

**Analyse der Auswirkung von *Coxiella burnetii*
Effektorproteinen auf die *in vivo* Infektion der
großen Wachsmottenlarven *Galleria mellonella***

Der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur Erlangung des Doktorgrades Dr. med.
vorgelegt von Teresa Schmidt

**Als Dissertation genehmigt von der
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-
Universität Erlangen-Nürnberg**

Vorsitzender des Promotionsorgans: Prof. Dr. Markus F. Neurath

Gutachterin: Prof. Dr. Anja Lührmann

Gutachter: Prof. Dr. Sven Krappmann

Tag der mündlichen Prüfung: 8. August 2023

Diese Abhandlung wurde am Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene des Universitätsklinikums Erlangen unter der Betreuung von Prof. Dr. Anja Lührmann von August 2015 bis März 2023 verfasst.

Inhaltsverzeichnis

I.	Abstract	13
I.I.	Objectives	13
I.II.	Design & Methods.....	13
I.III.	Observations & Results.....	14
I.IV.	Conclusions.....	14
II.	Zusammenfassung.....	15
II.I.	Hintergrund und Ziele.....	15
II.II.	Methoden	15
II.III.	Ergebnisse und Beobachtungen.....	16
II.IV.	Schlussfolgerungen und Diskussion	16
III.	Einleitung.....	18
III.I.	<i>Coxiella burnetii</i>	18
III.I.I.	Das Bakterium	18
III.I.II.	Q-Fieber.....	21
III.I.III.	Typ IVB Sekretionssystem.....	24
III.I.IV.	Effektorproteine	26
III.I.V.	Anti-apoptotische Wirkung von <i>C. burnetii</i>	28
III.I.VI.	Infektionsmodelle von <i>C. burnetii</i>	31
III.II.	<i>Galleria mellonella</i>	33
III.II.I.	Die große Wachsmottenlarve	33
III.II.II.	<i>G. mellonella</i> als Infektionsmodell	33
IV.	Zielsetzung	35
V.	Material und Methoden.....	37
V.I.	Material	37
V.I.I.	<i>Coxiella burnetii</i>	37
V.I.II.	<i>Galleria mellonella</i>	38

V.I.III. Antikörper	38
V.I.IV. Chemikalien	39
V.I.V. Medien	40
V.I.VI. Puffer und Lösungen	40
V.I.VII. Standards und Komplettssets	41
V.I.VIII. Geräte	41
V.I.IX. Verbrauchsmaterialien	42
V.II. Methoden	43
V.II.I. Bakterienanzucht	43
V.II.II. <i>Galleria mellonella</i> Infektion	43
V.II.III. Überlebensauswertung	43
V.II.IV. Quantitative PCR (Polymerase Kettenreaktion)	44
V.II.V. Hämolymphe	45
V.II.VI. Immunfluoreszenzfärbung	45
VI. Ergebnisse	47
VI.I. Das Überleben von <i>G. mellonella</i> bei <i>C. burnetii</i> NMII Infektion ist dosis- und T4SS-abhängig	47
VI.II. Die Überexpression von Flag-AnkG verringert die Pathogenität von <i>C. burnetii</i> in <i>G. mellonella</i>	49
VI.III. Die anti-apoptotische Wirkung von AnkG ist essenziell für die verringerte Pathogenität von NMII::Flag-AnkG	51
VI.IV. Auswirkung von AnkG verschiedener <i>C. burnetii</i> Stämme	53
VI.IV.I. Standardisierung der <i>G. mellonella</i> Aufzucht sind essentiell für die Reproduktion der Ergebnisse	53
VI.IV.II. Die überlebensfördernde Wirkung von AnkG _{NM} ist bei AnkG _{F3} und AnkG _{SOYTA} aufgehoben	56
VI.V. Korrelation des <i>G. mellonella</i> Überlebens mit der <i>C. burnetii</i> Last	58
VI.VI. Expression von AnkG _{NM} erhöht signifikant das Überleben von <i>G. mellonella</i> bei <i>C. burnetii</i> NMII Infektion	68

VII. Diskussion	74
VIII. Literaturverzeichnis	82
IX. Anhang	98
IX.I. Abbildungsverzeichnis	98
IX.II. Abkürzungen	99
X. Publikation	100
XI. Danksagung	101

I. Abstract

I.I. Objectives

Coxiella burnetii is a Gram-negative bacterium and the causative agent of the zoonotic disease Q fever [1]. After phagocytic uptake, the obligate intracellular bacterium *C. burnetii* modifies the infected host cell [2, 3]. Among other things, it inhibits host cell apoptosis [4]. For this purpose, a type IVB secretion system (T4SS) could be identified as essential, with the help of which *C. burnetii* is able to inject effector proteins into the host cytosol [5, 6]. Of the approximately 150 effector proteins, only a few have so far been assigned a function [7] AnkG (**ank**yrin-repeat protein **G**), CaeA (**C. burnetii** anti-apoptotic effector **A**) and CaeB (**C. burnetii** anti-apoptotic effector **B**) were found to be anti-apoptotic *in vitro* [8-14].

Increasing numbers of Q fever cases require a better understanding of the *in vivo* infection [15, 16]. Studying *in vivo* infection is difficult for *C. burnetii* because of its virulence. The avirulent laboratory strain *C. burnetii* NMII, on the other hand, allows better handling, but can only be used in immunodeficient SCID (severe combined immunodeficiency) mice [17]. In 2014, a suitable *in vivo* model for *C. burnetii* NMII was identified in the form of the large wax moth larva *Galleria mellonella* [18, 19]. The host cells represent the phagocytic haemocytes [20, 21]. Within my work, I was to establish this model in the laboratory, reproduce its suitability for *C. burnetii* NMII infections and investigate the effect of effector proteins, especially AnkG on *G. mellonella* infection.

I.II. Design & Methods

Bacteria were grown in cell-free ACCM-2 (acidified citrate- cysteine medium-2). Wild-type *C. burnetii* NMII, *C. burnetii* NMII- Δ dotA, which are not capable of forming a T4SS, and overexpression mutants of the effector proteins AnkG_{NM}, AnkG_{I11E}, AnkG_{F3}, AnkG_{SOYTA}, AnkF and a transposon mutant of AnkF were used. The *G. mellonella* larvae were infected by injection of the bacteria. Larval survival was monitored daily for 10 days, and incubation of larvae was at 37°C and at 21°C [22]. In addition, replication in VI.V. and VI.VI. was checked by quantitative PCR (polymerase chain reaction) and immunofluorescence staining.

I.III. Observations & Results

First, the *G. mellonella* infection model was confirmed as suitable for *C. burnetii* NMII infection. Larval death could be identified as dose- and T4SS-dependent. Furthermore, infection with *C. burnetii* that either overexpressed AnkG or lacked a functional T4SS (Δ dotA) resulted in enhanced survival of *G. mellonella* larvae. In contrast, infection with *C. burnetii* NMII::Flag-AnkG_{I11E} overexpressing an AnkG lacking anti-apoptotic function resulted in larval death. This demonstrated that overexpression does not lead to loss of virulence and that the anti-apoptotic function of AnkG is causative for the observed phenotype [14]. This was confirmed by using AnkG_{F3} and AnkG_{SOYTA}, which do not have a translocation domain and thus cannot be released via the T4SS [23] (VI.IV.). Furthermore, by means of qPCR and immunofluorescence staining of infected haemocytes, a replication defect of the AnkG_{NM}-overexpressing *C. burnetii* could be excluded as a causal factor for the survival of the infected larvae. Furthermore, it was shown that overexpression of AnkF does not affect the pathogenicity of *C. burnetii* in *G. mellonella* larvae. In contrast, the absence of AnkF results in a loss of virulence.

I.IV. Conclusions

G. mellonella is a suitable *in vivo* infection model for *C. burnetii* NMII. In this work, it was demonstrated that the survival of *G. mellonella* larvae infected with AnkG-overexpressing *C. burnetii* was positively influenced. The reduced pathogenicity of *C. burnetii* NMII::Flag-AnkG could be attributed to the anti-apoptotic protein effect of AnkG. Which probably leads to an increased resilience of infected haemocytes to infection [24]. Since the modification of the host cell transcript has recently been shown to be causative for the anti-apoptotic effect for AnkG [25], the transcriptome of infected *G. mellonella* should be investigated. In particular, the AnkG-mediated transcriptome changes should be the focus of this research effort. Furthermore, this work demonstrated for the first time that the T4SS effector protein AnkF could play a role in virulence. Partial results on AnkG and AnkF were part of the publication Schäfer et al. [23], which had already been published in 2020.

II. Zusammenfassung

II.I. Hintergrund und Ziele

Coxiella burnetii ist als Gram-negatives Bakterium der Erreger der Zooanthroponose Q-Fieber [1]. Nach phagozytischer Aufnahme modifiziert das obligat intrazelluläre Bakterium *C. burnetii* die infizierte Wirtszelle [2, 3] Unter anderen hemmt es die Wirtszell-Apoptose [4]. Hierfür konnte ein TypIVB-Sekretionssystem (T4SS) als essenziell identifiziert werden, mit dessen Hilfe *C. burnetii* in der Lage ist Effektorproteine ins Wirtszytosol zu injizieren [5, 6]. Von den circa 150 Effektorproteinen konnten bislang nur wenigen eine Funktion zugeordnet werden [7]. Anti-apoptotisch wirksam waren *in vitro* AnkG (engl.: **An**kyrin-repeat protein **G**), CaeA (**C. burnetii** anti-apoptotischer **E**ffektor **A**) und CaeB (**C. burnetii** anti-apoptotischer **E**ffektor **B**) [8-14]. Steigende Zahlen von Q-Fieber Fällen erfordern es die *in vivo* Infektion besser zu verstehen [15, 16]. Die Erforschung der *in vivo* Infektion ist für *C. burnetii* aufgrund ihrer Virulenz erschwert. Der avirulente Laborstamm *C. burnetii* NMII hingegen ermöglicht eine bessere Handhabung, kann allerdings nur in immundefizienten SCID (engl.: Severe combined immunodeficiency) Mäusen verwendet werden [17]. 2014 konnte ein geeignetes *in vivo* Modell für *C. burnetii* NMII in Form der großen Wachsmottenlarve *Galleria mellonella* identifiziert werden [18, 19]. Die Wirtszellen stellen die phagozytischen Hämozyten dar [20, 21]. Innerhalb meiner Arbeit sollte ich dieses Modell im Labor etablieren, die Eignung für *C. burnetii* NMII Infektionen reproduzieren und die Wirkung von Effektorproteinen, insbesondere von AnkG auf die *G. mellonella* Infektion untersuchen.

II.II. Methoden

Die Bakterienanzucht erfolgte in zellfreiem ACCM-2 (engl.: Acidified Citrate Cysteine Medium-2) Medium. Verwendet wurden wildtypische *C. burnetii* NMII, *C. burnetii* NMII- Δ dotA, welche nicht zur Ausbildung eines T4SS fähig sind und Überexpressionsmutanten der Effektorproteine AnkG_{NM}, AnkG_{I11E}, AnkG_{F3}, AnkG_{SOYTA}, AnkF und einer Transposonmutante von AnkF. Die Infektion der *G. mellonella* Larven erfolgte über Injektion der Bakterien. Das Überleben der Larven wurde über 10 Tage täglich kontrolliert, die Inkubation der Larven erfolgte bei 37°C und bei 21°C [22]. Zusätzlich

wurde die Replikation in VI.V. und VI.VI. mittels quantitativer PCR (Polymerase Kettenreaktion) und Immunfluoreszenzfärbung überprüft.

II.III. Ergebnisse und Beobachtungen

Zunächst konnte das Infektionsmodell *G. mellonella* als geeignet für die Infektion mit *C. burnetii* NMII bestätigt werden. Das Larvensterben konnte als dosis- und T4SS-abhängig identifiziert werden. Weiterhin führte die Infektion mit *C. burnetii*, die entweder AnkG überexprimierte oder der ein funktionsfähiges T4SS fehlte (Δ dotA) zu einem verbesserten Überleben der *G. mellonella* Larven. Die Infektion mit *C. burnetii* NMII::Flag-AnkG_{I11E}, die ein AnkG überexprimieren, das keine anti-apoptotische Funktion aufweist, führte dagegen zum Larvensterben. Damit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression nicht zu einem Virulenzverlust führt und, dass die anti-apoptotische Funktion von AnkG ursächlich für den beobachteten Phänotyp ist [14]. Dies wurde durch Verwendung von AnkG_{F3} und AnkG_{SOYTA}, welche keine Translokationsdomäne besitzen und somit nicht über das T4SS ausgeschleust werden können, bestätigt [23] (VI.IV.). Weiterhin konnte mittels qPCR und Immunfluoreszenzfärbung infizierter Hämocyten ein Replikationsdefekt der AnkG_{NM} überexprimierenden *C. burnetii* als ursächlich für das Überleben der infizierten Larven ausgeschlossen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden dass die Überexpression von AnkF zu keiner Beeinflussung der Pathogenität von *C. burnetii* in *G. mellonella* Larven führt. Wohingegen das Fehlen von AnkF einen Virulenzverlust zur Folge hat.

II.IV. Schlussfolgerungen und Diskussion

G. mellonella ist ein geeignetes *in vivo* Infektionsmodell für *C. burnetii* NMII. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass das Überleben von *G. mellonella* Larven, die mit AnkG-überexprimierenden *C. burnetii* infiziert waren, positiv beeinflusst wurde. Die verringerte Pathogenität von *C. burnetii* NMII::Flag-AnkG konnte der anti-apoptotischen Proteinwirkung von AnkG zugeschrieben werden. Was wahrscheinlich zu einer gesteigerten Resilienz der infizierten Hämocyten gegenüber der Infektion führt [24]. Da für AnkG kürzlich die Modifikation des Wirtszell-Transkripts als ursächlich für die anti-apoptotische Wirkung nachgewiesen werden konnte [25], sollte das Transkriptom von infizierten *G. mellonella* untersucht werden. Insbesondere die AnkG-vermittelten Transkriptomsänderung sollten im Fokus dieser

Forschungsanstrengungen stehen. Weiterhin konnte in dieser Arbeit erstmal nachgewiesen werden, dass das T4SS Effektorprotein AnkF eine Rolle für die Virulenz spielen könnte. Teilergebnisse zu AnkG und AnkF waren Bestandteil der bereits im Jahr 2020 veröffentlichten Publikation Schäfer et al. [23].

III. Einleitung

III.I. *Coxiella burnetii*

III.I.I. Das Bakterium

Das Gram-negative, obligat intrazellulär lebende Bakterium *Coxiella burnetii* ist der nahezu weltweit verbreitete Erreger des Q-Fiebers [1]. Der Erreger ließ sich bislang überall außer in Neuseeland und der Antarktis nachweisen [1]. Phylogenetisch konnte der Erreger zur Klasse der γ -Proteobacteria, genauer zur Ordnung der *Legionellales*, mittels 16 S ribosomaler RNA Sequenzierung zugeordnet werden [26]. Die Ordnung der *Legionellales* umfasst die beiden Familien der *Legionellaceae* und *Coxiellaceae*. Letztere beinhaltet unter anderem die Gattungen der *Coxiella* und *Rickettsia* [27]. Die genetisch enge Verwandtschaft der *Coxiella* zu *Rickettsia* zeigt, weshalb sie bei ihrer Entdeckung fälschlicherweise der Gattung der *Rickettsia* zugeordnet wurden. *C. burnetii* stellt die einzige bekannte Art der Gattung *Coxiella* dar. Bei Genomanalysen von 38 verschiedenen *C. burnetii* Isolaten konnten diese mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) in 6 (I-VI) Gengruppen eingeteilt werden [28]. Die Genomgröße unterschiedlicher *C. burnetii* Stämme variiert von 1,5 bis 2,4 Megabasen [29]. Zusätzlich zur Chromosomalen DNA (Desoxyribonukleinsäure) können *C. burnetii* Stämme über eines der vier autonom replizierenden und hochkonservierten Plasmide QpH1, QpRS, QpDV oder QpDG verfügen [30].

Erstmalig wurde im Jahr 1937 von Derrick ein Fieber Ausbruch in einer Fleischfabrik in Brisbane (Australien) beschrieben. Hierbei erkrankten in den Jahren 1935 bis 1942 176 der Arbeiter an einem Fieber, dessen Erreger nicht isoliert werden konnte [31]. Weswegen der Pathologe Edward Holbrook Derrick das Fieber als „query“, im Sinne von unklarem Fieber, abgekürzt Q-Fieber, bezeichnete [32]. Aus Blut und Urin der Patienten wurde nach Inokulation in Mäusen der Erreger durch den Mediziner Frank Mcfarlane Burnet und des Biologen Mavis Freeman nachgewiesen, welche ihm den Namen *Rickettsia burnetii* gaben [33]. Im gleichen Jahr isolierten die Forscher Gordon Davis und Herald Rea Cox in Minnesota nahe des Nine Mile Flusses aus 200 Zecken (*Dermacentor andersoni*) einen Erreger, den sie *Rickettsia diaporica* nannten [34]. Dieser Erreger löste bei Meerschweinchen eine Krankheit mit anhaltendem

Fieberanstieg aus. Im Verlauf konnte ermittelt werden, dass es sich um den gleichen Erreger handelte und den Forschern zu Ehren wurde diesem der Name *Coxiella burnetii* gegeben.

C. burnetii ist ein obligat intrazellulär lebendes, pleomorphes, kokkoides bis stäbchenförmiges, maximal 1µm kurzes Bakterium [1]. Es kommt in zwei unterschiedlichen Formen vor, zum einen als kleinzellige, nicht-replikative und stoffwechsellinaktive SCV (engl.: small cell variant) und als größere, replikative und stoffwechselaktive LCV (engl.: large cell variant). Während die SCV eine umweltresistente, langlebige, sporenähnliche, hochinfektiöse, extrazelluläre Form darstellt, ist die LCV die intrazelluläre Variante der Bakterien [35]. Die LCV ist gekennzeichnet durch eine geringe Chromatindichte mit körnigem Zytoplasma und eine unregelmäßige Form [36, 37]. Der Übergang der Morphologie unterliegt einem intrazellulären Kreislauf, der abhängig von der Mikroumgebung ist und einen der Sporulation ähnlichen Prozess beinhaltet [35], hierbei wandelt sich innerhalb der ersten beiden Tage nach Infektion die SCV in die LCV um. Die LCV ist danach für weitere 4 Tage bis zur stationären Wachstumsphase sichtbar, um danach wieder in die SCV überzugehen [38, 39]. Die Verdopplungszeit in *in vitro* Versuchen beträgt je nach *C. burnetii* Spezies und Zelllinie zwischen 15 und 36 Stunden [40].

C. burnetii verfügt über mehrere Virulenzfaktoren, die entscheidend für die Pathogenität des Erregers sind. Unter anderem gehören dazu das Oberflächenantigen Lipopolysaccharid (LPS) und das Typ IV Sekretionssystem (T4SS). Die virulente Form von *C. burnetii* verfügt über ein LPS mit langem O-Antigen, das sogenannte glatte LPS. Dieses glatte LPS verdeckt die weiteren Oberflächenantigene und verhindert so die Erkennung durch das Immunsystem. In immunkompetenten Wirten bleibt die Ausbildung eines glatten LPS bei Replikation der *Coxiellen* erhalten und führt dadurch zu einer Entstehung von Phase I Antikörpern, die gegen das glatte LPS gerichtet sind. Infizieren virulente Bakterien einen immuninkompetenten Wirt, wie beispielsweise befruchtete Hühnereier oder Zellkulturen, bildet *C. burnetii* LPS mit verkürztem O-Antigen aus [41-43]. Das verkürzte LPS wird als raues oder Phase II LPS bezeichnet und ist nicht mehr in der Lage die weiteren Oberflächenantigene zu bedecken, was dem Komplementsystem eine rasche Eliminierung von *C. burnetii* erlaubt [44, 45]. Somit gelten die als Phase II Bakterien bezeichneten *C. burnetii* als avirulent. Der Übergang von Phase I zu Phase

II LPS, der eine chromosomale Gendeletion zu Grunde liegt, wird als Phasenvariation bezeichnet [46]. Aufgrund der Phasenvariation konnte durch Vermehrung des Nine Mile Phase I (NMI) (RSA 493) Stammes in Hühnereiern der avirulente und heutzutage oft in Laboren genutzte Nine Mile Phase II (NMII) Stamm generiert werden [47]. Im Gegensatz zur LPS-Phasenvariation bei *Enterobacteriaceae* ist der Phasenübergang zum rauen LPS bei *C. burnetii* durch Gendeletion irreversibel.

Die Entdeckung der Avirulenz von *C. burnetii* NMII ermöglichte eine Einstufung des Erregers als potentiell krankheitserregend mit guter Behandelbarkeit [48]. Wodurch *C. burnetii* NMII im Gegensatz zu allen übrigen *C. burnetii* Stämmen in die Risikogruppe 2, anstatt 3, nach Biostoffverordnung eingruppiert wurde [48, 49]. Erreger der Risikogruppe 3 vereinen die Eigenschaften der ernststen Gefahr für Beschäftigte mit Auslösung einer schweren Krankheit in sich. Nach TRBA (Technische Regeln für biologische Arbeitsstoffe) -100 werden mit ansteigender Risikogruppen Zahl umfangreichere Schutzmaßnahmen im Umgang mit biologischen Arbeitsstoffen nötig [50]. Labore müssen der Risikogruppe entsprechende Ausstattungen aufweisen, um der benötigten Schutzstufe zu entsprechen [50]. Der Umgang mit *C. burnetii* NMII erfolgt somit in „S2“ (Schutzstufe 2) Laboren, mit gegenüber „S3“ Laboren deutlich reduzierten Arbeitsschutzbestimmungen. Die hierdurch entstandene Erleichterung der Arbeitsbedingungen im Umgang mit *C. burnetii* NMII gegenüber *C. burnetii* NMI, ermöglichte erst die umfassende Erforschung des Erregers.

Abgesehen von der Lockerung der Arbeitsbedingungen wäre eine Erforschung von *C. burnetii* bis zum heutigen Kenntnisstand nicht möglich gewesen, wenn es nicht weitere Neuerungen im Umgang mit *C. burnetii* gegeben hätte. Ein Meilenstein der *C. burnetii* Forschung stellt die Entwicklung eines Zell-freien Mediums, dem ACCM bzw. ACCM-2 (engl.: acidified citrate cysteine media) im Jahr 2009 und 2011 dar [51-53]. Zur Optimierung des ACCM wurde das fetale Rinderserum durch Methyl- β -Zyklodextrin ausgetauscht, wodurch ACCM-2 entstand. Darüber hinaus wurde das ACCM-2 weiter optimiert, indem ernährungsphysiologisch Aminosäuren zugesetzt wurden, da *C. burnetii* auxotroph für elf Aminosäuren ist [54]. Aufgrund dieses Mediums konnte *C. burnetii* erstmals ohne Gebrauch von Zellkulturen vervielfältigt werden. Obwohl *C. burnetii* im Medium einer Phasenvariation unterliegt und damit die Eigenschaften der *Coxiellen* verändert werden, konnte gezeigt werden, dass *C. burnetii* seine Virulenz

nicht verliert [43]. Dies wiederum erleichterte die Entwicklung neuer Modelle zur Manipulation des *C. burnetii* Genoms [55].

Über Inhalation von erregerehaltigem Staub oder Aerosolen erfolgt die Infektion mit *C. burnetii* beim Menschen. Primäre Wirtszellen stellen hierbei die Alveolarmakrophagen und Monozyten der Lunge dar, welche die Erreger phagozytieren [1, 17]. Diese Zellen sind die primären Wirtszellen und Ort der bakteriellen Replikation, wobei auch Epithelzellen, Trophoblasten, Endothelzellen, Fibroblasten und Adipozyten infiziert werden können [56-67]. *C. burnetii* wird über eine Aktin abgängige Phagozytose mittels $\alpha\beta 3$ -Integrin Adhäsion in die Makrophagen aufgenommen [3]. Extrazelluläre Vermehrung wurde bei Infektionen von Tieren und Menschen bislang nicht beobachtet [45].

Nach Verschmelzung des Phagosoms mit dem Lysosom und einem damit einhergehenden Absinken des pH-Wertes, sind in dem frühen Phagolysosom die idealen Replikationsbedingungen geschaffen [2]. Der Prozess der Phagozytose dient dem angeborenem Immunsystem der Eliminierung von Pathogenen, da durch Ansäuern des Phagolysosom eine enzymatische Hydrolyse bakterieller Proteine, Polysaccharide und Nukleinsäuren ermöglicht wird [68]. *C. burnetii*-Infektion kann sich allerdings dem sauren, sauerstoffarmen Milieu anpassen und wird nicht abgetötet. Im Gegenteil *C. burnetii* benötigt die Bedingungen im Phagolysosom um zu replizieren [69, 70]. *C. burnetii* nutzt das bereits bestehende Kompartiment und verändert es so, dass es optimale Replikationsbedingungen innerhalb der Wirtszelle erhält [71]. Die dadurch entstehenden Vakuolen innerhalb der Wirtszellen werden als CCV (engl.: *Coxiella*-containing-vacuoles) oder parasitophore Vakuolen bezeichnet [72]. Die CCV ist charakterisiert durch einen sauren pH, Cathepsin D, saure Hydrolasen, kationische Peptide und lysosomale Membranproteine wie LAMP-1 (Lysosomen assoziiertes Membranprotein 1) [60, 73, 74].

III.I.II. Q-Fieber

Im Fall des Q-Fiebers handelt es sich um eine Zooanthroponose, da *C. burnetii* von infiziertem Vieh, wie Rindern, Schafen und Ziegen auf den Menschen übertragen wird [1]. Weitere Erregerreservoirare stellen Vögel, Nagetiere, Amöben und Zecken dar. Infizierte Tiere sind selten symptomatisch, mit Ausnahme einer erhöhten Abortrate bei trächtigen Tieren [75]. Sie fungieren als Erregerreservoir und führen zu einer weiteren

Verbreitung von *C. burnetii*. Am häufigsten erfolgt die Infektion mit *C. burnetii* über Inhalation erregerehaltiger Stäube, kontaminierter Geburtsprodukte, Milch oder Ausscheidungen infizierter Tiere. Die Aerosole können hierbei bis zu 30 km weit infektiös sein, da bereits 10 inhalierte Bakterien eine Infektion auslösen können [76, 77]. Es sind auch weitere Infektionswege wie Ingestion von Rohmilchprodukten, Übertragung durch Zecken und Mensch-zu-Mensch Übertragung denkbar [22]. Während es für die Infektion durch Rohmilchprodukte nur indirekte Hinweise über eine gesteigerte Seroprävalenz gibt, konnten wenige Fälle der Mensch-zu-Mensch Übertragung berichtet werden. Hierbei handelte es sich um Infektionen durch *C. burnetii* beinhaltende Geburtsprodukte infizierter Schwangerer [78, 79]. Eine menschliche Infektion durch Zeckenkot konnte noch nicht nachgewiesen werden, allerdings spielt dieser Infektionsweg wohl eine Rolle bei der Verbreitung der Erreger zwischen Tieren [22].

Nach einer Inkubationszeit von 2-3 Wochen kommt es bei Menschen in 40 % zu einer Symptomatik [80]. Das akute Q- Fieber kann hierbei von milden Symptomen einer Grippe ähnlichen Erkrankung bis hin zu schweren Formen wie Pneumonie, Hepatitis und Akuter Endo- Peri und Myokarditis und neurologischer Manifestation, variieren [22, 44, 80]. Die hiervon häufigste Form stellt die milde Form mit guter Prognose dar, sie ist gekennzeichnet durch Fieber über 40 °C und vor allem retrobulbär gelegenen Kopfschmerzen. Von der schweren Ausprägung des akuten Q-Fiebers hat die Herzbeteiligung die höchste Letalität, die jedoch mit ca. 2 % aller Primärinfektionen selten ist [81].

Wie bereits beschrieben sind 60 % der Primärinfektionen asymptomatisch. Erfolgt nach der Infektion mit *C. burnetii* aufgrund eines geschwächten Immunsystems keine Serokonversion und somit keine Infektionseindämmung kann es zur Erregerpersistenz kommen. Diese Erregerpersistenz wiederum kann weiterhin asymptomatisch bleiben oder zu einem so genannten chronischen Q-Fieber führen. Der Begriff des chronischen Q-Fiebers stellt einen historischen Begriff dar, der früher mit der *C. burnetii* induzierten Endokarditis lenta gleichgesetzt wurde. Aktuell gibt es Debatten darüber, ob der Begriff erstens die Formen aller persistierenden *C. burnetii* Infektionen abbilden kann und zweitens, ob es nicht auch akute Endokarditiden gibt, die dann nicht als chronisches Q-Fieber bezeichnet werden können [22]. Die niederländische Q-Fieber Konsensus Gruppe hat im Jahr 2011 Leitlinien

herausgegeben, nach denen eine chronische Q-Fieber Infektion diagnostiziert werden kann, wenn entweder ein positiver *C. burnetii* PCR (Polymerasekettenreaktion) Nachweis aus Patientenblut oder Gewebe erfolgt ist oder ein IgG (Immunglobulin G) Phase I Titer über 1:1,024 und nach Dukes-Kriterien diagnostizierte Endokarditis oder Großgefäßvaskulitis nachgewiesen wurde [82].

Eine spezielle Variante des persistierenden Q-Fiebers stellt die Infektion von Schwangeren dar. Bei Schwangeren ist zum einen die Therapie aufgrund der Kontraindikation gegen Doxycyclin eingeschränkt und es muss auf Co-Trimoxazol zurückgegriffen werden, zum anderen stellt die Infektion eine Gefahr für das ungeborene Kind dar. Wie bei trächtigem Vieh wurde auch bei Schwangeren mit *C. burnetii* Infektion eine erhöhte Abortrate festgestellt [83].

Die Therapie der Erkrankung sollte bei schweren Formen des akuten Q-Fiebers und bei chronischem Q-Fieber mit Antibiotika erfolgen. Während bei akutem Q-Fieber eine Monotherapie mit 200 mg Doxycyclin täglich meist für wenige Wochen ausreichend ist, sollte die chronische Form mit einer Kombination von 200 mg Doxycyclin und 600 mg Hydroxychloroquin täglich für mindestens 18 Monate therapiert werden. Bei Nachweis einer *C. burnetii* Endokarditis, als Ausprägung des chronischen Q-Fiebers, ist meist eine lebenslange antibiotische Therapie von Nöten. Bei mittlerweile steigenden Resistenzraten gegenüber Doxycyclin, sollte bei ungenügendem Ansprechen auf Kombinationstherapien von Doxycyclin mit weiteren Antibiotika umgestiegen werden [22].

Als Risikofaktor für eine *C. burnetii* Infektion gilt vor allem die berufliche Exposition mit Schafen, Rindern und Ziegen. Viehzüchter sind dabei am meisten durch Geburtsprodukte aufgrund ihrer hohen Bakterienlast gefährdet. In den Jahren 2007 bis 2009 ereignete sich in den Niederlanden um die Stadt s'-Hertogenbosch der bislang größte Q-Fieber Ausbruch, bei dem über 4.000 Menschen an Q-Fieber erkrankten und sich infolgedessen mindestens 150 Todesfälle ereigneten[84] [15]. Als begünstigend für die Ausmaße des Ausbruchs gilt die hohe Rate an Ziegenfarmen zur Herstellung von Ziegenmilchprodukten in den Niederlanden und die dichte urbane Besiedelung, gepaart mit einem trockenen, windreichen Klima im Jahr 2007 [15, 16]. Ursächlich waren gesteigerte Q-Fieber assoziierte Abortraten in 7 Ziegenherden und einer Schafzucht im Jahr 2007 [85]. In Deutschland werden dem Robert-Koch-Institut jährlich zwischen 200 und 500 Fälle gemeldet. Die Fälle haben ihren Ursprung meist

in Schafzucht-Betrieben, besonders beim Ablammen infizierter Tiere werden viele Bakterien freigesetzt [45, 86].

III.1.III. Typ IVB Sekretionssystem

Um das Mikromilieu außerhalb des Bakteriums zu verändern, müssen exprimierte Proteine, transkribierte Nukleinsäuren oder Nukleoproteinkomplexe durch die Zellwand transportiert werden können. Viele Gram-negative Bakterien, wie beispielsweise *Legionella pneumophila*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Helicobacter pylori*, *Brucella spp.*, *Bordetella pertussis*, *Rickettsia prowazekii*, und *C. burnetii* bilden hierfür Multiproteinkomplexe, die als Typ IV Sekretionssysteme (T4SS) bezeichnet werden, aus [87]. Die Typ IV Sekretionssysteme stellen molekulare Spritzensysteme dar, welche durch eine gebildete Pore Effektorproteine ins Wirtszytosol injizieren können. Damit stellt das T4SS einen wichtigen Virulenzfaktor der Gram-negative Erreger dar [5, 88, 89]. Es konnte die Beobachtung gemacht werden, dass *C. burnetii* Mutanten, denen ein funktionsfähiges T4SS fehlte, zwar keinen Nachteil bei der Invasion in die Zielzellen aufweisen, aber nicht in der Lage waren in Makrophagen parasitophore Vakuolen auszubilden und darin zu Replizieren [5].

Die Typ IV Sekretionssysteme können entsprechend ihrer Proteinzusammensetzung in Typ IVA Sekretionssysteme und Typ IVB Sekretionssysteme unterschieden werden. T4ASS sind seinerseits durch homologe Proteine der Virulenzproteine VirB und VirD4 des Ti-Plasmids (Tumor induzierendes Plasmid) von *Agrobacterium tumefaciens* charakterisiert [90]. T4BSS zeichnen sich durch Homologie zum Incl Plasmid Tra/Trb Systems (Transferproteine des Inkompatibilität Plasmids Typ I) oder des Dot/Icm Systems von *L. pneumophila*, dem Erreger der Legionärskrankheit, aus [90, 91]. Die Bezeichnungen der beteiligten Proteine sind aus deren Funktion abgeleitet, Dot steht für Defekt des Organellentransports und Icm für intrazelluläre Multiplikation; sind die Erreger defizient für diese Proteine, kann keine Replikation der Erreger innerhalb infizierter Zellen stattfinden [92-94]. Der Austausch von Plasmiden über T4SS wird als Konjugation bezeichnet und dient der Weitergabe von Virulenzgenen oder Antibiotikaresistenzgenen von Bakterium zu Bakterium [95]. Der Weitergabe von Proteinen, Nukleoproteinkomplexen und Nukleinsäuren dient das T4ASS, wohingegen das T4BSS ausschließlich Proteinen transferiert [96, 97]. *C. burnetii* bildet ein T4BSS, ähnlich dem Dot/Icm Sekretionssystem von *L. pneumophila*,

aus [98]. Für das Dot/Icm Sekretionssystem von *L. pneumophila* konnten zwei kodierende Genregionen mit jeweils 7 und 18 Genen identifiziert werden. Bei *C. burnetii* befinden sich 21 Gene in einer 35 kB großen Genregion von denen nur das *icmF* Gen 1.270 Basenpaare entfernt liegt [87, 99].

Nachfolgend ist eine schematische Abbildung des T4BSS von *C. burnetii* und *L. pneumophila* dargestellt.

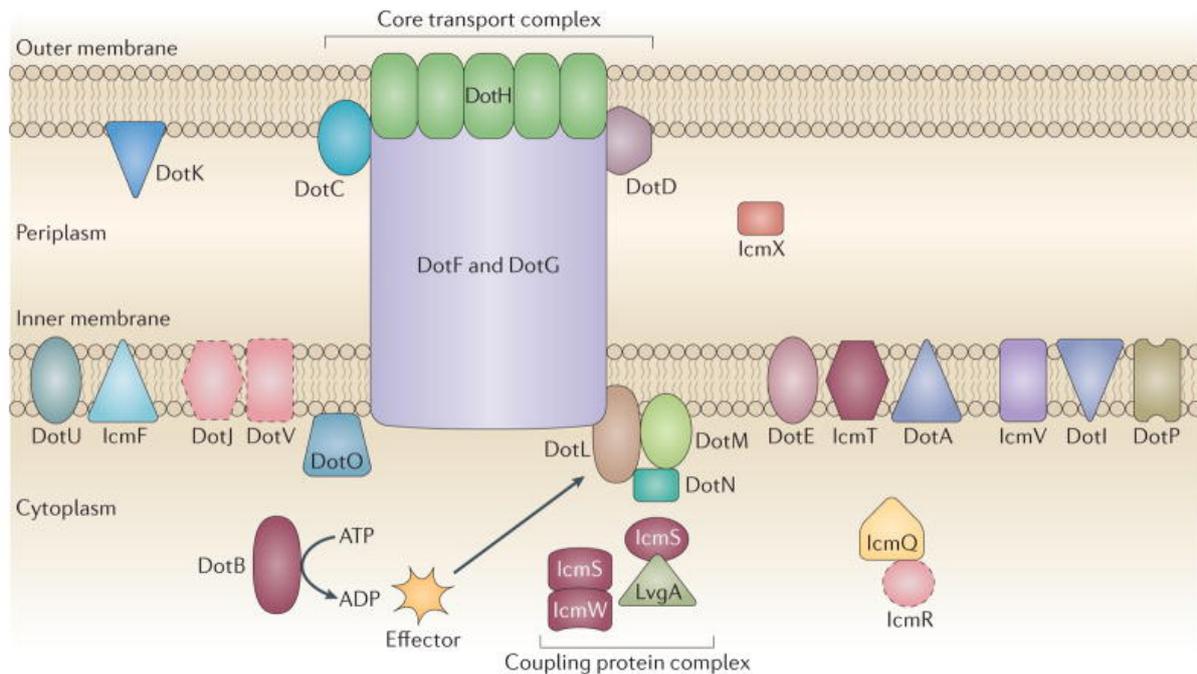


Abb. 1 The type IVB secretion systems of *C. burnetii* and *Legionella pneumophila* [55]

C. burnetii kodiert für 24 der 27 Komponenten des *Legionella pneumophila* Typ IVB Sekretionssystems (T4BSS). Dem *C. burnetii* Sekretionssystem fehlen drei Homologe, DotJ (Defekt im Organellenverkehr J; auch bekannt als IcmM), DotV und IcmR (intrazelluläre Multiplikation R), die mit einem gestrichelten Umriss dargestellt sind. Studien mit *L. pneumophila* identifizierten einen Subkomplex, der als Kerntransportkomplex bezeichnet wird, der die inneren und äußeren Membranen verbindet und aus DotC, DotD, DotF, DotG und DotH besteht. Da dieser Komplex auch im T4ASS konserviert ist, wird angenommen, dass *C. burnetii* einen ähnlichen Komplex zusammensetzt. Ein zweiter Subkomplex besteht aus dem Kopplungsprotein DotL (das eine Verbindung zwischen den Substraten und dem Transportkomplex herstellt), DotM, DotN, IcmS und IcmW. Die ATPase-Aktivität von DotB ist für die Sekretion erforderlich, aber die Funktion dieser Aktivität muss noch bestimmt werden. *C. burnetii* Proteine, die die

entsprechenden Proteine im *L. pneumophila*-System ersetzen können, sind kastanienbraun dargestellt [55].

Das T4SS von *C. burnetii* besteht aus 24 verschiedenen Proteinen, welche, wie ein Spritzenapparat angeordnet, sowohl die Zellwand der Bakterien als auch die Membran der parasitophoren Vakuole durchspannen. Die Homologie, von 24 der 27 für das T4SS kodierenden Genen von *L. pneumophila* und *C. burnetii*, zeigt die phylogenetische Nähe der beiden Bakterienfamilien, daher ist es auch nicht verwunderlich, dass *L. pneumophila* zu Beginn der weiteren Erforschung von *C. burnetii* als Erregermodell zu Hilfe genommen wurde. [99] [98]. Jedoch gibt es auch genomische Unterschiede beider T4SS, beispielsweise weist eines der *icmF*-Gene von *C. burnetii* ein Stopcodon in der kodierenden Sequenz auf und für das in *L. pneumophila* codierte *icmR*-Gen gibt es in *C. burnetii* kein homologes Protein [100]. Das Dot/Icm Sekretionssystem dient sowohl *L. pneumophila* als auch *C. burnetii* der Injektion von so genannten Effektorproteinen; Proteine, die an unterschiedlichen Stellen den Wirtszellmetabolismus modulieren [6]. Zum Ausschleusen von *C. burnetii* Effektorproteinen kommt es erst bei saurem pH und circa 24 Stunden nach Infektion [101].

III.I.IV. Effektorproteine

Für *C. burnetii* sind ungefähr 150 verschiedene Effektorproteine bekannt, deren Funktion weitestgehend unbekannt ist und Gegenstand der aktuellen Forschung darstellt [7]. Die Mehrzahl der Effektorproteine wird 24 Stunden nach der Infektion in die Wirtszelle transloziert, dafür steigt die Anzahl an translozierten Proteinen ab 8 Stunden nach Infektion bis zum Erreichen des Maximum nach 24 Stunden [101]. Effektorproteine zeichnen sich durch eine C-Terminal (engl.: Carboxy-terminus) gelegene T4SS Translokationssequenzen aus. Viele Effektorproteine haben außerdem eukaryotische Proteindomänen, Coiled-Coil-(dt.: Doppelwendel) Domänen, Ankyrin (Ank) Repeat (dt.: Wiederholung) -Domänen, Tetratricopeptid Repeat (TPR) und F-Box-Domänen (erstmalig gefunden im Cyclin F Protein) [102-105]. Ein Modell eines funktionslosen Dot/Icm Sekretionssystems sowohl für *L. pneumophila* als auch für *C. burnetii* stellt eine Deletionsmutante nach Entfernung des *dotA*-Gens dar [88, 89, 106]. Die Deletionsmutante ist ihrerseits unverändert in Flüssigmedium replikationsfähig, ist allerdings intrazellulär nicht vermehrungsfähig. Das T4SS kann somit als essentieller

Faktor für die *Coxiellen* Replikation angesehen werden, was daran liegt, dass funktionslose Sekretionssysteme keine Effektorproteine ins Wirtszytosol injizieren können [101]. Daraus kann man schließen, dass Effektorproteine essenziell für die intrazelluläre Replikation sind.

Effektorproteine, die den vesikulären Transport und damit die Transformation der CCV beeinflussen, sind beispielsweise CvpA (**Coxiellen Vakuolen Protein A**) und Cig57 (co-reguliert mit *icm-Gen 57*). Während CvpA den Clathrin vermittelten Vesikeltransport unterminiert [107], greift Cig57 ebenfalls in den Clathrin vermittelten Vesikeltransport über die Interaktion mit FCHO2 (FER/CIP 4 einziges Homologes Protein 2) ein, dem Protein, das sich in Clathrin bedeckten Grübchen findet, ein. Durch die Interaktion kann die Entstehung der CCV erleichtert werden [108]. Überdies gibt es Effektorproteine, die der weiteren Ausreifung und Vergrößerung der CCV dienen. Das Protein Cig2 (co-reguliert mit *icm Gen 2*)/CvpB (**Coxiellen Vakuolen Protein B**) bindet Phosphatidylinositol-3-Phosphatase (PI3P) und Phosphatidylserin (PS) und erleichtert damit die Fusion der parasitophoren Vakuole mit Autophagosomen [109, 110]. CirA (**Colicin Ia Rezeptor A**) steigert seinerseits die GTPase Aktivität von RhoA (Ras-Homologe A) um damit die Biogenese der CCV zu unterstützen [111]. Weitere mit der Membran der parasitophoren Vakuole und LAMP-1 (engl.: Lysosomal-associated membrane protein 1) positiven Vesikeln assoziierte Proteine stellen die Effektorproteine CvpC, CvpD und CvpE (engl.: **Coxiella vacuoles protein C, D, E**) dar, die auf noch ungeklärtem Weg die Ausbildung der CCV ermöglichen [112].

Neben der Modifikation der replikativen Nische, können Effektorproteine von *C. burnetii* auch indirekt das Überleben und die Vermehrung des Erregers sichern. Dabei steht der Erhalt der Wirtszelle im Mittelpunkt. Hierfür gilt es immunvermittelte, programmierte Tottodwege zu inhibieren. Die Hemmung der Wirtszell-Apoptose wurde 2007 erstmalig für *C. burnetii* beschrieben, wobei diese Strategie für die intrazellulären Erreger *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Bartonella henselae* bekannt war [4] [113, 114]. Es konnte für das Effektorprotein IcaA (Inhibitor der **Caspase Aktivierung A**) eine inhibierende Wirkung auf das Inflammasom und somit auf die Pyroptosis nachgewiesen werden [115]. Darüber hinaus konnte für die Effektorproteine AnkG (engl.: **Ankyrin-repeat protein G**), CaeA (**C. burnetii anti-apoptotischer Effektor A**) und CaeB (**C. burnetii anti-apoptotischer Effektor B**) eine hemmende Wirkung auf die Wirtszell-Apoptose entdeckt werden [8-14].

Inwieweit das Wirtszellgenom durch *C. burnetii* Effektorproteine beeinflusst wird ist weitestgehend unbekannt, jedoch zeigten Chromatin Immunopräzipitationsanalysen, dass das Effektorprotein CBU (*Coxiella burnetii*) 1314 im Zellkern mit Chromatin assoziiert ist und dadurch einen Effekt auf das Transkriptom haben könnte [116, 117]. Weitere Effektorproteine, deren Funktion ebenfalls nicht geklärt ist, zeigen Assoziation mit unterschiedlichen Zellkompartimenten, was wiederum eine Wirkung auf deren Funktion nahelegt. Beispiele hierfür sind CpeB (engl.: **C**oxiella **p**lasmid **e**ffector protein **B**) in Autophagosomen, CpeD (engl.: **C**oxiella **p**lasmid **e**ffector protein **D**) im endoplasmatischen Retikulum sowie CpeC (engl.: **C**oxiella **p**lasmid **e**ffector protein **C**), welches sich in Ubiquitin reichen Kompartimenten befinden und den proteasomalen Proteinabbau beeinflusst [88, 104].

An der Zelladhäsion und Invasion scheinen Effektorproteine nicht beteiligt zu sein, da sie einerseits zu spät nach der Infektion transloziert werden und andererseits bei funktionslosem Sekretionssystem keine Unterschiede der Infektionsrate festgestellt werden konnten. Vielmehr ist der Virulenzfaktor OmpA (engl.: **O**uter **m**embrane protein **A**) als Invasin von *C. burnetii* gefunden worden, welches das Eindringen des Erregers in nicht-phagozytische Zellen induziert [118].

III.I.V. Anti-apoptotische Wirkung von *C. burnetii*

Apoptose ist neben Pyroptose und Nekrose ein Weg des programmierten Zelltodes in eukaryotischen Zellen [119]. Durch Apoptose können überflüssige, gealterte, infizierte oder beschädigte Zellen ohne Entwicklung einer Entzündungsreaktion gezielt eliminiert werden [120]. Dadurch ergibt sich eine wichtige Rolle der Apoptose im Wachstum, Überleben und Homöostase multizellulärer Organismen. Besondere Bedeutung kommt der Apoptose bei Entfernung DNA-beschädigter Zellen zu, womit sie entscheidend an der Prävention von Krebs beteiligt ist.

Apoptotische Zellen sind sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch durch bestimmte Charakteristika definiert. Nach Induktion der Apoptose schrumpfen die Zellen, wodurch das Zytoplasma, die Zellorganellen und das Chromatin (Pyknose) dichter werden. Anschließend wird die DNA fragmentiert und die Zelle löst sich auf, indem sie Vesikel, so genannte anti-apoptotische Körperchen bildet. Dieser Prozess wird als Knospung bezeichnet. Die entstandenen anti-apoptotischen Körperchen

können dann von umliegenden Zellen und Makrophagen phagozytiert werden [119, 121, 122].

Apoptose kann durch unterschiedliche Trigger induziert werden, die dann in einem extrazellulären oder intrazellulären Signalweg münden. Der extrinsische Signalweg wird durch Bindung diverser Liganden, wie beispielsweise Tumornekrosefaktor (TNF) an Todesrezeptoren, wie TNF-Rezeptor 1, CD 95 (engl.: Cluster of Differentiation 95) und TRAIL-R1/2 (engl.: TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1/2) der Zellmembran aktiviert. Der intrazelluläre Signalweg wird Mitochondrien-vermittelt durch intrazelluläre Stimuli wie Strahlung, Toxine, Hypoxie, freie Radikale, Hyperthermie, Fehlen von Wachstumsfaktoren und Weiterem aktiviert [122, 123].

Intrazellulär sind die extrinsische und intrinsische Apoptose eng miteinander verbunden und führen zu einer gegenseitigen Verstärkung der Signale. Im Weiteren sind viele tausend Proteine an der Vermittlung des Zellunterganges beteiligt [11]. Unter Anderem kommt es zur Spaltung des DNA-Reparaturproteins PARP-1 (engl.: Poly-ADP-ribose-polymerase 1) [124]. Der Vorgang der Apoptose ist durch ein ausgewogenes Zusammenspiel pro- und anti-apoptotischer Faktoren reguliert.

C. burnetii macht sich die physiologische Regulierung der Apoptose zu Nutze, um sowohl die intrinsische als auch die extrinsische Apoptose zu inhibieren. Der Entdeckung der anti-apoptotischen Wirkung von *C. burnetii* 2007 schlossen sich zahlreiche Studien an, um den Wirkmechanismus besser zu charakterisieren. Früh zeigte sich, dass sich der anti-apoptotische Effekt mittels Einsatzes von bakteriellen Proteinsynthesehemmern, wie Chloramphenicol und Rifampicin, aufheben ließ. Dies ließ die Annahme eines Protein-abhängigen Wirkmechanismus zu [4, 125]. Um dies zu bestätigen, erfolgte eine Untersuchung einiger, der in der Sequenzierung des kompletten *C. burnetii* identifizierten 13 Ankyrin-Wiederholungs-Domänen beinhaltende Proteine (Anks) [99]. Zur Vermittlung der anti-apoptotischen Wirkung müssen Effektorproteine mit Proteinen der Wirtszelle interagieren können, dies kann durch Proteindomänen, wie beispielsweise Ankyrin-Wiederholungs-Domänen, ermöglicht [105] ermöglicht werden. Es zeigte sich zunächst, dass Anks von *L. pneumophila* und *C. burnetii* von einem funktionierenden T4SS transloziert werden [102, 105]. Schließlich konnte 2010 AnkG als erstes, Apoptose inhibierendes Effektorprotein von *C. burnetii* identifiziert werden [13].

Mittlerweile sind mehrere Signalwege sowohl der intrinsischen als auch der extrinsischen Apoptose bekannt, die von *C. burnetii* beeinflusst werden. Dabei ist meist das Zusammenspiel der Effektorproteine und Wirtszellproteine noch unbekannt. Es konnte gezeigt werden, dass mit *C. burnetii* infizierte Makrophagen nach Stimulation mit Staurosporin, einem potenten Induktor der intrinsischen Apoptose, ein geringeres Zellsterben und eine geringere Konzentration an gespaltenen Caspasen 3 und 9 sowie PARP aufwiesen. Gleichzeitig wurde das Expressionslevel anti-apoptotischer Proteine [125] erhöht, um die Cytochrom C Freisetzung des Mitochondriums zu inhibieren [126]. Ergänzend dazu wurde eine verminderte Cytochrom C Freisetzung in *C. burnetii* infizierten Säugetierzellen beobachtet, nachdem sie mit Staurosporin und UV-Licht behandelt wurden [4]. Eine geringere PARP Spaltung in Makrophagen konnte ebenfalls bei Induktion der extrinsischen Apoptose mittels TNF α detektiert werden [125].

Ergänzend dazu konnten nachgewiesen werden, dass *C. burnetii* einige Wirtszellproteine, die an der Signaltransduktion der Apoptose beteiligt sind, beeinflusst. Hierbei handelt es sich unter anderem um die anti-apoptotischen Kinasen Akt (Proteinkinase B), Erk1/2 (engl.: Extracellular signal-regulated kinase 1, 2) und die Proteinkinase A [127, 128].

Bislang sind drei bakterielle Proteine namens AnkG, CaeA und CaeB bekannt, die einen anti-apoptotischen Effekt auf die Wirtszelle haben. Von diesen drei Effektorproteinen ist die Funktion von AnkG am besten erforscht. AnkG ist ein 39 kDa Ankyrin Repeat- Domänen Protein [13]. Die anti-apoptotische Wirkung wird über die 28 N-terminalen (Aminoterminal), der insgesamt 338 Aminosäuren vermittelt. AnkG inhibiert sowohl die Staurosporin-induzierte als auch die pathogeninduzierte Wirtszellapoptose, indem es das Wirtszellprotein p32 bindet [13]. Dabei ist jedoch nicht die Inhibierung des Proteins p32 für die anti-apoptotische Wirkung entscheidend, sondern der Transfer von AnkG mittels p32 zum Zellkern [9]. Dort wird AnkG durch Bindung an Importin- α 1, einem mit der Zellkernpore assoziierten Protein, in den Nukleus geschleust. Die intranukleäre Lokalisation von AnkG ist seinerseits essentiell für die anti-apoptotische Wirkung [14]. Intranukleär interagiert AnkG_{NM} mit der Wirtszell nukleären RNA Helikase DDX21 (engl.: DExD box RNA helicase 21) und der kleinen, nukleären 7SK RNA. Durch Bindung an sowohl DDX21 als auch die 7SK RNA wird CDK9 (engl.: Cyclin-dependend kinases 9) vom 7SK snRNP (kleinen, nukleären

Ribonukleoprotein) Komplex freigesetzt. Der Freisetzung von CDK9 folgt über Aktivierung der RNA Polymerase II eine Veränderung der Transkription pro- und antiapoptotischer Gene, wodurch das Verhältnis hin zur anti-apoptotischen Wirkung verschoben wird [25].

Durch Überexpressionsversuche verschiedener ektopisch exprimierter Effektorproteine von *C. burnetii* konnten die zwei Proteine CaeA und CaeB als anti-apoptotisch identifiziert werden. Beide Proteine inhibierten hierbei den intrinsischen Apoptose Weg [8]. Es wird vermutet, dass CaeB die Permeabilität der Mitochondrienmembran verringert, wodurch kein Cytochrom C ins Zytosol freigesetzt werden kann. CaeA hemmt zusätzlich zur intrinsischen Apoptose und die extrinsische Apoptose [12]. Als entscheidend für die anti-apoptotische Wirkung konnte eine Tandemwiederholung der Aminosäuren Glutaminsäure (E) und Lysin (K), das so genannte EK-Motiv, identifiziert werden [12]. Die weitere Funktion und die Wirkweise sowohl für CaeA als auch für CaeB sind bislang nicht weiter bekannt. Interessant ist, dass die für CaeA und CaeB kodierenden Gene in ihrer Länge zwischen Coxiellenstämmen variieren. So sind CaeA und CaeB bei *C. burnetii* NM 25.1 kDa und 16.5 kDa groß, wohingegen ihre Homologen der *C. burnetii* Dugway 36.9 kDa und 49.7 kDa groß sind [8]. Inwieweit die Verkürzung der Proteine Einfluss auf deren Funktion nimmt, ist bislang nicht geklärt.

III.I.VI. Infektionsmodelle von *C. burnetii*

Zur Untersuchung der *C. burnetii* Infektion stehen mehrere *in vitro* und *in vivo* Modelle zur Verfügung. Wie bereits beschrieben gibt es eine Vielzahl an Zelllinien, die zur Analyse der Wirtszell-Pathogen-Interaktion *in vitro*, geeignet sind. Einige davon sind HeLa (engl.: Human cervical epithelial), Vero (engl.: African green monkey kidney epithelial), CHO (engl.: Chinese hamster ovary fibroblast), und HEK 293 (engl.: Human embryonic kidney) Zellen [13, 60, 129-132]. Allerdings entsprechen diese Zelllinien nicht den primären Wirtszellen der *C. burnetii* Infektion in Säugetieren. Die während der Infektion primär befallenen Zellen sind Makrophagen und dendritische Zellen, und somit professionelle Fresszellen des Immunsystems [1, 17]. Um den natürlichen Infektionsweg beim Menschen besser durch *in vitro* Infektionen nachempfinden zu können, wurden daher primäre menschliche Makrophagen und dendritische Zellen zur Infektion mit *C. burnetii* genutzt [57, 133-135]. Diese

Annäherung an die natürliche Infektion reichte jedoch nicht aus, um die Vorgänge während der *C. burnetii* Infektion in Organismen umfassend zu untersuchen. Somit wurde die Entwicklung von *in vivo* Infektionsmodellen für *C. burnetii* unabdingbar.

Meerschweinchen, Mäuse, Primaten und große Wachsmottenlarven konnten als geeignete Modelle der *C. burnetii* Infektion gefunden werden [18, 136-140]. Wenngleich damit die, der natürlichen Infektion ähnlichsten, Bedingungen geschaffen werden konnten, birgt jedes *in vivo* Modell Vor- und Nachteile in sich. Das am meisten etablierte Modell stellen Meerschweinchen dar, sie wurden schon früh als Infektionsmodell für *C. burnetii* genutzt [32]. Limitiert wird sein Gebrauch durch das eingeschränkte Repertoire an immunologischen und genetischen Werkzeugen. Diesen Vorzug bringt das weit verbreitete Mausmodell mit sich. Welches jedoch durch den Einsatz von *C. burnetii* NMII limitiert wird. Durch die Avirulenz des *C. burnetii* NMII-Laborstammes können ausschließlich immundefiziente SCID-Mäuse (engl.: Severe combined immunodeficiency) als Infektionsmodell verwendet werden [17]. Zur Infektion mit *C. burnetii* NMI können mehrere Mäuselinien verwendet werden, die ihrerseits jedoch durch unterschiedlich starke Serokonversion und darauf folgender Erreger Elimination, stark in ihrer Eignung als Infektionsmodell schwanken [17, 139]. Das einzige Primateninfektionsmodell stellten Makaken dar [140]. Sie eigneten sich als Modell der Q-Fieberinfektion mit NMI. Dieses Modell wurde jedoch aufgrund der zweifelhaften ethischen Gesichtspunkte sowie Sicherheitsaspekte im Umgang mit Biostoffen der Risikoklasse 3 verlassen [60]. Im Vergleich zu den Säugetiermodellen ermöglichen *Galleria mellonella* Larven eine Einschätzung der Virulenz sowohl von *C. burnetii* NMI also auch NMII [18]. Dabei sind sie zudem weniger kostenintensiv und leichter in der Handhabung. Im Gegensatz zur Mausinfektion mit 30 Tage andauernder Beobachtungszeit kann bereits nach 10 Tagen ein Ergebnis im Larvenüberleben gewonnen werden [139]. Außerdem ist keine Genehmigung für Versuche an Invertebraten von Nöten.

Alles in allem ist der Vergleich zwischen *C. burnetii* NMI und NMII nur in wenigen *in vivo* Modellen möglich, da NMII in immunkompetenten Wirten eliminiert wird.

III.II. *Galleria mellonella*

III.II.I. Die große Wachsmottenlarve

Die große Wachsmotte, *G. mellonella*, erfreut sich zunehmender Aufmerksamkeit. Das Insekt gehört zur Gattung der Schmetterlinge (*Lepidoptera*), genauer zur Familie der Zünsler (*Pyralidae*). Ausgewachsen erreicht die Motte eine Größe von bis zu 30-40 mm. Das Stadium der ausgewachsenen Motte ist jedoch nicht das für die Forschung relevante, sondern das am Beginn der Entwicklung stehende Larvenstadium. Die Larve der Wachsmotte erreicht eine Größe von 2 cm und ein Gewicht von 250 mg [141]. An das Larvenstadium schließt sich, unter optimalen Bedingungen, nach 3-7 Tagen das temperaturabhängige Puppenstadium an [142]. Die Wachsmotte hat wie alle Insekten ausschließlich ein angeborenes Immunsystem mit humoraler und zellulärer Komponente. Die zelluläre Immunität wird über Phagozyten, die als Hämozyten bezeichnet werden, gewährleistet. Hämozyten können opsonisierte Erreger aufnehmen und intrazellulär abbauen, sie stellen damit ein Homolog der in Wirbeltieren vorkommenden Makrophagen dar [20]. Hämozyten verfügen über eine ähnliche Proteinausstattung wie Neutrophile, um Pathogene abtöten zu können, wie beispielsweise Homologe der NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) Oxidase zur Bildung von Sauerstoffradikalen oder NETs (engl.: Neutrophil extracellular traps) [20, 143]. Humorale Bestandteile des angeborenen Immunsystems von *G. mellonella* stellen antimikrobielle Peptide, Lektin-abhängige Hämozyten Koagulation, das Erkennen von Peptidoglykanen und die Fähigkeit zur Phenol-Oxidase abhängigen Melanisierung dar [143-146].

III.II.II. *G. mellonella* als Infektionsmodell

Wachsmottenlarven sind ein mittlerweile oft genutztes Infektionsmodell. Die Haltung und Handhabung der Larven sind im Vergleich zu Säugetieren einfacher, mit weniger zusätzlichen Anschaffungen und geringeren Kosten verbunden. Zudem ermöglicht der schnelle Lebenszyklus der Wachsmotten gepaart mit großen Untersuchungspopulationen schnelle Ergebnisse und eine hohe Aussagekraft der Experimente [18, 141]. Ein Vorteil von *G. mellonella* gegenüber anderen Insektenmodellen, wie *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans*, ist die Möglichkeit der Inkubation bei bis zu 37°C, was die optimalen

Temperaturbedingungen für bakterielle Virulenzproteine in Wirbeltieren imitiert. Für viele intrazellulär lebende Bakterien, wie *Burkholderia pseudomallei*, *Campylobacter jejuni*, *Francisella tularensis* und *Legionella pneumophila*, konnte bereits das Infektionsmodell der *G. mellonella* Larven etabliert werden [147-151]. So ist es nicht verwunderlich, dass das Infektionsmodell ebenfalls mit *C. burnetii* erprobt wurde.

Erstmals 2014 wurden *G. mellonella* Larven mit *C. burnetii* infiziert, dabei konnte gezeigt werden, dass *G. mellonella* konzentrationsabhängig durch Infektion mit *C. burnetii* NMI und NMII sterben. Zwischen den beiden Stämmen zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied, sodass von einer LPS unabhängigen Immunreaktion ausgegangen werden kann. Inwiefern der Mangel eines adaptiven Immunsystems bei *G. mellonella* ursächlich für diese Beobachtung ist, ist spekulativ. Darüber hinaus konnte durch den Gebrauch einer Δ dotA *C. burnetii* Mutante gezeigt werden, dass das Vorhandensein eines intakten Dot/Icm T4SS essenziell für die *C. burnetii* Virulenz in *G. mellonella* ist. Überdies kann die *C. burnetii*-Infektion in *G. mellonella* mit Doxycyclin erfolgreich behandelt werden [18]. Isolierte Hämocyten konnten mittels Immunofluoreszenz als Wirtszelle der *C. burnetii* Infektion identifiziert werden [18]. Dies stellte eine Neuerung dar, da der bislang nur *in vitro* Zellkulturen und in Zellfreiem Medium verwendete Laborstamm dadurch *in vivo* weiter erforscht werden konnte. Weitere Arbeitsgruppen untersuchten den Einfluss von *C. burnetii* Effektorproteinen auf das Überleben von *G. mellonella*. So konnte gezeigt werden, dass das Effektorprotein CvpB, welches einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der CCV hat, essentiell für die Virulenz in *G. mellonella* Larven ist [110]. Dabei zeigte die Infektion von *G. mellonella* mit zwei verschiedenen Transposonmutanten von CvpB/Cig2 ein, durch einen Replikationsdefekt bedingtes verlängertes Überleben der Larven [109]. Neben dem bislang verwendeten Laborstamm NMII wurden im letzten Jahr weitere *C. burnetii* Stämme im *G. mellonella* Modell erprobt. Dabei handelte es sich um zehn aus Wiederkäuern isolierte Stämme, die mittels Ermittlung der LD₅₀ Dosis (50 % der letalen Dosis) in drei Gruppen von avirulent bis hoch virulent eingeteilt wurden. Es zeigte sich eine Zunahme der Letalität und Melanisierung, mit steigender Virulenz der Stämme. Somit kann das Modell auch zur Virulenz Einschätzung verschiedener *C. burnetii* Stämme genutzt werden [19].

IV. Zielsetzung

Steigende Zahlen von *C. burnetii* Infektionen, sowohl in Europa als auch weltweit, erfordern zunehmende Aufmerksamkeit. Innerhalb der letzten beiden Jahrzehnte können vermehrte Q-Fieber Ausbrüche detektiert werden. 2009 gipfelte in den Niederlanden diese Entwicklung schließlich in dem größten bisher bekannten Q-Fieber Ausbruch mit 4000 Erkrankten. Als ursächlich für die Ausmaße der Epidemie gelten dichte urbane Besiedelung und massiv erhöhte Zuchtviehzahlen. Beide Faktoren liegen wiederum in einer wachsenden Weltbevölkerung begründet und werden sich in der Zukunft noch verstärken.

Die meisten *C. burnetii* Infektionen bleiben für den Menschen harmlos. Schwerwiegend sind die seltenen Primärinfektionen in Form von Hepatitis, Pneumonie und Peri-, Endo- und Myokarditis, die mitunter eine hohe Letalität aufweisen und Formen der chronischen *C. burnetii* Infektion, die in einer Endokarditis enden können. Eine Behandlung dieser Erkrankungen erfolgt durch eine langandauernde, hoch konzentrierte Antibiotikatherapie. Mehrere Probleme mindern dabei den Therapieerfolg. Zum einen zeigen die Antibiotika, aufgrund der intrazellulären Lebensweise von *C. burnetii*, nur einen geringen Wirkungsgrad, zum anderen zwingen Nebenwirkungen der Langzeitantibiose die Patienten oftmals zum Abbruch der Therapie. Umso wichtiger wird es zukünftig effizientere Therapien gegen *C. burnetii* zu entwickeln.

Zur Identifizierung möglicher Therapie-Angriffspunkte ist es entscheidend den Infektionszyklus von *C. burnetii* nachvollziehen zu können. Bisher konnte gezeigt werden, dass die Injektion von *C. burnetii* Effektorproteinen mittels Typ IV Sekretionssystem essenziell für die intrazelluläre Replikation ist. Da die Wirkweise der meisten *C. burnetii* Effektorproteine allerdings nicht bekannt ist, wird es in Zukunft wesentlich sein, deren molekulare Funktion zu analysieren.

Um die Interaktion des intrazellulär lebenden Bakteriums mit dem Wirtsorganismus untersuchen zu können, ist die Verwendung eines geeigneten *in vivo* Infektionsmodells von besonderer Wichtigkeit. Allerdings sind für den avirulenten *C. burnetii* NMII-Laborstamm, im Gegensatz zu *C. burnetii* NMI, nur 2 Infektionsmodelle zur Beurteilung der Virulenz bekannt. Dabei handelt es sich zum einen um SCID (engl.: severe combined immunodeficiency) Mäuse und zum anderen um Larven der

großen Wachsmotte *Galleria mellonella*. Hierbei bietet das *G. mellonella* Modell einige Vorteile, wie geringere Haltungs- und Anschaffungskosten, bessere Handhabbarkeit und schnellere Infektionszyklen und fehlender Notwendigkeit einer Beantragung gegenüber dem Mausmodell.

Meine Arbeit hatte zum Ziel, das für *C. burnetii* erstmals im Jahr 2014 vorgestellte *G. mellonella* Infektionsmodell, im Labor zu etablieren. Im nächsten Schritt sollte dieses Infektionsmodell zur Analyse der Funktion bakterieller Virulenzfaktoren angewendet werden. So wurde untersucht, ob das T4SS essenziell für die Virulenz von *C. burnetii* im *G. mellonella* Modell ist und ob das anti-apoptotische T4SS Effektorprotein AnkG Einfluss auf die Infektion nimmt.

V. Material und Methoden

V.I. Material

V.I.I. *Coxiella burnetii*

Abkürzung	Bakterium	Vektor	Antibiotika-resistenz	Referenz
WT	<i>C. burnetii</i> Nine Mile Phase II	-	-	[47]
Δ dotA	<i>C. burnetii</i> NMII- Δ dotA		Chloramphenicol (CA)	Julian Pechstein (AG Lührmann), [89]
AnkG _{NM}	<i>C. burnetii</i> NMII::Flag-AnkG _{NM}	pKM244 _{mod} -Flag-AnkG _{NM}	CA	[14]
AnkG _{I11E}	<i>C. burnetii</i> NMII::Flag-AnkG _{I11E}	pKM244 _{mod} -Flag-AnkG _{I11E}	CA	[14]
AnkG _{F3}	<i>C. burnetii</i> NMII::Flag-AnkG _{F3}	pKM244 _{mod} -Flag-AnkG _{F3}	CA	[14]
AnkG _{SOYTA}	<i>C. burnetii</i> NMII::Flag-AnkG _{SOYTA}	pKM244 _{mod} -Flag-AnkG _{SOYTA}	CA	[14]
AnkF	<i>C. burnetii</i> NMII::Flag-AnkF	pKM244 _{mod} -Flag-AnkF	CA	Julian Pechstein (AG Lührmann)
AnkF-Transposon	<i>C. burnetii</i> NMII::Flag-AnkF::Tn#1775		CA	Matteo Bonazzi [118]

V.I.II. *Galleria mellonella*

Versuch	Hersteller	Adresse
1-12	R.J. Mouse Livebait vof	8561 EX BALK, Niederlande
13-15	TruLarv, BioSystems Technology Ltd.	University of Exeter, Geoffrey Pope Building Lab 406, Stocker Road

V.I.III. Antikörper

V.I.III.I. Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Best.-Nr.
anti- <i>C. burnetii</i>	Kaninchen	1:5000	Davids	-
anti-Flag M2	Maus	1:3000	Sigma Aldrich	F1804
Phalloidin-Alexa- Fluor 647	-	1:50	Invitrogen	A22287

V.I.III.II. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Best.-Nr.
anti-Kaninchen- IgG-Alexa-Fluor 488	Ziege	1:500	Dianova	111-545-045
anti-Maus-IgG- Alexa-Fluor 488	Ziege	1:500	Dianova	115-545-062

Die aufgelisteten Antikörper wurde alle für Immunfluoreszenzfärbung in 5% Ziegenserum in 1x PBS verwendet.

V.I.IV. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Albumin Fraktion V (BSA)	ROTH
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	ROTH
Bacto Neopeptone	BD Bioscience
Calciumchlorid	MERCK
Casaminosäuren	AMRESCO
Chloramphenicol	ROTH
Citronensäure	SIGMA-ALDRICH
Eisen (II)- Sulfat- Heptahydrat	SIGMA-ALDRICH
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Fermentas/Thermo
Kaliumphosphat	MERCK
L-Cystein	SIGMA-ALDRICH
Magnesiumchlorid	MERCK
Methanol	VWR
Methyl-β-Cyclodextrin	SIGMA-ALDRICH
Natriumchlorid	SIGMA-ALDRICH
Natriumcitrat	SIGMA-ALDRICH
Paraformaldehyd (PFA)	Alfa Aesar
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom
Poly-L-Lysin	SIGMA-ALDRICH
ProLong Gold mit DAPI	Invitrogen
RPMI- Medium 1640 - GlutaMAX	Invitrogen
Triton-X-100	SIGMA-ALDRICH
Ziegenserum	Invitrogen

V.I.V. Medien

V.I.V.I. 2x ACCM-2 (engl.: Acidified Citrate Cysteine Medium)

Wachstumsmedium für *C. burnetii* [51]

Ingredienz	Menge	Hersteller
RPMI- Medium 1640 - GlutaMAX	25% (v/v)	Invitrogen
Citronensäure	26,8 mM	SIGMA- ALDRICH
Natriumcitrat	32,2 mM	SIGMA- ALDRICH
Casaminosäuren	0,5% (w/v)	AMRESCO
Kaliumphosphat	7,34 mM	MERCK
Magnesiumchlorid	0,196 mM	MERCK
Calciumchlorid	0,0394 mM	MERCK
Eisen(II)- Sulfat- Heptahydrat	0,02 mM	SIGMA- ALDRICH
Natriumchlorid	250,8 mM	SIGMA- ALDRICH
L-Cystein	3,0 mM	SIGMA- ALDRICH
Bacto Neopeptone	0,02% (w/v)	BD Bioscience
Methyl- β -Cyclodextrin	0,2% (w/v)	SIGMA- ALDRICH

Die Ingredienzen werden in aufgelisteter Reihenfolge in deionisiertes Wasser gegeben, mit 6 M Natriumhydroxid auf den pH-Wert 4,75 eingestellt und steril filtriert.

V.I.V.II. 2x ACCM- D (-Glucose) Lot # 8A0680, Sunrise Science Products

V.I.VI. Puffer und Lösungen

Puffer	Hersteller
ATL-Puffer des DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen

V.I.VII. Standards und Komplettssets

Komplettssets	Hersteller
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen
5x QPCR MixEvaGreen® (Rox)	BIO & SELL

V.I.VIII. Geräte

Bezeichnung	Name	Hersteller
Bakterienkultur- Inkubator	Heraeus B6	Heraeus
Epifluoreszenzmikroskop	Axiovert 200 M	Zeiss
Feinwaage	ALC 210.4	Sartorius
Gefrierschrank	-80°C Kühlgerät	Panasonic
Gewebezerstörer	Tissue Lyser	Qiagen
Gewebezerstörer	Bead Ruptor 24	OMNI International
Heizblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Konfokalmikroskop	LSM 700	Zeiss
Kühlschränke	4°C und -20°C Kühlgeräte	Liebherr
Multichannel- Pipette	Xplorer	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetboy Plus	Integra Bioscience
qPCR-Gerät	7900 HAT Fast Real- Time PCR System	Life Technologies
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner	VWR
UV- Photometer	BioPhotometer Plus	Eppendorf
Vortexer	MS3 digital	IKA Werke
Zellkultur- Inkubator	HERAcell 240i	Thermo Fisher Scientific
Zellkultur- Sterilbank	HERAsafe KS	Thermo Fisher Scientific
Zentrifugen	Cetrifuge 5417 R Multifuge 3SR+	Eppendorf Thermo Fisher Scientific

V.I.IX. Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
1,5 mL Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf
10 cm Zellkulturschalen	Greiner bio-one
12- Kavitäten Zellkulturplatten	Greiner bio-one
15 mL Falcon Zentrifugationsgefäß	BD Bioscience
2 mL Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf
24- Kavitäten Zellkulturplatten	Greiner bio-one
384 Kavitäten Mikroplatten	Greiner bio-one
50 mL Falcon Zentrifugationsgefäß	BD Bioscience
6- Kavitäten Zellkulturplatten	Greiner bio-one
96 Kavitäten Mikroplatten	Greiner bio-one
Biosphere® Filter Tips 0,5- 20 µL	SARSTEDT
Biosphere® Filter Tips 100- 1000 µL	SARSTEDT
Biosphere® Filter Tips 2- 100 µL	SARSTEDT
Biosphere® Filter Tips 2- 200 µL	SARSTEDT
Chirurgische Einmalskalpelle	Braun
Glaskugeln	Sigma Aldrich
Kanülen 22G $1\frac{1}{4}$ -Nr. 12 0,7 x 30 mm	BD Microlance
Küvette UVette® 220- 1600 nm 50- 2000 µL	Eppendorf
Menzel- Gläser Deckgläser Ø 12 mm	Firma?
Objektträger	Diagonal
Parafilm	Bemis
Research Plus Pipetten	Eppendorf
SOFT-Ject® Tuberkulin Spritzen 1 mL	Henke, Sass, Wolf
T-100 Zellkulturflaschen	Nunc
T-25 Zellkulturflaschen	Nunc
T-75 Zellkulturflaschen	Nunc

V.II. Methoden

V.II.I. Bakterienanzucht

In Vorbereitung auf die Infektion von *G. mellonella* Larven wurden *C. burnetii* 5 Tage in 1xACCM-2 bei 37°C, 5% CO₂ und 2.5% O₂ inkubiert. Hierfür wurden bei -80°C eingefrorene Aliquote, die eine Menge von 10⁸ *C. burnetii* in 100 µL 1xPBS (engl.: Phosphate buffered saline) beinhalteten, zu 15 mL 1x ACCM-2 in 25 cm² Zellkulturflaschen mit und ohne 3 µg/mL Chloramphenicol und Kanamycin hinzugefügt. Einen Tag vor der Infektion wurden 2 mM IPTG zur Induktion der Effektorprotein-Produktion beigefügt.

V.II.II. *Galleria mellonella* Infektion

Die *G. mellonella* Larven wurden einen bis drei Tage vor der Infektion geliefert. Danach wurden die Larven nach Größe und Vitalität Sortiert und Randomisiert. Je 10 Larven wurden je *C. burnetii* Genotyp und Kontrolle verwendet.

Am Tag der Infektion wurden die *C. burnetii* Kulturen in 50 ml Falcon Zentrifugationsröhrchen bei 12°C und 4600 rpm für 40 min pelletiert und anschließend in 500 µL 1x PBS resuspendiert. Die dadurch entstandene *C. burnetii*-Suspension wurde in ein steriles 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die *C. burnetii* Konzentration wurde mittels OD₆₀₀ Messung am Photometer bestimmt.

Anschließend wurden die gewünschten Verdünnungen hergestellt. In jede Larve wurden 20 µL *C. burnetii*-Suspension oder PBS injiziert. Die Injektion erfolgte in das jeweilige rechte, zweitletzte Beinchen der Larven.

V.II.III. Überlebensauswertung

Während der folgenden 10 Tage wurden täglich die Larven auf ihr Überleben kontrolliert. Konnte sich eine Larve nicht mehr eigenständig bewegen oder bekam sie eine schwarze Färbung galt sie als tot. Inkubiert wurden die Larven für diese Zeit bei 37°C für Versuch VI.I. und VI.VI. und bei 21°C für die Versuche VI.II.-VI.V.. Tote Larven, wurden täglich entfernt und bei -80°C tiefgefroren.

V.II.IV. Quantitative PCR (Polymerase Kettenreaktion)

Zur Bestimmung der *C. burnetii* Last wurden pro Zeitpunkt und *C. burnetii* Genotyp je 3 zusätzliche Larven infiziert. Im Versuch VI.V. wurden diese 2, 7 und 10 Tage nach Infektion bei -80°C eingefroren, im Versuch VI.VI nach 1 und 5 Tagen. Die gefrorenen Larven wurden mit 500 µL 1x PBS und sterilen Glaskügelchen in 2 mL Safe lock Reaktionsgefäße gegeben, mit der Feinwaage gewogen und mittels eines Tissue Lysers je 5 min bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Von der Zellsuspension sind 150 µL in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und mit 180 µL des im DNeasy Blood & Tissue Kit enthaltenen ATL-Puffers und 20 µL Proteinase K versetzt worden, um die *G. mellonella* Zellen bei 56°C über Nacht zu lysieren. Am nächsten Tag wurde die genomische DNA anhand des Quick Start Protokolls des DNeasy Blood & Tissue Kits isoliert, aufgereinigt und in 200 µL ddH₂O eluiert.

Für die Durchführung der qPCR wurde die DNA zuvor 1:10 verdünnt und davon dann 1 µL pro Versuchsansatz verwendet. Die DNA einer Larve wurde in 3 technischen Replikaten aufgetragen. Neben den Proben wurde ein Triplikat ohne DNA und ein Standard, der aus einer *C. burnetii* NMII-Kultur ebenfalls mit DNeasy Blood & Tissue Kit hergestellt wurde, auf eine 384 Mikrowellplatte aufgetragen. Die Bestimmung der Genomäquivalente von *C. burnetii* erfolgte anhand der chromosomalen, repetitiven Sequenz von *IS1111* (Insertionssequenz 1111) [152].

1 x Versuchsansatz für qPCR

5x QPCR MixEvaGreen®	2 µL
672 IS1111 Primer 1µM	1 µL
673 IS1111 Primer 1µM	1 µL
DNA- Probe	1 µL
ddH ₂ O	5 µL
	10 µL

qPCR-Protokoll	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min
Amplifikation (40 Zyklen)		
Denaturierung	95 °C	15 sec
Annealing	60 °C	20 sec
Elongation	72 °C	20 sec

V.II.V. Hämolymphe

Um die Infektionsrate und die *C. burnetii* Vermehrung auf zellulärer Ebene bestimmen zu können, wurde die Immunfluoreszenzfärbung von *G. mellonella* Hämocyten durchgeführt. Für jeden *C. burnetii* Ansatz und Zeitpunkt wurden 3 Larven infiziert. Die Zeitpunkte für die Hämolymphe Extraktion beim Versuch VI.V. waren an Tag 2, 7 und 10 nach der Infektion, beim Versuch VI.VI. an Tag 1 und 5 nach der Infektion.

Damit die Hämocyten auf den Deckgläsern adhären konnten, mussten die Objektträger mit Poly-L-Lysin beschichtet werden. Dafür wurden die Deckgläser in 24-Kavitäten-Platten gegeben und steril mit 1:10 Poly-L-Lysin Lösung in ddH₂O bedeckt, nach 10 min Inkubationszeit konnte der Überstand abgenommen werden.

Die Deckgläser wurden mit 1x PBS gewaschen und die Hämolymphe zugegeben. Zur Extraktion der Hämolymphe wurden die Larven zuerst für 10 min bei -20 °C inkubiert, bis sich die Larven nicht mehr bewegten. Anschließend wurden je 3 Larven mit einem Skalpell seitlich eingeschnitten und durch Druck die goldgelbe Hämolymphe in eine mit 500 µL 1x PBS gefüllte Kavität der 24-Kavitäten-Platten ausgepresst. Die Platten wurden bei 500xg und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und zwei Mal mit 500 µL 1x PBS gewaschen. [18]

V.II.VI. Immunfluoreszenzfärbung

Die Hämocyten wurden mit 4 % Paraformaldehyd in 1x PBS für 20 min bei Dunkelheit fixiert und nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS mit 0.1 % Triton X-100 in 1x PBS für 3-5 min permeabilisiert. Zum Blocken der Deckgläser wurden diese mit der Zellseite nach unten auf Parafilm mit 50 µL 1x PBS mit 50mM NH₄Cl und 5 % Ziegen Serum für 30min bei Raumtemperatur und in Dunkelheit gelegt. Daraufhin wurden die Deckgläser direkt auf neuen Parafilm mit 40 µL 1x PBS mit 5 %

Ziegenserum und den primären Antikörpern 30 min bei Raumtemperatur und in Dunkelheit gefärbt. Nach dreimaligem Waschen der Deckgläser wurden diese für 20 min in 40 µL 1x PBS und 5 % Ziegenserum mit den sekundären Antikörpern auch bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen der Deckgläser mit 1x PBS wurden die Deckgläser schließlich mit 3-8 µL ProLong Gold mit DAPI, um bakterielle DNA und Zellnuklei blau fluoreszierend zu färben, auf den Objektträgern eingebettet.

Die somit hergestellten Immunfluoreszenzfärbungen der Hämozyten konnten via konfokalem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht und ausgewertet werden. Um die dabei festgestellten Unterschiede im *C. burnetii* Replikationsverhalten der verschiedenen *C. burnetii* Mutanten objektivierbar zu machen wurden an zufällig ausgewählten Stellen der Deckgläser Z-Stack und 4 x 4 Kachel Aufnahmen angefertigt, anhand derer die *C. burnetii* Menge von 100 Hämozyten gezählt wurden. Daneben wurden repräsentative Bilder angefertigt.

VI. Ergebnisse

VI.I. Das Überleben von *G. mellonella* bei *C. burnetii* NMII Infektion ist dosis- und T4SS-abhängig

Zur Etablierung eines *in vivo* Modells ist es wichtig, bisherige Ergebnisse anderer *in vivo* Modelle zu bestätigen. So konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl das *Galleria mellonella* Infektionsmodell als auch das SCID Maus Modell zur Einschätzung der Virulenz von *Coxiella burnetii* NMII geeignet ist [18, 153, 154]. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Infektionsdosis, als auch das Vorhandensein eines T4SS einen Einfluss auf die Infektion nehmen [18, 153, 154]. Deshalb wurde als erstes getestet, ob sich diese Ergebnisse mit wildtypischen *C. burnetii* NMII (WT) und *C. burnetii* NMII- $\Delta dotA$ ($\Delta dotA$) reproduzieren ließen. Die hier verwendeten *C. burnetii* $\Delta dotA$ wurden nach einem etablierten Protokoll zur Herstellung einer Sekretionssystem defizienten *C. burnetii* Mutante generiert [89]. Wie unter V.II.I. und V.II.II. beschrieben wurden je 10 Larven mit jeweils 10^3 , 10^4 , 3×10^4 , 6×10^4 , 10^5 *C. burnetii* infiziert und das Larvensterben über 10 Tage beobachtet. Als Kontrolle wurden den Larven PBS injiziert.

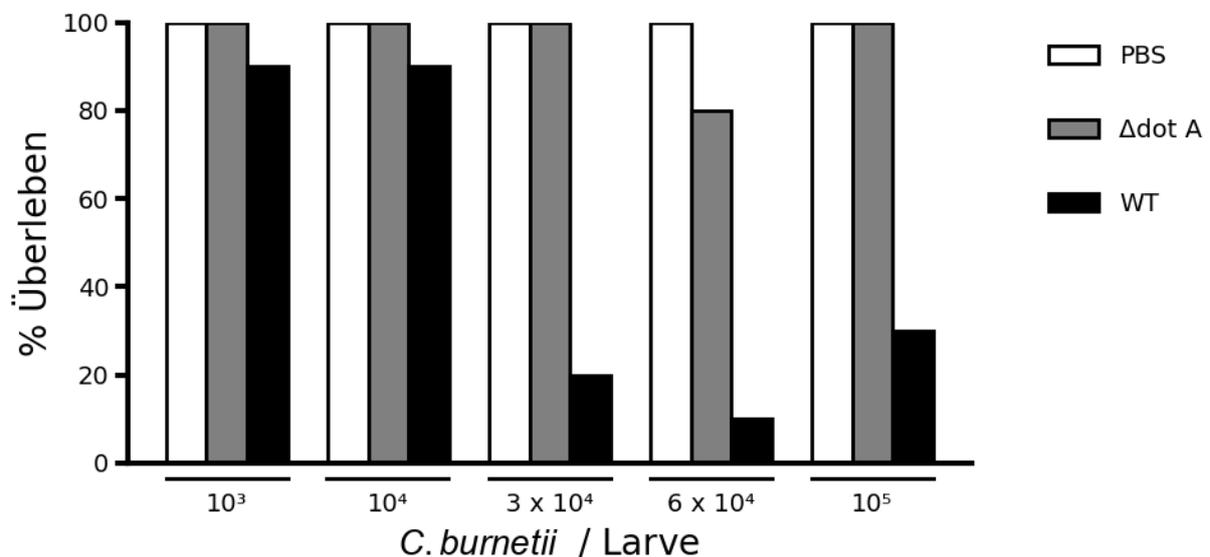


Abb. 2 Das Überleben von *G. mellonella* bei *C. burnetii* NMII Infektion ist dosis- und T4SS-abhängig

10 *G. mellonella* Larven wurden mit jeweils 10^3 , 10^4 , $3 \cdot 10^4$, $6 \cdot 10^4$, 10^5 *C. burnetii* NMII (WT) oder T4SS-Mutante ($\Delta dotA$) infiziert. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS. Die Larven wurden bei 37 °C inkubiert und das Überleben alle 24 h für 10 Tage kontrolliert. Dargestellt ist nur das Überleben nach 10 Tagen.

Ab einer Infektionsdosis von 3×10^4 *C. burnetii* nimmt die Letalität der Larve zu. Dieses Ergebnis unterstützt die Beobachtung anderer Arbeitsgruppen hinsichtlich einer konzentrationsabhängigen Letalität von *C. burnetii* im *G. mellonella* Modell [18, 19, 109, 155]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die *C. burnetii* NMII- $\Delta dotA$ Mutante avirulent im *G. mellonella* Modell ist. Die PBS-Kontrolle wies für alle Konzentrationen ein Larvenüberleben von 100 % an Tag 10 auf. Genauso wie die mit PBS injizierten Larven überleben ~100% der Larven die Injektion mit auch hohen Infektionsdosen der $\Delta dotA$ Mutante.

Dadurch kann das *G. mellonella* Modell als geeignetes Infektionsmodell zur Virulenz Einschätzung von *C. burnetii* NMII angesehen werden, da es mit steigender *C. burnetii* Infektionsrate zum vermehrten Larvensterben kommt und das T4SS als essenzieller Virulenzfaktor nachgewiesen werden konnte. Um zu eruieren welche T4SS Effektorproteine eine Rolle für die Virulenz von *C. burnetii* in *G. mellonella* spielen, wurden weitere Versuche mit *C. burnetii* unternommen, die jeweils ein einzelnes Effektorprotein überexprimieren.

VI.II. Die Überexpression von Flag-AnkG verringert die Pathogenität von *C. burnetii* in *G. mellonella*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das T4SS entscheidend für die Pathogenität von *C. burnetii* NMII ist, sollte der Einfluss der Effektorproteine auf die *G. mellonella* Infektion ermittelt werden. Als erstes wurde das *C. burnetii* Effektorprotein AnkG untersucht, da 2010 gezeigt werden konnte, dass eine Überexpression von AnkG in *L. pneumophila* die *L. pneumophila*-induzierte Apoptose in dendritischen Zellen hemmt [13]. Dadurch wurde der Grundstein der Erforschung des anti-apoptotischen Effektorproteins AnkG gelegt. Weiterhin zeigt AnkG während der *in vitro* Infektionen eine nukleäre Lokalisation und vermittelt dadurch seine Funktion [14]. Die intranukleäre Wirkweise von AnkG_{NM} konnte im Jahr 2022 *in vitro* weiter spezifiziert werden. AnkG vermittelt seine Wirkung mittels Interaktion von AnkG_{NM} mit der Wirtszell nukleären RNA Helikase DDX21 (engl.: DExD box RNA helicase 21) und der kleinen, nukleären 7SK RNA. AnkG_{NM} bindet DDX21 und 7SK RNA, dadurch wird CDK9 (engl.: Cyclin-dependend kinases 9) vom 7SK snRNP (kleinen, nukleären Ribonukleoprotein) Komplex freigesetzt. Die Freisetzung von CDK9 führt über die RNA Polymerase II zur Veränderung der Transkription. So werden anti-apoptotische Gene hochreguliert, während die Expression pro-apoptotische Gene gehemmt wird [25].

Bisher existiert kein gutes System, um die Wirkung von AnkG auf die *C. burnetii* Infektion zu untersuchen. Da gezeigt werden konnte, dass sich *G. mellonella* sowohl als *in vivo* Modell für *C. burnetii* Isolate, als auch für Transposonmutanten, wie im Falle des Effektorproteins CvpB/Cig2, eignet, lag es nahe, dieses Infektionsmodell zur weiteren Charakterisierung von AnkG zu verwenden [18, 19, 109, 156].

Es wurden je 10 Larven mit 10^4 , 10^5 und 10^6 *C. burnetii* NMII, Δ dotA und NMII::Flag-AnkG pro Larve infiziert. Die Produktion von AnkG wurde hierbei, wie in V.II.I. beschrieben, mit IPTG induziert. Da sich im vorherigen Versuchsansatz eine hohe Verpuppungsrate der Larven zeigte, wurden die Inkubationsbedingungen auf 21°C geändert. Dadurch konnte die Larvenverpuppung verhindert werden, deren Temperaturoptimum bei 30 °C liegt [141]. Die Temperaturveränderung führte allerdings zu einer verminderten Virulenz, sodass ein Effekt auf das Larvenüberleben erst bei höheren Konzentrationen beobachtet werden konnte [1]. Erst bei 10^6

Coxiellen/Larve zeigt sich ein signifikanter Abfall des Überlebens der mit WT infizierten Larven. Larven, die mit Δ dotA oder AnkG Mutanten infiziert wurden, wiesen mit circa 90 % Überlebensrate eine signifikant höhere Vitalität auf.

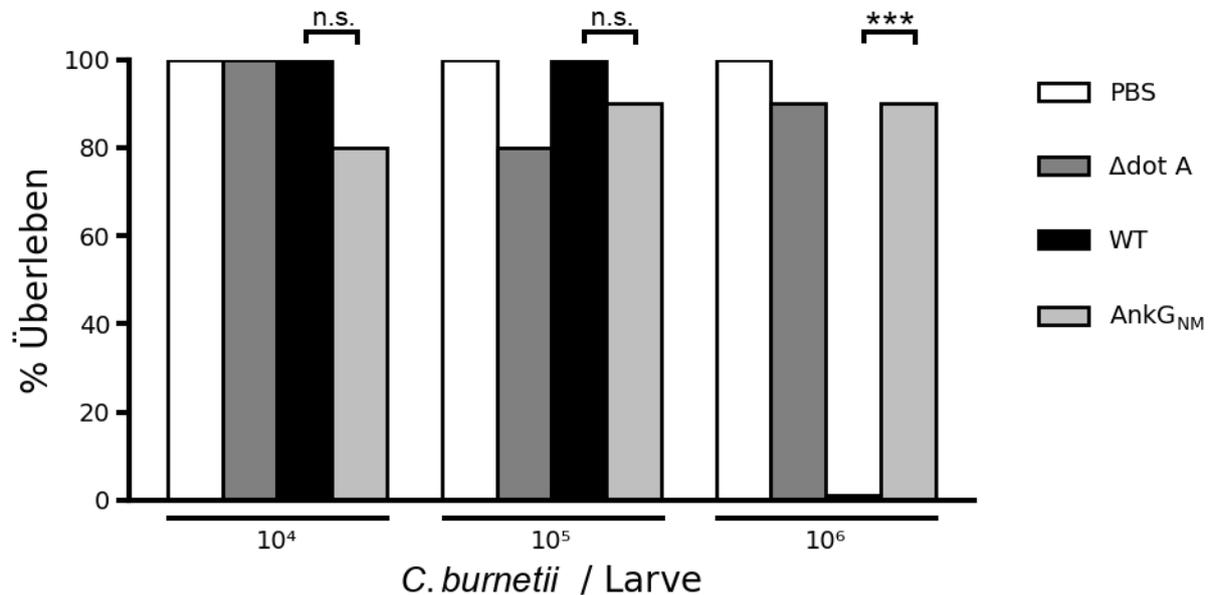


Abb. 3 Die Überexpression von Flag-AnkG verringert die Pathogenität von *C. burnetii* in *G. mellonella*

10 *G. mellonella* Larven wurden mit jeweils 10⁴, 10⁵ und 10⁶ *C. burnetii* NMII (WT), T4SS-Mutante (Δ dotA) oder NMII::Flag-AnkG infiziert. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS. Die Larven wurden bei 21 °C inkubiert und das Überleben alle 24 h für 10 Tage kontrolliert. Dargestellt ist nur das Überleben nach 10 Tagen.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *C. burnetii*, die zusätzlich Flag-markiertes AnkG exprimieren eine geringere Pathogenität im *G. mellonella* Modell aufweisen. Die Ursache dieser verringerten Pathogenität sollte im Folgenden weiter analysiert werden.

VI.III. Die anti-apoptotische Wirkung von AnkG ist essenziell für die verringerte Pathogenität von NMII::Flag-AnkG

Die beobachtete Reduktion der NMII::Flag-AnkG Pathogenität kann in mehreren Ursachen begründet sein. Eine mögliche Erklärung ist die Hemmung der physiologischen Effektorprotein-Ausschleusung mittels T4SS durch das Überangebot an überexprimiertem Flag-AnkG Protein. Wodurch es zu einem relativen Effektorprotein-Mangel im Zytosol und daraus resultierender Pathogenitätsminderung kommen kann. Eine andere Erklärung für die verminderte NMII::Flag-AnkG Pathogenität stellt die bereits *in vitro* festgestellte anti-apoptotische Wirkung von AnkG dar [13]. Dabei kann die anti-apoptotische Wirkung von AnkG zu einer Erhöhung der *G. mellonella* Toleranz gegenüber der *C. burnetii* Infektion führen. Zur Diskriminierung beider Möglichkeiten wurde eine weitere NMII Mutante mit Expression eines funktionslosen AnkG Effektorproteines verwendet. Das hierbei verwendete AnkG_{I11E} unterscheidet sich lediglich in einer Aminosäure von AnkG, weist allerdings *in vitro* keine anti-apoptotische Wirkung auf. Die Entdeckung der Aminosäure 11 als essentiell für die anti-apoptotische Wirkung von AnkG begründete sich in der Beobachtung, dass AnkG Proteine der Stämme NM und Dugway bei transienter Expression in CHO-FcR Zellen (Hamster Ovarialzellen) eine unterschiedlich starke Hemmung der Apoptose aufwiesen [14]. Vergleiche der Aminosäuresequenz von AnkG_{NM} und AnkG_{Dugway} zeigten eine bis auf Position 11 identische Abfolge. Bei AnkG_{NM} findet sich als 11. Aminosäure ein Isoleucin, bei AnkG_{Dugway} Leucin [14]. Diese Konstitutionsisomere wurden in weiteren Versuchen durch andere Aminosäuren ausgetauscht und deren Auswirkung auf den anti-apoptotischen Effekt untersucht. Die dadurch entstandenen Mutanten AnkG_{I11E}, AnkG_{I11T} und AnkG_{I11V} wiesen in transient exprimierenden CHO-FcR-Zell keine anti-apoptotische Wirkung auf. Die Aminosäure 11 konnte als Bindungsstelle für Importin- α 1 und somit als essentiell für die intrazelluläre Lokalisation für AnkG identifiziert werden [14].

In den weiteren Versuchen wurde deshalb der Einfluss von NMII::Flag-AnkG mit NMII::Flag-AnkG_{I11E} verglichen. Diese *C. burnetii* exprimieren die mit Flag markierte AnkG_{I11E} Mutante, bei der Isoleucin durch Glutaminsäure ausgetauscht wurde. Die

Mutante zeigte bei Infektion von MEF-Zellen eine zytosolische Lokalisation von AnkG_{I11E} im Gegensatz zur nukleären Lokalisation von AnkG_{NM} [157].

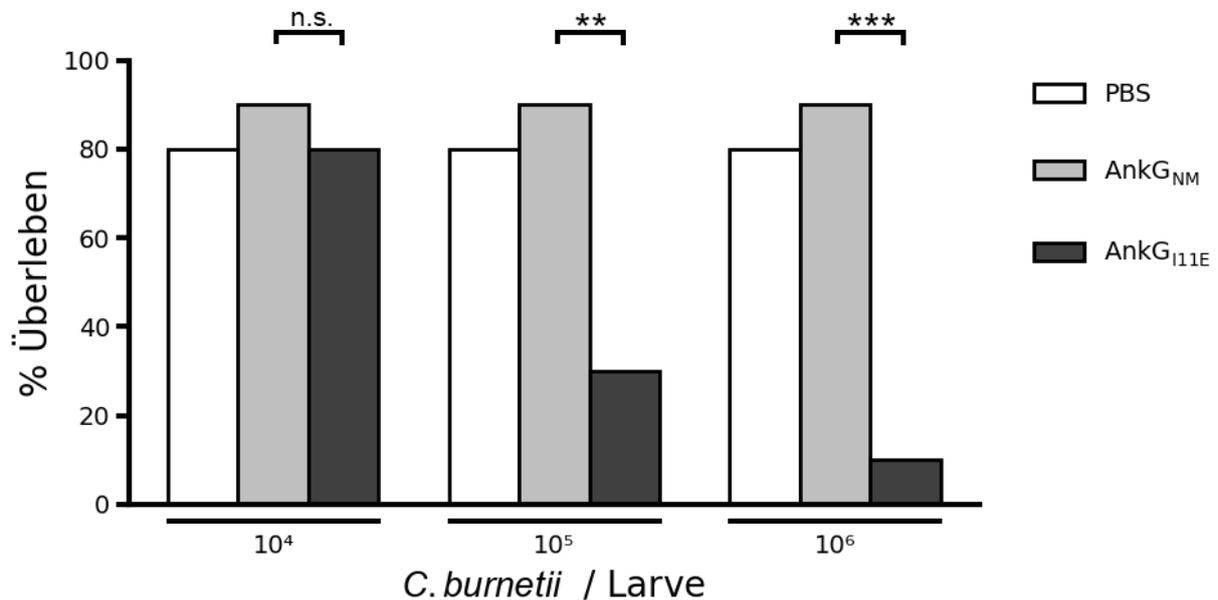


Abb. 4 Die anti-apoptotische Wirkung von AnkG ist essenziell für die verringerte Pathogenität von NMII::Flag-AnkG

10 *G. mellonella* Larven wurden mit jeweils 10⁴, 10⁵ und 10⁶ *C. burnetii* NMII::Flag-AnkG_{NM} oder NMII::Flag-AnkG_{I11E} infiziert. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS. Die Larven wurden bei 21 °C inkubiert und das Überleben alle 24 h für 10 Tage kontrolliert. Dargestellt ist nur das Überleben nach 10 Tagen.

An Tag 10 nach Infektion zeigte sich sowohl für Konzentration 10⁵ *C. burnetii*/Larve als auch für 10⁶ *C. burnetii*/Larve ein signifikantes Larvensterben bei Infektion mit *C. burnetii* NMII::Flag-AnkG_{I11E}. Larven, die mit Δ dotA und NMII::Flag-AnkG_{NM} infiziert wurden, wiesen, wie erwartet, einen ähnlichen Phänotyp wie die PBS Kontrolle auf.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die Überexpression eines T4SS Effektorproteins in *C. burnetii* nicht zu einem Pathogenitätsverlust führt. Vielmehr lassen die dargestellten Daten vermuten, dass der beobachtete Phänotyp mit der anti-apoptotischen Funktion von AnkG assoziiert ist.

VI.IV. Auswirkung von AnkG verschiedener *C. burnetii* Stämme

VI.IV.I. Standardisierung der *G. mellonella* Aufzucht sind essentiell für die Reproduktion der Ergebnisse

Genomanalysen von *C. burnetii* Stämmen lassen Unterschiede der für Effektorproteine kodierenden Sequenzen erkennen [12, 30, 99, 157-160]. So gibt es ebenfalls Differenzen des *ankG* Genes. Es wurden bisher 40 *C. burnetii* Stämme hinsichtlich ihrer *ankG* Sequenzen untersucht, dabei konnten drei Gruppen unterschieden werden [157]. Die erste Gruppe, deren Vertreter AnkG_{NM} darstellt, exprimieren ein 338 Aminosäuren langes Protein, wohingegen Stämme der Gruppe 2 und 3 ein auf 92 und 51 Aminosäuren verkürztes Protein bilden. AnkG der Gruppe 2 sind in den ersten 83 Aminosäuren mit AnkG_{NM} identisch. Ein Vertreter stellt AnkG_{SOYTA} dar. Mitglieder der Gruppe 3 entsprechen nur in den ersten 28 Aminosäuren der Abfolge von AnkG_{NM}. Als Beispiel gilt AnkG_{F3} [157]. AnkG_{NM}, AnkG_{SOYTA} und AnkG_{F3} ist gemein, dass sie in CHO-FcR- Zellen und HEK 293T-Zellen transient exprimiert, nukleär lokalisiert sind und sowohl p32 als auch Importin- α 1 binden können [157]. Allerdings weisen sie Unterschiede hinsichtlich ihrer anti-apoptotischen Wirkung auf. So konnte für AnkG_{SOYTA} keine anti-apoptotische und für AnkG_{F3} sogar eine pro-apoptotische Wirkung nachgewiesen werden. Allerdings wird weder AnkG_{SOYTA} noch AnkG_{F3} von *C. burnetii* während der Infektion in die Wirtszellen injiziert [157]. Als ursächlich kann das Fehlen einer Translokationsdomäne vermutet werden.

Um zu verifizieren, ob AnkG_{SOYTA} und AnkG_{F3} eine von AnkG_{NM} abweichende Wirkung auf das Überleben von *G. mellonella* haben, wurden für den folgenden Versuchsansatz *C. burnetii* NMII, Δ dotA, NMII::Flag-AnkG_{NM}, NMII::Flag-AnkG_{I11E}, NMII::Flag-AnkG_{F3} und NMII::Flag-AnkG_{SOYTA} verwendet. Die Infektion erfolgte nach der in V.II.I.-V.II.III. beschriebenen Weise für alle Ansätze mit 10^6 *C. burnetii* pro Larve. Die nachfolgende Abbildung zeigt das Überleben der Larven gemittelt aus allen drei Versuchsansätzen. Hierin sind darüber hinaus die Signifikanzen und Standardabweichungen dargestellt.

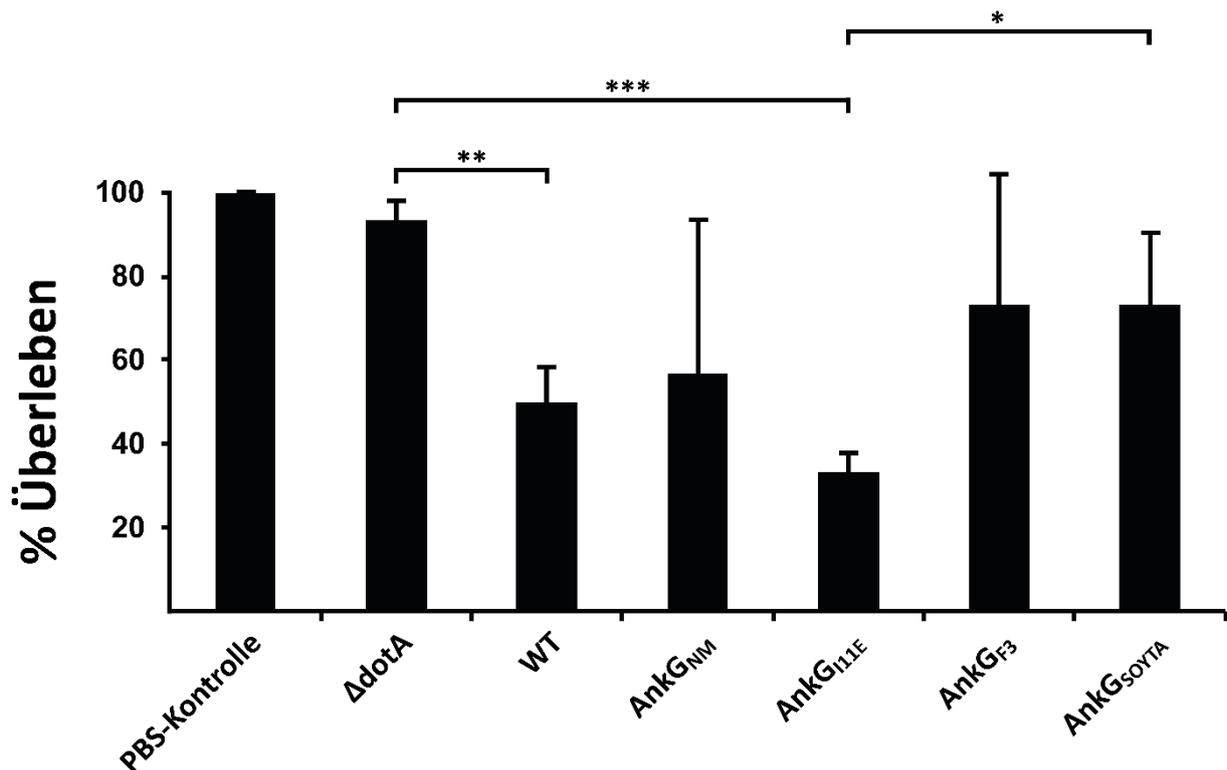


Abb. 5 Standardisierung der *G. mellonella* Aufzucht sind essentiell für die Reproduktion der Ergebnisse

10 *G. mellonella* Larven wurden mit jeweils 10^6 *C. burnetii* NMII, T4SS-Mutante (Δ dotA), NMII::Flag-AnkGNM, NMII::Flag-AnkG_{111E}, NMII::Flag-AnkG_{F3} oder NMII::Flag-AnkG_{SOYTA} infiziert. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS. Die Larven wurden bei 21 °C inkubiert und das Überleben alle 24 h für 10 Tage kontrolliert. Mittelwert mit Standardabweichung des *G. mellonella* Überlebens am Tag 10 von drei unabhängigen Experimenten. n.s. nicht signifikant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Die Auswertung der drei Versuche ergibt einen signifikanten Unterschied zwischen dem Überleben von *G. mellonella* Larven, die mit WT oder Δ dotA Coxiellen infiziert wurden. Dieses Ergebnis bestätigt den Eindruck der vorherigen Experimente. Die mit WT *C. burnetii* infizierten Larven, zeigen ein mittleres Überleben von $50 \% \pm 8 \%$, wohingegen für Δ dotA ein mittleres Überleben von $93 \pm 5 \%$ nachgewiesen werden konnte. Wiederholt kann ein starker Abfall des Überlebens für mit AnkG_{111E} infizierte Larven detektiert werden, er ist mit $33 \% \pm 4 \%$ am deutlichsten. Das mittlere Larvenüberleben im Fall von AnkGNM ($57 \% \pm 40 \%$), AnkG_{F3} ($73 \% \pm 30 \%$) und AnkG_{SOYTA} ($73 \% \pm 16 \%$) weist keine Signifikanz gegenüber WT oder Δ DotA auf.

Somit kann kein Unterschied zwischen der Wirkung von AnkG_{NM}, AnkG_{F3} und AnkG_{SOYTA} auf das Larvenüberleben postuliert werden.

Die Überlebenskurven der drei Versuche zeigten sich in diesem Experiment als inhomogen. Die Larven wurden aus einer Futterzuchtstelle in den Niederlanden bezogen. Ein verändertes Klima während der Lieferung, aber vor allem ein Fehlen standardisierter Aufzuchtbedingungen, erschwert die Standardisierung der *G. mellonella* Infektionsversuche. Aufgrund dessen wurden die Larven in VI.VI. von einem Zuchtbetrieb im vereinigten Königreich (TruLarv) mit standardisierten Aufzuchtbedingungen für Forschungszwecke bezogen.

VI.IV.II. Die überlebensfördernde Wirkung von AnkG_{NM} ist bei AnkG_{F3} und AnkG_{SOYTA} aufgehoben

Da sich die Überlebenskurven des letzten 3 Versuche als inkongruent präsentierten, wurde der gleiche Versuchsansatz wiederholt. Zur Infektion von *G. mellonella* wurden *C. burnetii* NMII, *C. burnetii* NMII- Δ dotA, *C. burnetii* NMII-flag-AnkG_{NM}, *C. burnetii* NMII-flag-AnkG_{F3} und *C. burnetii* NMII-flag-AnkG_{SOYTA} verwendet. Die Infektion erfolgte nach der in V.II.I.-V.II.III. beschriebenen Weise für alle Ansätze mit 10⁶ Coxiellen/Larve. In Abbildung 6 sind die Ergebnisse dreier Versuche als Mittelwert mit Standardabweichung und Signifikanz dargestellt.

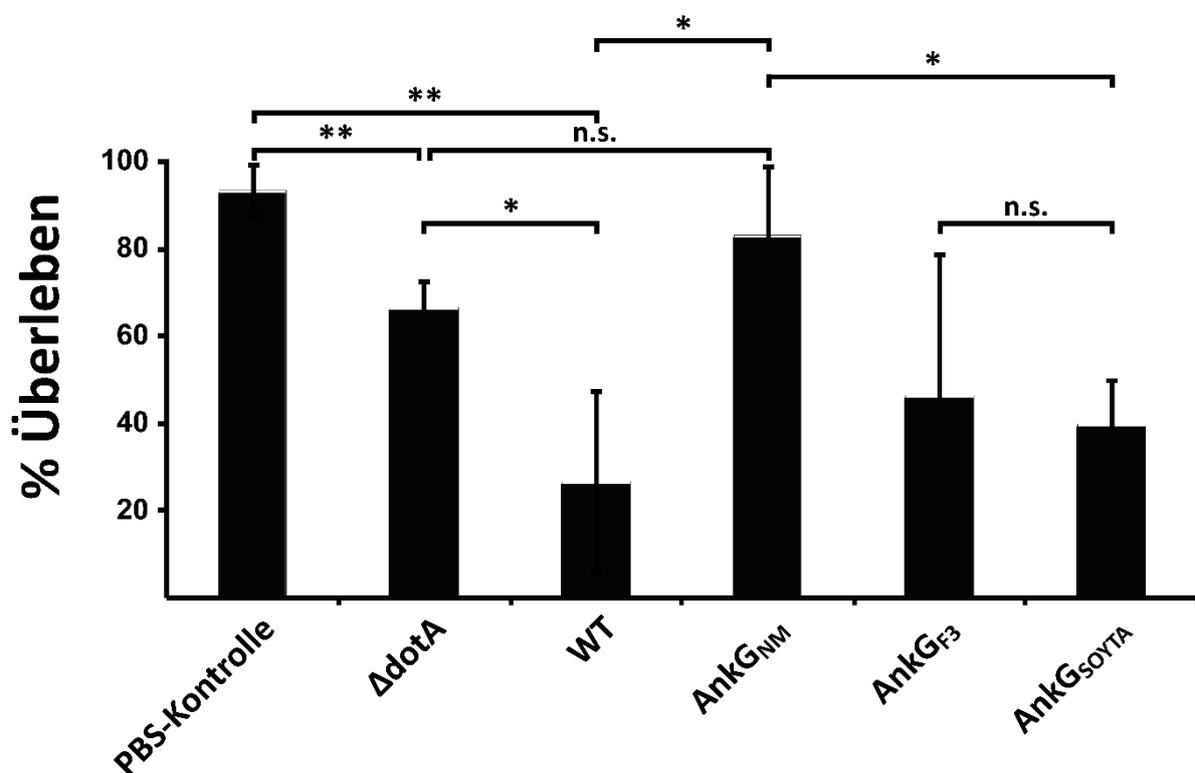


Abb. 6 Die überlebensfördernde Wirkung von AnkG_{NM} ist bei AnkG_{F3} und AnkG_{SOYTA} aufgehoben

10 *G. mellonella* Larven wurden mit jeweils 10⁶ *C. burnetii* NMII, T4SS-Mutante (Δ dotA), NMII::Flag-AnkG_{NM}, NMII::Flag-AnkG_{F3} oder NMII::Flag-AnkG_{SOYTA} in drei Versuchen infiziert. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS. Die Larven wurden bei 21 °C inkubiert und das Überleben alle 24 h für 10 Tage kontrolliert. Mittelwert mit Standardabweichung des *G. mellonella* Überlebens am Tag 10 von drei unabhängigen Experimenten. n.s. nicht signifikant, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

Die in Abbildung 6 gezeigten Resultate für WT, Δ dotA und AnkG_{NM} decken sich erneut mit den vorherigen Ergebnissen. So kann für mit wildtypischen *C. burnetii* infizierte Larven das geringste Überleben von 27%±21% gefunden werden. Im Vergleich hierzu zeigt die Δ dotA Mutante einen signifikanten Anstieg des Überlebens auf 67 ± 6 %. Auch für die AnkG_{NM} Mutante kann diesmal ein signifikanter Überlebensanstieg gegenüber WT detektiert werden, dabei liegt das mittlere Überleben an Tag 10 nach Infektion bei 83 ± 15 %. Über dies hinaus ist sichtbar, dass AnkG_{SOYTA} (40 % ± 10 %) im Vergleich zu AnkG_{NM} signifikant das Überleben der Larven verringert. Die Endpunkte der mit AnkG_{F3} Larven zeigen eine große Varianz (47 % ± 32 %), sodass keine Signifikanz festgestellt werden kann, die Darstellung lässt jedoch eine Tendenz erahnen.

Am ehesten lässt sich hieraus schlussfolgern, dass das reduzierte Larvenüberleben für AnkG_{SOYTA} oder AnkG_{F3} gegenüber AnkG_{NM} aus der Unfähigkeit der Ausschleusung der Effektorproteine ins Wirtszytosol, wie bereits in MEF- Zellen gezeigt [157], resultiert.

Weiterhin konnte insgesamt eine Steigerung des Larvenüberlebens unter Infektion mit *C. burnetii* NMII::Flag-Ank_{NM} innerhalb der bisherig durchgeführten Versuche festgestellt werden. Es scheint sich hierbei um eine Reduktion der Pathogenität zu handeln. Weiterhin lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass dieser Effekt nicht auf die Überexpression eines T4SS Effektorproteins zurückzuführen ist. Um zu zeigen, dass dieser Effekt auf die anti-apoptotische Wirkung von AnkG_{NM} zurückzuführen ist, und nicht auf einen Replikationsdefekt, sollte die intrazelluläre Replikation untersucht werden.

VI.V. Korrelation des *G. mellonella* Überlebens mit der *C. burnetii* Last

Im folgenden Experiment wurden die zweite Methode, siehe V.II.IV.-V.II.V. gewählt, um einen umfassenden Eindruck der *C. burnetii* Infektion bekommen zu können. Hierfür wurden *G. mellonella* Larven mit *C. burnetii* NMII, NMII- Δ dotA, NMII::Flag-AnkG_{NM}, NMII::Flag-AnkG_{I11E}, NMII::Flag-AnkG_{F3}, NMII::Flag-AnkG_{SOYTA}, NMII::Flag-AnkF und NMII::ankF::Tn#1775 infiziert.

Das Experiment wurde drei Mal wiederholt. Die Abbildungen 7-11 zeigen die gemittelten Ergebnisse aller Versuche. Für die Analyse des Überlebens von *G. mellonella* wurden pro *C. burnetii* Mutante je 15 Larven, außer für AnkG_{NM} 10 Larven, infiziert, zusätzlich zur PBS-Kontrolle. Um differenzieren zu können ob der Beobachtete Phänotyp exprimierter Effektorproteine auf deren Proteinwirkung oder auf eine Beeinflussung der *C. burnetii* Replikation zurückzuführen ist, sollte eine Quantifizierung der *Coxiellen* Last erfolgen. Es gibt mehrere etablierte Wege die *Coxiellen* Last pro *G. mellonella* Larve zu bestimmen. Via quantitativer PCR (Polymerasekettenreaktion) können *C. burnetii* Genome in DNA-aufgereinigten Larvenproben gemessen werden [109, 110]. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Infektionsrate und des Replikationsverhalten der *Coxiellen* stellt die Gewinnung von Hämozyten und anschließende Immunfluoreszenzfärbung dar. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *G. mellonella* Hämozyten die Wirtszellen der *C. burnetii* Infektion darstellen [18, 109, 110].

Hier wurde zur Bestimmung der *C. burnetii* Last pro Zeitpunkt und *Coxiellen*-Ansatz je drei Larven für die quantitative PCR (qPCR) und je drei Larven für die Extraktion der Hämolymphe infiziert. Inkubiert wurden die Larven für 10 Tage nach Infektion bei 21 °C.

In den Abbildungen 7-9 sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Für die Auszählungen des 2. und 10. Tages nach Infektion wurden aus je 3 Larven von *C. burnetii* NMII (WT), der T4SS-Mutante Δ dotA und *C. burnetii* NMII::Flag-AnkG_{NM} Hämocyten aus der Hämolymphe gewonnen und gepoolt (siehe Beschreibung V.II.V.). Die Anfärbung der Zellen mittels Immunofluoreszenz (V.II.IV.) erlaubte eine Darstellung von *C. burnetii* (grün) und Zellkerne (blau), siehe Abbildung 7. In Z-Stack Aufnahmen wurden je 100 Zellen ausgezählt und die Infektionsrate der Zellen, sowie die *Coxiellen* Zahl pro Zelle bestimmt.

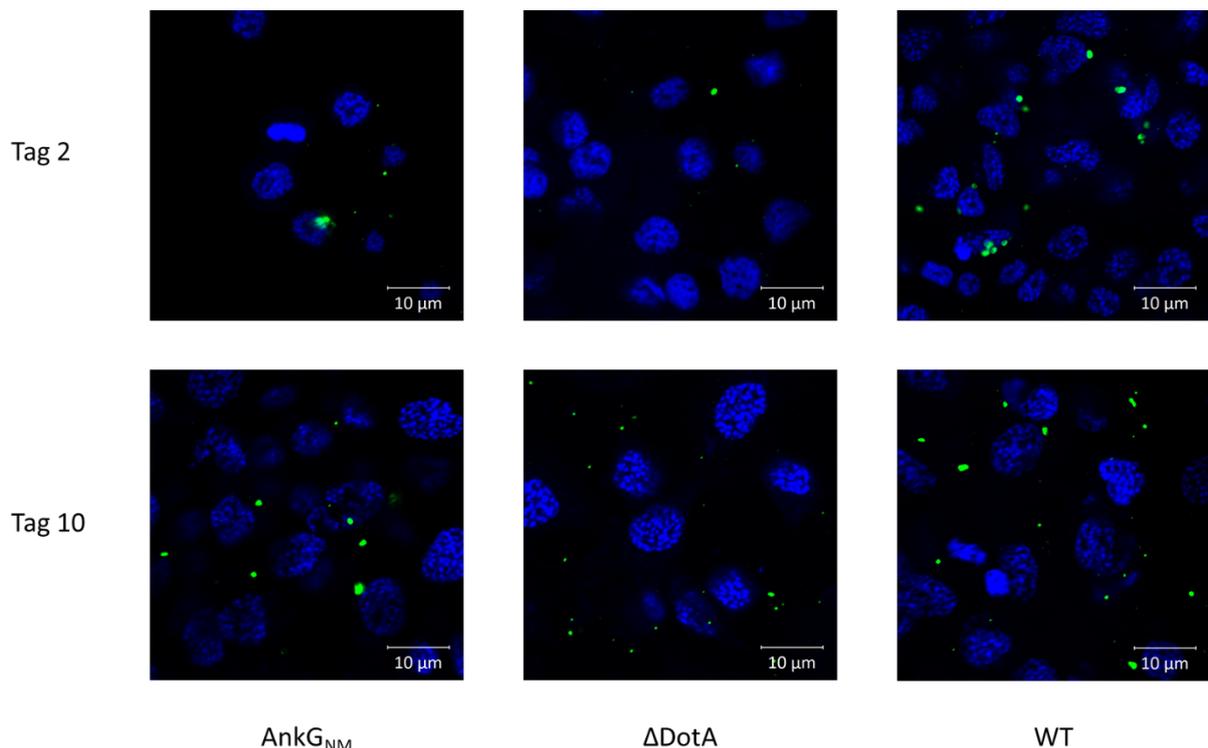


Abb. 7 *C. burnetii* NMII und NMII::Flag-AnkG_{NM} replizieren in *G. mellonella* Hämocyten

Immunfluoreszenzfärbung von *G. mellonella* Hämocyten infiziert mit *C. burnetii* NMII (WT), T4SS-Mutante (Δ dotA) oder NMII::Flag-AnkG_{NM} (AnkG_{NM}) an Tag 2 und 10 nach Infektion. Färbung des Zellkerns mittels DAPI (blau) und *C. burnetii* mit IgG-Alexa-Fluor 488 (grün).

In den Immunfluoreszenz-Aufnahmen der Hämolymphe kann eine signifikante Zunahme der Bakterien bei NMII und NMII::Flag-AnkG_{NM} und eine Steigerung der Infektionsrate für AnkG_{NM} zwischen Tag 2 und 10 beobachtet werden. Lediglich für die replikationsunfähige Δ dotA Mutante, konnte, wie zu erwarten, keine Vermehrung

festgestellt werden. Ebenfalls ist kein signifikanter Unterschied der *C. burnetii* Infektionsrate zwischen den *C. burnetii* Ansätzen zu erkennen.

In Abbildung 8 ist die Anzahl der *C. burnetii* pro 100 Zellen am Tag 2 und 10 nach Infektion als Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

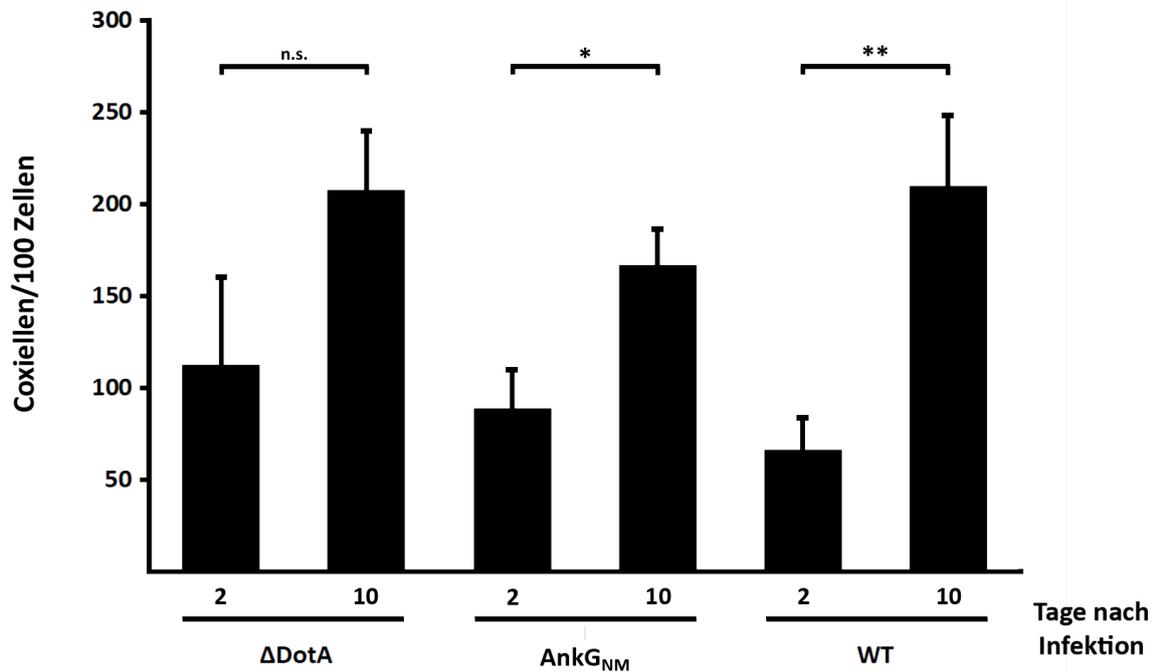


Abb. 8 Signifikante Zunahme der *C. burnetii* NMII und NMII::Flag-AnkGNM Last während der Infektion

3 *G. mellonella* Larven wurden mit jeweils 10^6 *C. burnetii* NMII, T4SS-Mutante (Δ dotA) oder NMII::Flag-AnkGNM in drei unabhängigen Versuchen infiziert. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS (nicht dargestellt). Die Larven wurden bei 21 °C inkubiert und an Tag 2 und 10 wurden die Hämocyten isoliert und mittels Immunofluoreszenz gefärbt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der *C. burnetii* Last in 100 Hämocyten an Tag 2 und 10 aus drei unabhängigen Versuchen. n.s. nicht signifikant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

C. burnetii NMII::Flag-AnkGNM und NMII konnten sich über die Infektionszeit vermehren. Wohingegen die T4SS-Mutante Δ dotA keinen signifikanten Anstieg der Bakterienzahl zu verzeichnen hat.

Im Folgenden wird die durchschnittliche Infektionsrate für *C. burnetii* NMII, Δ dotA und NMII::Flag-AnkG_{NM} an Tag 2 und 10 nach Infektion gezeigt. Diese wurde ebenfalls in 100 Hämocyten bestimmt. Dabei erscheint der Anstieg der Infektionsrate zwischen Tag 2 und 10 nur im Fall von AnkG_{NM} als signifikant. Das Fehlen eines signifikanten Anstiegs von NMII, lässt sich durch die große Varianz innerhalb der drei Versuche erklären.

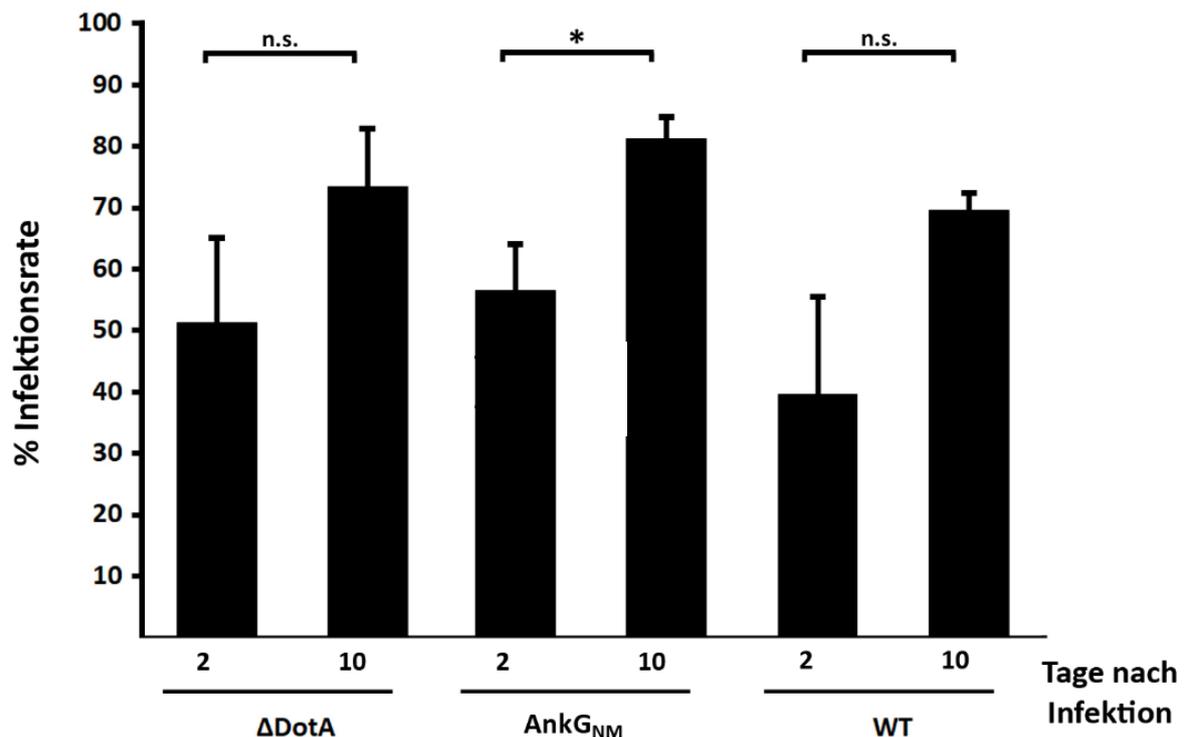


Abb. 9 Signifikante Zunahme *C. burnetii* NMII Infektionsrate bleibt aus

3 *G. mellonella* Larven wurden mit jeweils 10^6 *C. burnetii* NMII, T4SS-Mutante (Δ dotA) oder NMII::Flag-AnkG_{NM} in drei unabhängigen Versuchen infiziert. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS (nicht dargestellt). Die Larven wurden bei 21 °C inkubiert und an Tag 2 und 10 wurden die Hämocyten isoliert und mittels Immunofluoreszenz gefärbt. Dargestellt ist der Mittelwert der Infektionsrate mit Standardabweichung an Tag 2 und 10 aus drei unabhängigen Versuchen. n.s. nicht signifikant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Aufgrund der kontroversen Ergebnisse, innerhalb der Experimente, wurde der Versuchsansatz in weiteren Versuchen nochmals mit *G. mellonella* von TruLarv mit einer Inkubationstemperatur 37°C statt 21°C wiederholt. Die zu Beginn verwendete Inkubationstemperatur von 37°C wurde ursprünglich aufgrund einer erhöhten

Verpuppungsrate der Larven reduziert. Da dies zu einer verringerten Vermehrung der Bakterien führte, wie in Abbildung 7 exemplarisch dargestellt, haben wir für weitere Versuche die Temperatur wieder auf die optimale Vermehrungstemperatur von *C. burnetii* gesetzt.

Nachfolgend ist das Überleben aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichungen der mit *C. burnetii* NMII, NMII- Δ dotA, NMII::Flag-AnkG_{NM}, NMII::Flag-AnkG_{F3} und NMII::Flag-AnkG_{SOYTA} *G. mellonella* Larven dargestellt. Es sollte erneut gezeigt werden, dass der Phänotyp von AnkG_{NM} auf dessen Proteinwirkung, unter Zuhilfenahme der nicht translozierbaren AnkG Mutanten, beruht.

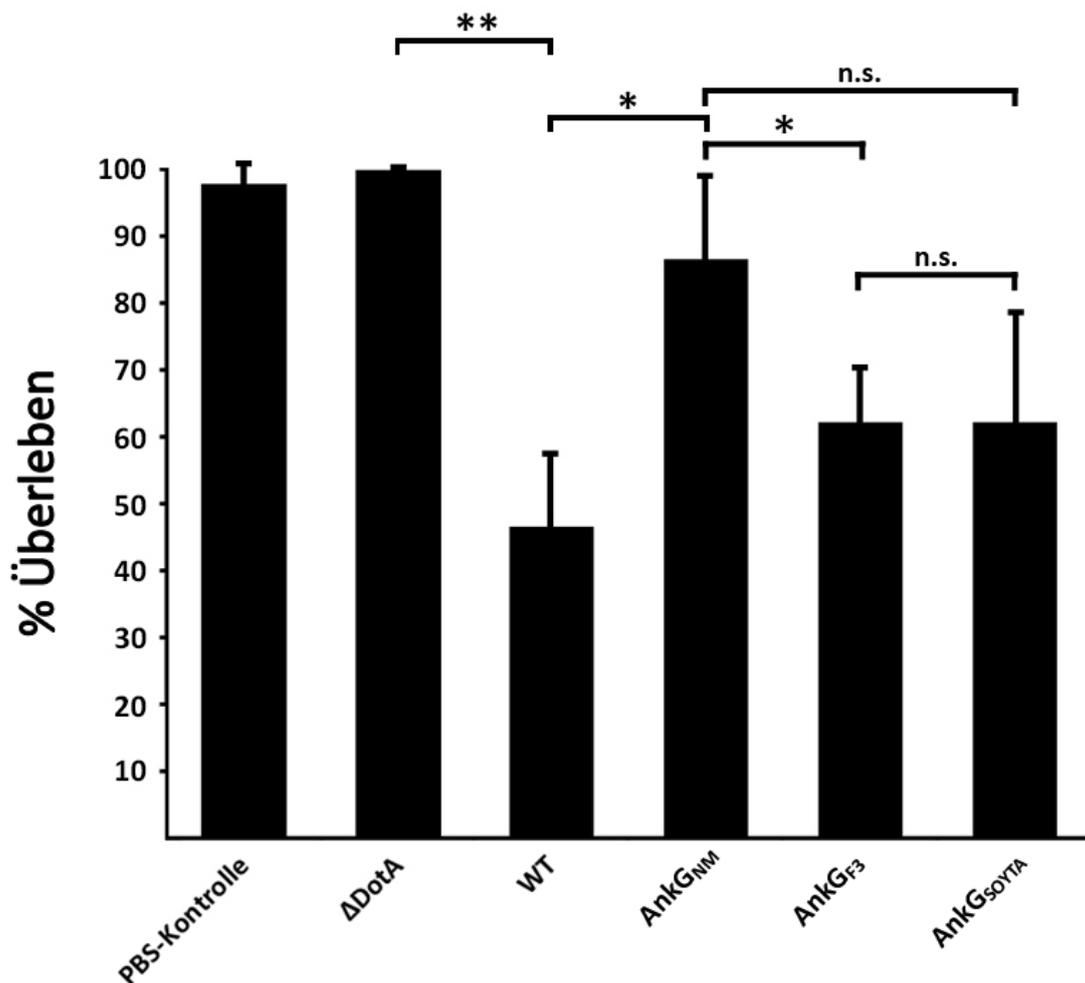


Abb. 10 Die AnkG_{NM} Proteinwirkung ist ursächlich für das Larvenüberleben

15 *G. mellonella* Larven wurden mit jeweils 10^6 *C. burnetii* NMII, T4SS-Mutante (Δ dotA), NMII::Flag-AnkG_{NM}, NMII::Flag-AnkG_{F3} oder NMII::Flag-AnkG_{SOYTA} in drei unabhängigen Versuchen infiziert. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS. Die Larven wurden bei 21 °C inkubiert und das Überleben alle 24 h für 10 Tage kontrolliert. Mittelwert mit Standardabweichung des *G. mellonella* Überlebens am Tag 10 von drei unabhängigen Experimenten. n.s. nicht signifikant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Das in Abbildung 10 sichtbare Überleben der *G. mellonella* Larven zeigt sich weitestgehend kongruent mit den Ergebnissen in Abbildung 6. Unterschiede finden sich lediglich darin, dass das Überleben von Δ dotA (100 % \pm 0%) keinen Unterschied zur PBS-Kontrolle (98 % \pm 3 %) ausweist, und diesmal AnkG_{F3} (62 % \pm 8%) signifikant das Überleben in Bezug auf AnkG_{NM} (87 % \pm 12%) vermindert. Wiederholt weisen die mit WT infizierten Larven das geringste Überleben von 47 % \pm 11% auf, signifikant vermindert hinsichtlich Δ dotA und AnkG_{NM}. Die Ergebnisse von AnkG_{SOYTA} (62 % \pm 17%) weisen keine Signifikanz auf. Dies ist wie in den vorherigen Versuchen, wie bereits erwähnt, vermutlich auf die Larvenaufzucht ohne Standardisierung zurückzuführen. Sodass für den nächsten Versuch VI.VI. auf unter standardisierten Aufzuchtbedingungen herangewachsenen, *G. mellonella* zurückgegriffen wurde.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Ergebnisse des Larvenüberlebens der drei unabhängigen Infektionsversuche mit *C. burnetii* NMII::Flag-AnkF und NMII::ankF::Tn#1775 für AnkF und AnkF-Transposon hiernach in einer eigenen Abbildung dargestellt.

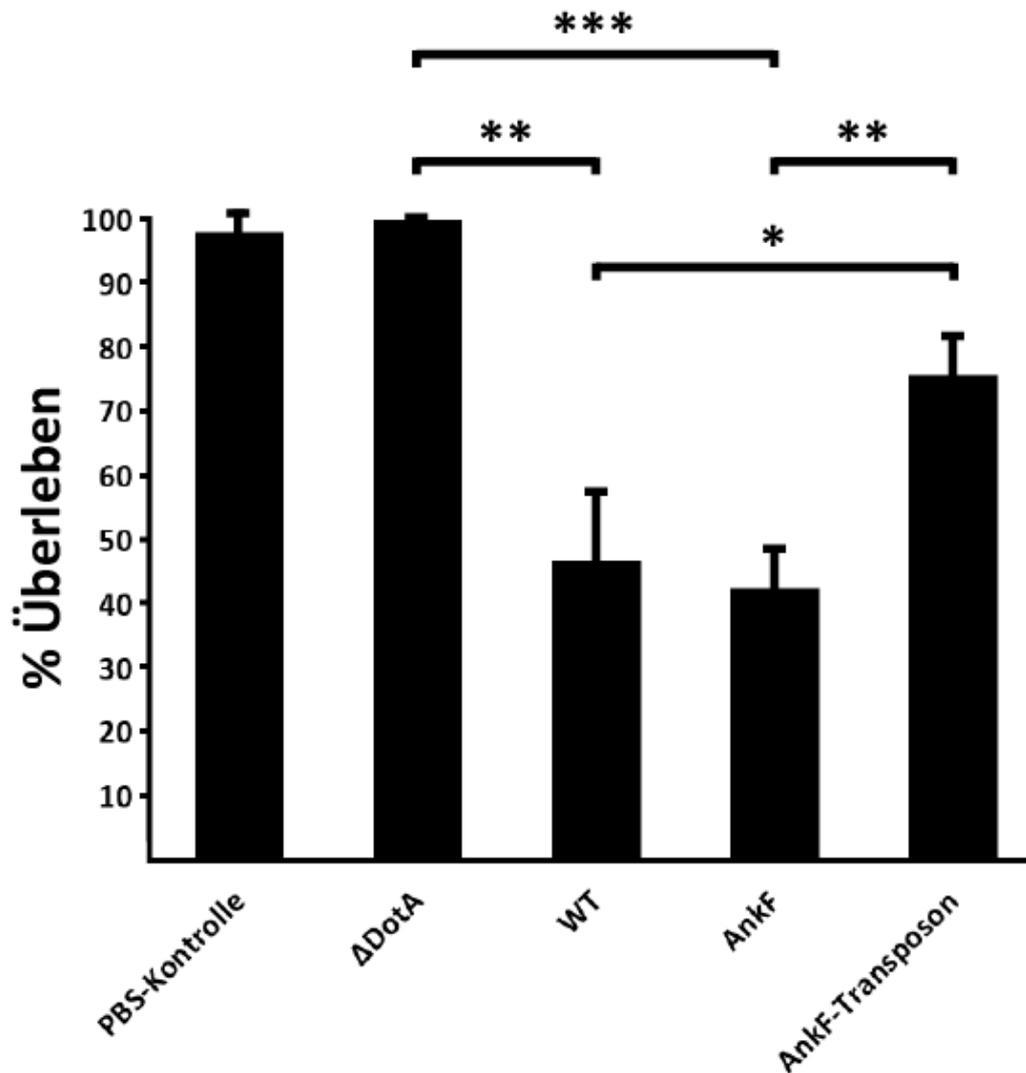


Abb. 11 AnkF ist ein wichtiger Virulenzfaktor

15 *G. mellonella* Larven wurden mit jeweils 10^6 *C. burnetii* NMII, T4SS-Mutante (Δ dotA), NMII::Flag-AnkF oder NMII::Flag-AnkF:: *Tn*#1775 in drei unabhängigen Versuchen infiziert. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS. Die Larven wurden bei 21 °C inkubiert und das Überleben alle 24 h für 10 Tage kontrolliert. Mittelwert mit Standardabweichung des *G. mellonella* Überlebens am Tag 10 von drei unabhängigen Experimenten. n.s. nicht signifikant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Larven, die mit AnkF exprimierenden *C. burnetii* infiziert wurden, präsentieren ein Überleben von 42 % ± 6 %. Dies ist dem Überleben bei WT ähnlich und somit signifikant vermindert gegenüber dem Überleben bei Δ dotA. Die AnkF Transposonmutante weist dagegen eine verringerte Virulenz auf. Sie zeigt mit einem mittleren Überleben von 76 % ± 6 % einen signifikanten Anstieg gegenüber dem AnkF und WT Überleben. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass AnkF ein wichtiger Virulenzfaktor ist [161].

VI.VI. Expression von AnkG_{NM} erhöht signifikant das Überleben von *G. mellonella* bei *C. burnetii* NMII Infektion

Die Infektion der TruLarv *G. mellonella* Larven erfolgte nach III.II.II mit *C. burnetii* NMII (WT), Δ dotA, NMII::Flag-AnkG_{NM} (AnkG) und NMII::Flag-AnkF. AnkF ist ein neben AnkG während der *C. burnetii* Infektion transloziertes T4SS Effektorprotein [13, 105]. Genomanalysen verschiedener *C. burnetii* Stämme offenbarten eine hohe Konservierung, sodass vermutet wurde, dass AnkF ein Virulenzfaktor darstellt [102]. Dies wurde darin untermauert, dass eine AnkF Transposonmutante *in vitro* eine gestörte Replikation aufwies, welche durch Ko-Infektion mit wild-typischen *C. burnetii* NMII wieder normalisiert werden konnte [161]. Obwohl gezeigt werden konnte, dass eine AnkF Transposonmutante keine CCV ausbilden kann und AnkF sowohl Vimentin bindet und zur CCV rekrutiert, konnte bislang AnkF keine Funktion zugeordnet werden [161]. *C. burnetii* NMII::Flag-AnkF wurde daher verwendet um den bereits zuvor, siehe Abb. 11, ermittelten Phänotyp zu bestätigen und diesen mit der Replikationsrate zu assoziieren. Darüber hinaus sollte die Proteinwirkung von AnkF mit der Wirkung von AnkG verglichen werden können.

Infiziert wurden je 10 Larven zur Auswertung des Überlebens sowie weitere 3 Larven zur Gewinnung der Hämolymphe an Tag 1 und 5 nach Infektion und 2 weitere Larven zur Bestimmung der *C. burnetii* Genomäquivalente mittels qPCR an Tag 1 und 5 nach Infektion. Der Versuchsansatz wurde in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die Larven wurden bei 37 °C für 10 Tage inkubiert, wie bereits beschrieben um die Replikation von *C. burnetii* zu verbessern. Durch die Erhöhung der Temperatur kam es zu einem frühzeitigen Sterben der infizierten Larven, sodass die Versuche am Tag 7 beendet wurden.

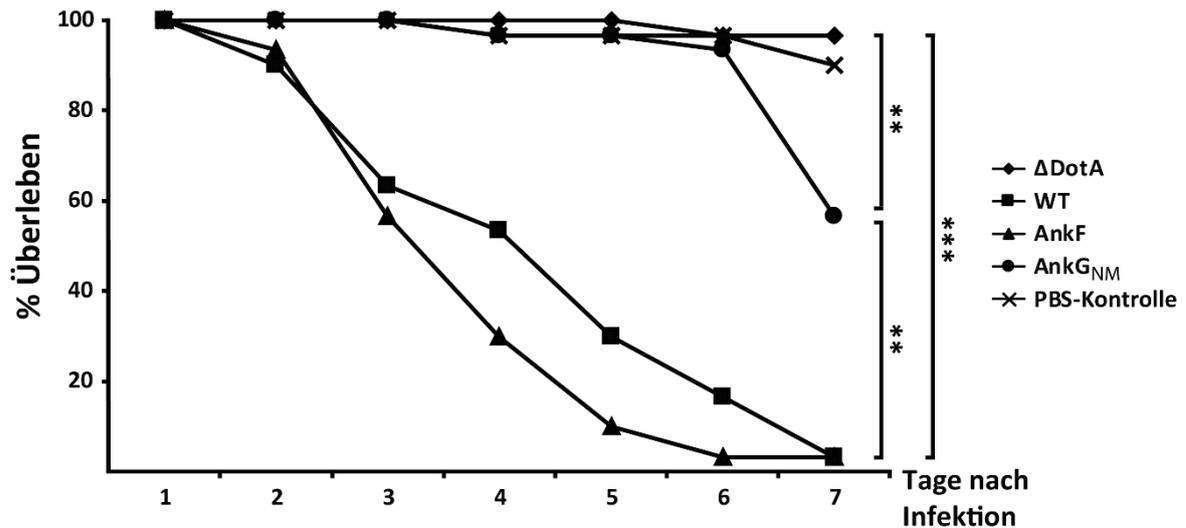


Abb. 12 Expression von AnkG_{NM} erhöht signifikant das Überleben von *G. mellonella* bei *C. burnetii* NMII Infektion [23]

10 *G. mellonella* Larven wurden mit jeweils 10^6 *C. burnetii* NMII, T4SS-Mutante (Δ dotA), NMII::Flag-AnkG_{NM} oder NMII::Flag-AnkF in drei unabhängigen Versuchen infiziert. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS. Die Larven wurden bei 37 °C inkubiert und das Überleben alle 24 h für 7 Tage kontrolliert. Mittelwert mit Standardabweichung des *G. mellonella* Überlebens am Tag 7 von drei unabhängigen Experimenten. n.s. nicht signifikant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

G. mellonella Larven, die mit Δ dotA infiziert wurden, wiesen am Tag 7 eine Überlebensrate von 97 % \pm 5 % auf und waren damit ähnlich vital wie die Larven, die PBS injiziert bekommen hatten (90 % \pm 8 %). Dies bestätigt damit erneut die vorherigen Resultate, dass Δ dotA avirulent ist.

Demgegenüber findet sich ein signifikant reduziertes Überleben bei Infektion mit *C. burnetii* NMII (3,3 % \pm 5 %) und NMII::Flag-AnkF(3,3 % \pm 5 %). Somit zeigen sich wildtypische *C. burnetii* NMII wiederholt virulent. Die Infektion von *G. mellonella* mit NMII::Flag-AnkG_{NM} dagegen führt zu einem verbesserten Überleben (57 % \pm 9 %).

Untermauert werden die Ergebnisse der Überlebenskurven mit Darstellungen der *C. burnetii* Replikation in *G. mellonella*. Zur Anwendung sind die beiden bereits genannten Methoden, der Hämocyten Immunfluoreszenzfärbung und anschließender Auszählung sowie die Bestimmung der Bakterienlast mittels quantitativer PCR, gekommen. Im Fall der Immunfluoreszenzfärbung wurde neben den Zellkernen auch

das Zytoskelett (Aktin) der Hämocyten gefärbt. Die zusätzliche Färbung des Zytoskelettes erlaubte eine genauere Diskriminierung von intra- und extrazellulären Bakterien. Die CCV konnte durch den Aktinaufbau deutlicher nachgewiesen werden.

Die Infektionsraten von je 100 Hämocyten mit *C. burnetii* NMII, Δ dotA, NMII::Flag-Ank_{GM} und NMII::Flag-AnkF zum Zeitpunkt 1 und 5 Tage nach Infektion wurden in Triplikaten in Abbildung 13 dargestellt. Gegenübergestellt werden die Infektionsraten von Tag 1 und 5.

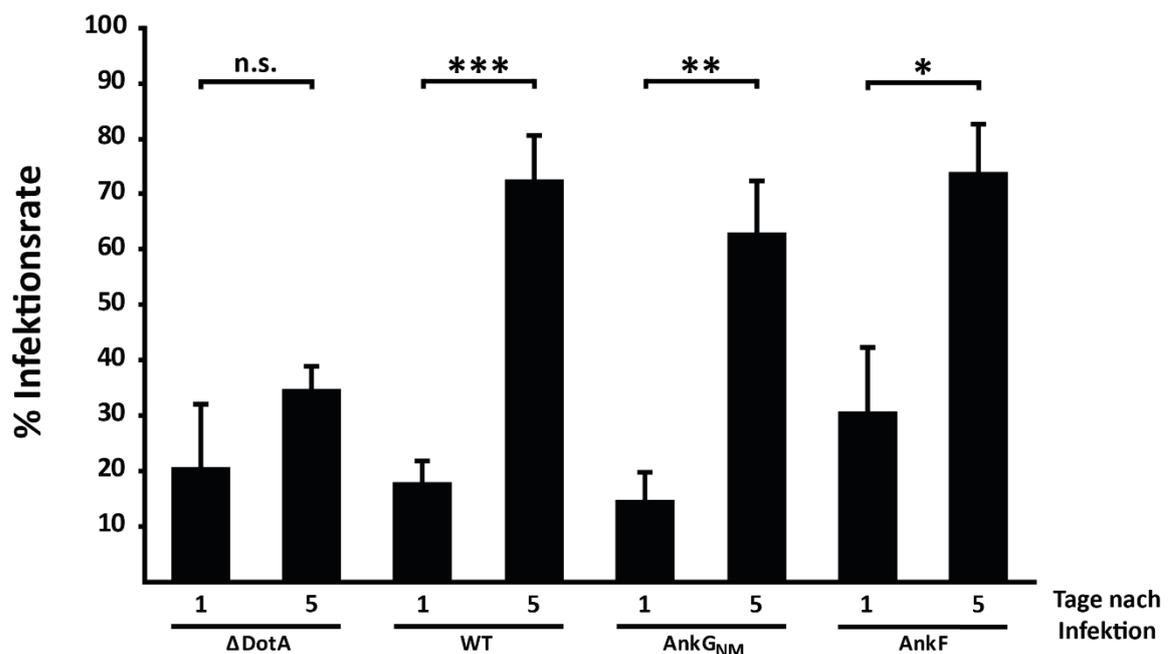


Abb. 13 Die Infektionsraten von *C. burnetii* NMII, NMII::Flag-Ank_{GM} und AnkF nehmen während der Infektion signifikant zu [23]

3 *G. mellonella* Larven wurden mit jeweils 10^6 *C. burnetii* NMII, T4SS-Mutante (Δ dotA), NMII::Flag-Ank_{GM} oder NMII::Flag-AnkF infiziert. Die Larven wurden bei 37 °C inkubiert und an Tag 1 und 5 wurden Hämocyten isoliert und mit Immunofluoreszenz gefärbt. Dargestellt ist der Mittelwert mittels Standardabweichung der Infektionsrate an Tag 1 und 5 von drei unabhängigen Experimenten. n.s. nicht signifikant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Zu Beginn der Infektion, an Tag 1 nach der Infektion, gibt es keinen signifikanten Unterschied der Infektionsraten, wohingegen es an Tag 5 nach Infektion einen signifikanten Anstieg der Infektionsrate für WT, Ank_{GM} und AnkF gegenüber Δ dotA gibt. Der Zuwachs der Infektionsraten zwischen Tag 1 und 5 ist für alle *C. burnetii*, außer Δ dotA, signifikant. Dieses Ergebnis untermauert, dass die Δ dotA Mutante, ohne

ein funktionsfähiges Typ IVB Sekretionssystem unfähig ist zu replizieren [89] [88, 162]. Obwohl NMII::Flag-AnkG_{NM} eine geringere Pathogenität in *G. mellonella* aufweist, zeigen die Daten der Abbildung 13, dass dies nicht durch einen Defekt in der bakteriellen Replikation verursacht wurde.

Die nachstehenden Bilder sind repräsentative Aufnahmen der Hämocyten Infektion durch *C. burnetii* NMII, Δ dotA, NMII::AnkG_{NM} und NMII::AnkF. Die Immunfluoreszenzen stellen das Zytoskelett Aktin als rot, den Zellkern als blau und die *C. burnetii* als grün dar.

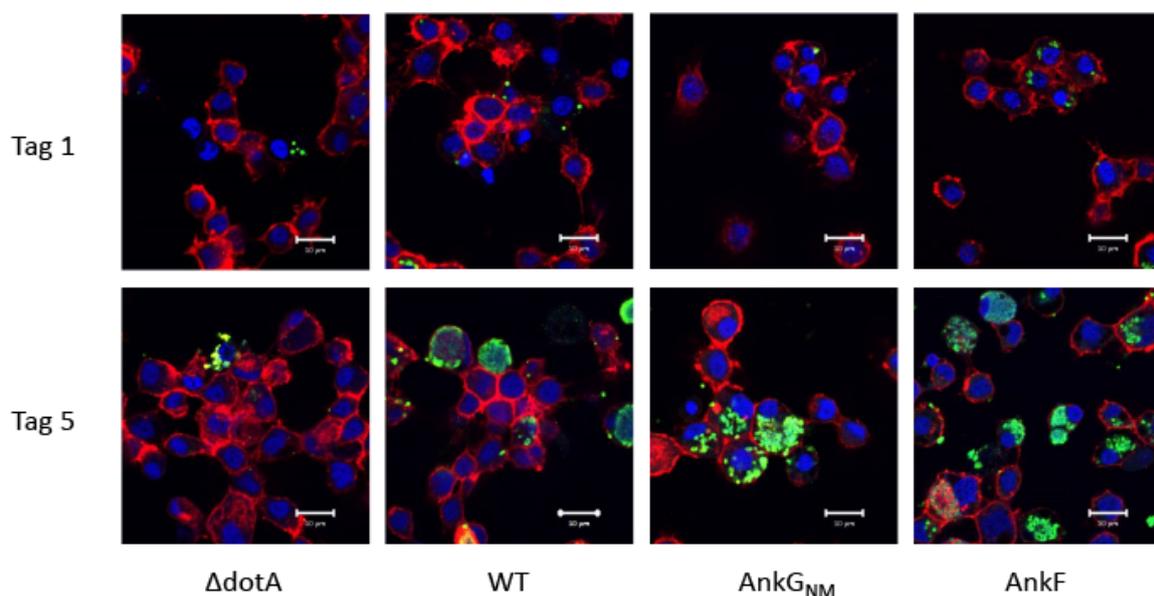


Abb. 14 Visualisierung der Replikation von *C. burnetii* NMII, NMII::Flag-AnkG_{NM} und NMII::Flag-AnkF in Hämocyten mittels Immunfluoreszenzfärbung [23]

Immunfluoreszenzfärbung von *G. mellonella* Hämocyten infiziert mit *C. burnetii* NMII (WT), T4SS-Mutante (Δ dotA), NMI::Flag-AnkG_{NM} oder NMII::Flag-AnkF an Tag 1 und 5 nach Infektion. Färbung des Zellkerns mittels DAPI (blau), Aktin mit Phalloidin-Alexa-Fluor 647 (rot) und *C. burnetii* mit IgG-Alexa-Fluor 488 (grün)

Die beispielhaften Aufnahmen lassen eine deutliche Zunahme der Infektionsrate und der CCV Größe für *C. burnetii* NMII, NMII::AnkG_{NM} und NMII::AnkF erkennen. Dabei ist keine Divergenz im replikativen Verhalten der NMII::AnkG_{NM} und NMII::AnkF, im Vergleich zu den NMII, sichtbar. Der Mangel an Replikationsfähigkeit der Δ dotA defizienten *C. burnetii*, der bereits in der Darstellung der Infektionsrate offensichtlich wird, kann ebenfalls in den Bildern der Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden.

Dies untermauert, dass das T4SS essentiell für die Ausbildung der CCV und somit der replikativen Nische von *C. burnetii* ist [6, 162].

Zusätzlich wurde die *C. burnetii* Replikation während der *G. mellonella* Infektion mittels Messung der Genomäquivalente durch quantitative PCR bestimmt. Das nachfolgende Diagramm zeigt die gemessenen Resultate der qPCR von je 2 Larven pro Zeitpunkt und *C. burnetii* Genotyp in drei unabhängigen Versuchen. Dargestellt ist die durchschnittliche Vervielfachung der *C. burnetii* Last von Tag 1 zu 5 nach Infektion.

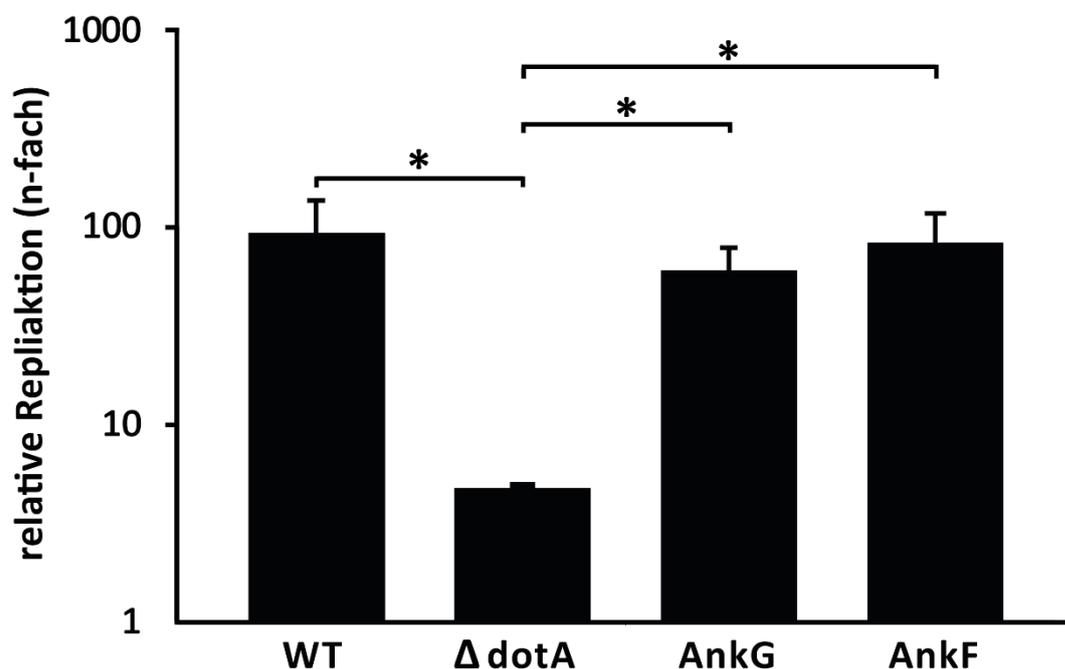


Abb. 15 Expression von AnkG_{NM} und AnkF beeinflussen nicht die Replikation in *G. mellonella*

2 *G. mellonella* Larven wurden mit jeweils 10^6 *C. burnetii* NMII, T4SS-Mutante ($\Delta dotA$), NMII::Flag-AnkG_{NM} oder NMII::Flag-AnkF in drei unabhängigen Versuchen infiziert. Die Larven wurden bei 37 °C inkubiert und an Tag 1 und 5 die genomische DNA mittels DNAesy Blood and Tissue Kit isoliert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung des relativen Zuwachses der Bakterien von drei unabhängigen Experimenten. n.s. nicht signifikant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Wiederholt kann gezeigt werden, dass NMII, NMII::Flag-AnkG_{NM} und NMII::AnkF im gleichen Maße replizieren und $\Delta dotA$ eine signifikant verminderte Replikation aufweist. Die Ermittlung der Replikation für *C. burnetii* mittels zweier differierender

Methoden zeigt sich hier als kongruent. Somit konnte durch Verwendung beider Verfahren eine Erhöhung der Validität erreicht werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Proteinwirkung von AnkG_{NM} ursächlich für die Reduktion der Virulenz von *C. burnetii* im *G. mellonella* Modell ist, wohingegen die Überexpression von AnkF keinen Einfluss auf die Virulenz nimmt.

VII. Diskussion

Coxiella burnetii benötigt ein T4SS, mit dem es Effektorproteine in die Wirtszelle injiziert, um sich intrazellulär vermehren zu können [6]. Bisher sind circa 150 Effektorproteine identifiziert worden, deren Funktion während der Infektion in den meisten Fällen unbekannt ist [7]. Die Effektorproteine, für die eine Funktion beschrieben worden ist, sind beteiligt an der Etablierung und Optimierung der replikativen Vakuole und dem Erhalt der Vitalität der infizierten Wirtszelle. Als an der Entstehung und Ausreifung der parasitophoren Vakuole beteiligten Effektorproteine konnten CvpA (**Coxiellen Vakuolen Protein A**) [107], Cig57 (**Co-reguliert mit *icm*-Gen 57**) [108], Cig2 (**Co-reguliert mit *icm* Gen 2**)/CvpB (**Coxiellen Vakuolen Protein B**) [109, 110], CirA (**Colicin Ia Rezeptor A**) [111] und CvpC, CvpD und CvpE (engl.: **Coxiella vacuoles protein C, D, E**) [112] identifiziert werden. Zum Überleben der infizierten Wirtszelle tragen das Effektorprotein IcaA (Inhibitor der **Caspase Aktivierung A**) über eine Inhibierung der Pyroptosis [115] und die Effektorproteine AnkG (engl.: **Ankyrin-repeat protein G**), CaeA (***C. burnetii* anti-apoptotischer Effektor A**) und CaeB (***C. burnetii* anti-apoptotischer Effektor B**) über eine Hemmung der Wirtszell-Apoptose bei [8-14].

Es erfolgte allerdings im Rahmen dieser Arbeit für AnkG und aufbauend auf dieser Arbeit für CaeB eine Bestätigung der Funktion *in vivo* [156, 163, 164]. Die Funktion der meisten anderen Effektorproteine wurde nur in *in vitro* Versuchen analysiert. Daraus wird ersichtlich, dass insbesondere die Frage welche Rolle einzelne Effektorproteine *in vivo* spielen, nicht einfach zu adressieren ist. Beispielsweise ist das häufig in der Forschung verwendete Mausmodell zur Analyse der *C. burnetii*-Infektion eher ungeeignet. In immunkompetenten Mäusen führt eine *C. burnetii* NMII Exposition nicht zur Infektion, sondern innerhalb 14 Tagen zur kompletten Erregerelimination [154]. So kann der Laborstamm *C. burnetii* NMII nur in immundefizienten SCID-Mäusen (engl.: Severe combined immunodeficiency) verwendet werden [17]. Der *C. burnetii* NMI Stamm, welcher durch seine Virulenz nur unter BSL3 Bedingungen analysiert werden darf, kann in mehreren Mäuselinien verwendet werden. Allerdings schwankt die Eignung der Mäuselinien stark, da sie eine unterschiedlich starke Serokonversion und darauffolgender Erreger Elimination aufweisen [17, 139].

Außerdem verfügen nur wenige Labore über die Möglichkeit mit einem S3 Erreger Infektionsversuche in Mäusen durchzuführen.

Das *in vivo* Infektionsmodell der großen Wachsmottenlarve (*Galleria mellonella*) dient als kosteneffektives und leicht handhabbares Infektionsmodell [147-151], auch für die Untersuchung sowohl einer *C. burnetii* NMI als auch einer NMII Infektion [18, 19]. Die Infektion von *G. mellonella* wurde, wie bereits für die *C. burnetii* Infektion etabliert, mittels Injektion durchgeführt [18, 109, 110, 165]. Hierfür konnte zunächst eine letale Dosis für *C. burnetii* NMII ermittelt werden, hier 10^6 Coxiellen/Larve. Es wurde für den Laborstamm *C. burnetii* NMII eine dosisabhängige Virulenz nachgewiesen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die *C. burnetii* Virulenz in *G. mellonella* von einem funktionsfähigen Dot/Icm T4SS abhängig ist. *G. mellonella* Larven, welche mit einer T4SS Mutante (Δ dotA oder Δ dotB) infiziert wurden, zeigten eine signifikant reduzierte Letalität gegenüber mit *C. burnetii* NMII infizierten Larven [18, 19]. Ein Ziel dieser Arbeit war es, das Infektionsmodell *G. mellonella* für *C. burnetii* NMII innerhalb der Arbeitsgruppe zu etablieren. Des Weiteren sollte die Rolle von *C. burnetii* Effektorproteinen für die Virulenz in *G. mellonella* untersucht werden. Mit Hilfe dieses Infektionsmodells konnte zuvor nachgewiesen werden, dass die T4SS Effektorproteine CvpB/Cig2, EirA (essenziell für intrazelluläre Replikation A) und aufbauend auf der hier etablierten Methode CaeB sowie AnkG als Ergebnis dieser Arbeit eine wichtige Rolle während der Infektion spielen [109, 156, 164, 165]. Von besonderem Interesse für diese Arbeit galt es die Wirkung des *in vitro* anti-apoptotischen Effektorproteins AnkG im *in vivo* Modell zu beleuchten [13] [9] [14]. So sollte der Einfluss der Überexpression von einzelnen Effektorproteinen auf die Vitalität der Larven während der *C. burnetii* Infektion analysiert werden. Zunächst wurde das *G. mellonella* Modell im Labor etabliert. So konnten bereits veröffentlichte Ergebnisse [18, 19] reproduziert werden. Das Larvensterben ist sowohl von der Infektionsdosis von NMII als auch von einem funktionierenden Dot/Icm Typ IV Sekretionssystem abhängig. Die Larven, welche mit der Δ dotA Mutante infiziert wurden, zeigten, wie in Abbildung 2 dargestellt, keine gesteigerte Letalität, ebenso wie die PBS-Kontrolle. Dieses Ergebnis ist somit übereinstimmend mit der Literatur, welches ein funktionsfähiges T4SS als essenziell für die *C. burnetii*-Replikation beschrieben hat [5].

Die Kongruenz der Ergebnisse ließ sich durch die Verwendung von Larven des Zuchtbetriebes BioSystems Technology Ltd. maßgeblich verbessern. Hierbei handelte es sich um, unter standardisierten Aufzuchtbedingungen, erzeugten *G. mellonella* Larven. Für die Aufzucht wird kein Antibiotikum verwendet und der Transport findet nur von normalisierten (Alter, Größe und Gewicht) Larven statt. Von der Verwendung von als Tierfutter bestimmten Larven wurde aus nachfolgenden Gründen abgesehen: i) Die zur Tierfütterung gezüchteten Larven wurden mit Antibiotika behandelt. Hierdurch wird sowohl der Lebenszyklus von *G. mellonella* als auch deren Infektionsanfälligkeit negativ beeinflusst. ii) Kein Standardisierter Transport der Larven. Larven welche bereits mit physikalischem Stress, wie Kälte oder Hitze während des Transportes oder Mangel an Nahrung konfrontiert waren, zeigten eine höhere Anfälligkeit gegenüber Infektionen [166]. iii) Die Larven hatten unterschiedliche Größen und Gewicht, was die Infektionsanfälligkeit beeinträchtigt. Somit sind Larven der Firma BioSystems besser für wissenschaftliche Untersuchungen geeignet und liefern reproduzierbarere Daten.

Während dieser Arbeit wurde die Inkubationstemperatur teilweise auf 21°C abgesenkt, da die Verpuppungsrate der Larven zu hoch war. Allerdings führte das zu einer stark reduzierten Vermehrung von *C. burnetii* [18]. Um die Replikationsrate zu erhöhen, wurde die Temperatur für alle weiteren Versuche wieder auf 37°C angehoben [22]. Dadurch konnte die bakterielle Vermehrung gesteigert werden (Abb. 11 und 14).

Das Effektorprotein Repertoire unterscheidet sich zwischen verschiedenen *C. burnetii* Isolaten [159]. So konnten beispielsweise für das *C. burnetii* Effektorprotein CaeA Sequenzunterschiede bis hin zur Deletion des Gens detektiert werden [12]. Auch die Sequenz von AnkG weist eine Heterogenität zwischen den *C. burnetii* Isolaten auf. Es gibt Stämme, die das Vollängen Protein AnkG mit 338 Aminosäuren (AnkG_{NM}) exprimieren, während andere Isolate nur ein verkürztes AnkG exprimieren. So exprimiert das Soyta Isolat ein AnkG von 92 Aminosäuren (AnkG_{SOYTA}) und das F3 Isolat ein AnkG von 51 Aminosäuren (AnkG_{F3}). Für AnkG_{NM} konnte eine anti-apoptotische, für AnkG_{SOYTA} keine, für AnkG_{F3} eine pro-apoptotische Wirkung nachgewiesen werden [23]. Allerdings werden weder AnkG_{SOYTA} noch AnkG_{F3} in die Wirtszelle transloziert, da ihnen die C-terminale Translokationsdomäne fehlt [23].

Hieraus abgeleitet sollte eine Expression von AnkG_{SOYTA} und AnkG_{F3} keinen Einfluss auf die Infektion haben, da sie nicht in die Wirtszelle gelangen.

Interessanter Weise führte die Überexpression des Effektorproteins AnkG_{NM} zu einer Reduktion der Virulenz von *C. burnetii* NMII (Abb. 3 – 7). Ähnlich wie bei einer Infektion mit der T4SS defizienten Δ dotA Mutante führte die Infektion mit AnkG_{NM} überexprimierenden *C. burnetii* nicht oder nur in wenigen Fällen zum Tod der infizierten Larven [13, 18, 89]. Dies liegt allerdings nicht an der verringerten Replikation von AnkG_{NM}-überexprimierenden *C. burnetii* (Abb. 9-11 und 13-14), wie dies für die Δ dotA Mutante der Fall ist. Die Überexpression von AnkG_{F3} und AnkG_{SOYTA} verändert die Virulenz dagegen nicht (Abb. 5-7) [14, 157]. Dies liegt mutmaßlich daran, dass beide verkürzten AnkG Proteine nicht über das T4SS in die Wirtszelle injiziert werden können.

Die anti-apoptotische Wirkung von AnkG ist von der Bindung an die Wirtszellproteine p32 und Importin- α 1 abhängig [14]. Durch die Bindung an p32 wird der Transport zum Zellkern ermöglicht. Durch die Bindung an Importin- α 1 wird der Import von AnkG in den Zellkern induziert. Die nukleäre Lokalisation von AnkG ist essenziell für die anti-apoptotische Wirkung. Die AnkG Mutante AnkG_{I11E} bindet nicht an Importin- α 1 und zeigt *in vitro* keine anti-apoptotische Wirkung (Abb. 5) [14]. Auch *in vivo* führte die Überexpression von AnkG_{I11E} nicht zu einer Verringerung der Virulenz von *C. burnetii*. Im Gegenteil, wir konnten eine Steigerung der Virulenz im Vergleich zu wild-typischen *C. burnetii* feststellen (Abb. 5). Um diesen Effekt der AnkG_{I11E} Überexpression zu erklären, müssten erneute Versuche mit unter standardisierten Bedingungen aufgewachsenen Larven durchgeführt werden, da die Versuche mit AnkG_{I11E} überexprimierenden *C. burnetii* mit Larven erfolgten, die als Tierfutter hergestellt worden sind. Dies außer Acht lassend könnte die Virulenz Steigerung durch AnkG_{I11E} Überexpression in der Blockierung einer Bindung von endogen gebildetem AnkG_{NM} mit p32 liegen. Es wäre auch möglich, dass die Überexpression von AnkG_{I11E} die Translokation anderer Effektorproteine beeinflusst. So könnte die Anzahl an transloziertem AnkG reduziert sein.

Hieraus ergibt sich, dass die Virulenz von *C. burnetii* in *G. mellonella* maßgeblich durch die Proteinwirkung beeinflusst wurde. Weshalb der Virulenzfaktor AnkG_{NM} die

Sterblichkeit der Larven reduzierte, könnte durch seine bereits bekannte anti-apoptotische Wirkung erklärbar sein.

Hämozyten der *G. mellonella* Larven sind das Äquivalent der neutrophilen Granulozyten bzw. der Makrophagen. Sie haben phagozytische Aktivität und sind Wirtszelle von *C. burnetii* [20, 21]. Es konnte bislang gezeigt werden, dass die zelluläre Immunantwort der Hämozyten durch Phagozytose von Pathogenen nicht zur Destruktion der Hämozyten führt [24]. Wohingegen für extrazelluläre Abwehrmechanismen wie die Knötchenbildung und Abkapselung oder nachfolgende intrazelluläre Abwehrmechanismen wie die Bildung intrazellulärer Sauerstoffradikale (engl.: oxidative burst) eine Aktivierung des Immunsystems mit Destruktion von Hämozyten nachgewiesen werden konnte. Gleiches gilt für die humorale Erregerabwehr und Aktivierung der Melanisierung [167, 168]. Eine Destruktion der Hämozyten korreliert hierbei mit einer Entzündungsreaktion, welche zu einem gesteigerten Larvensterben führt [20, 169]. Wenn nun vor allem die Phagozytose als Weg der Erregerelimination dient und Ank_{GM} die Apoptose in Hämozyten hemmt, könnte die Infektion von *C. burnetii* in Hämozyten fortschreiten ohne zu einer weiteren Aktivierung des Immunsystems, und somit zum Larvensterben zu führen. Es ist allerdings bekannt, dass eine Infektion von Insekten mit Gram-negativen Bakterien zu einer humoralen und zellulären Immunantwort führt. Deshalb sollte die Immunantwort während der *C. burnetii* Infektion Gegenstand weiterer Forschung sein [168].

Im Gegensatz zur Analyse von CvpB/Cig2 und EirA wurden keine Mutanten mit Deletion der Effektorproteine verwendet, sondern Mutanten, welche induzierbar Effektorproteine überexprimierten [109, 165]. Sowohl die Deletion als auch die Überexpression von Proteinen kann zu künstlich erzeugten Phänotypen führen. Kann es bei Überexpression beispielsweise zu Verdrängung weiterer Effektorproteine kommen, so kann das Fehlen eines Effektorproteins durch andere Effektorproteine kompensiert werden. Während einer *C. burnetii* Infektion wurden pro- und anti-apoptotische Effekt festgestellt, sodass ein Zusammenspiel pro- und anti-apoptotischer Effektorproteine vermutet werden kann [23]. Ein Eingreifen in dieses Zusammenspiel kann sowohl durch Entfernung oder Überexpression zu einem Missverhältnis führen. Letztlich ist man gezwungen unter Akzeptanz möglicher Störungen des Phänotyps auf ein praktikables Modell zurückzugreifen. Da

Signalkaskaden neben der Qualität auch von der Quantität vorhandener Proteine abhängig sind, können diese nach Veränderung der Proteinmenge sowohl gehemmt als auch induziert werden [170]. In dieser Arbeit konnte mittels Überexpression von AnkG_{NM} eine Reduktion der Letalität gegenüber wild-typischen *C. burnetii* NMII erreicht werden. Allerdings führte die Überexpression von AnkG_{I11E} nicht zu einer Veränderung der Virulenz von *C. burnetii*. Hieraus lässt sich schließen, dass der Phänotyp durch die Wirkung von AnkG und nicht durch Überexpression *per se* erreicht werden konnte. Ein Vorteil der Überexpression von Proteinen kann gegenüber der Deletion darin liegen, die Überexprimierten Proteine beispielsweise durch Immunhistologische Färbung direkt nachweisen zu können. So konnte für AnkG_{NM} *in vitro* bereits eine nukleäre Lokalisation gezeigt werden [14]. Weiterhin erlaubt die Immunfluoreszenzfärbung überexprimierter Proteine eine Kontrolle der Induktion mit ggf. Quantifizierung der exprimierten Proteinmenge [163].

Als Kritikpunkt einer Überexpressionsanalyse könnte eine fehlgeschlagene Induktion angeführt werden, sodass die Wirkung überexprimierter Proteine im Verlauf der Infektion nachlassen könnte. Durch Transkriptionsanalysen der *ankG* Genvarianten konnte eine fehlgeschlagene Induktion ausgeschlossen werden. Allerdings war die induzierte Transkript-Menge trotz nachlassender Induktion höher als die endogene Expression von *ankG* [163].

Eine nützliche Ergänzung der Überexpression stellen Deletionen von Effektorproteinen dar. Zum Zeitpunkt der Versuche mit AnkG Mutanten war es noch nicht möglich eine AnkG_{NM} Deletionsmutante herzustellen. In Schäfer et al. 2020 konnten schließlich Infektionsversuche mit einer AnkG Deletionsmutante in *G. mellonella* publiziert werden [95]. Die Ergebnisse deckten sich mit der Erwartung, dass die anti-apoptotische Wirkung von AnkG ursächlich für ein gesteigertes Larvenüberleben ist. *G. mellonella*, welche mit der Deletionsmutante infiziert wurden, wiesen eine hohe Letalität auf. Der anti-apoptotische Effekt von AnkG war aufgehoben. So ermöglichte die Deletion von AnkG die Verifikation der durch Überexpression gewonnenen Erkenntnisse.

Insgesamt konnte innerhalb dieser Arbeit erneut nachgewiesen werden, dass *G. mellonella* ein geeignetes Infektionsmodell für *C. burnetii* NMII ist. Weiterhin gelang es den Einfluss der Effektorproteine AnkG mittels Überexpression auf die Pathogenität

von *C. burnetii* NMII zu untersuchen. Es konnte eine signifikant reduziertes Larvensterben als Wirkung des AnkG_{NM} Effektorproteins nachgewiesen werden. Wobei als ursächlich für diesen Phänotyp am ehesten eine gesteigerte Resilienz der Hämozyten gegenüber der Infektion vermutet werden kann. Wie bereits oben erwähnt, stellt vor allem die Untersuchung der durch AnkG_{NM} beeinflusste Signaltransduktion Schwerpunkt weiterer Forschung dar. Dass AnkG_{NM} die anti-apoptische Wirkung über Transfer in den Nukleus vermittelt, konnte bereits gezeigt werden [14]. Die intranukleäre Wirkweise von AnkG_{NM} ließ sich im Jahr 2022 *in vitro* in HEK293T Zellen (engl.: Human embryonic kidney cells), HeLa Zellen (engl.: human epithelial cervix cells) und THP-1 Zellen (engl.: human monocytic cell line) weiter spezifizieren. Als ursächlich hierfür konnte eine Interaktion von AnkG_{NM} mit der Wirtszell nukleären RNA Helikase DDX21 (engl.: DExD box RNA helicase 21) und der kleinen, nukleären 7SK RNA nachgewiesen werden. AnkG_{NM} bindet sowohl DDX21 als auch die 7SK RNA, dadurch wird CDK9 (engl.: Cyclin-dependend kinases 9) vom 7SK snRNP (kleinen, nukleären Ribonukleoprotein) Komplex freigesetzt. Die Freisetzung von CDK9 führt über die RNA Polymerase II zur Veränderung der Transkription. So werden anti-apoptische Gene hochreguliert, während die Expression pro-apoptische Gene gehemmt wird [25].

AnkF stellt neben AnkG ein während der *C. burnetii* Infektion transloziertes T4SS Effektorprotein dar, dem bislang keine Funktion zugeordnet werden konnte [13, 105]. Diese Daten zeigen, dass AnkF eine wichtige Rolle für das intrazelluläre Überleben spielt und relevant für die Replikation ist. Eine AnkF Transposonmutante wies *in vitro* eine gestörte Replikation auf, welche durch Ko-Infektion mit wild-typischen *C. burnetii* NMII wieder normalisiert werden konnte [161]. Innerhalb dieser Arbeit wurde die NMII::Flag-AnkF Mutante (überexprimiert AnkF) und die Transposonmutante von AnkF (keine Expression von AnkF) im *G. mellonella* Infektionsmodel untersucht [171]. Die Überexpression von AnkF führt zu einer ähnlichen Letalität wie die Infektion mit Wild-typ *C. burnetii* (Abb. 12). Die Replikation der Bakterien war durch die Überexpression durch AnkF nicht beeinflusst (Abb. 13). Im Gegensatz dazu, führte die Deletion von AnkF zu einer reduzierten Virulenz, und somit zu einem verbesserten Überleben der infizierten Larven (Abb.11). Aufbauend auf diesen Daten wurden in der Arbeitsgruppe weitere Untersuchungen zur Funktion und Wirkungsweise von AnkF durchgeführt [161].

Zusammenfassend gelang es in dieser Arbeit das Infektionsmodell *G. mellonella* erfolgreich innerhalb der Arbeitsgruppe zu etablieren. Aufgrund dessen konnten die die *in vivo* Funktion von AnkG analysiert werden, was maßgeblich zur Veröffentlichung von Schäfer et al. 2020 beitrug [163]. AnkF wurde hier erstmals *in vivo* als Virulenzfaktor identifiziert. Außerdem konnte durch die Etablierung der *G. mellonella* Infektion weitere Analyse des Effektorproteins CaeB erfolgen [164].

VIII. Literaturverzeichnis

1. Maurin, M. and D. Raoult, *Q fever*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(4): p. 518-53.
2. Maurin, M., et al., *Phagolysosomes of Coxiella burnetii-infected cell lines maintain an acidic pH during persistent infection*. Infect Immun, 1992. **60**(12): p. 5013-6.
3. Capo, C., et al., *Subversion of monocyte functions by coxiella burnetii: impairment of the cross-talk between alphavbeta3 integrin and CR3*. J Immunol, 1999. **163**(11): p. 6078-85.
4. Luhrmann, A. and C.R. Roy, *Coxiella burnetii inhibits activation of host cell apoptosis through a mechanism that involves preventing cytochrome c release from mitochondria*. Infect Immun, 2007. **75**(11): p. 5282-9.
5. Beare, P.A., et al., *Dot/Icm type IVB secretion system requirements for Coxiella burnetii growth in human macrophages*. MBio, 2011. **2**(4): p. e00175-11.
6. Luhrmann, A., H.J. Newton, and M. Bonazzi, *Beginning to Understand the Role of the Type IV Secretion System Effector Proteins in Coxiella burnetii Pathogenesis*. Curr Top Microbiol Immunol, 2017. **413**: p. 243-268.
7. Larson, C.L., et al., *Right on Q: genetics begin to unravel Coxiella burnetii host cell interactions*. Future Microbiol, 2016. **11**: p. 919-39.
8. Klingenbeck, L., et al., *The Coxiella burnetii type IV secretion system substrate CaeB inhibits intrinsic apoptosis at the mitochondrial level*. Cell Microbiol, 2013. **15**(4): p. 675-87.
9. Eckart, R.A., et al., *Antiapoptotic activity of Coxiella burnetii effector protein AnkG is controlled by p32-dependent trafficking*. Infect Immun, 2014. **82**(7): p. 2763-71.
10. Berens, C., et al., *Applying an Inducible Expression System to Study Interference of Bacterial Virulence Factors with Intracellular Signaling*. J Vis Exp, 2015(100): p. e52903.
11. Friedrich, A., et al., *Modulation of host cell apoptotic pathways by intracellular pathogens*. Curr Opin Microbiol, 2017. **35**: p. 88-99.

12. Bisle, S., et al., *The inhibition of the apoptosis pathway by the Coxiella burnetii effector protein CaeA requires the EK repetition motif, but is independent of survivin*. *Virulence*, 2016. **7**(4): p. 400-12.
13. Luhrmann, A., et al., *Inhibition of pathogen-induced apoptosis by a Coxiella burnetii type IV effector protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(44): p. 18997-9001.
14. Schäfer, W., et al., *Nuclear trafficking of the anti-apoptotic Coxiella burnetii effector protein AnkG requires binding to p32 and Importin- α 1*. 2017. **19**(1): p. e12634.
15. Speelman, P., *The largest Q fever outbreak ever reported*. *Neth J Med*, 2010. **68**(12): p. 380-1.
16. Roest, H.I., et al., *The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection*. *Epidemiol Infect*, 2011. **139**(1): p. 1-12.
17. Stein, A., et al., *Q fever pneumonia: virulence of Coxiella burnetii pathovars in a murine model of aerosol infection*. *Infect Immun*, 2005. **73**(4): p. 2469-77.
18. Norville, I.H., et al., *Galleria mellonella as an alternative model of Coxiella burnetii infection*. *Microbiology*, 2014. **160**(Pt 6): p. 1175-81.
19. Selim, A., et al., *Characterization of Coxiella burnetii strains from ruminants in a Galleria mellonella host-based model*. *New Microbes New Infect*, 2018. **24**: p. 8-13.
20. Browne, N., M. Heelan, and K. Kavanagh, *An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes*. *Virulence*, 2013. **4**(7): p. 597-603.
21. Kovacs-Simon, A., et al., *Coxiella burnetii replicates in Galleria mellonella hemocytes and transcriptome mapping reveals in vivo regulated genes*. *Virulence*, 2020. **11**(1): p. 1268-1278.
22. Eldin, C., et al., *From Q Fever to Coxiella burnetii Infection: a Paradigm Change*. *Clin Microbiol Rev*, 2017. **30**(1): p. 115-190.
23. Schäfer, W., et al., *The anti-apoptotic Coxiella burnetii effector protein AnkG is a strain specific virulence factor*. *Scientific Reports*, 2020. **10**(1): p. 15396.

24. Lavine, M.D. and M.R. Strand, *Insect hemocytes and their role in immunity*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002. **32**(10): p. 1295-309.
25. Cordsmeier, A., et al., *The Coxiella burnetii T4SS effector protein AnkG hijacks the 7SK small nuclear ribonucleoprotein complex for reprogramming host cell transcription*. *PLoS Pathog*, 2022. **18**(2): p. e1010266.
26. Stein, A., et al., *Phylogenetic homogeneity of Coxiella burnetii strains as determined by 16S ribosomal RNA sequencing*. *FEMS Microbiol Lett*, 1993. **113**(3): p. 339-44.
27. Weisburg, W.G., et al., *Phylogenetic diversity of the Rickettsiae*. *J Bacteriol*, 1989. **171**(8): p. 4202-6.
28. Hendrix, L.R., J.E. Samuel, and L.P. Mallavia, *Differentiation of Coxiella burnetii isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE*. *J Gen Microbiol*, 1991. **137**(2): p. 269-76.
29. Willems, H., C. Jager, and G. Baljer, *Physical and genetic map of the obligate intracellular bacterium Coxiella burnetii*. *J Bacteriol*, 1998. **180**(15): p. 3816-22.
30. Beare, P.A., et al., *Genetic diversity of the Q fever agent, Coxiella burnetii, assessed by microarray-based whole-genome comparisons*. *J Bacteriol*, 2006. **188**(7): p. 2309-24.
31. Derrick, E.H., *The epidemiology of Q fever*. *J Hyg (Lond)*, 1944. **43**(5): p. 357-61.
32. Derrick, E.H., *"Q" fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation*. *Rev Infect Dis*, 1983. **5**(4): p. 790-800.
33. Burnet, F.M. and M. Freeman, *Experimental Studies on the Virus of " Q " Fever*. *Medical Journal of Australia*, 1937. **2**(8): p. 299-305 pp.
34. Davis, G.E., et al., *A Filter-Passing Infectious Agent Isolated from Ticks*. *Public Health Reports (1896-1970)*, 1938. **53**(52): p. 2259-2282.
35. McCaul, T.F. and J.C. Williams, *Developmental cycle of Coxiella burnetii: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations*. *J Bacteriol*, 1981. **147**(3): p. 1063-76.

36. Heinzen, R.A., T. Hackstadt, and J.E. Samuel, *Developmental biology of Coxiella burnetii*. Trends Microbiol, 1999. **7**(4): p. 149-54.
37. Minnick, M.F. and R. Raghavan, *Developmental biology of Coxiella burnetii*. Adv Exp Med Biol, 2012. **984**: p. 231-48.
38. Coleman, S.A., et al., *Temporal analysis of Coxiella burnetii morphological differentiation*. J Bacteriol, 2004. **186**(21): p. 7344-52.
39. Sandoz, K.M., et al., *Developmental transitions of Coxiella burnetii grown in axenic media*. Journal of microbiological methods, 2014. **96**: p. 104-110.
40. Boulos, A., et al., *Measurement of the antibiotic susceptibility of Coxiella burnetii using real time PCR*. Int J Antimicrob Agents, 2004. **23**(2): p. 169-74.
41. Stoker, M.G. and P. Fiset, *Phase variation of the Nine Mile and other strains of Rickettsia burneti*. Can J Microbiol, 1956. **2**(3): p. 310-21.
42. Ftacek, P., L. Skultety, and R. Toman, *Phase variation of Coxiella burnetii strain Priscilla: influence of this phenomenon on biochemical features of its lipopolysaccharide*. J Endotoxin Res, 2000. **6**(5): p. 369-76.
43. Kersh, G.J., et al., *Virulence of pathogenic Coxiella burnetii strains after growth in the absence of host cells*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2011. **11**(11): p. 1433-8.
44. Angelakis, E. and D. Raoult, *Q Fever*. Vet Microbiol, 2010. **140**(3-4): p. 297-309.
45. [*Coxiella burnetii* -- causative agent of Q (query) fever]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2013. **56**(8): p. 1178-90.
46. Hoover, T.A., et al., *Chromosomal DNA deletions explain phenotypic characteristics of two antigenic variants, phase II and RSA 514 (crazy), of the Coxiella burnetii nine mile strain*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6726-33.
47. Hackstadt, T., et al., *Lipopolysaccharide variation in Coxiella burnetii: intrastain heterogeneity in structure and antigenicity*. Infect Immun, 1985. **48**(2): p. 359-65.

48. Bundesregierung, D., *Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit Biologischen Arbeitsstoffen (Biostoffverordnung - BioStoffV)*, B.f.A.u. Soziales, Editor. 2017.
49. Arbeitsmedizin, B.f.A.u., *TRBA 466 Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen*, in *Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe*. 2015.
50. Arbeitsmedizin, B.f.A.u., *TRBA 100 Schutzmaßnahmen für Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in Laboratorien*, A.f.B. Arbeitsstoffe, Editor. 2013.
51. Omsland, A., et al., *Isolation from animal tissue and genetic transformation of Coxiella burnetii are facilitated by an improved axenic growth medium*. *Appl Environ Microbiol*, 2011. **77**(11): p. 3720-5.
52. Sandoz, K.M., et al., *Developmental transitions of Coxiella burnetii grown in axenic media*. *J Microbiol Methods*, 2014. **96**: p. 104-10.
53. Omsland, A., et al., *Host cell-free growth of the Q fever bacterium Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(11): p. 4430-4.
54. Sandoz, K.M., et al., *Complementation of Arginine Auxotrophy for Genetic Transformation of Coxiella burnetii by Use of a Defined Axenic Medium*. *Appl Environ Microbiol*, 2016. **82**(10): p. 3042-51.
55. van Schaik, E.J., et al., *Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium Coxiella burnetii*. *Nature reviews. Microbiology*, 2013. **11**(8): p. 561-573.
56. Srigley, J.R., et al., *Q-fever. The liver and bone marrow pathology*. *Am J Surg Pathol*, 1985. **9**(10): p. 752-8.
57. Shannon, J.G., D. Howe, and R.A. Heinzen, *Lack of dendritic cell maturation following infection by Coxiella burnetii synthesizing different lipopolysaccharide chemotypes*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. **1063**: p. 154-60.
58. Gorvel, L., et al., *Intracellular bacteria interfere with dendritic cell functions: role of the type I interferon pathway*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e99420.
59. Bechah, Y., et al., *Persistence of Coxiella burnetii, the agent of Q fever, in murine adipose tissue*. *PLoS One*, 2014. **9**(5): p. e97503.

60. Voth, D.E. and R.A. Heinzen, *Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of Coxiella burnetii*. Cell Microbiol, 2007. **9**(4): p. 829-40.
61. Brouqui, P., J.S. Dumler, and D. Raoult, *Immunohistologic demonstration of Coxiella burnetii in the valves of patients with Q fever endocarditis*. Am J Med, 1994. **97**(5): p. 451-8.
62. Greiner, T.C., et al., *Fine-needle aspiration findings of the liver in a case of Q fever*. Diagn Cytopathol, 1992. **8**(2): p. 181-4.
63. Marrie, T.J., *Coxiella burnetii (Q fever) pneumonia*. Clin Infect Dis, 1995. **21 Suppl 3**: p. S253-64.
64. Qizilbash, A.H., *The pathology of Q fever as seen on liver biopsy*. Arch Pathol Lab Med, 1983. **107**(7): p. 364-7.
65. Ben Amara, A., et al., *Coxiella burnetii, the agent of Q fever, replicates within trophoblasts and induces a unique transcriptional response*. PloS one, 2010. **5**(12): p. e15315-e15315.
66. Lepidi, H., et al., *Cardiac valves in patients with Q fever endocarditis: microbiological, molecular, and histologic studies*. J Infect Dis, 2003. **187**(7): p. 1097-106.
67. Million, M., et al., *Antiphospholipid Antibody Syndrome With Valvular Vegetations in Acute Q Fever*. Clin Infect Dis, 2016. **62**(5): p. 537-44.
68. Flannagan, R.S., V. Jaumouille, and S. Grinstein, *The cell biology of phagocytosis*. Annu Rev Pathol, 2012. **7**: p. 61-98.
69. Heinzen, R.A., et al., *Developmentally regulated synthesis of an unusually small, basic peptide by Coxiella burnetii*. Mol Microbiol, 1996. **22**(1): p. 9-19.
70. Baca, O.G., Y.P. Li, and H. Kumar, *Survival of the Q fever agent Coxiella burnetii in the phagolysosome*. Trends Microbiol, 1994. **2**(12): p. 476-80.
71. Pechstein, J., J. Schulze-Luehrmann, and A. Luhrmann, *Coxiella burnetii as a useful tool to investigate bacteria-friendly host cell compartments*. Int J Med Microbiol, 2017.

72. Burton, P.R., et al., *Some ultrastructural effects of persistent infections by the rickettsia Coxiella burnetii in mouse L cells and green monkey kidney (Vero) cells*. Infect Immun, 1978. **21**(2): p. 556-66.
73. Schulze-Luehrmann, J., et al., *LAMP proteins account for the maturation delay during the establishment of the Coxiella burnetii-containing vacuole*. Cell Microbiol, 2016. **18**(2): p. 181-94.
74. Howe, D. and L.P. Mallavia, *Coxiella burnetii exhibits morphological change and delays phagolysosomal fusion after internalization by J774A.1 cells*. Infect Immun, 2000. **68**(7): p. 3815-21.
75. Palmer, N.C., et al., *Placentitis and Abortion in Goats and Sheep in Ontario Caused by Coxiella burnetii*. The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne, 1983. **24**(2): p. 60-61.
76. Tissot-Dupont, H., et al., *Wind in November, Q fever in December*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(7): p. 1264-9.
77. Benenson, A.S. and W.D. Tigertt, *Studies on Q fever in man*. Trans Assoc Am Physicians, 1956. **69**: p. 98-104.
78. Amit, S., et al., *Suspected person-to-person transmission of Q fever among hospitalized pregnant women*. Clin Infect Dis, 2014. **58**(11): p. e146-7.
79. Raoult, D. and A. Stein, *Q Fever during Pregnancy -- A Risk for Women, Fetuses, and Obstetricians*. 1994. **330**(5): p. 371-371.
80. Raoult, D., T. Marrie, and J. Mege, *Natural history and pathophysiology of Q fever*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(4): p. 219-26.
81. Wielders, C.C., et al., *Long-Term Serological Follow-Up of Acute Q-Fever Patients after a Large Epidemic*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0131848.
82. Wegdam-Blans, M.C., et al., *Chronic Q fever: review of the literature and a proposal of new diagnostic criteria*. J Infect, 2012. **64**(3): p. 247-59.
83. Carcopino, X., et al., *Managing Q fever during pregnancy: the benefits of long-term cotrimoxazole therapy*. Clin Infect Dis, 2007. **45**(5): p. 548-55.

84. Kampschreur, L.M., et al., *Chronic Q fever in the Netherlands 5 years after the start of the Q fever epidemic: results from the Dutch chronic Q fever database*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(5): p. 1637-43.
85. Bontje, D.M., et al., *Analysis of Q fever in Dutch dairy goat herds and assessment of control measures by means of a transmission model*. Prev Vet Med, 2016. **123**: p. 71-89.
86. Hellenbrand, W., T. Breuer, and L. Petersen, *Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999*. Emerging infectious diseases, 2001. **7**(5): p. 789-796.
87. Sexton, J.A. and J.P. Vogel, *Type IVB secretion by intracellular pathogens*. Traffic, 2002. **3**(3): p. 178-85.
88. Carey, K.L., et al., *The Coxiella burnetii Dot/Icm system delivers a unique repertoire of type IV effectors into host cells and is required for intracellular replication*. PLoS Pathog, 2011. **7**(5): p. e1002056.
89. Beare, P.A., et al., *Two systems for targeted gene deletion in Coxiella burnetii*. Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(13): p. 4580-9.
90. Christie, P.J. and J.P. Vogel, *Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells*. Trends in microbiology, 2000. **8**(8): p. 354-360.
91. Segal, G. and H.A. Shuman, *Possible origin of the Legionella pneumophila virulence genes and their relation to Coxiella burnetii*. Mol Microbiol, 1999. **33**(3): p. 669-70.
92. Segal, G., M. Purcell, and H.A. Shuman, *Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the Legionella pneumophila genome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(4): p. 1669.
93. Berger, K.H., J.J. Merriam, and R.R. Isberg, *Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the Legionella pneumophila dotA gene*. Mol Microbiol, 1994. **14**(4): p. 809-22.

94. Brand, B.C., A.B. Sadosky, and H.A. Shuman, *The Legionella pneumophila icm locus: a set of genes required for intracellular multiplication in human macrophages*. Mol Microbiol, 1994. **14**(4): p. 797-808.
95. Fronzes, R., et al., *Structure of a type IV secretion system core complex*. Science, 2009. **323**(5911): p. 266-8.
96. Juhas, M., D.W. Crook, and D.W. Hood, *Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence*. Cell Microbiol, 2008. **10**(12): p. 2377-86.
97. Guglielmini, J., F. de la Cruz, and E.P. Rocha, *Evolution of conjugation and type IV secretion systems*. Mol Biol Evol, 2013. **30**(2): p. 315-31.
98. Zamboni, D.S., et al., *Coxiella burnetii express type IV secretion system proteins that function similarly to components of the Legionella pneumophila Dot/Icm system*. Mol Microbiol, 2003. **49**(4): p. 965-76.
99. Seshadri, R., et al., *Complete genome sequence of the Q-fever pathogen Coxiella burnetii*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5455-60.
100. Segal, G., M. Feldman, and T. Zusman, *The Icm/Dot type-IV secretion systems of Legionella pneumophila and Coxiella burnetii*. FEMS Microbiol Rev, 2005. **29**(1): p. 65-81.
101. Newton, H.J., J.A. McDonough, and C.R. Roy, *Effector protein translocation by the Coxiella burnetii Dot/Icm type IV secretion system requires endocytic maturation of the pathogen-occupied vacuole*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54566.
102. Voth, D.E., et al., *The Coxiella burnetii ankyrin repeat domain-containing protein family is heterogeneous, with C-terminal truncations that influence Dot/Icm-mediated secretion*. J Bacteriol, 2009. **191**(13): p. 4232-42.
103. Voth, D.E. and R.A. Heinzen, *Coxiella type IV secretion and cellular microbiology*. Curr Opin Microbiol, 2009. **12**(1): p. 74-80.
104. Voth, D.E., et al., *The Coxiella burnetii cryptic plasmid is enriched in genes encoding type IV secretion system substrates*. J Bacteriol, 2011. **193**(7): p. 1493-503.

105. Pan, X., et al., *Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors*. Science, 2008. **320**(5883): p. 1651-4.
106. Roy, C.R., K.H. Berger, and R.R. Isberg, *Legionella pneumophila DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake*. Mol Microbiol, 1998. **28**(3): p. 663-74.
107. Larson, C.L., et al., *Coxiella burnetii effector protein subverts clathrin-mediated vesicular trafficking for pathogen vacuole biogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(49): p. E4770-9.
108. Latomanski, E.A., et al., *The Effector Cig57 Hijacks FCHO-Mediated Vesicular Trafficking to Facilitate Intracellular Replication of Coxiella burnetii*. PLoS Pathog, 2016. **12**(12): p. e1006101.
109. Kohler, L.J., et al., *Effector Protein Cig2 Decreases Host Tolerance of Infection by Directing Constitutive Fusion of Autophagosomes with the Coxiella-Containing Vacuole*. mBio, 2016. **7**(4).
110. Martinez, E., et al., *Coxiella burnetii effector CvpB modulates phosphoinositide metabolism for optimal vacuole development*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016. **113**(23): p. E3260-E3269.
111. Weber, M.M., et al., *The Type IV Secretion System Effector Protein CirA Stimulates the GTPase Activity of RhoA and Is Required for Virulence in a Mouse Model of Coxiella burnetii Infection*. Infection and immunity, 2016. **84**(9): p. 2524-2533.
112. Larson, C.L., et al., *Coxiella burnetii effector proteins that localize to the parasitophorous vacuole membrane promote intracellular replication*. Infect Immun, 2015. **83**(2): p. 661-70.
113. Teng, Y.T. and W. Hu, *Expression cloning of a periodontitis-associated apoptotic effector, cagE homologue, in Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **303**(4): p. 1086-94.
114. Schmid, M.C., et al., *A translocated bacterial protein protects vascular endothelial cells from apoptosis*. PLoS Pathog, 2006. **2**(11): p. e115.

115. Cunha, L.D., et al., *Inhibition of inflammasome activation by Coxiella burnetii type IV secretion system effector IcaA*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 10205.
116. Weber, M.M., et al., *Modulation of the host transcriptome by Coxiella burnetii nuclear effector Cbu1314*. Microbes Infect, 2016. **18**(5): p. 336-45.
117. Chen, C., et al., *Large-scale identification and translocation of type IV secretion substrates by Coxiella burnetii*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(50): p. 21755-60.
118. Martinez, E., et al., *Identification of OmpA, a Coxiella burnetii protein involved in host cell invasion, by multi-phenotypic high-content screening*. PLoS Pathog, 2014. **10**(3): p. e1004013.
119. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
120. Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin, *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 231-41.
121. Enari, M., et al., *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 43-50.
122. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicologic pathology, 2007. **35**(4): p. 495-516.
123. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
124. Wang, Z.Q., et al., *PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis*. Genes & development, 1997. **11**(18): p. 2347-2358.
125. Voth, D.E., D. Howe, and R.A. Heinzen, *Coxiella burnetii inhibits apoptosis in human THP-1 cells and monkey primary alveolar macrophages*. Infect Immun, 2007. **75**(9): p. 4263-71.
126. Wang, C.Y., et al., *NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis*. Molecular and cellular biology, 1999. **19**(9): p. 5923-5929.

127. Voth, D.E. and R.A. Heinzen, *Sustained activation of Akt and Erk1/2 is required for Coxiella burnetii antiapoptotic activity*. Infect Immun, 2009. **77**(1): p. 205-13.
128. Macdonald, L.J., et al., *Coxiella burnetii exploits host cAMP-dependent protein kinase signalling to promote macrophage survival*. Cellular microbiology, 2014. **16**(1): p. 146-159.
129. Heinzen, R.A., et al., *Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of Coxiella burnetii and Chlamydia trachomatis*. Infect Immun, 1996. **64**(3): p. 796-809.
130. Miller, J.D., A.T. Curns, and H.A. Thompson, *A growth study of Coxiella burnetii Nine Mile Phase I and Phase II in fibroblasts*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2004. **42**(3): p. 291-7.
131. Romano, P.S., et al., *The autophagic pathway is actively modulated by phase II Coxiella burnetii to efficiently replicate in the host cell*. Cell Microbiol, 2007. **9**(4): p. 891-909.
132. Beron, W., et al., *Coxiella burnetii localizes in a Rab7-labeled compartment with autophagic characteristics*. Infect Immun, 2002. **70**(10): p. 5816-21.
133. Ghigo, E., et al., *Coxiella burnetii survival in THP-1 monocytes involves the impairment of phagosome maturation: IFN-gamma mediates its restoration and bacterial killing*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4488-95.
134. Shannon, J.G. and R.A. Heinzen, *Infection of human monocyte-derived macrophages with Coxiella burnetii*. Methods Mol Biol, 2008. **431**: p. 189-200.
135. Cockrell, D.C., et al., *Robust growth of avirulent phase II Coxiella burnetii in bone marrow-derived murine macrophages*. PLoS One, 2017. **12**(3): p. e0173528.
136. Burnet, F.M. and M. Freeman, *Experimental studies on the virus of "Q" fever*. Rev Infect Dis, 1983. **5**(4): p. 800-8.
137. Moos, A. and T. Hackstadt, *Comparative virulence of intra- and interstrain lipopolysaccharide variants of Coxiella burnetii in the guinea pig model*. Infect Immun, 1987. **55**(5): p. 1144-50.

138. Russell-Lodrigue, K.E., et al., *Clinical and pathologic changes in a guinea pig aerosol challenge model of acute Q fever*. Infect Immun, 2006. **74**(11): p. 6085-91.
139. Scott, G.H., J.C. Williams, and E.H. Stephenson, *Animal models in Q fever: pathological responses of inbred mice to phase I Coxiella burnetii*. J Gen Microbiol, 1987. **133**(3): p. 691-700.
140. Waag, D.M., et al., *Evaluation of cynomolgus (Macaca fascicularis) and rhesus (Macaca mulatta) monkeys as experimental models of acute Q fever after aerosol exposure to phase-I Coxiella burnetii*. Lab Anim Sci, 1999. **49**(6): p. 634-8.
141. Ramarao, N., C. Nielsen-Leroux, and D. Lereclus, *The insect Galleria mellonella as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis*. Journal of visualized experiments : JoVE, 2012(70): p. e4392-e4392.
142. Cymborowski, B., *Temperature-dependent regulatory mechanism of larval development of the wax moth (Galleria mellonella)*. Acta Biochim Pol, 2000. **47**(1): p. 215-21.
143. Bergin, D., et al., *Superoxide production in Galleria mellonella hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils*. Infect Immun, 2005. **73**(7): p. 4161-70.
144. Minnick, M.F., R.A. Rupp, and K.D. Spence, *A bacterial-induced lectin which triggers hemocyte coagulation in Manduca sexta*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **137**(2): p. 729-35.
145. Seitz, V., et al., *Identification of immunorelevant genes from greater wax moth (Galleria mellonella) by a subtractive hybridization approach*. Dev Comp Immunol, 2003. **27**(3): p. 207-15.
146. Vogel, H., et al., *A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host Galleria mellonella*. BMC Genomics, 2011. **12**: p. 308.
147. Champion, O.L., et al., *Insect infection model for Campylobacter jejuni reveals that O-methyl phosphoramidate has insecticidal activity*. J Infect Dis, 2010. **201**(5): p. 776-82.

148. Aperis, G., et al., *Galleria mellonella as a model host to study infection by the Francisella tularensis live vaccine strain*. Microbes Infect, 2007. **9**(6): p. 729-34.
149. Schell, M.A., L. Lipscomb, and D. DeShazer, *Comparative genomics and an insect model rapidly identify novel virulence genes of Burkholderia mallei*. J Bacteriol, 2008. **190**(7): p. 2306-13.
150. Wand, M.E., et al., *Macrophage and Galleria mellonella infection models reflect the virulence of naturally occurring isolates of B. pseudomallei, B. thailandensis and B. oklahomensis*. BMC Microbiol, 2011. **11**(1): p. 11.
151. Harding, C.R., et al., *Legionella pneumophila pathogenesis in the Galleria mellonella infection model*. Infect Immun, 2012. **80**(8): p. 2780-90.
152. Kersh, G.J., et al., *Presence of Coxiella burnetii DNA in the environment of the United States, 2006 to 2008*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(13): p. 4469-75.
153. Andoh, M., et al., *SCID mouse model for lethal Q fever*. Infect Immun, 2003. **71**(8): p. 4717-23.
154. van Schaik, E.J., et al., *The SCID Mouse Model for Identifying Virulence Determinants in Coxiella burnetii*. 2017. **7**(25).
155. Tsai, C.J.-Y., J.M.S. Loh, and T. Proft, *Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing*. Virulence, 2016. **7**(3): p. 214-229.
156. Martinez, E., et al., *Coxiella burnetii effector CvpB modulates phosphoinositide metabolism for optimal vacuole development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(23): p. E3260-9.
157. Schäfer, W., *Charakterisierung des nukleären Imports und der nukleären Aktivität des anti-apoptotischen Coxiella burnetii Typ IV Effektorproteins AnkG*. 2017.
158. Beare, P.A., et al., *Preliminary assessment of genome differences between the reference Nine Mile isolate and two human endocarditis isolates of Coxiella burnetii*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1063**: p. 64-7.

159. Beare, P.A., et al., *Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus Coxiella*. *Infect Immun*, 2009. **77**(2): p. 642-56.
160. Kuley, R., et al., *Genome Plasticity and Polymorphisms in Critical Genes Correlate with Increased Virulence of Dutch Outbreak-Related Coxiella burnetii Strains*. *Front Microbiol*, 2017. **8**: p. 1526.
161. Pechstein, J., et al., *The Coxiella burnetii T4SS Effector AnkF Is Important for Intracellular Replication*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020. **10**: p. 559915.
162. Crabill, E., et al., *Dot/Icm-Translocated Proteins Important for Biogenesis of the Coxiella burnetii-Containing Vacuole Identified by Screening of an Effector Mutant Sublibrary*. *Infect Immun*, 2018. **86**(4).
163. Schafer, W., et al., *The anti-apoptotic Coxiella burnetii effector protein AnkG is a strain specific virulence factor*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 15396.
164. Friedrich, A., et al., *The Coxiella burnetii effector protein CaeB modulates ER stress signaling and is required for efficient replication in Galleria mellonella*. *Cell Microbiol*, 2020.
165. Kuba, M., et al., *EirA Is a Novel Protein Essential for Intracellular Replication of Coxiella burnetii*. *Infect Immun*, 2020. **88**(6).
166. Jorjão, A.L., et al., *From moths to caterpillars: Ideal conditions for Galleria mellonella rearing for in vivo microbiological studies*. *Virulence*, 2018. **9**(1): p. 383-389.
167. Oliver, J.D., et al., *Comparative analysis of hemocyte phagocytosis between six species of arthropods as measured by flow cytometry*. *J Invertebr Pathol*, 2011. **108**(2): p. 126-30.
168. Pereira, T.C., et al., *Recent Advances in the Use of Galleria mellonella Model to Study Immune Responses against Human Pathogens*. *J Fungi (Basel)*, 2018. **4**(4).
169. Baggiolini, M. and M.P. Wymann, *Turning on the respiratory burst*. *Trends Biochem Sci*, 1990. **15**(2): p. 69-72.

170. Prelich, G., *Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation*. Genetics, 2012. **190**(3): p. 841-54.
171. Beare, P.A. and R.A. Heinzen, *Gene inactivation in Coxiella burnetii*. Methods Mol Biol, 2014. **1197**: p. 329-45.

IX. Anhang

IX.I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	<i>The type IVB secretion systems of C. burnetii and Legionella pneumophila [55].....</i>	25
Abb. 2	<i>Das Überleben von G. mellonella bei C. burnetii NMII Infektion ist dosis- und T4SS-abhängig.....</i>	47
Abb. 3	<i>Die Überexpression von Flag-AnkG verringert die Pathogenität von C. burnetii in G. mellonella</i>	50
Abb. 4	<i>Die anti-apoptotische Wirkung von AnkG ist essenziell für die verringerte Pathogenität von NMII::Flag-AnkG</i>	52
Abb. 5	<i>Standardisierung der G. mellonella Aufzucht sind essentiell für die Reproduktion der Ergebnisse</i>	54
Abb. 6	<i>Die überlebensfördernde Wirkung von AnkG_{NM} ist bei AnkG_{F3} und AnkG_{SOYTA} aufgehoben.....</i>	56
Abb. 7	<i>C. burnetii NMII und NMII::Flag-AnkG_{NM} replizieren in G. mellonella Hämozyten.....</i>	59
Abb. 8	<i>Signifikante Zunahme der C. burnetii NMII und NMII::Flag-AnkG_{NM} Last während der Infektion</i>	61
Abb. 9	<i>Signifikante Zunahme C. burnetii NMII Infektionsrate bleibt aus</i>	62
Abb. 10	<i>Die AnkG_{NM} Proteinwirkung ist ursächlich für das Larvenüberleben</i>	64
Abb. 11	<i>AnkF ist ein wichtiger Virulenzfaktor.....</i>	66
Abb. 12	<i>Expression von AnkG_{NM} erhöht signifikant das Überleben von G. mellonella bei C. burnetii NMII Infektion</i>	69
Abb. 13	<i>Die Infektionsraten von C. burnetii NMII, NMII::Flag-AnkG_{NM} und AnkF nehmen während der Infektion signifikant zu</i>	70
Abb. 14	<i>Visualisierung der Replikation von C. burnetii NMII, NMII::Flag-AnkG_{NM} und NMII::Flag-AnkF in Hämozyten mittels Immunfluoreszenzfärbung.....</i>	71
Abb. 15	<i>Expression von AnkG_{NM} und AnkF beeinflussen nicht die Replikation in G. mellonella.....</i>	72

IX.II. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Best.-Nr.	Bestellnummer
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
dt.:	deutsch
engl.:	englisch
O ₂	Sauerstoff
Spp.	Spezies plural
UV	Ultraviolett

Maße und Einheiten

°C	Grad Celsius
%	Prozent
g	Gramm
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
cm	Zentimeter
pH	Potential des Wasserstoffs
s	Sekunden
w/v	Gewichtsprozent

X. Publikation

Schäfer W, Schmidt T, Cordsmeier A, Borges V, Beare PA, Pechstein J, Schulze-Luehrmann J, Holzinger J, Wagner N, Berens C, Heydel C, Gomes JP, Lührmann A. *The anti-apoptotic Coxiella burnetii effector protein AnkG is a strain specific virulence factor*. Sci Rep. 2020 Sep 21;10(1):15396. doi: 10.1038/s41598-020-72340-9. PMID: 32958854; PMCID: PMC7506536.

XI. Danksagung

Insbesondere gilt mein Dank meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Anja Lührmann für Ihre stets geduldige und motivierende Unterstützung besonders in mühsamen Zeiten. Zu jedem Zeitpunkt war die Betreuung von großem Engagement, positiver Bestärkung, wissenschaftlichem Diskurs und einem freundlichen Miteinander geprägt, welche eine Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichte.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Christian Bogdan für die Möglichkeit zur Promotion am mikrobiologischen Institut für klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universitätsklinik Erlangen.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Sven Krappmann für die Anfertigung des Zweitgutachtens für diese Arbeit.

Großer Dank geht an meine Arbeitskolleginnen und Arbeitskollegen sowohl der Arbeitsgruppe Lührmann als auch dem gesamten Institut, welche mich von Beginn an herzlich aufgenommen und voller Hilfsbereitschaft unterstützt haben. Vielen Dank für die wunderbare und besondere Zeit mit euch.

Für den seelisch- moralischen und liebevollen Beistand sowohl während der Doktorarbeit als auch während des Studiums danke ich meinen Eltern und meinem Ehemann Benedikt.