbar angesehen wird – eben durch die besseren Früherkennungs- bzw. Behandlungsmöglichkeiten im Falle einer Infektion (Marcus, 2002). Dabei gehört die Infektion mit Chlamydien zu einer der häufigsten, sexuell übertragbaren Krankheiten weltweit (Newman *et al.*, 2015). Auch mehr als 100 Jahre nach der Erstbeschreibung und nach 70 jähriger Forschungsgeschichte zu diesen Erregern sind diese beim

Menschen weiterhin nicht impfvermeidbar und werden konventionell über eine zielgerichtete Antibiose behandelt (Phillips, Quigley and Timms, 2019). Im Gegensatz zu freilebenden Bakterien hat eine Behandlung mit β -Laktam-Antibiotika bei Chlamydien keine bakterizide, sondern nur eine bakteriostatische Wirkung, die durch einen persistierenden, aber nicht infektiösen Zustand gekennzeichnet ist (Skilton *et al.*, 2009; Shima *et al.*, 2013; Kintner *et al.*, 2014; Elwell *et al.*, 2016). Darüber hinaus behalten diese intrazellulären Krankheitserreger die Fähigkeit, ihre Infektiosität nach Abbau bzw. Entfernung der bakteriostatischen Substanz wiederherzustellen (Skilton *et al.*, 2009; Shima *et al.*, 2013; Kintner *et al.*, 2014). Bereits in den 1960er Jahren wiesen klinischen Beobachtungen darauf hin, dass β -Laktam Antibiotika für Chlamydien nicht letal sind (Holmes *et al.*, 1967; Richmond *et al.*, 1972). Daher werden β -Laktam Antibiotika nicht mehr zur Behandlung von Chlamydien-Infektionen bei Erwachsenen empfohlen. Dennoch werden diese häufig zur Behandlung anderer bakterieller Infektionen eingesetzt (Kacmar *et al.*, 2001). 75 % der chlamydialen Infektionen verlaufen asymptomatisch und eine Exposition gegenüber β -Laktamen während der Behandlung anderer bakterieller Infektionen kann *in vivo* zu einer Chlamydien-Persistenz führen (Kintner *et al.*, 2014). Eine Studie ergab, dass häufig verschriebene β -Laktam Antibiotika in Zellkultur in physiologisch relevanten Konzentrationen zu einer Persistenz von *C. trachomatis* führen (Kintner *et al.*, 2014). Das Antibiotikum Ceftriaxon aus der Gruppe der Cephalosporine ist ein Medikament, welches zur Behandlung von *Neisseria gonorrhoeae*-Infektionen empfohlen wird. Auch dieses zeigt eine Persistenz-induzierende Wirkung auf Chlamydien, die häufig in Co-Infektion mit Neisserien auftreten (Kintner *et al.*, 2014).

Um das Risiko einer Chlamydien-Persistenz für die öffentliche Gesundheit abzuschätzen, ist es wichtig, zu untersuchen, ob dies ein generelles Verhalten von Chlamydien bei der Behandlung mit β -Laktamen ist und dieses Phänomen auch auf molekularer Ebene besser zu verstehen. Bei der therapeutischen Anwendung von Antibiotika ist es bedeutend, mögliche Co-Infektionen mit verschiedenen sexuell übertragbaren Krankheiten zu beachten. Bei der Erforschung neuer Therapeutika, z.B. gegenüber zunehmend resistenten Gonokokken, ist außerdem darauf zu achten, diese auch in Bezug auf häufige Co-Infektionen zu untersuchen, denn es besteht die Gefahr eine primäre Infektion erfolgreich zu behandeln aber z.B. eine parallel vorliegende häufig symptomlose chlamydiale Infektion nur „pausieren“ zu lassen.

Wie schon in der Masterarbeit des Kandidaten im Rahmen von Vorarbeiten zur ghanaischen Fledermaus-Zecken-Studie gezeigt (Krannich, 2017), konnten in der vorliegenden Arbeit weitere Individuen der Gattung *Nycteris* positiv auf *Borrelia*, *Rickettsia* und *Chlamydiales* getestet werden. So konnten in der Masterarbeit (Krannich, 2017) und auch in dieser Arbeit erstmals Borrelien im Ausbreitungsgebiet südlicher 13° Nord, was der Höhe der Karibikinsel Barbados entspricht, in Zecken, welche von Fledermäusen der Gattung *Nycteris* gesammelt wurden, detektiert werden (Pappas *et al.*, 2006; Trape *et al.*, 2013;). In Ghana konnten Zecken bereits auf der großen Rohrratte (*Thryonomys swinderianus*; bekannt als „grass cutter“) gefunden werden (Adenyo *et al.*, 2020). Wie auch Fledermäuse, wird die große Rohrratte in West- und Zentralafrika gejagt und dient als Nahrung („bush meat“). Somit ist eine potentielle Übertragung von Krankheitserregern von diesen Tieren auf den Menschen möglich (Mickleburgh, Waylen and Racey, 2009; Adenyo *et al.*, 2020). In der oben genannten Studie konnten weder Borrelien, Chlamydien noch Rickettsien in Zecken von ghanaischen Rohrratten detektiert werden (Adenyo *et al.*, 2020). Im Gegensatz dazu, wurden im Rahmen dieser Arbeit in Zecken von ghanaischen Fledermäusen nicht nur alle drei Gruppen von Erregern detektiert, sondern konnten zusätzlich neue Familien innerhalb der *Chlamydiales* und *Rickettsia* durch Sequenzierung identifiziert werden, was die enorme Bedeutsamkeit von Feldstudien unter Berücksichtigung unterschiedlicher Tierarten belegt, um das regional vorliegende Erregerspektrum zu erfassen. Die in dieser Arbeit neu identifizierte Familie innerhalb der *Chlamydiales* mit 86 %iger Sequenzidentität zu *Neochlamydia hartmannellae* ist evolutiv eng verwandt mit *Parachlamydia* (Abbildung 34) (Horn *et al.*, 2000).

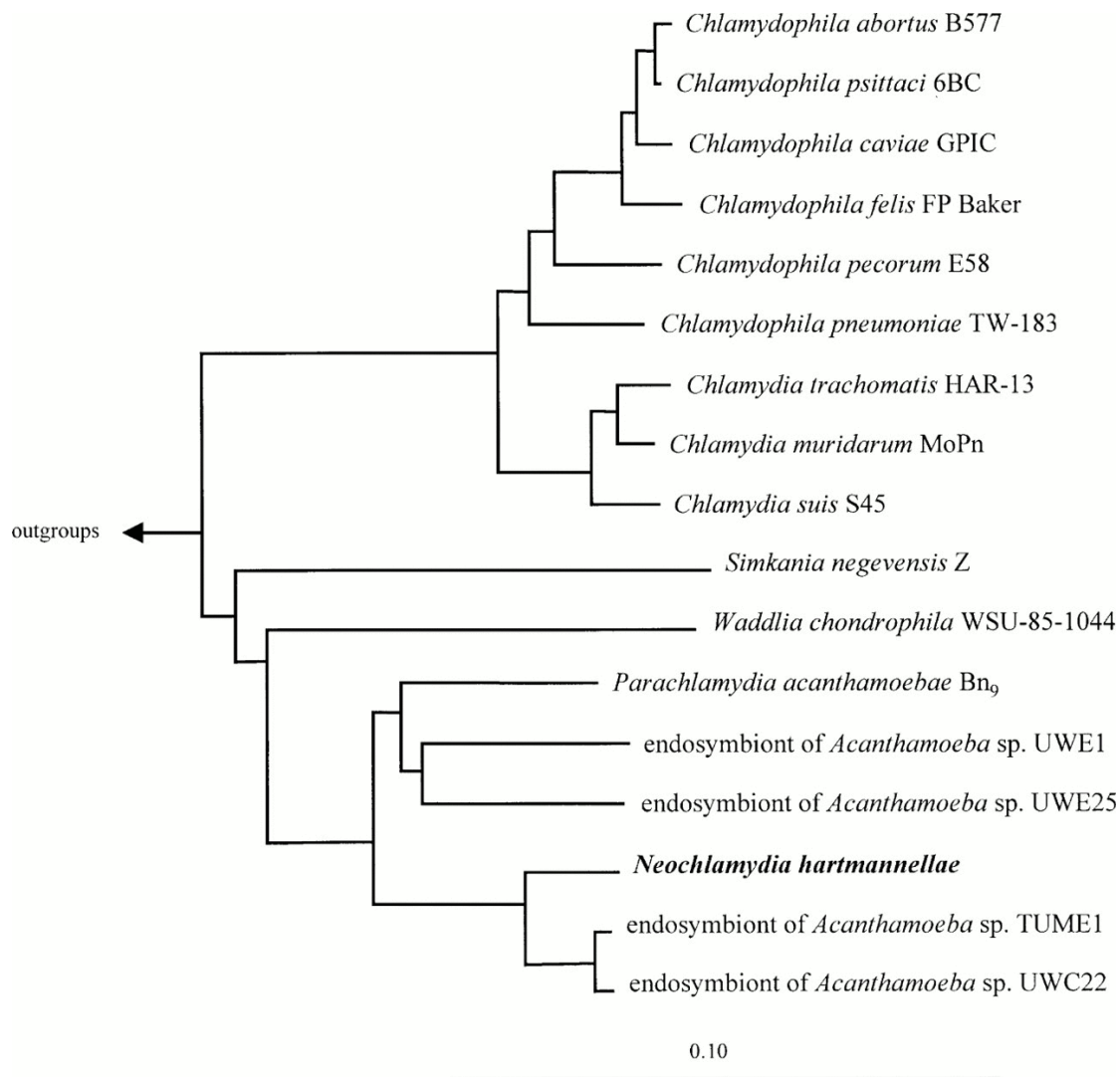


Abbildung 34: 16S rRNA-basierter Stammbaum zur Einordnung von *Neochlamydia hartmannellae* (Horn *et al.*, 2000).

Intrazelluläre Bakterien wie Chlamydien, Rickettsien oder Borrelien sind noch sehr unzureichend erforscht, trotz ihrer weltweiten Bedeutung als humanpathogene Erreger. Dies liegt insbesondere an der Besonderheit ihrer intrazellulären Lebensweise, welche molekularbiologische Untersuchungen insbesondere an Chlamydien und Rickettsien in der Vergangenheit stark einschränkte. Die Abhängigkeit von einer Wirtszelle ist ein großes Problem für die genetische Transformation und macht einfache Verfahren, wie beispielsweise das Klonieren, extrem schwierig. In den letzten Jahren konnten jedoch enorme Fortschritte bei der genetischen Manipulation von *C. trachomatis* und Rickettsien erreicht werden (Riley, Macaluso and Martinez, 2015; Wan *et al.*, 2023).

Der Covid-19-Ausbruch und die anschließende Pandemie haben gezeigt, wie schnell eine Übertragung vom Tier auf den Menschen eine Kettenreaktion mit verheerenden Ausmaßen auslösen kann (Shereen *et al.*, 2020; Beyer, Manica and Mora, 2021) und vermutlich sind Fledertiere dafür (mit-) verantwortlich (Beyer, Manica and Mora, 2021). Beispielhaft für eine Aufklärung der gesamten Infektionskette bis hin zum Ursprung ist der Ebola-Ausbruch von 2014 (Saéz *et al.*, 2015). Der Ursprung war ein Kind aus Meliandou (Guinea), welches sich bei Flughunden, die in einem hohlen Baum lebten, infizierte (Saéz *et al.*, 2015). Fledertiere stellen daher eine besondere Risikogruppe dar. Für die in dieser Arbeit untersuchten Spezies *Hipposideros cf. ruber* konnte bereits nachgewiesen werden, dass diese mit Coronaviren infiziert sein können (Corman *et al.*, 2015). Neben den Zecken sollten daher auch die Fledermäuse beprobt werden, von denen die analysierten Arthropoden gesammelt wurden, um weiterführend die Übertragung von Erregern zwischen den beiden Wirtsorganismen zu untersuchen. Weiterhin liegt der Schwerpunkt der Zoonosen-Forschung zumeist auf viralen Erregern. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass auch bakterielle Erreger nachzuweisen sind, die schwere Krankheiten auslösen können (Christou, 2011; Allocati *et al.*, 2016). Durch die weltweite Zerstörung von Habitaten (beispielsweise großflächige Abholzung von Wäldern) werden Tiere in immer engere Lebensräume gedrängt, sodass sich die Tiere in den Lebensraum der Menschen flüchten (Caminade, McIntyre and Jones, 2019). Durch diese räumliche Nähe steigt die Gefahr einer Übertragung vom Tier auf den Menschen beachtlich (Brancalion *et al.*, 2020; Wong *et al.*, 2020; Baker *et al.*, 2022). Weiterhin führt der Klimawandel mit allen seinen Effekten dazu, dass Vektoren wie Zecken oder Moskitos, die eher in warmen Umgebungen vorkommen, sich nun teilweise in nördlicheren Gebieten ausbreiten und somit Krankheiten wie Gelb-, West-Nil-, Dengue-Fieber und Malaria verstärkt vorkommen können (Wu *et al.*, 2016; Brancalion *et al.*, 2020; Rahman *et al.*, 2020; Wong *et al.*, 2020). Um gleichzeitig neue und alte Infektionsketten und Erreger zu bestimmen, ist es wichtig, Menschen, Tiere, Parasiten, Vektoren und Erreger zu beproben und phylogenetisch zu bestimmen. Durch eine zoonotische „Kartierung“ können mögliche Ausbrüche schneller eingedämmt und Bekämpfungsstrategien entwickeln werden. Um Ausbrüche zu melden und zu verfolgen, gibt es verschiedene Warnsysteme auf europäischer (*European Early Warning and Response System*, EWRS) und auch globaler Ebene (*Global Outbreak Alert and Response Network*, GOARN). Für den Erfolg dieser Warnsysteme ist es wichtig, dass alle Länder ihre

Informationen teilen (Zinsstag *et al.*, 2018). Ebenso wichtig ist, alle Teildisziplinen der Mikrobiologie zu involvieren, da wie diese Studie zeigt, auch mehrere Pathogene aus verschiedenen Erregergruppen in unterschiedlichen Vektoren vorkommen können. Dies impliziert, dass die Durchführung von Feldstudien nicht nur sinnvoll, sondern unumgänglich ist, um mögliche neue Gefahren zu erkennen und Risiken der Verbreitung von neuartigen und bekannten Erregern vorzubeugen. Dies untermauert auch die auf Madagaskar durchgeführte Peststudie, zu der die vorliegende Arbeit beigetragen hat. Zugleich kann an dieser Studie auch die Bedeutung von interdisziplinärer Forschung unter der Begrifflichkeit des *One Health-Ansatzes* gezeigt werden. Neben dem im Fokus stehenden bakteriellen Erreger der Studie, *Yersinia pestis*, konnten in den analysierten Proben beispielsweise auch *Chlamydia*-ähnliche Bakterien sowie kritische virale Erreger wie zum Beispiel hämorrhagische Hantaviren nachgewiesen werden. Die Studie zeigte zudem deutlich auf, wie wichtig es ist, dass Studien holistisch angelegt sind und nicht nur einzelne biologische Parameter wie Erregervorkommen und Übertragungswege betrachtet werden.

Um die Wechselwirkungen des Erregers mit der Umwelt zu verstehen, müssen beispielsweise die geographischen und sozioökonomischen Parameter, wie Haushaltseinkommen, Bildungsgrad, Zugang zu medizinischen Einrichtungen mit einzubeziehen und deren Wechselwirkungen zu analysieren (Jones *et al.*, 2008; Caminade, McIntyre and Jones, 2019; Redding *et al.*, 2019; Baker *et al.*, 2022).

Wichtig ist also, dass der Erreger oder deren Vektor nicht isoliert betrachtet werden, sondern immer im holistischen (bspw. lokalen und regionalen) Kontext.

6.2 Testung möglicher neuer antibiotischer Substanzen

Entscheidend für antimikrobielle Substanzen ist, dass sie eine selektive Aktivität gegenüber dem Krankheitserreger aufweisen und nicht toxisch wirken, d.h. den zu therapierenden Patienten nicht schädigen. Für die klinische Zulassung dringend benötigter neuer antibiotischer Substanzen sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin, sind die Anforderungen sehr hoch. Unter anderem muss frühzeitig im Prozess untersucht werden, ob die Substanzen zytotoxische Effekte auf humane Zellen ausprägen. Hierfür gibt es verschiedene Methoden (Bácskay *et al.*, 2018), welche, wie der in dieser Arbeit angewendete gängige Assay den Zellmetabolismus detektieren oder aber auch weitere Experimente, die über die Detektion der

Mitochondrien-Aktivität, Zellmembranintegrität, Protein/Protease-Aktivität, DNA-Replikation oder Zellteilung funktionieren (Adan, Kiraz and Baran, 2016). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das synthetische DCAP im Vergleich zu der schwachen ionischen Säure CCCP geringfügig zytotoxischer ist, jedoch weniger zytotoxisch als die kleinen THCz-Moleküle (Reithuber *et al.*, 2021; Ludwig *et al.*, 2024). Bei den beobachteten Effekten der zytotoxischen Analysen zeigten sich quantitative Unterschiede in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinien und Medien, die bei verschiedenen Inkubationszeiten unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Auf dieser Basis ist es empfehlenswert, nicht nur Daten aus einem einzigen Testaufbau auszuwerten, sondern verschiedene zu kombinieren, um ein umfassenderes Bild über die Zytotoxizität zu erhalten.

Die Überprüfung neuer Substanzen auf einen möglichen hämolytischen Effekt hin ist ein weiterer wichtiger Schritt, um Erkenntnisse zur Toxizität zu gewinnen, bevor anschließende Versuche im Tiermodell in Betracht kommen. Wie schon von Ramchuran *et al.* gezeigt, konnte auch in dieser Arbeit keine hämolytische Aktivität auf Erythrozyten bei einer bis zu sechsstündiger Inkubation durch Teixobactin und Hypeptin detektiert werden (Ramchuran *et al.*, 2018; Crüsemann *et al.*, 2021). Bei einer längeren Inkubationszeit zeigt Teixobactin eine stärkere Hämolyse als Hypeptin, der Grund hierfür ist nach aktueller Studienlage unklar.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Heike Brötz-Oesterheld der Universität Tübingen konnten wir frühere Toxizitätsstudien erweitern, die zeigten, dass DCAP bei 50 μM (20,7 $\mu\text{g/ml}$) mäßig toxisch für rote Blutkörperchen von Kaninchen ist (Eun *et al.*, 2012; Ludwig *et al.*, 2024). In dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung der Hämolyse von menschlichen roten Blutkörperchen zeigt, dass DCAP, nicht aber CCCP, bis zu 128 $\mu\text{g/ml}$ inert ist (Ludwig *et al.*, 2024). Bei menschlichen Hep2-Zellen als auch bei McCoy-Zellen der Maus konnte eine Zeit- und dosisabhängige zytotoxische Wirkungen für DCAP beobachtet werden (Ludwig *et al.*, 2024). Wichtig ist, dass die Toxizität nicht durch größere Membranläsionen verursacht wurde, da selbst bei einer 4-fachen IC_{50} keine Wirkung von DCAP auf die Membranintegrität eukaryotischer Zellen festgestellt wurde (Ludwig *et al.*, 2024). Da die Membranintegrität von *B. subtilis*-Zellen bei der 4-fachen MHK stark beeinträchtigt war, verdeutlicht dies erneut die Bedeutung der spezifischen Interaktion mit einem molekularen Ziel, das in Bakterienzellen vorhanden ist, aber in

menschlichen Plasmamembranen nicht vorkommt (Ludwig *et al.*, 2024). Zu beachten ist, dass eukaryotische Polyprenyl-Pyrophosphat-Analoga wie Nona- oder Decaprenyl-Pyrophosphat und Dolichyl-Pyrophosphat in mitochondrialen Membranen vorhanden bzw. an der N-Glykosylierung von Proteinen im endoplasmatischen Reticulum beteiligt sind (Ludwig *et al.*, 2024). Es konnte gezeigt werden, dass DCAP die Mitochondrien in Hep2-Zellen mit einer 4-fachen IC₅₀ depolarisiert, was sich früheren Beobachtungen deckt, die eine Depolarisierung von Mitochondrien in menschlichen Epithelnierenzellen (HEK) beschrieben (Ludwig *et al.*, 2024). Ähnlich wie bei HEK-Zellen war die Viabilität von Hep2-Zellen bei kurzer Behandlungsdauer nahezu unbeeinflusst, jedoch verringerte sich diese bei längeren Inkubationszeiten (Ludwig *et al.*, 2024).

Im nächsten Teil dieser Arbeit wurde die antibiotische Substanz Corallopyronin A (CorA) im Kontext mit chlamydialen Infektionen sowie bezüglich einer möglichen Wirkung auf Biofilme bei *S. aureus* untersucht. CorA ist ein α -Pyrone Antibiotikum, das an die bakterielle DNA-abhängige RNA-Polymerase bindet (Shima *et al.*, 2018). Als obligat intrazelluläre Bakterien sind Chlamydien bereits intrinsisch gegenüber Substanzen geschützt, welche initial nicht in die eukaryotische Zelle einzudringen vermögen (Sandoz and Rockey, 2010). Zusätzlich können Chlamydien in eine persistierende, fast inaktive Stoffwechselform übergehen, was eine antibiotische Behandlung noch schwieriger macht. Dieser Zustand der Persistenz wird beispielsweise unter Behandlung mit Zellwandantibiotika wie Penicillin induziert (Abbildung 25, PenG). CorA inhibiert die bakterielle DNA-abhängige RNA-Polymerase (RNAP) (Mukhopadhyay *et al.*, 2008). Isoliert wurde CorA aus dem gramnegativen Myxobakterium *Coralloccoccus coralloides* Cc c127 (Irschik *et al.*, 1985; Bouhired *et al.*, 2019). Bekannt ist eine antibiotische Wirkung u.a. gegenüber Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stämmen und den obligat intrazellulären *Wolbachien* (O'Neill *et al.*, 2000; Schäberle *et al.*, 2014). Letztere sind essentielle Endosymbionten von Filarien (Taylor, Bandi and Hoerauf, 2005). *Wuchereria bancrofti* und *Brugia* spp. lösen eine lymphatische Filariose aus, während *Onchocerca volvulus* die Onchocerciasis verursacht (Hoerauf *et al.*, 2011). Die lymphatische Filariose und Onchocerciasis gehören zu den vernachlässigten tropischen Erkrankungen (*neglected tropical diseases*; NTDs) (Hoerauf *et al.*, 2011), an denen geschätzt 120 Millionen Menschen in 80 Ländern in den Regionen Sub-Sahara Afrika, Indien, Südostasien, Teile von Südamerika, Karibik und im Südpazifik-Raum erkranken (Pfarr *et al.*, 2009;

Schäberle *et al.*, 2014). Durch das Abtöten der Wolbachien werden die Filarien indirekt abgetötet. Dabei wird bei einer Dosierung mit 1 µg/ml CorA *in vitro* dieselbe Aktivität gegenüber Wolbachien erzielt wie bei einer Behandlung mit 4 µg/ml Doxycyclin (Schiefer *et al.*, 2012).

Für CorA konnte eine antibiotische Wirkung auch gegenüber aktiven Chlamydien-Infektionen *in vitro* sowie im human Eileitermodellen festgestellt werden (Loeper *et al.*, 2019). Ziel dieser Arbeit war es nun, zu analysieren, ob CorA insbesondere auch gegenüber klinisch relevanteren und schwierig zu behandelnden persistierenden Chlamydien-Infektionen Aktivität zeigt. In der Tat gelang es in dieser Arbeit nachzuweisen, dass Chlamydien, die in einer durch Penicillin induzierten Persistenz vorlagen, mit CorA abgetötet werden konnten (Tabelle 26). Somit könnte CorA eine Chance für die Chlamydien-Therapie darstellen. Im weiteren Schritten wäre es lohnenswert, das Interferon-γ Persistenz Model als ein weiteres mechanistisch abweichendes Modell zur chlamydialen Persistenz hinsichtlich eines inhibitorischen Effekts durch CorA zu untersuchen (Beatty, Byrne and Morrison, 1993; Beatty *et al.*, 1994). Chlamydien sind, durch ihr reduziertes Genom, auf intrazelluläres Tryptophan angewiesen. Zu wenig Tryptophan in der Wirtszelle führt bei *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* zu einem Stoppen der chlamydialen Zellteilung, ähnlich der Penicillin-induzierten Persistenz (Wyrick, 2010) In der Wirtszelle wird durch das proinflammatorische Zytokin Interferon-γ das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase aktiviert, dass Tryptophan abbaut (Beatty *et al.*, 1994). Durch diesen proinflammatorischen Mechanismus versucht die Wirtszelle die Infektionserreger zu schwächen oder durch Rekrutierung zusätzlicher Komponenten der humoralen Immunantwort auszurotten. Eine Verknappung der Tryptophan-Vorräte in der Wirtszelle führt nicht zu Eradikation der Chlamydien (Beatty, Byrne and Morrison, 1993; Beatty, Morrison and Byrne, 1995). Obwohl der chlamydiale Stoffwechsel und die Replikation stark verlangsamt sind und keine infektiösen Chlamydien produziert werden, bleiben die Zellen lebensfähig und können in ein reproduktives Stadium zurückkehren, sobald Tryptophan wieder verfügbar ist (Beatty, Byrne and Morrison, 1993; Beatty, Morrison and Byrne, 1995).

Durch die Ausbildung von Biofilmen sind Bakterien in der Lage sich gegen ungünstige Umweltbedingungen oder die Behandlung mit Antibiotika zu schützen (Roy *et al.*, 2018). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CorA eine gute Wirkung gegenüber bestehenden und entstehenden Biofilmen aufweisen. Die

Untersuchungen wurden nur mit dem Biofilmbildner *S. aureus* ATCC 25923 durchgeführt, welcher als potenter Biofilmbildner beschrieben ist (Fallarero *et al.*, 2013; Manner *et al.*, 2017). Besonders kritisch sind in diesem Fall die Bildung von Biofilmen an Herzschrittmachern oder anderen Implantaten, die zu Abstoßreaktionen bis hin zur Sepsis führen können (Tuon *et al.*, 2023). Es gibt einige bereits bekannte Wirkungsweisen von Anti-Biofilm Substanzen, die über die Hemmung bzw. Störung der Quorum-Sensing-Pfade, Adhäsionsmechanismen, Zerstörung von extrazellulärer DNA, Proteinen, Lipopolysacchariden, Exopolysacchariden und sekundäre Botenstoffe wirken, die an verschiedenen Signalwegen beteiligt sind (Roy *et al.*, 2018). Es ist möglich, dass CorA, ähnlich zu Rifampicin, die Fähigkeit besitzt Biofilme zu durchdringen (Ferreira *et al.*, 2024). Biofilme sind für ca. 50 % der nosokomialen Infektionen (Krankenhausinfektionen), über Kontaminationen an Geräten/ Utensilien, die in den Körper eingebracht werden, wie beispielsweise Katheter, künstliche Gelenke und Herzklappen, verantwortlich (Wu *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2018). Bei einer Therapie ist zu beachten, dass, wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, eine subinhibitorische Konzentration von Antibiotika zu einer verstärkten Bildung von Biofilm führen kann (Kaplan *et al.*, 2012; Howlin *et al.*, 2017; Koo *et al.*, 2017; Ranieri, Whitchurch and Burrows, 2018). Es konnte gezeigt werden, dass bei 0,25-fach bis 1-fach MHK-Konzentrationen die Bildung des Biofilms in Vergleich zur Wachstumskontrolle begünstigt wird (Abbildung 22).

6.3 Neuer Einblick in die Funktionen chlamydialer LysM-Proteine

Im Laufe der Koevolution mit ihrem Wirt wurden die Genome von Chlamydien auf ein Minimum an Genen reduziert, die für ihren obligatorischen intrazellulären Lebensstil benötigt werden (Collingro *et al.*, 2011). In ihrer intrazellulären Nische sind *Chlamydiaceae* vor dem extrazellulären osmotischen Druck geschützt (Jacquier, Viollier and Greub, 2015; Klöckner *et al.*, 2018; Otten *et al.*, 2018). Die reduktive Anpassung an ihren Wirt spiegelt sich im Verlust einer energiekostenintensiven Zellwand wider, welche freilebende Bakterien umhüllt, um mechanische Festigkeit und osmotische Stabilisierung zu vermitteln (Jacquier, Viollier and Greub, 2015; Klöckner *et al.*, 2018; Otten *et al.*, 2018). *Chlamydiaceae* produzieren jedoch einen transienten PG-Ring, welcher essentiell für die Zellteilung ist (Liechti *et al.*, 2016).

PG ist einzigartig für Bakterien und besteht aus einem Netzwerk von linearen Glykanketten, die durch vernetzte Peptide verbunden sind. Die PG-Biosynthese beginnt im chlamydialen Zytoplasma mit der Bildung von UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) und UDP-N-Acetylmuramyl (UDP-MurNAc)-Pentapeptid. Die Vorläufer UDP-GlcNAc sowie (UDP-MurNAc)-Pentapeptid werden verwendet, um Lipid II an der zytoplasmatischen Membran aufzubauen (Typas *et al.*, 2012). Lipid II wird anschließend auf die periplasmatische Seite der Membran transferiert und in das PG-Netzwerk eingebaut (Typas *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2017). Glycosyltransferasen polymerisieren die Glykanketten von Lipid II zu langen Glykansträngen und Transpeptidasen vernetzen die Peptidseitenketten miteinander (Typas *et al.*, 2012). *Chlamydiaceae* haben eine einzigartige reduzierte Zellteilungsmaschinerie, denn der zentrale Organisator der Zellteilung in fast allen Bakterien, das Tubulin-Homolog FtsZ fehlt. Stattdessen wird das Aktin-Homolog MreB verwendet, das typischerweise für die Zellverlängerung in stäbchenförmigen Bakterien verwendet wird (Gaballah *et al.*, 2011; Ouellette *et al.*, 2012; Frandi *et al.*, 2014; Jacquier *et al.*, 2014; Kemege *et al.*, 2015). Es ist nicht vollständig geklärt, wie MreB die eng miteinander verbundenen chlamydialen Maschinerien für die PG-Ringbiosynthese und Zellteilung organisiert. Zusätzlich zu MreB und seinem Regulator RodZ (Kemege *et al.*, 2015) haben *Chlamydiaceae* einen nahezu vollständigen Weg für die Lipid-II-Biosynthese konserviert sowie die SEDS-Proteine FtsW und RodA, welche in freilebenden Bakterien eine Glycosyltransferase-Aktivität und eine Funktion in der Lipid-II-Translokation zugeschrieben wurde. Zusätzlich kodieren *Chlamydiaceae* mit MurJ ein weiteres Transmembranprotein, für das eine Lipid-II-Flippaseaktivität in freilebenden Bakterien beschrieben wurde (De Benedetti *et al.*, 2014; Henrichfreise, Brunke and Viollier, 2016; Meeske *et al.*, 2016; Klöckner *et al.*, 2018). Wie andere intrazelluläre Bakterien mit einer reduzierten PG-Struktur beherbergen *Chlamydiaceae* eine kleine Gruppe von Penicillin-bindenden Proteinen (PBP), die zwei Homologe der monofunktionellen PG-Transpeptidasen aus *E. coli*, PBP2 und PBP3, umfassen, welche wahrscheinlich am Einbau von Lipid II beteiligt sind, sowie die DD-Carboxypeptidase PBP6 (Otten *et al.*, 2015; Atwal *et al.*, 2021). Darüber hinaus findet man in den Genom-reduzierten *Chlamydiaceae* ein Homolog der Zellteilungsamidase, das bifunktionale AmiA (Klöckner *et al.*, 2014) und den, die Zellhülle durchspannenden, Tol-Pal-Komplex (Jacquier *et al.*, 2015). Der ungewöhnliche Prozess der Zellteilung bei *Chlamydiaceae* wird durch einen

Knospungsmechanismus eingeleitet, ähnlich dem der Planctomyceten, welche ebenso wie Chlamydien kein FtsZ beherbergen (Abdelrahman *et al.*, 2016). Die asymmetrischen Zellpole reifen anschließend zu zwei ungefähr gleich großen Tochterzellen heran, die durch ein MreB-kontrolliertes Septum getrennt sind. Das Septum enthält den transienten PG-Ring, der während der Konstriktion kontinuierlich umgebaut und im Zuge der Trennung der Tochterzellen abgebaut wird (Liechti *et al.*, 2016; Liechti, 2021). Bis zum heutigen Tag sind noch nicht alle Schritte der PG-Biosynthese in Chlamydien vollständig aufgeklärt.

In dieser Arbeit sollten die chlamydialen LysM II-Proteine als mögliche neue Komponente der PG-Biosynthesemaschinerien in Chlamydien näher beleuchtet werden. Für das LysM I-Protein Cpn0902, aus der humanpathogenen Spezies *C. pneumoniae* konnte bereits eine Carboxypeptidase-Aktivität (Klößner *et al.*, 2014) und für dessen Homolog aus der *Chlamydia*-ähnlichen Spezies *Waddlia chondrophila* (WCW01388) eine Endopeptidase-Aktivität (Frandi *et al.*, 2014) nachgewiesen werden. Die chlamydialen LysM II- und LysM III-Proteine sind bislang diesbezüglich einer möglichen Funktion im PG-Biosyntheseweg gänzlich unerforscht. Klassischerweise wird LysM-Domänen eine Funktion in der Bindung von PG und Chitin zugeschrieben. Die in dieser Arbeit durchgeführte Peptidoglykan/ Chitin-Pulldown-Experimente ergaben für alle getesteten LysM II-Proteine aus *C. trachomatis* (Ct_601), *C. pneumoniae* (Cpn0780) und *W. chondrophila* (WCW0123) eine Bindung an PG sowie an Chitin. In den ergänzenden SPR-Analysen konnte erstaunlicher Weise zusätzlich für alle getesteten Proteine eine Bindung zu Glykogen determiniert werden. Diese Bindeaktivität ist vermutlich ebenso den LysM-Domänen der Testproteine zuzuordnen, da in dieser Arbeit durchgeführte Blast-Analysen keine Hinweise auf das Vorhandensein von Glykogen-bindenden Domänen, wie z.B. Kohlenhydratbindungsmodul Familie 2 (Machovič and Janeček, 2006), ergaben. Außerdem zeigte ein Vergleich der Sequenzen der LysM-Domänen der verschiedenen chlamydialen LysM II-Proteine mit den 6 eingehend charakterisierten LysM-Domänen in AtlA aus *Enterococcus faecalis* (Mesnage *et al.*, 2014), eine Ähnlichkeit zu einander auf (Abbildung 35).

Die LysM-Domänen in AtlA weisen eine Affinität gegenüber PG und Chitin, aber nicht gegenüber Cellulose oder Xylan auf, was darauf zurückgeführt wird, dass die charakteristische Amidgruppe an der C2'-Position der GlcNAc-Reste in PG und Chitin für die Bindung an das Substrat essentiell ist (Mesnage *et al.*, 2014). Auf dieser Basis

stellt sich die Frage, welche Unterschiede zwischen den LysM-Domänen in den chlamydialen LysM II-Proteinen und den LysM-Domänen aus AtlA bestehen, auf die eine zusätzliche Glykogen-Bindung zurückgeführt werden könnte. Um Einblicke in diese Unterschiede zu gewinnen wurden die LysM-Domänen der chlamydialen LysM-Proteine und *E. faecalis* AtlA im Folgenden vergleichend *in silico* untersucht. Für die Bindung von PG an AtlA (*E. faecalis*) sind mehrere Interaktionen identifiziert worden (Abbildung 35) (Mesnage *et al.*, 2014). Besonders wichtig für die Bindung von AtlA an PG sind die Aminosäuren L14 sowie N15 (Abbildung 35 A) (Mesnage *et al.*, 2014). Die Aminosäure L14 ist wichtig für die Interaktion mit der Amidgruppen in GucNAc und in allen drei chlamydialen LysM II-Domänen, die in dieser Studie analysiert wurden, konserviert. Die N-Acetylgruppen der GlcNAc-Zuckerreste bilden Wasserstoffbrückenbindungen zu den Amidgruppen der Rückgratreste von N15 (Mesnage *et al.*, 2014). Die Aminosäure an Position 15, für die eine Funktion in der Unterscheidung von PG und Chitin in AtlA diskutiert wurde (Mesnage *et al.*, 2014) könnte eine Rolle für abweichende Substratspezifität der chlamydialen Proteine, da diese Aminosäure in den chlamydialen LysM II-Proteinen anstatt Asparagin (N), wie in *E. faecalis* AtlA durch Serin (S) oder Glutaminsäure (E) ersetzt ist. Serin und Glutaminsäure der chlamydialen LysM II-Domänen haben untereinander schwach ähnliche, aber zu Asparagin in *E. faecalis* AtlA divergente Eigenschaften. Des Weiteren wäre die Aminosäure V41, welche ebenso wie N15 eine Wasserstoffbrücke mit der Amidgruppe in einer GlucNAc-Untereinheit ausbildet und zusätzlich mit einer benachbarten MurNAc-Untereinheit 1 interagiert, für weitere Untersuchungen von Interesse, nicht zuletzt auch da Valin in dieser Position in den chlamydialen LysM-Domänen durch Threonin (T) bzw. Alanin (A) oder Isoleucin (I) ersetzt wurde (Abbildung 35 A). Diese in den Positionen 15 und 41 geschilderten Unterschiede könnten beispielsweise durch eine Mutagenese der chlamydialen LysM II-Proteine mit anschließenden SPR-Affinitätsanalysen hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Substratspezifität untersucht werden. In der oben genannten Studie wurde gezeigt, dass AtlA für die Bindung des Substrats die Amidgruppe benötigt, welche in Glykogen nicht vorhanden ist, ebenso fehlen diese in Cellulose und Xylan, welche AtlA auch nicht gebunden haben (Abbildung 35 B).

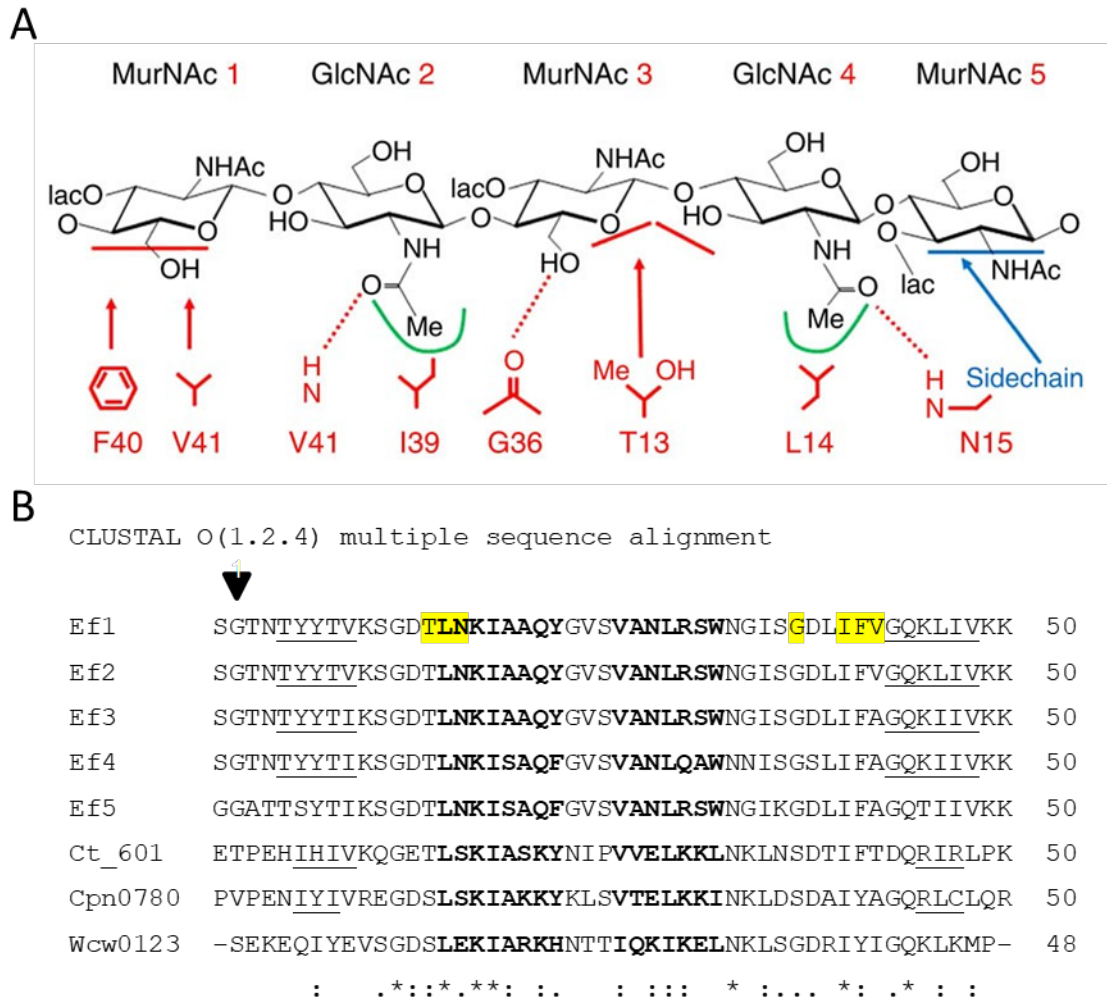


Abbildung 35: **A**: Für das Protein AtlA aus *E. faecalis* konnten innerhalb der LysM-Domänen bereits Aminosäuren identifiziert werden, welche für die Bindung von PG wichtig sind (Mesnage et al., 2014). In der Abbildung 35 B sind diese Aminosäuren in gelb hinterlegt.

Abbildung 35: **B**: Alignment (Madeira et al., 2024) zwischen LysM-Domänen aus *E. faecalis* AtlA (EF_0799) und chlamydialen LysM II-Proteinen. Vorhersagen zur Sekundärstruktur wurden für die chlamydialen LysM II-Domänen mit Psipred angefertigt (Jones, 1999) und für AtlA der Studie von Mesnage et al., 2014 entnommen (Unterstrichen: β -Faltblatt, Fett: α -Helix). Die für die Bindung von PG wichtigen Aminosäuren in AtlA aus *E. faecalis* sind gelb markiert (Mesnage et al., 2014). Ct: *C. trachomatis*; Cpn: *C. pneumoniae*, Wcw: *W. chondrophila*; Ef1-6: *E. faecalis* AtlA (Mesnage et al., 2014)

Der Blattschimmelpilz *Cladosporium fulvum* sondert das LysM-Effektorprotein Ecp6 während der Besiedelung der Tomate ab, um so die Erkennung des Chitins durch Immunrezeptoren des Wirts zu verhindern (Sánchez-Vallet et al., 2013). Die chlamydialen LysM II-Proteine zeigen im Vergleich zu Ecp6 im ersten Chitin-

Bindebereich (gelb) Ähnlichkeiten auf, jedoch weicht die Sequenz im zweiten Chitin-Bindebereich stark ab (Abbildung 36 B). Der Ecp6 Abschnitt zwischen LysM1 und dem LysM2–LysM3-Bereich erlaubt es, GlcNAc-Einheiten eines Chitinoligomers durch Wasserstoffbrückenbindungen und zahlreiche andere nicht-kovalente Wechselwirkungen zu binden (Abbildung 36 A) (Sánchez-Vallet *et al.*, 2013). Die Wechselwirkungen der N,N',N''-Triacetylchitotriose-Trimere mit den chlamydialen LysM II-Proteinen waren geringer als die unspezifischen Interaktionen mit der Matrix der Chips und dürften somit nicht von biologischer Relevanz sein.

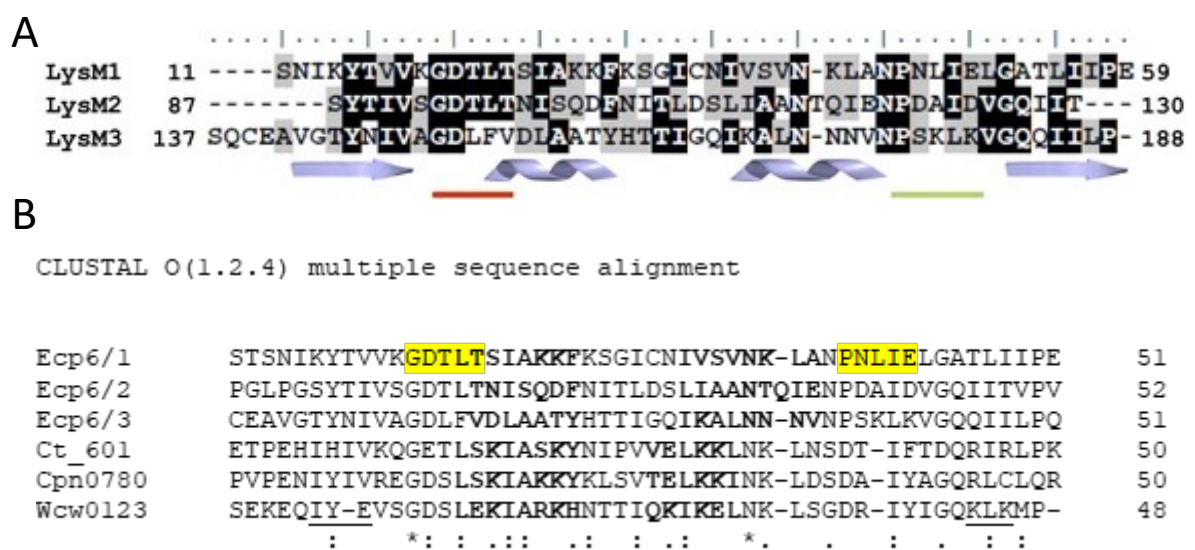


Abbildung 36: **A:** Clustal-W-Alignment der drei LysM-Domänen von Ecp6 (Sánchez-Vallet *et al.*, 2013). Dargestellt ist die Verteilung der α -Helices (Helices) und β -Faltblätter (Pfeile). Die beiden Chitinbindestellen in LysM1 und LysM3 sind mit einer roten und einer grünen Linie unterlegt (Sánchez-Vallet *et al.*, 2013).

Abbildung 36 **B:** Alignment (Madeira *et al.*, 2024) der LysM-Domänen aus *Cladosporium fulvum* Ecp6 und chlamydialen LysM II-Proteinen. Die Vorhersagen zur Sekundärstruktur wurden für die chlamydialen LysM II-Domänen mit Psipred (Jones, 1999) angefertigt und für *C. fulvum* Ecp6 von (Sánchez-Vallet *et al.*, 2013) entnommen (Unterstrichen: β -Faltblatt, Fett: α -Helix). Die für die Bindung von PG wichtigen Aminosäuren in den LysM-Domänen aus *C. fulvum* Ecp6 sind gelb markiert (Sánchez-Vallet *et al.*, 2013). Ct: *C. trachomatis*; Cpn: *C. pneumoniae*; Wcw: *W. chondrophila*; Ecp6/1-3: *C. fulvum* Ecp6 (Sánchez-Vallet *et al.*, 2013).

Dasselbe Bild zeigte sich bei den Bindeanalysen mit den chlamydialen LysM-II-Proteinen und einer weiteren Triose, der aus drei Glukoseeinheiten bestehenden Maltotriose. Diese nicht-acetylierte Triose wurde als Untereinheit des Glykogens in die Studien aufgenommen, da in dieser Arbeit überraschenderweise nachgewiesen

werden konnte, dass chlamydiale LysM-Proteine Glykogen binden können. In Einklang mit den Ergebnissen zur N,N',N''-Triacetylchitotriose konnte für keines der analysierten chlamydialen LysM II-Proteine eine ausgeprägte Bindung gegenüber Maltotriose nachgewiesen werden, denn auch hier waren die unspezifischen Interaktionen mit der Matrix stärker als mit dem chlamydialen Testproteinen.

Unberührt von der Bestimmung des minimalen Bindemotivs innerhalb der Substrate chlamydialer LysM II-Proteine, bleibt die spannende Frage, welche Rolle die Doppelfunktion als Bindeproteine von PG und Glykogen für die Biologie der Chlamydien haben könnte. Analysen zum genetischen Kontext der LysM II-Proteine in den pathogenen Spezies *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* zeigen, dass diese Teil des Tol/Pal-Operons sind (Brunke, 2018). In gramnegativen Modellorganismus *E. coli* ist das Tol/Pal-Operon ein wichtiger Bestandteil der Zellteilungsmaschinerie und koordiniert die Konstriktion der äußeren Membran parallel zum PG-Sacculus (Gerding *et al.*, 2007). Bei einer Untersuchung der Funktionalität des Tol/Pal-Komplexes in dem *Chlamydia*-ähnlichen Organismus *Waddlia chondrophila* wurde gezeigt, dass das Waddlia-Pal-Protein an den restlichen Peptidoglykan-Sacculus von Waddlia bindet (Jacquier *et al.*, 2015). Anders als im konservierten Tol/Pal-Gen-Cluster von *Chlamydiaceae* liegt neben dem LysM II-Gen aus *Waddlia chondrophila* das Gen der Glutamat-Racemase *murl* sowie ein Gen für Transporterproteine, welches nicht mit dem Tol/Pal-System assoziiert ist (Brunke, 2018).

Es könnte durchaus sein, dass auch LysM II-Proteine in Chlamydien eine Rolle in der Zellteilung spielen. Für diese These spräche zusätzlich der in dieser Arbeit erbrachte Beweis, dass die chlamydialen LysM-II-Proteine, welche über Sec-Signalpeptide für den Transport ins Periplasma verfügen, tatsächlich PG zu binden vermögen. Die Proteine könnten somit zum ungewöhnlichen Zellteilungsmechanismus der intrazellulären Chlamydien beitragen. Dieser wird durch eine minimale Zellteilungs- und PG-Maschinerie vermittelt und hängt von der Konstriktion eines septalen PG-Rings ab (Klöckner *et al.*, 2018).

Die zusätzlich für chlamydiale LysM II-Proteine in dieser Arbeit nachgewiesene, für LysM-Proteine bislang nicht beschriebene, Bindung von Glykogen könnte in *C. trachomatis* und *W. chondrophila*, zwei chlamydialen Spezies, die den Genitaltrakt zu infizieren vermögen (Baud *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2009), eine wichtige sensorische Aufgabe besitzen. Während des Menstruationszyklus ändert sich der Glykogengehalt im Endometrium in Abhängigkeit des Progesteronspiegels. Während

der Lutealphase ist der Glykogengehalt in Vorbereitung auf die Einnistung der Blastozyste am höchsten (Silbernagel and Despopoulos, 2007; Amabebe and Anumba, 2018). Kommt es nicht zu einer Schwangerschaft, sinken der Östrogen- und Progesteronspiegel sowie der Glykogengehalt im Endometrium und es folgt die Desquamationsphase, in der das Endometrium abgebaut und ausgeschieden wird (Silbernagel and Despopoulos, 2007; Amabebe and Anumba, 2018). Vor diesem Hintergrund könnte es sein, dass die LysM II-Proteine in *C. trachomatis* und *W. chondrophila* als Sensoren für den Glykogengehalt und somit indirekt als Zeit-Sensor innerhalb des Menstruationszyklus fungieren. Für das Überleben der obligat intrazellulären Erreger und die Aufrechterhaltung der Infektion in den Zellen des Endometriums ist es von höchster Bedeutung, dass die Bakterien innerhalb ihres einzigartigen biphasischen Lebenszyklus noch vor dem Abbau ihrer endometrialen Wirtszellen aus dem Stadium der sich vermehrenden, äußerst empfindlichen und nicht infektiösen Retikularkörperchen redifferenzieren in die infektiöse widerstandsfähigere Form der Elementarkörperchen. Diese infektiösen Elementarkörperchen können, während der Auflösung des Endometriums freigesetzt, die darunterliegende neue Zellschicht infizieren und somit die Infektion über die Desquamationsphase des Menstruationszyklus hinweg aufrechterhalten. In diesem Zusammenhang ist weiterhin von Interesse, dass *C. trachomatis* nicht nur Glykogen aus der Wirtszelle aufnehmen und im Lumen seiner Vakuole als Energiequelle zwischenspeichern kann, sondern auch, im Gegensatz zu anderen intrazellulären bakteriellen Erregern, einen Biosyntheseweg für Glykogen konserviert hat (Lu *et al.*, 2013; Gehre *et al.*, 2016). *C. trachomatis* produziert Glykogen *de novo* aus UPD-Glucose der Wirtszelle mittels der Synthase GlgA, welche der Erreger in die Vakuole sezerniert (Lu *et al.*, 2013; Gehre *et al.*, 2016). Auch für diesen zellulären Prozess der Bereitstellung von Glykogen, für den eine sehr wichtige Rolle in der Energieversorgung der infektiösen EBs postuliert wird (Colpaert *et al.*, 2021), wäre es möglich, dass das LysM II-Protein eventuell eine regulatorische Funktion hat und als Glykogen-Sensor dient, um zwischen der Aufnahme von Glykogen aus der Wirtszelle umzuschalten auf *de novo*-Synthese sofern der Glykogen-Wirtzellpool erschöpft ist.

7 Literaturverzeichnis

- Abdelrahman, Y. et al. (2016)** 'Polarized Cell Division of *Chlamydia trachomatis*', *PLOS Pathogens*. Edited by C. M. Sasseti, 12(8), p. e1005822. doi: 10.1371/journal.ppat.1005822.
- Adan, A., Kiraz, Y. and Baran, Y. (2016)** 'Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays', *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), pp. 1213–1221. doi: 10.2174/1389201017666160808160513.
- Adenyo, C. et al. (2020)** 'Bacterial and protozoan pathogens/symbionts in ticks infecting wild grasscutters (*Thryonomys swinderianus*) in Ghana', *Acta Tropica*. Elsevier, 205(January), p. 105388. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105388.
- Allocati, N. et al. (2016)** 'Bat–man disease transmission: zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations', *Cell Death Discovery*. Nature Publishing Group, 2(May), p. 16048. doi: 10.1038/cddiscovery.2016.48.
- Althaus, F. et al. (2010)** 'International Journal of Infectious Diseases African tick-bite fever: a new entity in the differential diagnosis of multiple eschars in travelers . Description of five cases imported from South Africa to Switzerland', *International Journal of Infectious Diseases*. International Society for Infectious Diseases, 14, pp. e274–e276. doi: 10.1016/j.ijid.2009.11.021.
- Amabebe, E. and Anumba, D. O. C. (2018)** 'The vaginal microenvironment: The physiologic role of Lactobacilli', *Frontiers in Medicine*, 5(JUN), pp. 1–11. doi: 10.3389/fmed.2018.00181.
- Ammerdorffer, A. et al. (2017)** '*Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia*-like bacteria: New enemies of human pregnancies', *Current Opinion in Infectious Diseases*, 30(3), pp. 289–296. doi: 10.1097/QCO.0000000000000369.
- Andrews, J. M. (2001)** 'Determination of minimum inhibitory concentrations', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl_1), pp. 5–16. doi: 10.1093/jac/48.suppl_1.5.
- Aslam, A. et al. (2020)** 'Evidence of the Practice of Self-Medication with Antibiotics among the Lay Public in Low- and Middle-Income Countries: A Scoping Review', *Antibiotics*, 9(9), p. 597. doi: 10.3390/antibiotics9090597.
- Atwal, S. et al. (2021)** 'Discovery of a Diverse Set of Bacteria That Build Their Cell Walls without the Canonical Peptidoglycan Polymerase aPBP', *mBio*. Edited by L. Søgaaard-Andersen, 12(4). doi: 10.1128/mBio.01342-21.
- Bácskay, I. et al. (2018)** 'Role of Cytotoxicity Experiments in Pharmaceutical Development', in *Cytotoxicity*. InTech. doi: 10.5772/intechopen.72539.

- Baker, R. E. et al. (2022)** 'Infectious disease in an era of global change', *Nature Reviews Microbiology*. Springer US, 20(4), pp. 193–205. doi: 10.1038/s41579-021-00639-z.
- Banerjee, A. et al. (2020)** 'Novel Insights Into Immune Systems of Bats', *Frontiers in Immunology*, 11(January), pp. 1–15. doi: 10.3389/fimmu.2020.00026.
- Barbour, A. G. et al. (1982)** 'Chlamydia trachomatis has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid', *Journal of Bacteriology*, 151(1), pp. 420–428. doi: 10.1128/jb.151.1.420-428.1982.
- De Barsy, M. and Greub, G. (2013)** 'Waddlia chondrophila: From biology to pathogenicity', *Microbes and Infection*. Elsevier Masson SAS, 15(14–15), pp. 1033–1041. doi: 10.1016/j.micinf.2013.09.010.
- Baud, D. et al. (2007)** 'Waddlia chondrophila , a Potential Agent of Human Fetal Death', *Emerging Infectious Diseases*, 13(8), pp. 1239–1243. doi: 10.3201/eid1308.070315.
- Baud, D. et al. (2014)** 'Role of Waddlia chondrophila Placental Infection in Miscarriage', *Emerging Infectious Diseases*, 20(3), pp. 460–464. doi: 10.3201/eid2003.131019.
- Baud, D., Regan, L. and Greub, G. (2008)** 'Emerging role of Chlamydia and Chlamydia-like organisms in adverse pregnancy outcomes', *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(1), pp. 70–76. doi: 10.1097/QCO.0b013e3282f3e6a5.
- Beatty, W. L. et al. (1994)** 'Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence', *Infection and Immunity*, 62(9), pp. 3705–3711. doi: 10.1128/iai.62.9.3705-3711.1994.
- Beatty, W. L., Byrne, G. I. and Morrison, R. P. (1993)** 'Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent Chlamydia trachomatis infection in vitro.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(9), pp. 3998–4002. doi: 10.1073/pnas.90.9.3998.
- Beatty, W. L., Morrison, R. P. and Byrne, G. I. (1995)** 'Reactivation of persistent Chlamydia trachomatis infection in cell culture', *Infection and Immunity*, 63(1), pp. 199–205. doi: 10.1128/iai.63.1.199-205.1995.
- Bender, J. K. et al. (2018)** 'Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature', *Drug Resistance Updates*, 40(August), pp. 25–39. doi: 10.1016/j.drug.2018.10.002.

- De Benedetti, S. et al. (2014)** 'Characterization of serine hydroxymethyltransferase GlyA as a potential source of D-alanine in *Chlamydia pneumoniae*', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(February), pp. 1–7. doi: 10.3389/fcimb.2014.00019.
- Berdy, B. et al. (2017)** 'In situ cultivation of previously uncultivable microorganisms using the ichip', *Nature Protocols*, 12(10), pp. 2232–2242. doi: 10.1038/nprot.2017.074.
- Beskow, L. M. (2014)** 'Lessons from HeLa Cells: The Ethics and Policy of Biospecimens', pp. 1–2. doi: 10.1146/annurev-genom-083115-022536.Lessons.
- Beyer, R. M., Manica, A. and Mora, C. (2021)** 'Shifts in global bat diversity suggest a possible role of climate change in the emergence of SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2', *Science of The Total Environment*. Elsevier B.V., 767, p. 145413. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.145413.
- Bilal, M. (2016)** 'Self-Medication with Antibiotics among People Dwelling in Rural Areas of Sindh', *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*, 10(5), pp. OC08-OC13. doi: 10.7860/JCDR/2016/18294.7730.
- Biller, S. J. et al. (2011)** 'The Putative Hydrolase YycJ (WalJ) Affects the Coordination of Cell Division with DNA Replication in *Bacillus subtilis* and May Play a Conserved Role in Cell Wall Metabolism', *Journal of Bacteriology*, 193(4), pp. 896–908. doi: 10.1128/JB.00594-10.
- Birnboim H.C. and Doly, J. (1979)** 'A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA', *Nucleic Acids Research*, 7(6), pp. 1513–23. doi: 10.1093/nar/7.6.1513.
- Bisht, K. and Ann Wakeman, C. (2019)** 'Discovery and therapeutic targeting of differentiated biofilm subpopulations', *Frontiers in Microbiology*, 10(AUG), pp. 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2019.01908.
- Borel, N. et al. (2007)** '*Parachlamydia* spp. and related *Chlamydia*-like organisms and bovine abortion', *Emerging Infectious Diseases*, 13(12), pp. 1904–1907. doi: 10.3201/eid1312.070655.
- Boudreau, M. A., Fisher, J. F. and Mobashery, S. (2012)** 'Messenger Functions of the Bacterial Cell Wall-derived Muropeptides', *Biochemistry*, 51(1), pp. 2974–2990. doi: 10.1021/bi300174x.
- Bouhired, S. et al. (2019)** 'Complete Genome Sequence of the Coralopyronin A-Producing Myxobacterium *Corallococcus coralloides* B035', *Microbiology Resource Announcements*. Edited by D. A. Baltrus, 8(17), pp. 4–5. doi: 10.1128/MRA.00050-19.

- Brancalion, P. H. S. et al. (2020)** 'Emerging threats linking tropical deforestation and the COVID-19 pandemic', *Perspectives in Ecology and Conservation*, 18(4), pp. 243–246. doi: 10.1016/j.pecon.2020.09.006.
- Brook, C. E. and Dobson, A. P. (2015)** 'Bats as “special” reservoirs for emerging zoonotic pathogens', *Trends in Microbiology*, 23(3), pp. 172–180. doi: 10.1016/j.tim.2014.12.004.
- Brouqui, P. et al. (2004)** 'Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe', *Clinical Microbiology and Infection*, 10(12), pp. 1108–1132. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.01019.x.
- Brunke, M. (2018)** *Dissertation: Novel aspects of peptidoglycan metabolism, persistent infection and pathogenicity in Chlamydiae*.
- Bühl, H. et al. (2018)** '*Chlamydiae* in febrile children with respiratory tract symptoms and age-matched controls, Ghana', *New Microbes and New Infections*. Elsevier Ltd, 22, pp. 44–48. doi: 10.1016/j.nmni.2017.12.008.
- Buist, G. et al. (2008)** 'LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans', *Molecular Microbiology*, 68(4), pp. 838–847. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06211.x.
- Caminade, C., McIntyre, K. M. and Jones, A. E. (2019)** 'Impact of recent and future climate change on vector-borne diseases', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1436(1), pp. 157–173. doi: 10.1111/nyas.13950.
- Castanon, J. I. R. (2007)** 'History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters', *Poultry Science*. Poultry Science Association, Inc., 86(11), pp. 2466–2471. doi: 10.3382/ps.2007-00249.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2006)** *Morbidity and Mortality Weekly Report*. Available at: <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr5511.pdf>.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2007)** 'Severe methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia associated with influenza-Louisiana and Georgia, December 2006-January 2007.', *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 56(14), pp. 325–360. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17431376>.
- Chapman, D. and Buxser, S. (2002)** 'Effects of membrane partitioning and other physical chemical properties on the apparent potency of “Membrane Active” compounds evaluated using red blood cell lysis assays', *Analytical Biochemistry*, 303(2), pp. 153–166. doi: 10.1006/abio.2002.5588.

- Christou, L. (2011)** 'The global burden of bacterial and viral zoonotic infections', *Clinical Microbiology and Infection*, 17(3), pp. 326–330. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03441.x.
- Cloud, K. A. and Dillard, J. P. (2002)** 'A lytic transglycosylase of *Neisseria gonorrhoeae* is involved in peptidoglycan-derived cytotoxin production', *Infection and Immunity*, 70(6), pp. 2752–2757. doi: 10.1128/IAI.70.6.2752-2757.2002.
- Collingro, A. et al. (2011)** 'Unity in Variety-The Pan-Genome of the *Chlamydiae*', *Molecular Biology and Evolution*, 28(12), pp. 3253–3270. doi: 10.1093/molbev/msr161.
- Colpaert, M. et al. (2021)** 'Conservation of the glycogen metabolism pathway underlines a pivotal function of storage polysaccharides in *Chlamydiae*', *Communications Biology*. Springer US, 4(1), p. 296. doi: 10.1038/s42003-021-01794-y.
- Cooper, L. E., Li, B. and Donk, W. A. van der (2010)** 'Biosynthesis and Mode of Action of Lantibiotics', in *Comprehensive Natural Products II*. Elsevier, pp. 217–256. doi: 10.1016/B978-008045382-8.00116-7.
- Corman, V. M. et al. (2015)** 'Evidence for an Ancestral Association of Human Coronavirus 229E with Bats', *Journal of Virology*, 89(23), pp. 11858–11870. doi: 10.1128/jvi.01755-15.
- Corsaro, D. and Greub, G. (2006)** 'Pathogenic potential of novel *chlamydiae* and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria', *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), pp. 283–297. doi: 10.1128/CMR.19.2.283-297.2006.
- Cox, J. V., Abdelrahman, Y. M. and Ouellette, S. P. (2020)** 'Penicillin-binding proteins regulate multiple steps in the polarized cell division process of *Chlamydia*', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 10(1), p. 12588. doi: 10.1038/s41598-020-69397-x.
- Croxatto, A. et al. (2014)** 'Presence of *Chlamydiales* DNA in ticks and fleas suggests that ticks are carriers of Chlamydiae', *Ticks and Tick-borne Diseases*. Elsevier GmbH., 5(4), pp. 359–365. doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.11.009.
- Crüsemann, M. et al. (2021)** 'Biosynthesis and mechanism of action of the cell wall targeting antibiotic hyeiptin', *Angewandte Chemie International Edition*. doi: 10.1002/anie.202102224.

- Cunningham, A. A., Daszak, P. and Wood, J. L. N. (2017)** 'One health, emerging infectious diseases and wildlife: Two decades of progress?', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1725). doi: 10.1098/rstb.2016.0167.
- Davies, J. and Davies, D. (1996)** 'Origins and evolution of antibiotic resistance.', *Microbiología (Madrid, Spain)*, 12(1), pp. 9–16. doi: 10.1128/mmbr.00016-10.
- Drexler, J. F. et al. (2012)** 'Bats host major mammalian paramyxoviruses', *Nature Communications*, 3. doi: 10.1038/ncomms1796.
- Dworkin, M. S. et al. (2013)** 'Tick-Borne Relapsing Fever', 31(9), pp. 1713–1723. doi: 10.1016/j.idc.2008.03.006.
- ECDC (2018)** 'Local transmission of dengue fever in France and Spain – 2018', *RAPID RISK ASSESSMENT*. Available at: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/08-10-2018-RRA-Dengue-France.pdf>.
- Eldin, C. et al. (2019)** 'Review of European and American guidelines for the diagnosis of Lyme borreliosis', *Médecine et Maladies Infectieuses*. The Authors, 49(2), pp. 121–132. doi: 10.1016/j.medmal.2018.11.011.
- Eldin, C. and Parola, P. (2018)** 'Update on Tick-Borne Bacterial Diseases in Travelers', *Current Infectious Disease Reports*. Current Infectious Disease Reports, 20(7), p. 17. doi: 10.1007/s11908-018-0624-y.
- Elwell, C. et al. (2016)** 'Chlamydia cell biology and pathogenesis', *Nature Reviews Microbiology*, 14(6), pp. 385–400. doi: 10.1038/nrmicro.2016.30.Chlamydia.
- Ericsson, C. D. et al. (2004)** 'Rickettsioses and the International Traveler', *Clinical Infectious Diseases*, 39(10), pp. 1493–1499. doi: 10.1086/425365.
- Eriksson, T. et al. (2010)** 'Intravenous Formulations of the Enantiomers of Thalidomide: Pharmacokinetic and Initial Pharmacodynamic Characterization in Man', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52(7), pp. 807–817. doi: 10.1211/0022357001774660.
- Eun, Y. et al. (2012)** 'DCAP: A Broad-Spectrum Antibiotic That Targets the Cytoplasmic Membrane of Bacteria', *American Chemical Society*, 134. doi: dx.doi.org/10.1021/ja302542j.
- Fabbretti, A., Gualerzi, C. O. and Brandi, L. (2011)** 'How to cope with the quest for new antibiotics', *FEBS Letters*, 585(11), pp. 1673–1681. doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.029.

- Fallarero, A. et al. (2013)** '(+)-Dehydroabietic acid, an abietane-type diterpene, inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro', *International journal of molecular sciences*, 14(6), pp. 12054–12072. doi: 10.3390/ijms140612054.
- Fang, R., Blanton, L. S. and Walker, D. H. (2017)** '*Rickettsiae* as Emerging Infectious Agents', *Clinics in Laboratory Medicine*. Elsevier Inc, 37(2), pp. 383–400. doi: 10.1016/j.cll.2017.01.009.
- Ferreira, L. et al. (2024)** 'Antibiotics with antibiofilm activity – rifampicin and beyond', *Frontiers in Microbiology*, 15(August), pp. 1–15. doi: 10.3389/fmicb.2024.1435720.
- Fleming, A. (1929)** 'On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*', *British Journal of Experimental Pathology*, 10((3)), pp. 226–236. doi: 10.1590/S0042-96862001000800017.
- Frandi, A. et al. (2014)** 'FtsZ-independent septal recruitment and function of cell wall remodelling enzymes in chlamydial pathogens', *Nature Communications*, 5(1), p. 4200. doi: 10.1038/ncomms5200.
- Friedman, M. G., Dvoskin, B. and Kahane, S. (2003)** 'Infections with the *chlamydia*-like microorganism *Simkania negevensis*, a possible emerging pathogen', *Microbes and Infection*, 5(11), pp. 1013–1021. doi: 10.1016/S1286-4579(03)00188-6.
- Gaballah, A. et al. (2011)** 'Functional Analysis of the Cytoskeleton Protein MreB from *Chlamydophila pneumoniae*', *PLoS ONE*. Edited by M. Gasset, 6(10), p. e25129. doi: 10.1371/journal.pone.0025129.
- Gehre, L. et al. (2016)** 'Sequestration of host metabolism by an intracellular pathogen', *eLife*, 5(MARCH2016), pp. 1–22. doi: 10.7554/eLife.12552.
- Gencay, M. et al. (1997)** '*Chlamydia trachomatis* detected in human placenta.', *Journal of Clinical Pathology*, 50(10), pp. 852–855. doi: 10.1136/jcp.50.10.852.
- Gerding, M. A. et al. (2007)** 'The trans -envelope Tol–Pal complex is part of the cell division machinery and required for proper outer-membrane invagination during cell constriction in *E. coli*', *Molecular Microbiology*, 63(4), pp. 1008–1025. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05571.x.
- Glatter, K. A. and Finkelman, P. (2020)** 'History of the Plague: An Ancient Pandemic for the Age of COVID-19', *The American Journal of Medicine*, 134(February). doi: 10.1016/j.amjmed.2020.08.019.

- Grein, F. et al. (2020)** 'Ca²⁺-Daptomycin targets cell wall biosynthesis by forming a tripartite complex with undecaprenyl-coupled intermediates and membrane lipids', *Nature Communications*. Springer US, 11(1), p. 1455. doi: 10.1038/s41467-020-15257-1.
- Greub, G. (2009)** 'Parachlamydia acanthamoebae, an emerging agent of pneumonia', *Clinical Microbiology and Infection*. European Society of Clinical Infectious Diseases, 15(1), pp. 18–28. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02633.x.
- Gubler, D. J. (2011)** 'Dengue , Urbanization and Globalization : The Unholy Trinity of the 21 st Century', *Tropical Medicine and Health*, 39(4), pp. 3–11. doi: 10.2149/tmh.2011-S05.
- Guzman, M. G. et al. (2010)** 'Dengue: a continuing global threat', *Nature Reviews Microbiology*, 8(S12), pp. S7–S16. doi: 10.1038/nrmicro2460.
- Guzman, M. G. et al. (2016)** 'Dengue infection', *Nature Publishing Group*. Macmillan Publishers Limited, 2, pp. 1–26. doi: 10.1038/nrdp.2016.55.
- Halberstaedter, L. and Prowazek, S. (1907)** 'Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur beim Trachom.', *Arbeiten Aus Dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*.
- Heidary, M. et al. (2018)** 'Daptomycin', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(1), pp. 1–11. doi: 10.1093/jac/dkx349.
- Heijenoort, J. van (2001)** 'Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit', *Natural Product Reports*, 18(5), pp. 503–519. doi: 10.1039/a804532a.
- Henrichfreise, B. et al. (2009)** 'Functional conservation of the lipid II biosynthesis pathway in the cell wall-less bacteria *Chlamydia* and *Wolbachia*: why is lipid II needed?', *Molecular Microbiology*, 73(5), pp. 913–923. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06815.x.
- Henrichfreise, B., Brunke, M. and Viollier, P. H. (2016)** 'Bacterial Surfaces: The Wall that SEDS Built', *Current Biology*. Elsevier Ltd, 26(21), pp. R1158–R1160. doi: 10.1016/j.cub.2016.09.028.
- van Herten, J., Bovenkerk, B. and Verweij, M. (2019)** 'One Health as a moral dilemma: Towards a socially responsible zoonotic disease control', *Zoonoses and Public Health*, 66(1), pp. 26–34. doi: 10.1111/zph.12536.

- Hesse, L. et al. (2003)** 'Functional and Biochemical Analysis of *Chlamydia trachomatis* MurC, an Enzyme Displaying UDP- N -Acetylmuramate:Amino Acid Ligase Activity', *Journal of Bacteriology*, 185(22), pp. 6507–6512. doi: 10.1128/JB.185.22.6507-6512.2003.
- Hoerauf, A. et al. (2011)** 'Filariasis in Africa—treatment challenges and prospects', *Clinical Microbiology and Infection*, 17(7), pp. 977–985. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03586.x.
- Hogan, B. et al. (2018)** 'Malaria Coinfections in Febrile Pediatric Inpatients: A Hospital-Based Study from Ghana', *Clinical Infectious Diseases*, 66(12), pp. 1838–1845. doi: 10.1093/cid/cix1120.
- Hokynar, K. et al. (2016)** '*Chlamydia*-Like Organisms (CLOs) in Finnish *Ixodes ricinus* Ticks and Human Skin', *Microorganisms*, 4(3), p. 28. doi: 10.3390/microorganisms4030028.
- Höltje, J.-V. (1998)** 'Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of *Escherichia coli*', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), pp. 181–203. doi: 10.1128/mmbr.62.1.181-203.1998.
- Hoogstraal, H. (1955)** 'Bat ticks of the genus *Argas* (*Ixodoidea*, *Argasidae*). 1. The sub-genus *Chiropterargas*', in *Fieldiana. Zoology*, pp. 579–600. doi: 10.5962/bhl.title.2895.
- Horn, M. et al. (2000)** '*Neochlamydia hartmannellae* gen. nov., sp. nov. (*Parachlamydiaceae*), an endoparasite of the amoeba *Hartmannella vermiformis*', *Microbiology*, 146(5), pp. 1231–1239. doi: 10.1099/00221287-146-5-1231.
- Horn, M. (2008)** '*Chlamydiae* as symbionts in eukaryotes', *Annual Review of Microbiology*, 62, pp. 113–131. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162818.
- Hou, G. Q., Chen, S. S. and Lee, C. P. (2006)** 'Pathogens in maternal blood and fetal cord blood using Q-PCR assay', *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. Taiwan Association of Obstetric & Gynecology, 45(2), pp. 114–119. doi: 10.1016/S1028-4559(09)60207-2.
- Howlin, R. P. et al. (2017)** 'Low-Dose Nitric Oxide as Targeted Anti-biofilm Adjunctive Therapy to Treat Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis', *Molecular Therapy*. Elsevier Ltd., 25(9), pp. 2104–2116. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.06.021.

- Huang, Y. et al. (2024)** 'Oleacein: A comprehensive review of its extraction, purification, absorption, metabolism, and health effects', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 433(April 2023), p. 137334. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.137334.
- Hurley, K. A. et al. (2015)** 'Membrane-Targeting DCAP Analogues with Broad-Spectrum Antibiotic Activity against Pathogenic Bacteria', *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 6(4), pp. 466–471. doi: 10.1021/acsmedchemlett.5b00024.
- Irschik, H. et al. (1985)** 'The coralopyronins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from *Myxobacteria*.', *The Journal of antibiotics*, 38(2), pp. 145–152. doi: 10.7164/antibiotics.38.145.
- Jacquier, N. et al. (2014)** 'Cell wall precursors are required to organize the chlamydial division septum', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5(1), p. 3578. doi: 10.1038/ncomms4578.
- Jacquier, N. et al. (2015)** 'Disassembly of a Medial Transenvelope Structure by Antibiotics during Intracellular Division', *Chemistry & Biology*, 22(9), pp. 1217–1227. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.08.009.
- Jacquier, N. et al. (2019)** 'A SpoIID Homolog Cleaves Glycan Strands at the Chlamydial Division Septum', *mBio*. Edited by R. Valdivia and A. Komeili, 10(4), pp. 1–16. doi: 10.1128/mBio.01128-19.
- Jacquier, N., Viollier, P. H. and Greub, G. (2015)** 'The role of peptidoglycan in chlamydial cell division: towards resolving the chlamydial anomaly', *FEMS Microbiology Reviews*, 39(2), pp. 262–275. doi: 10.1093/femsre/fuv001.
- Jones, D. T. (1999)** 'Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices', *Journal of Molecular Biology*, 292(2), pp. 195–202. doi: 10.1006/jmbi.1999.3091.
- Jones, K. E. et al. (2008)** 'Global trends in emerging infectious diseases', *Nature*, 451(7181), pp. 990–993. doi: 10.1038/nature06536.
- Joseph Davey, D. L., Shull, H. I. and Billings, J. D. (2020)** 'Prevalence of Curable Sexually Transmitted Infections in Pregnant Women in Low- and Middle-Income Countries From 2010 to 2015: A Systematic Review', *Sexually Transmitted Diseases*, 47(5), pp. e11–e13. doi: 10.1097/OLQ.0000000000001172.
- Kacmar, J. et al. (2001)** 'A Randomized Trial of Azithromycin Versus Amoxicillin for the Treatment of *Chlamydia trachomatis* in pregnancy', *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 9(4), pp. 197–202. doi: 10.1155/S1064744901000321.

- Kaplan, J. B. et al. (2012)** 'Low levels of β -Lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*', *mBio*, 3(4), pp. 2–9. doi: 10.1128/mBio.00198-12.
- Karkman, A. et al. (2018)** 'Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, 26(3), pp. 220–228. doi: 10.1016/j.tim.2017.09.005.
- Karygianni, L. et al. (2019)** 'Compounds from *Olea europaea* and *Pistacia lentiscus* inhibit oral microbial growth', *BMC Complementary and Alternative Medicine*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 19(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s12906-019-2461-4.
- Kavathas, P. B. et al. (2013)** 'Nod1, but not the ASC inflammasome, contributes to induction of IL-1 β secretion in human trophoblasts after sensing of *Chlamydia trachomatis*', *Mucosal Immunology*, 6(2), pp. 235–243. doi: 10.1038/mi.2012.63.
- Kayser, F. H. et al. (2010)** *Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Ke, Y., Chen, Z. and Yang, R. (2013)** '*Yersinia pestis*: mechanisms of entry into and resistance to the host cell', *Front Cell Infect Microbiol.*, 3(December), pp. 1–9. doi: 10.3389/fcimb.2013.00106.
- Kelley, L. A. et al. (2015)** 'The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis', *Nature Protocols*. Nature Publishing Group, 10(6), pp. 845–858. doi: 10.1038/nprot.2015.053.
- Kemege, K. E. et al. (2015)** '*Chlamydia trachomatis* protein CT009 is a structural and functional homolog to the key morphogenesis component RodZ and interacts with division septal plane localized MreB', *Molecular Microbiology*, 95(3), pp. 365–382. doi: 10.1111/mmi.12855.
- Khalil, H. et al. (2016)** 'Declining ecosystem health and the dilution effect', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 31314. doi: 10.1038/srep31314.
- Kim, H. et al. (2021)** 'Detection of *Rickettsia lusitaniae* Among *Ornithodoros sawaii* Soft Ticks Collected From Japanese Murrelet Seabird Nest Material From Gugul Island, Republic of Korea', *Journal of Medical Entomology*, (X), pp. 1–8. doi: 10.1093/jme/tjab005.
- Kintner, J. et al. (2014)** 'Commonly prescribed β -lactam antibiotics induce *C. trachomatis* persistence/stress in culture at physiologically relevant concentrations', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(April), pp. 1–10. doi: 10.3389/fcimb.2014.00044.

- Klöckner, A. et al. (2014)** 'AmiA is a penicillin target enzyme with dual activity in the intracellular pathogen *Chlamydia pneumoniae*', *Nature Communications*, 5(May), pp. 1–10. doi: 10.1038/ncomms5201.
- Klöckner, A. et al. (2016)** '*Chlamydia*-related bacteria in free-living and captive great apes, Gabon', *Emerging Infectious Diseases*, 22(12), pp. 2199–2200. doi: 10.3201/eid2212.150893.
- Klöckner, A. (2016)** *Dissertation: Chlamydiae as non-model organisms to study antibiotic activity- evolutionary, cellular and molecular aspects.*
- Klöckner, A. et al. (2018)** 'Deconstructing the Chlamydial Cell Wall.', *Current topics in microbiology and immunology*. Springer, Cham, 412, pp. 1–33. doi: 10.1007/82_2016_34.
- Kock, F. et al. (2018)** '*Orientia tsutsugamushi* is highly susceptible to the RNA polymerase switch region inhibitor coralopyronin a in vitro and in vivo', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(4). doi: 10.1128/AAC.01732-17.
- Köhler, W. et al. (2001)** *Medizinische Mikrobiologie, Urban & Fischer*. München, Jena: Urban & Fischer.
- Koo, H. et al. (2017)** 'Targeting microbial biofilms: Current and prospective therapeutic strategies', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 15(12), pp. 740–755. doi: 10.1038/nrmicro.2017.99.
- Korenromp, E. L. et al. (2017)** 'Costing of national sti program implementation for the global sti control strategy for the health sector, 2016-2021', *PLoS ONE*, 12(1), pp. 2016–2021. doi: 10.1371/journal.pone.0170773.
- Krannich, S. (2017)** *Masterthesis: Intrazelluläre Chlamydien: Bedeutung als Krankheitserreger und funktionelle Analyse putativer β -Laktamasen.*
- Kremer, B. P. and Bannwarth, H. (2018)** *Einführung in die Laborpraxis, Einführung in die Laborpraxis*. doi: 10.1007/978-3-662-57757-8.
- De La Fuente, J. et al. (2008)** 'Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals', *Frontiers in Bioscience*, pp. 6938–6946. doi: 10.2741/3200.
- Laemmli, U. K. (1970)** 'Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4', *Nature*, 227(5259), pp. 680–685. doi: 10.1038/227680a0.
- Lauderdale, K. J. et al. (2010)** 'Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material', *Journal of Orthopaedic Research*, 28(1), pp. 55–61. doi: 10.1002/jor.20943.

- Lerner, H. and Berg, C. (2015)** 'The concept of health in One Health and some practical implications for research and education: what is One Health?', *Infection Ecology & Epidemiology*, 5(1), p. 25300. doi: 10.3402/iee.v5.25300.
- Levy, S. B. and Marshall, B. (2004)** 'Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses', *Nature Medicine*, 10(S12), pp. S122–S129. doi: 10.1038/nm1145.
- Liechti, G. et al. (2016)** 'Pathogenic *Chlamydia* Lack a Classical Sacculus but Synthesize a Narrow, Mid-cell Peptidoglycan Ring, Regulated by MreB, for Cell Division', *PLOS Pathogens*. Edited by C. M. Sassetti, 12(5), p. e1005590. doi: 10.1371/journal.ppat.1005590.
- Liechti, G. et al. (2018)** '*Chlamydia trachomatis* dapF Encodes a Bifunctional Enzyme Capable of Both d -Glutamate Racemase and Diaminopimelate Epimerase Activities', *mBio*. Edited by S. Gottesman, 9(2). doi: 10.1128/mBio.00204-18.
- Liechti, G. W. (2021)** 'Localized Peptidoglycan Biosynthesis in *Chlamydia trachomatis* Conforms to the Polarized Division and Cell Size Reduction Developmental Models', *Frontiers in Microbiology*, 12(December). doi: 10.3389/fmicb.2021.733850.
- Lienard, J. et al. (2011)** 'Development of a new *Chlamydiales*-specific real-time PCR and its application to respiratory clinical samples', *Journal of Clinical Microbiology*, 49(7), pp. 2637–2642. doi: 10.1128/JCM.00114-11.
- Ling, L. L. et al. (2015)** 'A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance', *Nature*, 517(7535), pp. 455–459. doi: 10.1038/nature14098.
- Lobanovska, M. and Pilla, G. (2017)** 'Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future?', *The Yale journal of biology and medicine*, 90(1), pp. 135–145. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28356901>.
- Loeper, N. et al. (2019)** 'Elaborations on Coralopyronin A as a Novel Treatment Strategy Against Genital Chlamydial Infections', *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 943. doi: 10.3389/fmicb.2019.00943.
- Lu, C. et al. (2013)** '*Chlamydia trachomatis* GlgA Is Secreted into Host Cell Cytoplasm', *PLoS ONE*. Edited by A. Subtil, 8(7), p. e68764. doi: 10.1371/journal.pone.0068764.
- Ludwig, K. C. et al. (2024)** 'The Dual Mode of Antibacterial Action of the Synthetic Small Molecule DCAP Involves Lipid II Binding', *Journal of the American Chemical Society*, 146(36), pp. 24855–24862. doi: 10.1021/jacs.4c05138.

- Machovič, M. and Janeček, Š. (2006)** 'Starch-binding domains in the post-genome era', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(23), pp. 2710–2724. doi: 10.1007/s00018-006-6246-9.
- Machowska, A. and Lundborg, C. S. (2019)** 'Drivers of irrational use of antibiotics in Europe', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(1). doi: 10.3390/ijerph16010027.
- Mackenzie, J. S. and Jeggo, M. (2019)** 'The one health approach-why is it so important?', *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(2), pp. 5–8. doi: 10.3390/tropicalmed4020088.
- Madeira, F. et al. (2024)** 'The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024', *Nucleic Acids Research*, 52(W1), pp. W521–W525. doi: 10.1093/nar/gkae241.
- Madison-Antenucci, S. et al. (2020)** 'Emerging Tick-Borne Diseases', *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2), pp. 1–34. doi: 10.1128/CMR.00083-18.
- Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific (2010)** *Asia Pacific Strategy for emerging diseases: 2010*. Available at: https://iris.wpro.who.int/bitstream/handle/10665.1/7819/9789290615040_eng.pdf.
- Manner, S. et al. (2017)** 'Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation by antibiotics in 96-Microtiter Well Plates and Drip Flow Reactors: Critical factors influencing outcomes', *Scientific Reports*, 7(January), pp. 1–10. doi: 10.1038/srep43854.
- Mans, B. J. et al. (2019)** 'Argasid and ixodid systematics: Implications for soft tick evolution and systematics, with a new argasid species list', *Ticks and Tick-borne Diseases*. Elsevier GmbH., 10(1), pp. 219–240. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.09.010.
- Marcus, U. (2002)** 'Zunahme von sexuellem Risikoverhalten und sexuell übertragbaren Infektionen bei homosexuellen Männern', *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 45(1), pp. 40–46. doi: 10.1007/s103-002-8385-3.
- McCoy, A. J. et al. (2006)** 'L,L-diaminopimelate aminotransferase, a trans-kingdom enzyme shared by *Chlamydia* and plants for synthesis of diaminopimelate/lysine', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(47), pp. 17909–17914. doi: 10.1073/pnas.0608643103.

- McCoy, A. J. and Maurelli, A. T. (2005)** 'Characterization of Chlamydia MurC-Ddl, a fusion protein exhibiting D-alanyl-D-alanine ligase activity involved in peptidoglycan synthesis and D-cycloserine sensitivity', *Molecular Microbiology*, 57(1), pp. 41–52. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04661.x.
- McCoy, A. J. and Maurelli, A. T. (2006)** 'Building the invisible wall: updating the chlamydial peptidoglycan anomaly', *Trends in Microbiology*, 14(2), pp. 70–77. doi: 10.1016/j.tim.2005.12.004.
- McGregor, J. A. and French, J. I. (1991)** '*Chlamydia trachomatis* infection during pregnancy', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Mosby, 164(6), pp. 1782–1789. doi: 10.1016/0002-9378(91)90560-E.
- Mediannikov, O. and Fenollar, F. (2014)** 'Looking in ticks for human bacterial pathogens', *Microbial Pathogenesis*. Elsevier Ltd, 77, pp. 142–148. doi: 10.1016/j.micpath.2014.09.008.
- Meeske, A. J. et al. (2016)** 'SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases', *Nature*. Nature Publishing Group, 537(7622), pp. 634–638. doi: 10.1038/nature19331.
- Mesnage, S. et al. (2014)** 'Molecular basis for bacterial peptidoglycan recognition by LysM domains', *Nature Communications*, 5(1), p. 4269. doi: 10.1038/ncomms5269.
- Mickleburgh, S., Waylen, K. and Racey, P. (2009)** 'Bats as bushmeat: A global review', *Oryx*, 43(2), pp. 217–234. doi: 10.1017/S0030605308000938.
- Modrow, S. et al. (2010) *Molekulare Virologie, Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. doi: 10.1007/978-3-8274-2241-5.
- Mortimer, C. E. and Müller, U. (2007)** *Das Basiswissen der Chemie, Chemie*. doi: 10.1055/b-0035-126397.
- Mukhopadhyay, J. et al. (2008)** 'The RNA Polymerase "Switch Region" Is a Target for Inhibitors', *Cell*. Elsevier Inc., 135(2), pp. 295–307. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.033.
- Mülhardt, C. (2009)** *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics, Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*.
- Mullis, K. et al. (1986)** 'Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986.', *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, LI(Table 1), pp. 263–273. doi: 10.1101/SQB.1986.051.01.032.
- Munderloh, U. G. and Kurtti, T. J. (1995)** 'Cellular and Molecular Interrelationships Between Ticks and Prokaryotic Tick-Borne Pathogens', *Annual Review of Entomology*,

40(1), pp. 221–243. doi: 10.1146/annurev.en.40.010195.001253.

Murray, C. J. L. et al. (2022) 'Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis', *The Lancet*, 399(10325), pp. 629–655. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.

Nabi, G. et al. (2021) 'Bats and birds as viral reservoirs: A physiological and ecological perspective', *Science of the Total Environment*, 754(January). doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142372.

Newman, L. et al. (2015) 'Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting', *PLoS ONE*, 10(12), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0143304.

Nichols, D. et al. (2010) 'Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of "uncultivable microbial species', *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8), pp. 2445–2450. doi: 10.1128/AEM.01754-09.

NovoBiotic Pharmaceuticals (2025) *Press Releases*. Available at: <https://www.novobiotic.com/news>.

Nunes, A. and Gomes, J. P. (2014) 'Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of *Chlamydia*.', *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. Elsevier B.V., 23, pp. 49–64. doi: 10.1016/j.meegid.2014.01.029.

O'Neill, A. et al. (2000) 'RNA Polymerase Inhibitors with Activity against Rifampin-Resistant Mutants of *Staphylococcus aureus*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(11), pp. 3163–3166. doi: 10.1128/AAC.44.11.3163-3166.2000.

O'Shea, T. J. et al. (2014) 'Bat flight and zoonotic viruses', *Emerging Infectious Diseases*, 20(5), pp. 741–745. doi: 10.3201/eid2005.130539.

Orlov, V. N. et al. (1994) 'Combination of the electrogenic ionophores, valinomycin and CCCP, can lead to non-electrogenic K⁺ / H⁺ exchange on bilayer lipid membranes', *FEBS Letters*, 345(2–3), pp. 104–106. doi: 10.1016/0014-5793(94)00420-X.

Osaka, I. and Hefty, P. S. (2013) 'Simple resazurin-based microplate assay for measuring chlamydia infections', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(6), pp. 2838–2840. doi: 10.1128/AAC.00056-13.

Otten, C. et al. (2015) 'Co-solvents as stabilizing agents during heterologous overexpression in *Escherichia coli* - Application to chlamydial penicillin-binding protein 6', *PLoS ONE*, 10(4), pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0122110.

- Otten, C. et al. (2018)** 'Peptidoglycan in obligate intracellular bacteria', *Molecular Microbiology*, 107(2), pp. 142–163. doi: 10.1111/mmi.13880.
- Ouellette, S. P. et al. (2012)** 'Chlamydia co-opts the rod shape-determining proteins MreB and Pbp2 for cell division', *Molecular Microbiology*, 85(1), pp. 164–178. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08100.x.
- Ouellette, S. P. et al. (2015)** 'Identification and Partial Characterization of Potential FtsL and FtsQ Homologs of *Chlamydia*', *Frontiers in Microbiology*, 6, pp. 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2015.01264.
- Packiam, M. et al. (2015)** 'Structural characterization of mucopeptides from *Chlamydia trachomatis* peptidoglycan by mass spectrometry resolves "chlamydial anomaly"', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(37), pp. 1–6. doi: 10.1073/pnas.1514026112.
- Pappas, G. et al. (2006)** 'The new global map of human brucellosis', *Lancet Infectious Diseases*, 6(2), pp. 91–99. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70382-6.
- Park, J. T. and Uehara, T. (2008)** 'How Bacteria Consume Their Own Exoskeletons (Turnover and Recycling of Cell Wall Peptidoglycan)', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2), pp. 211–227. doi: 10.1128/mmbr.00027-07.
- Parola, P. et al. (2013)** 'Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach', 26(4), pp. 657–702. doi: 10.1128/CMR.00032-13.
- Patin, D. et al. (2012)** 'Biochemical characterisation of the chlamydial MurF ligase, and possible sequence of the chlamydial peptidoglycan pentapeptide stem', *Archives of Microbiology*, 194(6), pp. 505–512. doi: 10.1007/s00203-011-0784-8.
- Pavelka, M. S. (2007)** 'Another brick in the wall', *Trends in Microbiology*, 15(4), pp. 147–149. doi: 10.1016/j.tim.2007.02.003.
- Pechous, R. D. et al. (2016)** 'Pneumonic Plague: The Darker Side of *Yersinia pestis*', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, 24(3), pp. 190–197. doi: 10.1016/j.tim.2015.11.008.
- Peeling, R. W. et al. (2017)** 'Syphilis', *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), p. 17073. doi: 10.1038/nrdp.2017.73.
- Persson, K. et al. (1996)** 'Two strains of *Chlamydia trachomatis* without detectable 7.5 kb plasmid', in *Proceedings of the third meeting of the European Society for Chlamydia research*, p. 33.
- Pfarr, K. M. et al. (2009)** 'Filariasis and lymphoedema', *Parasite Immunology*, pp. 664–672. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01133.x.

- Phillips, S., Quigley, B. L. and Timms, P. (2019)** 'Seventy years of *Chlamydia* vaccine research - Limitations of the past and directions for the future', *Frontiers in Microbiology*, 10(JAN), pp. 1–18. doi: 10.3389/fmicb.2019.00070.
- Plamann, M. D. and Stauffer, G. V. (1983)** 'Characterization of the *Escherichia coli* gene for serine hydroxymethyltransferase', *Gene*, 22(1), pp. 9–18. doi: 10.1016/0378-1119(83)90059-8.
- Portillo, A. et al. (2017)** 'Guidelines for the Detection of *Rickettsia* spp.', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(1), pp. 23–32. doi: 10.1089/vbz.2016.1966.
- Puls, J. S. et al. (2024)** 'Staphylococcus epidermidis bacteriocin A37 kills natural competitors with a unique mechanism of action', *ISME Journal*, 18(1). doi: 10.1093/ismejo/wrae044.
- Radomski, N. et al. (2016)** 'Chlamydia–host cell interaction not only from a bird's eye view: some lessons from *Chlamydia psittaci*', *FEBS Letters*, 590(21), pp. 3920–3940. doi: 10.1002/1873-3468.12295.
- Rahman, M. T. et al. (2020)** 'Zoonotic diseases: Etiology, impact, and control', *Microorganisms*, 8(9), pp. 1–34. doi: 10.3390/microorganisms8091405.
- Ramchuran, E. J. et al. (2018)** 'In Vitro Antibacterial Activity of Teixobactin Derivatives on Clinically Relevant Bacterial Isolates', *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2018.01535.
- Ranieri, M. R., Whitchurch, C. B. and Burrows, L. L. (2018)** 'Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials', *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 45, pp. 164–169. doi: 10.1016/j.mib.2018.07.006.
- Rank, R. G. and Yeruva, L. (2014)** 'Hidden in Plain Sight: Chlamydial Gastrointestinal Infection and Its Relevance to Persistence in Human Genital Infection', *Infection and Immunity*. Edited by H. L. Andrews-Polymenis, 82(4), pp. 1362–1371. doi: 10.1128/IAI.01244-13.
- Redding, D. W. et al. (2019)** 'Impacts of environmental and socio-economic factors on emergence and epidemic potential of Ebola in Africa', *Nature Communications*. Springer US, 10(1). doi: 10.1038/s41467-019-12499-6.
- Reid, F. et al. (2017)** 'Chlamydia related bacteria (*Chlamydiales*) in early pregnancy: community-based cohort study', *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier, 23(2), pp. 119.e9-119.e14. doi: 10.1016/j.cmi.2016.10.011.

- Reithuber, E. et al. (2021)** 'THCz: Small molecules with antimicrobial activity that block cell wall lipid intermediates.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(47). doi: 10.1073/pnas.2108244118.
- Ridings, J. E. (2013)** 'The Thalidomide Disaster, Lessons from the Past', in *Methods in Molecular Biology*, pp. 575–586. doi: 10.1007/978-1-62703-131-8_36.
- Riley, S. P., Macaluso, K. R. and Martinez, J. J. (2015)** 'Electrotransformation and Clonal Isolation of *Rickettsia* Species', *Current Protocols in Microbiology*, 39(1), pp. 3A.6.1-3A.6.20. doi: 10.1002/9780471729259.mc03a06s39.
- Ripa, K. T. (1982)** 'Microbiological diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection', *Infection*. Germany, 10(S1), pp. S19–S24. doi: 10.1007/BF01640710.
- Ripa, K. T. and Mårdh, P. A. (1977)** 'Cultivation of *Chlamydia trachomatis* in Cycloheximide-Treated McCoy Cells', *Journal of Clinical Microbiology*, 6(4), pp. 328–331. doi: 10.1128/jcm.6.4.328-331.1977.
- Robert Koch-Institut (2010)** 'Chlamydiosen (Teil 1): Erkrankungen durch *Chlamydia trachomatis*. RKI-Ratgeber für Ärzte', *RKI-Ratgeber für Ärzte*. Available at: [http://edoc.rki.de/series/rki-ratgeber-fuer-arzte/2010/PDF/chlamydiosen-\(teil-1\):-erkrankungen-durch-chlamydia-trachomatis.pdf](http://edoc.rki.de/series/rki-ratgeber-fuer-arzte/2010/PDF/chlamydiosen-(teil-1):-erkrankungen-durch-chlamydia-trachomatis.pdf).
- Rochat, E. et al. (2020)** 'Nested Species Distribution Models of *Chlamydiales* in *Ixodes ricinus* (Tick) Hosts in Switzerland', *Applied and Environmental Microbiology*, 87(1), pp. 1–20. doi: 10.1128/AEM.01237-20.
- Roshdy, M. A. and Hoogstraal, H. (1974)** 'Bat ticks of the genus *Argas* (Ixodoidea: Argasidae) - II. The structure and possible function of the ventral paired grooves in *A. (Chiropterargas) boueti* and *A. (Carios) vespertilionis*', *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 44(1), pp. 15–18. doi: 10.1007/BF00328828.
- Rours, I. G. I. J. G. and Hammerschlag, M. R. (2013)** 'Maternal and infant *Chlamydia trachomatis* infections', *Chlamydial Infection: A Clinical and Public Health Perspective*, 7, pp. 131–141. doi: 10.1159/000348764.
- Roy, R. et al. (2018)** 'Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action', *Virulence*. Taylor & Francis, 9(1), pp. 522–554. doi: 10.1080/21505594.2017.1313372.
- Saéz, A. M. et al. (2015)** 'Investigating the zoonotic origin of the West African Ebola epidemic', *EMBO Molecular Medicine*, 7(1), pp. 17–23. doi: 10.15252/emmm.201404792.

- Sambrook, J. (1989)** 'Molecular cloning: a laboratory manual.', *Cold Spring Harbor Laboratory*, 5(1), p. 104. doi: 10.1002/abio.370050118.
- Sánchez-Vallet, A. et al. (2013)** 'Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization', *eLife*, 2(2), pp. 1–16. doi: 10.7554/eLife.00790.
- Sándor, A. D. et al. (2021)** 'Argasid Ticks of Palearctic Bats : Distribution , Host Selection , and Zoonotic Importance', *Frontiers in Veterinary Science*, 8(684737). doi: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.684737>.
- Sandoz, K. M. and Rockey, D. D. (2010)** 'Antibiotic resistance in *Chlamydiae*', *Future Microbiology*, 5(9), pp. 1427–1442. doi: 10.2217/fmb.10.96.
- Schäberle, T. F. et al. (2014)** 'Corallopyronin A - A promising antibiotic for treatment of filariasis', *International Journal of Medical Microbiology*. Elsevier GmbH., pp. 72–78. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.08.010.
- Schiefer, A. et al. (2012)** 'Corallopyronin A Specifically Targets and Depletes Essential Obligate *Wolbachia* Endobacteria From Filarial Nematodes In Vivo', *The Journal of Infectious Diseases*, 206(2), pp. 249–257. doi: 10.1093/infdis/jis341.
- Schleifer, K. H. and Kandler, O. (1972)** 'Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and their Taxonomic Implications', *American Society for Microbiology*, 36(4), pp. 407–477.
- Schwind, J. S. et al. (2014)** 'Capacity building efforts and perceptions for wildlife surveillance to detect zoonotic pathogens: Comparing stakeholder perspectives', *BMC Public Health*, 14(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/1471-2458-14-684.
- Shereen, M. A. et al. (2020)** 'COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses', *Journal of Advanced Research*, 24, pp. 91–98. doi: 10.1016/j.jare.2020.03.005.
- Sherpa, R. T., Reese, C. J. and Aliabadi, H. M. (2015)** 'Application of iChip to grow "uncultivable" microorganisms and its impact on antibiotic discovery', *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 18(3), pp. 303–315. doi: 10.18433/j30894.
- Shima, K. et al. (2013)** 'Activities of First-Choice Antimicrobials against Gamma Interferon-Treated *Chlamydia trachomatis* Differ in Hypoxia', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(6), pp. 2828–2830. doi: 10.1128/AAC.02211-12.

- Shima, K. et al. (2018)** 'Effective inhibition of rifampicin-resistant *Chlamydia trachomatis* by the novel DNA-dependent RNA polymerase inhibitor corallopyronin A', *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier B.V., 52(4), pp. 523–524. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.07.025.
- Shoji, J. et al. (1989)** 'Isolation and characterization of hypeptin from *Pseudomonas* sp.', *The Journal of antibiotics*, 42(10), pp. 1460–4. doi: 10.7164/antibiotics.42.1460.
- Shukla, R. et al. (2023)** 'An antibiotic from an uncultured bacterium binds to an immutable target', *Cell*, 186(19), pp. 4059–4073.e27. doi: 10.1016/j.cell.2023.07.038.
- Shukla, S. and Rao, Ts. (2017)** '*Staphylococcus aureus* biofilm removal by targeting biofilm-associated extracellular proteins', *Indian Journal of Medical Research*, 146(7), p. 1. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_410_15.
- Silbernagel, S. and Despopoulos, A. (2007)** *Taschenatlas Physiologie*. 7. Auflage.
- Silveira, M. F. et al. (2009)** '*Chlamydia trachomatis* infection during pregnancy and the risk of preterm birth: A case-control study', *International Journal of STD and AIDS*, 20(7), pp. 465–469. doi: 10.1258/ijsa.2008.008388.
- Simpson, D. I. H. (1972)** 'Arbovirus diseases', *British Medical Bulletin*, 28(1), pp. 10–15. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a070876.
- Skilton, R. J. et al. (2009)** 'Penicillin Induced Persistence in *Chlamydia trachomatis*: High Quality Time Lapse Video Analysis of the Developmental Cycle', *PLoS ONE*. Edited by K. A. Kelly, 4(11), p. e7723. doi: 10.1371/journal.pone.0007723.
- Sothmann, P. et al. (2017)** '*Rickettsia felis* Infection in Febrile Children , Ghana', 96(4), pp. 783–785. doi: 10.4269/ajtmh.16-0754.
- Steiper, M. E. and Young, N. M. (2006)** 'Primate molecular divergence dates', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(2), pp. 384–394. doi: 10.1016/j.ympev.2006.05.021.
- Storey, C. and Chopra, I. (2001)** 'Affinities of β -lactams for penicillin binding proteins of *Chlamydia trachomatis* and their antichlamydial activities', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(1), pp. 303–305. doi: 10.1128/AAC.45.1.303-305.2001.
- Studier, F. W. (2005)** 'Protein production by auto-induction in high density shaking cultures.', *Protein expression and purification*, 41(1), pp. 207–234. doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016.
- Succo, T. et al. (2016)** 'Autochthonous dengue outbreak in Nîmes, South of France, July to September 2015', *Eurosurveillance*, 21(21), pp. 1–7. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.21.30240.

- Taylor, M. J., Bandi, C. and Hoerauf, A. (2005)** 'Wolbachia.Bacterial Endosymbionts of Filarial Nematodes', in *Advances in Parasitology*. Elsevier Masson SAS, pp. 245–284. doi: 10.1016/S0065-308X(05)60004-8.
- Trape, J. F. et al. (2013)** 'The epidemiology and geographic distribution of relapsing fever borreliosis in West and North Africa, with a review of the *Ornithodoros erraticus* complex (Acari: Ixodida)', *PLoS ONE*, 8(11), pp. 1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0078473.
- Tsai, Y. S. et al. (2008)** 'African tick bite fever', *Journal of the Formosan Medical Association*, 107(1), pp. 73–76. doi: 10.1016/S0929-6646(08)60011-X.
- Tsiotas, D. and Tselios, V. (2022)** 'Understanding the uneven spread of COVID-19 in the context of the global interconnected economy', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 12(1), p. 666. doi: 10.1038/s41598-021-04717-3.
- Tuon, F. F. et al. (2023)** 'Antimicrobial Treatment of *Staphylococcus aureus* Biofilms', *Antibiotics*, 12(1), p. 87. doi: 10.3390/antibiotics12010087.
- Typas, A. et al. (2012)** 'From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 10(2), pp. 123–136. doi: 10.1038/nrmicro2677.
- Uehara, T. et al. (2010)** 'Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis', *EMBO Journal*. Nature Publishing Group, 29(8), pp. 1412–1422. doi: 10.1038/emboj.2010.36.
- Vasilakis, N. and Weaver, S. C. (2008)** *The History and Evolution of Human Dengue Emergence*, *Advances in Virus Research*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/S0065-3527(08)00401-6.
- Vestby, L. K. et al. (2020)** 'Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease', *Antibiotics*, 9(2). doi: 10.3390/antibiotics9020059.
- Visweswaran, G. R. R. et al. (2014)** 'Exploiting the peptidoglycan-binding motif, LysM, for medical and industrial applications', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(10), pp. 4331–4345. doi: 10.1007/s00253-014-5633-7.
- Wan, W. et al. (2023)** 'Advances in genetic manipulation of *Chlamydia trachomatis*', *Frontiers in Immunology*, 14(June), pp. 1–8. doi: 10.3389/fimmu.2023.1209879.
- Wegener, H. C. et al. (1999)** 'Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe', *Emerging Infectious Diseases*, 5(3), pp. 329–335. doi: 10.3201/eid0503.990303.

- Welsh, L. E., Gaydos, C. A. and Quinn, T. C. (1992)** 'In vitro evaluation of activities of azithromycin, erythromycin, and tetracycline against *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(2), pp. 291–294. doi: 10.1128/AAC.36.2.291.
- Woitzik, P. and Linder, S. (2021)** 'Molecular Mechanisms of *Borrelia burgdorferi* Phagocytosis and Intracellular Processing by Human Macrophages', *Biology*, 10(7), p. 567. doi: 10.3390/biology10070567.
- Wolf, A. J. and Underhill, D. M. (2018)** 'Peptidoglycan recognition by the innate immune system', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 18(4), pp. 243–254. doi: 10.1038/nri.2017.136.
- Wolfe, N. D., Dunavan, C. P. and Diamond, J. (2007)** 'Origins of major human infectious diseases', *Nature*, 447(7142), pp. 279–283. doi: 10.1038/nature05775.
- Wong, G. et al. (2020)** 'Zoonotic origins of human coronavirus 2019 (HCoV-19 / SARS-CoV-2): Why is this work important?', *Zoological Research*, 41(3), pp. 213–219. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2020.031.
- Wong, J. E. M. M. et al. (2015)** 'An intermolecular binding mechanism involving multiple LysM domains mediates carbohydrate recognition by an endopeptidase', *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71, pp. 592–605. doi: 10.1107/S139900471402793X.
- Wright, H. R., Turner, A. and Taylor, H. R. (2007)** 'Trachoma Cause of Blindness', *Lancet*, 371, pp. 1945–1954.
- Wu, H. et al. (2015)** 'Strategies for combating bacterial biofilm infections', *International Journal of Oral Science*, 7(July), pp. 1–7. doi: 10.1038/ijos.2014.65.
- Wu, X. et al. (2016)** 'Impact of climate change on human infectious diseases: Empirical evidence and human adaptation', *Environment International*. The Authors, 86, pp. 14–23. doi: 10.1016/j.envint.2015.09.007.
- Wyrick, P. B. (2010)** '*Chlamydia trachomatis* Persistence In Vitro: An Overview', *The Journal of Infectious Diseases*, 201(S2), pp. 88–95. doi: 10.1086/652394.
- Yang, R. (2018)** 'Plague: Recognition, treatment, and prevention', *Journal of Clinical Microbiology*, 56(1), pp. 1–6. doi: 10.1128/JCM.01519-17.
- Young, K. D. (2014)** 'A flipping cell wall ferry', *Science*, 345(6193), pp. 139–140. doi: 10.1126/science.1256585.

Zhao, H. et al. (2017) 'Don't let sleeping dogmas lie: new views of peptidoglycan synthesis and its regulation', *Molecular Microbiology*, 106(6), pp. 847–860. doi: 10.1111/mmi.13853.

Zinsstag, J. et al. (2012) 'Mainstreaming one health', *EcoHealth*, 9(2), pp. 107–110. doi: 10.1007/s10393-012-0772-8.

Zinsstag, J. et al. (2018) 'Climate change and One Health', *FEMS Microbiology Letters*, 365(11), pp. 1–9. doi: 10.1093/femsle/fny085.

8 Danksagungen

An erster Stelle bedanke mich sehr herzlich bei Dr. Beate Henrichfreise und Prof. Dr. Tanja Schneider für die Vergabe meines Themas, für die sehr gute Betreuung meiner Doktorarbeit und für die langjährige gute Zusammenarbeit.

Frau Priv.-Doz. Dr. Christiane Dahl, möchte ich für die Übernahme der Funktion als Zweitgutachterin danken.

Herrn Prof. Dr. Lukas Schreiber danke ich für die Übernahme des fachnahen Gutachters in meiner Promotionsprüfung.

Frau Priv.-Doz. Dr. Beate Kümmerer möchte ich für die Übernahme der Rolle als fachfremde Gutachterin danken.

Zusätzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen Arbeitsgruppenmitgliedern von Dr. Beate Henrichfreise, Prof. Dr. Tanja Schneider und Dr. Fabian Grein.

Für das Sammeln und Bestimmen der Ektoparasitenproben aus Afrika danke ich der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Marco Tschapka aus Ulm.

Danken möchte ich Rita de Sousa von dem Portugiesisches Referenzlabor für Magen-Darm-Infektionen und Zoonosen; National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge für die molekulare Bestimmung der Rickettsien.

Weiterhin möchte ich Dr. Daniel Eibach und Doris Winter aus der Arbeitsgruppe Infektionsepidemiologie von dem Bernhard-Nocht-Institut (BNITM) für Tropenmedizin für die Unterstützung der Rickettsiendetektion danken.

Ich danke auch der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gilbert Greub und Sébastien Aebly aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Lausanne für die Übernahme der Sequenzierungen der Chlamydiales positiven Proben.

Herrn Dr. Michael Nagel danke ich für die Projektkoordination der Zecken- sowie der Peststudie.

Meiner Familie möchte ich dafür danken, dass sie mich in jeder Lebenslage so herzlich unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich mich noch bei all denen bedanken, die mich in der letzten Zeit unterstützt haben, auf welche Art und Weise auch immer. Vielen Dank, ihr habt enorm viel zu dem Gelingen beigetragen.

9 Anhang

9.1 Chlamydien und andere intrazelluläre bakterielle Erreger in Zecken von westafrikanischen Fledermäusen

Tabelle 29: Gesamtauswertung aller untersuchten ghanaischen Zecken. Es wurden 199 Zecken von 46 verschiedenen Fledermaus-Individuen auf *Rickettsien*, *Borrelien* und *Chlamydiales* untersucht. Die 51 Zecken der Fledermäuse F1- F4 wurden bereits in der Masterarbeit des Kandidaten untersucht (Krannich, 2017). Insgesamt wurden *Borrelia* in 67, *Chlamydiales* in 23 und *Rickettsia* in 178 Zecken detektiert. Alle Fledermäuse, bis auf die Fledermausspezies F3* *Hipposideros cf. ruber*, gehörten der Spezies *Nycteris macrotis* an. Die mit # (*Chlamydiales*) oder ° (*Rickettsia*) gekennzeichneten Proben wurden sequenziert. +: positiv getestete Proben; -: negativ getestete Proben. Farbkodierung (detektierte Erregerkombinationen): keine Farbe: keine Erreger; schwarz: *Chlamydiales*, *Borrelia* und *Rickettsia*; grau -> *Chlamydiales*; gelb -> *Rickettsia*; dunkel grün -> *Chlamydiales* und *Rickettsia*; hell grün: *Borrelia* und *Rickettsia*.

Fledermaus [Probennummer]	Zecken	positiv befundet gegenüber		
		<i>Chlamydiales</i>	<i>Borrelia</i>	<i>Rickettsia</i>
F1	Z13	+	+	+
	Z18	+	+	+°
	Z29	+	+	+°
	Z31	+	+	+
	Z33	+	+	+
	Z01	-	+	+
	Z02	-	+	+
	Z03	-	+	+
	Z04	-	+	+
	Z05	-	+	+
	Z06	-	+	+
	Z08	-	+	+
	Z09	-	+	+
	Z10	-	+	+
	Z12	-	+	+
	Z14	-	+	+
	Z16	-	+	+
	Z17	-	+	+
	Z19	-	+	+
	Z20	-	+	+
	Z21	-	+	+
	Z22	-	+	+
	Z23	-	+	+
	Z24	-	+	+
	Z25	-	+	+
	Z26	-	+	+°
	Z27	-	+	+

F1	Z28	-	+	+
	Z30	-	+	+
	Z32	-	+	+
	Z07	-	-	+
	Z11	-	-	+
	Z15	-	-	+
F2	Z35	+	+	+°
	Z36	+	+	+
	Z37	+	+	+
	Z34	-	+	+
F3*	Z38	+	-	+
	Z39	+	-	+°
	Z40	+	-	+
	Z41	+	-	+
	Z42	-	-	+
F4	Z50	+	+	+°
	Z47	+	-	+
	Z51	+	-	+
	Z48	-	+	+
	Z43	-	-	+
	Z44	-	-	+
	Z45	-	-	+
	Z46	-	-	+
	Z49	-	-	+
F5	Z52	-	-	+
	Z53	-	-	+
	Z54	-	-	+
	Z55	-	-	+°
F6	Z56	-	-	+
	Z57	-	-	+°
F7	Z58	-	+	+°
F8	Z59	-	-	+°
F9	Z60	-	+	+
	Z62	-	+	+
	Z61	-	-	+
F10	Z63	-	-	+°
F11	Z64	-	+	+°
F12	Z65	-	-	+°
	Z66	-	-	+
	Z67	-	-	+
F13	Z70	-	+	+°
	Z68	-	-	+
	Z69	-	-	+
F14	Z72	-	+	+
	Z73	-	+	+°
	Z71	-	-	+
F15	Z74	-	+	+°
F16	Z75	-	+	+°
F17	Z76	-	+	+°

F18	Z78	-	+	+°
	Z77	-	-	+
	Z79	-	-	+
	Z80	-	-	+
	Z81	-	-	+
F19	Z88	-	+	-
	Z82	-	-	-
	Z83	-	-	-
	Z84	-	-	-
	Z85	-	-	-
	Z86	-	-	-
	Z87	-	-	-
	Z89	-	-	-
F20	Z90	-	-	-
F21	Z91	-	-	-
F22	Z92	-	-	+°
F23	Z93	-	-	+°
F24	Z94	-	-	+
	Z95	-	-	+
	Z96	-	-	+
	Z97	-	-	+°
	Z98	-	-	+
	Z99	-	-	+
	Z100	-	-	+
F25	Z101	-	-	+
	Z102	-	-	+
	Z103	-	-	+
	Z104	-	-	+
	Z105	-	-	+
	Z106	-	-	+°
F26	Z107	-	-	-
	Z108	-	-	-
	Z109	-	-	-
	Z110	-	-	-
	Z111	-	-	-
	Z112	-	-	-
F27	Z113	-	-	+
	Z114	-	-	+
	Z115	-	-	+°
	Z116	-	-	+
	Z117	-	-	+
F28	Z118	-	-	+°
F29	Z120	-	+	+°
	Z119	-	-	+
	Z121	-	-	+
F30	Z122	-	+	+
	Z123	-	-	+°
F31	Z124	-	+	+°
	Z125	-	-	+

F31	Z126	-	-	-
F32	Z129	-	+	+
	Z131	-	+	+
	Z133	-	+	+°
	Z127	-	-	+°
	Z128	-	-	+
	Z130	-	-	+
	Z132	-	-	+
	Z134	-	-	+
	Z135	-	-	+
	Z136	-	-	+
F33	Z137	-	+	+°
	Z138	-	-	+
	Z139	-	-	+
	Z140	-	-	+
F34	Z141	-	-	+°
F35	Z142	-	-	+
	Z143	-	-	+°
F36	Z150	-	+	+°
	Z144	-	-	+
	Z145	-	-	+
	Z147	-	-	+
	Z148	-	-	+
	Z149	-	-	+
	Z146	-	-	-
F37	Z152	-	-	+°
	Z153	-	-	+
	Z154	-	-	+
	Z155	-	-	+
	Z156	-	-	+
	Z157	-	-	+
	Z159	-	-	+
	Z160	-	-	+
	Z161	-	-	+
	Z162	-	-	+
	Z163	-	-	+
	Z164	-	-	+
	Z165	-	-	+
	Z166	-	-	+
	Z167	-	-	+
	Z151	-	-	-
	Z158	-	-	-
F38	Z168	-	+	+°
	Z169	-	+	+
F39	Z171	-	+	+°
	Z179	-	+	+°
	Z170	-	-	+
	Z172	-	-	+
	Z173	-	-	+

F39	Z174	-	-	+
	Z175	-	-	+
	Z176	-	-	+
	Z177	-	-	+
	Z178	-	-	+
F40	Z180	+#	-	+
	Z181	+#	-	+°
	Z182	+#	-	+
	Z183	+#	-	-
F41	Z184	+#	-	+°
F42	Z185	-	-	+°
F43	Z186	-	-	+
	Z187	-	-	+
	Z188	-	-	+
	Z189	-	-	+°
F44	Z190	+	+	+°
	Z192	+	-	+
	Z191	-	+	+
	Z194	-	+	+
	Z194	-	+	+
	Z193	-	-	+
	Z195	-	-	+
F45	Z197	-	+	+°
	Z198	-	+	+
F46	Z199	+	+	+°