

**CEACAM3: ein neuartiger phagozytischer Rezeptor der
angeborenen Immunantwort zur Erkennung human-
spezifischer Pathogene**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften der Fakultät für Biologie
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Tim Schmitter
aus Trier
Würzburg 2005

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: PD Dr. C.R. Hauck
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Reidl

Tag des Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: PD Dr. C.R. Hauck
2. Prüfer: Prof. Dr. J. Reidl

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation

„CEACAM3: ein neuartiger phagozytischer Rezeptor der angeborenen Immunantwort zur Erkennung human-spezifischer Pathogene“

selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

.....
(Tim Schmitter)

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben. Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit vom 15.3.2001 bis zum 31.06.2005 am Zentrum für Infektionsforschung, Würzburg unter der Anleitung von Herrn PD Dr. C.R. Hauck durchgeführt. Im Besonderen

Herrn Prof. Dr. J. Hacker für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes,

Herrn PD Dr. C.R. Hauck für das spannende Thema, sein stetiges Interesse an dieser Arbeit und die Erweiterung meines wissenschaftlichen Horizonts,

Herrn Prof. Dr. J. Reidl für die Bereitschaft als Zweitgutachter dieser Arbeit zu fungieren,

Hilde Merkert und Arthur Altenhöfer für die stete Hilfsbereitschaft und Geduld bei Computerproblemen,

Julia Blass-Warmuth und Doris Deininger für die praktische Unterstützung,

der AG Hammerschmidt für gute Tipps in Bezug auf Proteinaufreinigungen,

meinen Mitstreitern im Labor Markus Hupp, Jürgen Meier, Lisa Petersson, Petra Münzner-Voigt, Stefanie Waeckerle, Sigrid Lux, Stefan Pils, Verena Bachmann, Florian Neske, Katrin Küspert, Jeeva Varadarajulu und Franziska Agerer für guten (schwarzen) Humor, die lustige Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft

meinen Freunden aus Bonn insbesondere Martin für stets lustige Nächte (Carpe Noctem), meinen Würzburger Freunden Robin, Ilona, Nedde, Franziska für ihre Freundschaft,

meinen Eltern für ihre Unterstützung, Motivation und ihr Vertrauen.

1. EINLEITUNG	1
1.1. Epidemiologie der Gonorrhö	1
1.2. Pathogenese und klinische Manifestation	1
1.3. Strategien für die Invasion in Epithelzellen und die Überquerung der Epithelbarriere	3
1.3.1. Die Pili-vermittelte Adhärenz	3
1.3.2. Opa _{HSPG} -vermittelte Adhärenz und Invasion über Heparansulfatproteoglykan unter Beteiligung von Vitronektin und Fibronektin als Brückenmoleküle	4
1.3.3. Die CEACAM-vermittelte Invasion in Epithelzellen	9
1.4. Bakterielle Virulenzfaktoren: Evasion der Immunantwort	13
1.4.1. Die IgA-Protease	13
1.4.2. Antigen- und Phasenvariation	14
1.5. Die CEACAM-vermittelte Interaktion der Opa_{CEA} Gonokokken mit Zellen des Immunsystems	16
1.5.1. Die Opsonin-unabhängige Phagozytose der Gonokokken durch Granulozyten und die Modulation der erworbenen Immunantwort	18
1.6. Parallelen in der CEACAM-abhängigen Pathogenese von Gonokokken und den CEACAM-bindenden Pathogenen <i>Neisseria meningitidis</i>, <i>Moraxella catarrhalis</i> und <i>Haemophilus influenzae</i>	26
1.7. Ziele der Arbeit	31
2. Die Opa_{CEA} Proteine der pathogenen Neisserien induzieren eine Src Kinasen-abhängige oder Lipid-raft-vermittelte Aufnahme über distinkte CEACAM-Isoformen	32
2.1. Einleitung	32
2.2. Ergebnisse	36
2.2.1. Proteine der CEACAM-Familie internalisieren Opa _{CEA} Gonokokken mit unterschiedlicher Effizienz	36
2.2.2. Die CEACAM3- aber nicht die CEACAM6-abhängige Phagozytose Opa _{CEA} -exprimierender Gonokokken beruht auf der spezifischen Stimulation von Kinasen der Src-Familie	40
2.2.3. Die Src-SH2 Domäne bindet an die zytoplasmatische Domäne von CEACAM3 während der Aufnahme Opa _{CEA} -exprimierender Gonokokken	42
2.2.4. Die CEACAM-vermittelte Aufnahme von Opa _{CEA} Gonokokken benötigt die Expression und Funktionalität von PTKs der Src-Familie	45
2.2.5. Die CEACAM6-abhängige, aber nicht die CEACAM3-vermittelte Internalisierung Opa _{CEA} -exprimierender Gonokokken beruht auf der Integrität von cholesterinreichen Membran-Mikrodomänen	48

2.2.6.	Die Aufnahme von Opa _{CEA} Gonokokken über epitheliale CEACAMs benötigt cholesterinreiche Mikrodomänen _____	50
2.2.7.	Die Internalisierung Opa _{CEA} -exprimierender Gonokokken durch Granulozyten wird nicht durch Cholesterin-Chelatoren beeinflusst _____	51
2.3.	Diskussion _____	53
3.	CEACAM3 wird exklusiv auf Granulozyten exprimiert, und ist ein phagozytischer Rezeptor der angeborenen Immunantwort, welcher human-spezifische Pathogene erkennt und eliminiert _____	61
3.1.	Einleitung _____	61
3.2.	Ergebnisse _____	68
3.2.1.	Humane polymorphkernige Granulozyten erkennen und eliminieren Opa _{CEA} -exprimierende Gonokokken _____	68
3.2.2.	CEACAM3 sowie CEACAM6 erkennen und eliminieren Opa _{CEA} -exprimierende Gonokokken _____	70
3.2.3.	Die CEACAM3- aber nicht die CEACAM6-abhängige Aufnahme Opa _{CEA} -exprimierender Gonokokken ist mit der kleinen GTPase Rac verbunden _____	72
3.2.4.	Die ITAM-ähnliche Sequenz in der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM3 wird für eine effektive Phagozytose der Opa _{CEA} Gonokokken und Stimulation der kleinen GTPase Rac benötigt _____	75
3.2.5.	Die effiziente Aufnahme von Opa _{CEA} Gonokokken benötigt die Kinaseaktivität der Src Kinase _____	78
3.2.6.	Die sterische Blockade der N-terminalen Opa-Bindungsstelle interferiert mit der CEACAM3-abhängigen Aufnahme von Opa _{CEA} Gonokokken _____	79
3.2.7.	Die Interferenz der CEACAM3 abhängigen Signalkaskade durch Inhibition der Rac-Stimulation beeinträchtigt die Phagozytose der Opa _{CEA} Gonokokken _____	82
3.2.8.	Die CEACAM3-vermittelt Stimulation der kleinen GTPase Rac wird auch durch die CEACAM-bindenden Bakterien <i>H. influenzae</i> und <i>M. catarrhalis</i> induziert _____	85
3.3.	Diskussion _____	88
4.	Die effiziente Phagozytose über CEACAM3 beruht auf der direkten Assoziation mit dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav _____	96
4.1.	Einleitung _____	96
4.2.	Ergebnisse _____	102
4.2.1.	Die CEACAM3-vermittelte Aufnahme von Opa _{CEA} Gonokokken kann durch eine dominant negative Version des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors Vav inhibiert werden _____	102

4.2.2.	Die genetische Manipulation der Vav2-Expression in stabil transfizierten CEACAM3-HeLa Zellen interferiert mit der CEACAM3-vermittelten Internalisierung Opa _{CEA} -exprimierender Gonokokken und mit der Stimulation der kleinen GTPase Rac _____	107
4.2.3.	Die CEACAM3-vermittelte Interaktion mit Opa _{CEA} -exprimierenden Gonokokken führt zur Rekrutierung des Austauschfaktors Vav _____	111
4.2.4.	Der Tyrosinrest 230 der CEACAM3 ITAM-ähnlichen Sequenz ist für eine direkte Proteininteraktion mit Vav verantwortlich _____	113
4.2.5.	Die Internalisierung von Opa _{CEA} -exprimierender Gonokokken in humane Granulozyten beruht auf der Vav-abhängigen Stimulation der kleinen GTPase Rac _____	115
4.3.	Diskussion _____	118
5.	Schlussbetrachtung _____	130
6.	Material _____	135
6.1.	Bakterien _____	135
6.1.1.	<i>Neisseria</i> - Stämme _____	135
6.1.2.	<i>Moraxella</i> - Stämme _____	135
6.1.3.	<i>Haemophilus</i> - Stämme _____	135
6.1.4.	<i>Escherichia coli</i> - Stämme _____	135
6.2.	Zell-Linien _____	135
6.3.	Nährmedien für Bakterien und Zellkultur _____	136
6.3.1.	Medien und Platten für Bakterien _____	136
6.3.2.	Medien für die Zellkultur _____	136
6.4.	Antikörper, Enzyme und Proteine _____	137
6.4.1.	Antikörper _____	137
6.4.2.	Enzyme und Proteine _____	137
6.5.	Plasmide und Oligonukleotide _____	138
6.5.1.	Plasmide _____	138
6.5.2.	Oligonukleotide _____	138
6.5.3.	siRNA-Oligonukleotide _____	138
6.6.	Lösungen und Puffer _____	139
6.6.1.	Lösungen und Puffer für eukaryontische Zellen _____	139
6.6.2.	Lösungen für die Molekularbiologie _____	139
6.6.3.	Puffer und Lösungen für SDS-PAGE, Coomassiefärbung und Western Blot _____	140
6.6.4.	Lösungen und Puffer für die Proteinaufreinigung _____	140

6.7.	Chemikalien und Kits	141
6.8.	Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	141
7.	Methoden	142
7.1.	Kultur von Bakterien	142
7.1.1.	Kultur von <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	142
7.1.2.	Kultur von <i>Moraxella catarrhalis</i> und <i>Haemophilus influenzae</i>	142
7.1.3.	Kultur von <i>Escherichia coli</i>	142
7.1.4.	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	142
7.1.5.	Einfrieren von Bakterien	142
7.2.	Isolierung und Kultur von Zellen	143
7.2.1.	Zell-Linien	143
7.2.2.	Isolation primärer Zellen	143
7.2.3.	Bestimmung der Zellzahl	144
7.2.4.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	144
7.3.	Infektionsexperimente	145
7.3.1.	Vorbereiten der Bakterien	145
7.3.2.	Transfektion der Zellen	146
7.3.2.1.	cDNA-Transfektion mittels Calcium-Phosphat Kopräzipitationsmethode	146
7.3.2.2.	Weitere Transfektionsmethoden	146
7.3.3.	Infektion von Phagozyten	146
7.3.3.1.	Elimination CEACAM-bindender Bakterien durch Granulozyten	146
7.3.4.	Infektion von Epithelzellen	147
7.3.4.1.	Gentamicinassay	147
7.3.5.	Immunfluoreszenzfärbung	147
7.3.5.1.	Präparate für die Immunfluoreszenzfärbung	147
7.4.	FACS Analyse	148
7.4.1.	FACS Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) mit Epithelzellen	148
7.4.2.	FACS Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) mit Granulozyten	148
7.4.3.	Rezeptorfärbung für FACS	149
7.4.4.	Quenchen des FITC-Fluoreszenzsignals mittels Trypanblau	149
7.5.	Protein	150
7.5.1.	Sodium Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamidelectrophoresis (SDS-PAGE)	150
7.5.2.	Westen Blot Analyse	151
7.5.3.	Nass-Transfer und Semidry-Verfahren	151
7.5.4.	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	151
7.5.5.	Aufreinigung von His-Fusionsproteinen	153
7.5.6.	Herstellung von Zell-Lysaten	153
7.5.7.	Immunpräzipitation	154

Inhaltsverzeichnis

7.5.8.	GST-Präzipitation	154
7.6.	DNA	155
7.6.1.	Agarose-Gelelektrophorese	155
7.6.1.1.	Agarose-Gelelektrophorese (analytisch)	155
7.6.1.2.	Agarose-Gelelektrophorese (präparativ)	155
7.6.2.	Cre-vermittelte, loxP-spezifische Rekombination	155
7.6.3.	DNA-Isolierung aus Agarosegel	156
7.6.4.	In-Fusion Reaktion	157
7.6.5.	PCR	158
7.6.6.	Plasmidpräparation	160
7.6.6.1.	Mini-Präparation (Birnboin-Dooley)	160
7.6.6.2.	Midi-Präparation (Nucleo-Bond, Clontech/Becton Dickinson)	160
7.6.7.	Restriktionsanalyse	161
8.	Zusammenfassung	162
9.	Summary	164
10.	Literaturverzeichnis	166
11.	Anhang	193
11.1.	Abbildungsverzeichnis	193
11.2.	Abkürzungen	196
11.3.	Publikationen	198
11.4.	Tagungsbeiträge	199
11.4.1.	Poster	199
11.4.2.	Vorträge	200
11.5.	Lebenslauf	201

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Gonorrhö

Die Vertreter der Gattung *Neisseria* sind Gram negative Diplokokken, welche als kommensale, nicht pathogene oder humanpathogene Stämme vorkommen. Die kommensalen Stämme wie *N. cinerea*, *N. mucosa*, *N. lactamica* oder *N. subflava* kolonisieren als Teil der normalen Mikroflora die Mukosa, während die human-spezifischen Erreger *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* die Mukosa als Plattform für die Transmission zu dem nächsten Wirt benutzen.

N. gonorrhoeae ruft die Gonorrhö hervor, welche auch heute noch eine der weit verbreitetsten venerischen Krankheiten mit fast 500.000 Fällen in den Vereinigten Staaten und 70 Millionen Fällen weltweit ist (World Health Organization: World Health Report; 1995). In Deutschland liegt die Zahl gemeldeter Inzidenzen bei 1000-2000 Fällen pro Jahr, doch liegt die reale Zahl an Erkrankungen wahrscheinlich um einen Faktor von zehn höher, da im Jahr 2000 die Meldepflicht für die Gonorrhö abgeschafft wurde (Epidemiologisches Bulletin – RKI; September 2001/Nr. 38).

Die Tatsache, dass der Erreger in der Bevölkerung erfolgreich trotz einer effektiven Antibiotikabehandlung persistiert, kann der erfolgreichen Adaption des Erregers an seinen humanen Wirt zugeschrieben werden, aber auch der Tatsache, dass die Gonorrhö in vielen Fällen asymptomatisch verläuft. So weisen 30-50% der infizierten Frauen und 10-30% der infizierten Männer keine Symptome auf und dies liefert dem Erreger ein ideales Reservoir für die Ausbreitung.

1.2 Pathogenese und klinische Manifestation

Die pathogenen Meningo- und Gonokokken sind humanspezifische Erreger, die unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen, obwohl beide Erreger Epithelzellen der Mukosa als Eintrittspforte benötigen. Sie kolonisieren die Oberfläche der Mukosa in einer für beide Arten konservierten, mehrstufigen Adhäsionskaskade, die letztendlich zu der Invasion von Wirtszellen führen kann. Die Gonokokken werden durch sexuellen Kontakt übertragen und kolonisieren daher hauptsächlich die Mukosa des Urogenital- oder Anorektaltraktes. Die Erreger können aber auch die

Schleimhaut des Nasopharynx und die Konjunktiva der Augen von Neugeborenen besiedeln. Die Kolonisierung verschiedener mukosaler Oberflächen reflektiert nicht eine ortsgebundene Spezialisierung, sondern eher die Art und Weise der Transmission.

Die symptomatische Gonorrhö manifestiert sich im Verlauf von 2 bis 6 Tagen nach der Übertragung des Erregers in einer akuten Inflammation des betroffenen Gewebes, hervorgerufen durch massiv infiltrierende Granulozyten. Damit einher geht ein eitriges Exudat, das hauptsächlich aus Granulozyten und assoziierten, lebenden Gonokokken besteht und seltener auch aus abgestoßenen, infizierten Arealen von Epithelzellen. Neben einer lokal begrenzten Infektion der Urethralschleimhaut können die Erreger aszendieren, so dass beim Mann Prostata und Nebenhoden mitbefallen sein können. Bei der Frau kann der Erreger durch die Zervix in den Uterus, die Tuben und bis in die Peritonealhöhle vordringen und eine Salpingitis (15-30% der infizierten Frauen) oder sogar eine Peritonitis verursachen mit einhergehender Sterilität. Kommt es zu einer systemischen Ausbreitung der Keime (1-5% der Patienten), kann dies zu Hautinfektionen, Perikarditis, Arthritis oder Sepsis führen.

Pathogene Bakterien können sterile Körperstellen kolonisieren, dort proliferieren und schwere Gewebeschäden oder systemische Infektionen hervorrufen. Der Verlauf einer Infektion hängt zu einem beträchtlichen Teil davon ab, ob die Erreger in der Lage sind, die angeborene und erlernte Immunantwort des Wirtes zu umgehen, ihnen zu widerstehen oder sie abzuwehren.

Die Gonokokken sind hochgradig an ihren einzigen Wirt, den Mensch, adaptiert und sie benutzen eine Bandbreite an Virulenzfaktoren, um die Mukosa erfolgreich zu kolonisieren und im Wirt zu persistieren. Ein Charakteristikum der Gonokokken ist ihre enorme Fähigkeit, Oberflächenstrukturen zu verändern. Die wichtigsten Adhäsine, Pili und die in der äußeren Membran lokalisierten *colony opacity-associated proteins* (Opa-Proteine) unterliegen der Phasen- und Antigenen Variation (s. Kapitel 1.4.2). Die Varianz dieser antigenen Determinanten ist sicherlich ein wichtiger Mechanismus, um der Immunantwort zu entgehen, aber sie verändert auch die Funktion der Adhäsine. Infolgedessen können die Gonokokken im weiteren Verlauf der Infektion spezifisch mit unterschiedlichen Zelltypen interagieren und so verschiedene Nischen besetzen. In den folgenden Kapiteln werden die wichtigsten Virulenzfaktoren der Gonokokken vorgestellt.

1.3 Strategien für die Invasion in Epithelzellen und die Überquerung der Epithelbarriere

1.3.1 Die Pili-vermittelte Adhärenz

Auch für eine erfolgreiche Gonokokkeninfektion ist der erste und wichtigste Schritt die Kolonisierung der Mukosa. Die Membran der Mukosa wird oft als erster Verteidigungsmechanismus des menschlichen Körpers zur Abwehr von bakteriellen Erregern bezeichnet, da sie die Bakterien von dem tieferliegenden Wirtsgewebe ausschließt. Die Integrität der anatomischen Barriere ist daher für den Körper von essentieller Bedeutung und wird durch aktive, größtenteils mechanische Verteidigungsmechanismen, wie zum Beispiel Entfernung der Bakterien durch Zilien im oberen Atemwegsapparat, ständiges Spülen mit Urin im unteren Urogenitalbereich oder auch das saure Milieu des Gastrointestinaltraktes, aufrecht erhalten. Für die Bakterien hingegen ist es in einer derartigen Umgebung essentiell, einen ersten Kontakt mit der Membran zu etablieren. Die Grundvoraussetzung hierfür ist die Adhärenz der Gonokokken an die apikale Seite der Epithelzellen der Schleimhaut. Die Gonokokken benutzen hierzu verlängerte, mit ihrer Oberfläche verbundene, filamentöse, bis zu 6 µm lange, haarförmige Fortsätze, die sog. Pili, um eine Verbindung mit der Membran herzustellen. Die Bedeutung der Pili für die Kolonisierung durch die Gonokokken wird dadurch hervorgehoben, dass nicht pillierte Gonokokken keine Infektion hervorrufen können und nur pillierte Varianten infektiös sind (Swanson et al. 1987) .

Die Pili der Gonokokken besitzen charakteristische Merkmale der Typ IV Pili und bestehen aus einer Hauptuntereinheit PilE Protein oder Pilin und weiteren Pilus-assoziierten Proteinen (Meyer et al. 1984). Für die Adhärenz an humane Epithelzellen ist PilC, ein 110 kD großes, unter anderem an der Pilusspitze lokalisiertes Protein verantwortlich (Rudel et al. 1992). PilC ist auch an der Pilus-Bioynthese beteiligt (Jonsson et al. 1991) und zeichnet sich für die natürliche Transformationskompetenz der Gonokokken verantwortlich (Rudel et al. 1995).

Als zellulärer Rezeptor für den Pilus der Gonokokken und Meningokokken wurde das CD46 Protein (auch als MCP bezeichnet) identifiziert, welches von allen humanen

Zellen mit Nukleus exprimiert wird und als Regulator des Komplementsystems funktioniert (Kallstrom et al. 1997). CD46 wurde auch als Rezeptor für das Masern Virus, Herpes Virus und das M-Protein von *Streptococcus pyogenes* identifiziert.

Nach dem ersten Kontakt mit den Epithelzellen über die Pili bilden sich Mikrokolonien von Gonokokken und unter den Kolonien werden kortikale Plaques sichtbar (Merz and So 1997). An diesen Orten reichern sich innerhalb weniger Minuten nach dem ersten Kontakt neben dem Pilirezeptor, Tyrosin-phosphorylierte Proteine, Aktin-assoziierte Proteine sowie Glykoproteine der Wirtszelle an. Ein enger Kontakt mit der Wirtsmembran wird durch das mechanische Einziehen der Pili erreicht, der Pilus-Retraktion. An diesem Prozess ist, wie Merz (Merz et al. 2000) zeigen konnte, das PilT Protein beteiligt, dessen eigentliche Funktion in der Depolymerisierung des Pilus und in der Fortbewegung (*twitching motility*) besteht. Nach acht bis 16 Stunden vereinzeln sich die Mikrokolonien und die Gonokokken verlieren die Pili, welche scheinbar für weitere Interaktionen überflüssig sind und den Invasionsprozess sogar inhibieren (Shaw and Falkow 1988; Makino et al. 1991). Es wird vermutet, dass in diesem Zeitraum zwischen der Wirtsmembran und den Gonokokken ein enger Kontakt über andere, in der äußeren Membran lokalisierte Faktoren, den sog. Opa Proteine, hergestellt wird. Die Opa Proteine vermitteln dann die Invasion in die Wirtszelle, wie im nächsten Kapitel erläutert wird.

1.3.2 Opa_{HSPG}-vermittelte Adhärenz und Invasion über Heparansulfatproteoglykan unter Beteiligung von Vitronektin oder Fibronektin als Brückenmoleküle

Epithelzellen sind normalerweise nicht in der Lage, größere Partikel wie Bakterienzellen oder Zelldebris zu internalisieren. Sie beschränken sich auf die Endozytose kleiner, extrazellulärer Substanzen (< 0,5µm), was auch als Pinozytose bezeichnet wird. Dennoch können auch Epithelzellen und andere Zelltypen, die als Abgrenzung zu den professionellen Phagozyten kollektiv als nicht-professionelle Phagozyten bezeichnet werden, dazu veranlasst werden, größere Partikel aufzunehmen. Pathogenen Bakterien haben spezifische Mechanismen entwickelt, in nicht professionelle Phagozyten einzudringen (Finlay and Cossart 1997; Finlay and Falkow 1997; Raupach et al. 1999). Sie müssen dafür mit den potentiellen

Wirtszellen kommunizieren, so dass sie ihre eigene Internalisierung induzieren können. Hierfür nutzen die Bakterien oft zelluläre Adhäsionsrezeptoren, die eigentlich den Kontakt zwischen eukaryontischen Zellen untereinander bzw. mit Proteinen der extrazellulären Matrix vermitteln, für ihre eigene Zwecke aus. Klassische Beispiele sind die Integrin-vermittelte Aufnahme von *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* (Isberg et al. 1987) oder die Cadherin vermittelte Aufnahme von *Listeria monocytogenes* (Gaillard et al. 1991; Mengaud et al. 1996). Die Art der Kontaktaufnahme und Kommunikation ist für jede pathogene Spezies einzigartig, doch scheint für alle bekannten Beispiele ein enger, räumlicher Kontakt des Pathogens mit der Wirtszelle unabdingbar zu sein. Die Interaktion der bakteriellen Adhäsine mit dem entsprechenden zellulären Rezeptor und in einigen Fällen der Injektion weiterer bakterieller Proteine führt zu einer lokalen Aggregation der Rezeptoren unterhalb des Bakteriums und induziert in vielen Fällen in der eukaryontischen Zelle eine Signaltransduktionskaskade, die zur Internalisierung des Erregers führt.

Die Kolonisierung der Mukosa über die Pili ist ein wichtiger Schritt der Gonokokkeninfektion, dennoch sind die Mikrokolonien immer noch der Immunabwehr der Mukosa ausgesetzt. Die Invasion in die Epithelzellen der Mukosa ist eine verbreitete Strategie von pathogenen Mikroorganismen, um die Epithelzellbarriere zu umgehen und der Entdeckung durch das Immunsystem des Wirtes zu entgehen. Für einige Pathogene (z.B. *Shigella ssp.*, *Listeria ssp.*) ist eine erfolgreiche Invasion eine notwendige Vorbedingung für die Kolonisierung und Proliferation im Wirt (Ireton and Cossart 1997; Niebuhr and Sansonetti 2000).

Mikroskopische Daten belegen, dass *N. gonorrhoeae* zur effektiven Invasion von Epithelzellen *in vivo* befähigt ist (Ward et al. 1972; Ward et al. 1974; Evans 1977; McGee et al. 1983; Apicella et al. 1996; Harvey et al. 1997; Mosleh et al. 1997; McGee et al. 1999).

Für die Invasion der Gonokokken in die Epithelzellen und einer anschließenden Transzytose über das Epithel haben die sog. *opacity associated proteins* (Opa) eine wichtige Bedeutung (James and Swanson 1978; King et al. 1978; Swanson 1978). Die Opa Proteine können auch mit der Wirtszelle ohne eine vorhergehende Bindung durch die Pili interagieren (Virji and Heckels 1986; Makino et al. 1991; Hauck et al. 1997)

Die Opa Proteine gehören zu einer Familie von verwandten, aber größenvariablen, integralen Proteinen der äußeren Membran und stellen eine Hauptkomponente der äußeren Membran der pathogenen Neisserien dar (Heckels 1981). Die Proteine bestehen aus acht, die Membran durchspannenden, antiparallelen β -Faltblattsträngen und weisen dabei vier extrazelluläre Schleifen (*loops*) auf. Die C- und N-terminalen Ende des Proteins befinden sich im Periplasma der Bakterienzelle (King and Swanson 1978; Lambden et al. 1979; Heckels 1981; Bhat et al. 1991; Malorny et al. 1998).

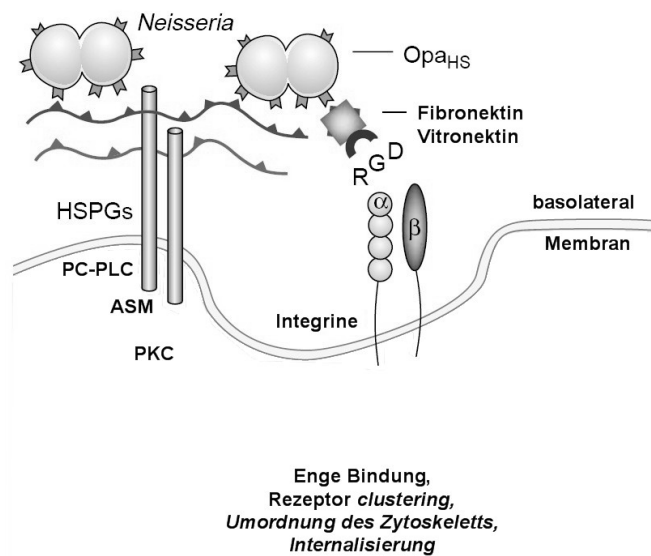


Abb. 1.1 **Adhärenz und Invasion Opa_{HSPG}-exprimierender Gonokokken über Heperansulfatproteoglykan** (Hauck and Meyer 2003)

Die Zahl der verschiedenen opa loci ist in Gonokokken (bis zu 11) deutlich höher als in Meningokokken (drei bis vier) (Bhat et al. 1991; Kupsch et al. 1993). Die Opa Proteine unterliegen einer unabhängigen Phasenvariation, so dass ein Bakterium kein, ein oder mehrere Opa Proteine exprimieren (s. Kapitel 1.4.2) kann. Diese Variabilität hat detaillierte Untersuchungen zur Rolle der Opa Proteine im Infektionsprozess und für die Interaktion mit Wirtszellkomponenten erschwert. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb ausschließlich Stämme mit einem definierten genetischen Hintergrund verwendet, d.h., jeder Stamm exprimiert jeweils nur eine Opa Variante und zwar unter kontrollierten Bedingungen von einem Plasmid aus. Die eingesetzten Bakterienstämme orientieren sich an der von Kupsch et al. (1993) vorgeschlagenen Nomenklatur.

Die Bedeutung der Opa Proteine für die Adhärenz und Invasion von Gonokokkeninfektion kann mit Hilfe von Experimenten an Freiwilligen etabliert werden. Nach der Infektion mit nicht-opaquen Gonokokken werden fast ausschließlich opaquen Bakterien reisoliert (Swanson et al. 1988; Jerse et al. 1994). Außerdem exprimieren Gonokokken, die nach natürlichen Infektionen des Urogenitaltraktes, der Zervix oder des Rektums isoliert werden, mindestens ein Opa Protein.

Die Opa Proteine interagieren mit zwei verschiedenen zellulären Rezeptoren. Die meisten Varianten erkennen und binden die sog. *carcinoembryonic antigen related cellular adhesion molecules* (CEACAM), während nur ein Opa Protein, Opa 50 (Opa_{HSPG}), des am besten charakterisierten Stammes MS11, für die Adhärenz und Invasion in verschiedene Epithelzellen verantwortlich ist (Makino et al. 1991; Kupsch et al. 1993; Chen et al. 1995).

Zelluläre Rezeptoren für die Opa_{HSPG}-exprimierenden Gonokokken sind Heparansulfatproteoglykane (HSPG) (Chen et al. 1995; van Putten and Paul 1995). Heparansulfatproteoglykane sind auf den meisten Zelloberflächen vorhanden und binden als membranverbundene Oberflächenproteine verschiedenste extrazelluläre Liganden, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Komponenten des Blut-Gerinnungssystems, Glykoproteine des Plasma und *Lipidcarrier* (Carey 1997). Die exponierte Lage der HSPG und die große Bandbreite an Liganden lässt sie an zellulären Aktionen wie der Zelladhäsion, Migration und Proliferation teilnehmen. Die Proteoglykane bestehen aus einem in der Membran verankerten Kernprotein und kovalent gebundenen Seitenketten, die aus langen, unverzweigten Zuckerketten, den Glykosaminoglykanen bestehen.

Die Invasion der Opa_{HSPG}-exprimierenden Gonokokken wird über Syndekan-1 und Syndekan-4, zwei Membran-durchspannende Vertreter der HSPG, vermittelt (Freissler et al. 2000), dennoch kann die Invasion über verschiedene Mechanismen ablaufen, die aber alle die Ligation eines dieser beiden Moleküle benötigen (Dehio et al. 1998). In Chang und ME 180 Zellen kann die Invasion der Opa_{HSPG}-exprimierenden Gonokokken ohne Beteiligung von anderen Faktoren stattfinden (Grassmé et al. 1997; Freissler et al. 2000), während für die Invasion, nicht aber für die Adhäsion, in andere Zelltypen (Hela, Cho, Hep-2) zusätzliche, aus dem Serum stammende Faktoren benötigt werden, wie z.B. Vitronektin oder Fibronektin, die einen

zusätzlichen Kontakt der Bakterien mit Integrinen der Zelloberfläche vermitteln (Dehio et al. 1998; van Putten et al. 1998).

Die Invasion der Opa_{HSPG} Gonokokken über Syndecan-1 und Syndecan-4 ist bis auf die molekulare Ebene relativ gut charakterisiert. Die Adhärenz der Gonokokken in die nicht-professionellen Phagozyten induziert eine Umordnung des Zytoskeletts, die zur Phagozytose der Bakterien führt. Dieser Mechanismus benötigt die Aktivitäten der Phosphatidylcholin-abhängigen Phospholipase C (PC-PLC) und der Sauren Sphingomyelinase (ASM), die Diacylglycerin und Ceramid produzieren. Beide *Second messenger* und die beiden Lipidhydrolasen sind für die HSPG-abhängige Aufnahme der Opa_{HSPG}-exprimierenden Gonokokken unersetzlich (Grassme et al. 1996; Grassmé et al. 1997).

Die Aufnahme der Bakterien über Heparansulfatproteoglykane ist nur eine der Alternativen, die die Gonokokken für die Zellinvasion benutzen können. Die Tatsache, dass die Gonokokken für die Invasion in einige Zellen zusätzliche Faktoren benötigen, während sie in andere Zellen ohne diese invadieren können, reflektiert vermutlich die erfolgreiche Anpassung an ihren natürlichen Wirt, da ihnen mehrere, voneinander unabhängige Mechanismen, entsprechend der vorhandenen Rezeptoren, für die Invasion zur Verfügung stehen.

Die Bedeutung der HSPG abhängigen Invasion von Opa_{HSPG}-exprimierenden Gonokokken *in vivo* ist problematisch, da die Rezeptoren vor allem basolateral auf Epithelzellen exprimiert werden (Carey 1997; Gomez-Duarte et al. 1997). Wie Wang und Kollegen (Wang et al. 1998) mit Hilfe von polarisierten T84 Zellen, die eine natürliche, mukosale Epithelbarriere nachahmen (Dharmasathaphorn and Madara 1990), zeigen konnten, können Opa_{HSPG}-exprimierenden Gonokokken diese Zellen nicht invadieren. Die HSPGs könnten aber eine Rolle in der erneuten Kolonisierung des Lumen spielen, so dass sie *in vivo* die Transmission zu einem neuen Wirt ermöglichen würden.

1.3.3 Die CEACAM-vermittelte Invasion in Epithelzellen

Neben den Heparansulfatproteoglycanen, die spezifisch von Opa_{HSPG}-exprimierenden Gonokokken erkannt werden, interagieren die meisten der Opa Proteine, 18 von 20 Varianten (Dehio et al. 1998), mit den sog. *carcinoembryonic antigen related cellular adhesion molecules* (CEACAMs). Diese Bindungsspezifität ist für die Gonokokkeninfektion von herausragender Bedeutung, da 95% der klinischen Isolate ein Mitglied dieser Familie, nämlich CEACAM1, binden können (Virji et al. 1996).

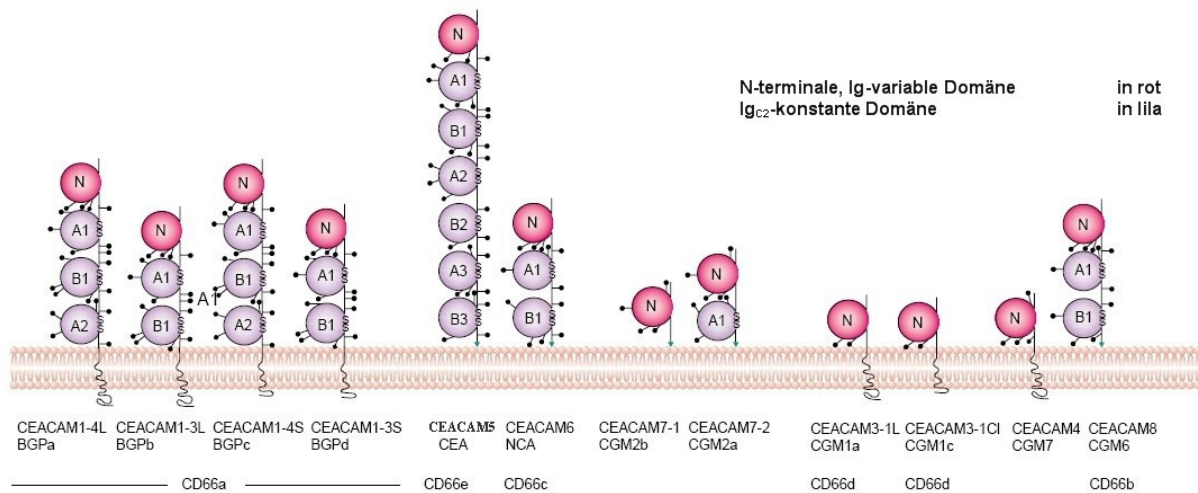


Abb. 1.2 **Struktur der CEACAM Proteine** (Hammarstrom and Baranov 2001)

Die CEACAMs gehören zu einer Untergruppe der CEA-Familie, die im Menschen aus 12 Genen besteht, von denen aber nur sieben exprimiert werden und die anderen 5 Mitglieder als Pseudogene vorliegen. Die Moleküle werden aufgrund der Charakterisierung der Maus-CEACAM1 Kristallstruktur in die Superfamilie der Immunglobuline (Ig) eingeordnet (Skubitz et al. 1995). Sie setzen sich aus 2 Arten von globulinähnlichen Domänen zusammen, einer stark konservierten N-terminalen Domäne aus 108 Aminosäuren, die homolog zu der Ig-variablen Domäne ist (*Ig_V-like*), gefolgt von bis zu sechs Domänen, die ähnlich der Ig_{C2}-konstanten Domäne sind (Thompson et al. 1991). Die CEACAMs sind entweder über eine C-terminale Transmembran Domäne, die in einer zytoplasmatischen Domäne endet, mit der Membran verankert (CEACAM1, CEACAM3 und CEACAM4) oder über einen

Glykosylphosphatidylanker mit der Membran verbunden (CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7 und CEACAM8; Thompson et al. 1991).

Das Molekulargewicht der CEACAMs setzt sich bis zu 50% aus Zuckerresten zusammen (Oikawa et al. 1987; Paxton et al. 1987; Hefta et al. 1990), doch variiert die Glykosylierung abhängig von Zelltyp und Differenzierung. Im Gegensatz zu der HSPG-abhängigen Opa Bindung, spielen die Zuckerreste bei der Interaktion von Opa-Adhäsinen und CEACAMs keine Rolle (Bos et al. 1998). Die Bindung erfolgt über eine direkte Protein-Protein Interaktion (Virji et al. 1996; Bos et al. 1997; Billker et al. 2000). Die Tatsache, dass CEACAM3 keine globulin-ähnlichen Ig_{G2}-konstante-Domänen besitzt (Nagel et al. 1993), legt die Bindungsdeterminante für die Interaktion mit den Opa Proteinen verantwortlichen Aminosäurereste auf die N-terminale Immunglobulin-ähnliche Domäne der CEACAMs fest. Dies konnte mit Hilfe von löslichen Chimären von CEACAM1 und CEACAM5 bestätigt werden, die nur die N-terminale Domäne umfassen und spezifisch mit Opa Adhäsinen interagieren (Virji et al. 1996; Bos et al. 1998).

Von den sieben exprimierten Mitgliedern der CEACAM-Familie interagieren vier Moleküle mit den Opa-Adhäsinen der Gonokokken, nämlich CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 und CEACAM6. Dabei erkennen einzelne Opa Proteine mehrere Mitglieder der CEACAM-Familie, wohingegen kein Adhäsin CEACAM4, CEACAM7 oder CEACAM8 erkennt (Chen and Gotschlich 1996; Virji et al. 1996; Bos et al. 1997; Gray-Owen et al. 1997; Popp et al. 1999). Nachfolgend werden diese Opa-CEACAM-bindenden Adhäsine als Opa_{CEA} gekennzeichnet, um diese von Opa_{HSPG}-bindenden Proteinen zu unterscheiden.

Die physiologische Funktion der CEACAM Proteine ist bis heute immer noch umstritten, es gilt aber als gesichert, dass sie an homo- und heterophiler Zell-Zell Adhäsion (Benchimol et al. 1989; Oikawa et al. 1991) sowie an der Interaktion mit anderen Liganden beteiligt sind (Stocks and Kerr 1993; Ohannesian et al. 1995; Feuk-Lagerstedt et al. 1999). So sind zum Beispiel CEACAM1 und CEACAM6 auf neutrophilen Granulozyten die Hauptpräsentatoren der Sialyl-LewisX Zuckerstruktur und spielen beim Einwandern der Neutrophile in Endothelzellen eine wichtige Rolle, indem sie an E-Selektin binden (Kuijpers et al. 1992; Stocks and Kerr 1993). CEACAM5 oder CEA, nach dem die Molekülfamilie benannt ist, wurde zunächst als Tumormarker identifiziert, und der Nachweis von großen Mengen an CEA im Blut ist

auch heute noch wichtiges Diagnose- und Prognosemerkmal nach der operativen Entfernung von Darmgeschwüren (Graham et al. 1998).

Die Opa-bindenden Moleküle der CEACAM-Familie werden differentiell in so unterschiedlichen Zellen wie Epithel- oder Endothelzellen, lymphoide und hämatopoetische Zellen exprimiert, so dass ein oder mehrere Mitglieder der Familie auf fast allen humanen Zelltypen exprimiert werden (Thompson et al. 1991). Da einzelne Opa Proteinvarianten verschiedene CEACAM Rezeptoren erkennen und aufgrund der Phasenvariation der Opa Proteine, diesbezüglich eine Gonokokkenpopulation immer heterogen ist, können sie über die CEACAM Moleküle fast in jedem Stadium der Infektion mit Wirtszellen interagieren.

Bereits während der Kolonisierung der Mukosa erscheint eine Interaktion mit verschiedenen CEACAMs plausibel, da CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6 an wichtigen Eintrittspforten der Gonokokkeninfektion, wie zum Beispiel den Epithelzellen des Endometrium, Zervix und der Urethra, exprimiert werden (Prall et al. 1996; Ogihara and Kato 2000). Außerdem werden die CEACAMs in diesen Zellen, im Gegensatz zu den HSPGs, apikal exprimiert, so dass sie auch *in vivo*, bereits zu Beginn einer Infektion als Rezeptoren für die Gonokokken dienen können und einen engen Kontakt mit nachfolgender Invasion zu vermitteln vermögen.

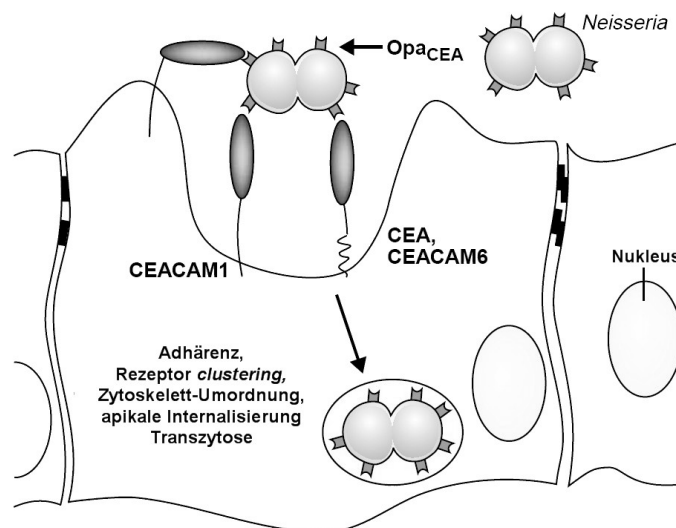


Abb. 1.3 **CEACAM-vermittelte Invasion von Epithelzellen** (Hauck and Meyer 2003)

Der heutige Stand der Forschung ist, dass CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6 das Potential besitzen, als Rezeptoren für die Invasion von Opa_{CEA}-exprimierenden

Gonokokken in Epithelzellen zu fungieren. Die drei Moleküle der CEACAM-Familie können in einem zellulären Hintergrund, in dem die einzelnen Rezeptoren in stabil transfizierten HeLa Zellen exprimiert werden, sowohl die Adhärenz als auch die Invasion von Opa_{CEA}-exprimierenden Gonokokken und von rekombinanten *E. coli* Stämme vermitteln (Chen and Gotschlich 1996; Virji et al. 1996; Bos et al. 1997; Gray-Owen et al. 1997; Gray-Owen et al. 1997).

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die natürliche Infektion der Gonokokken normalerweise von einer lokalen Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen begleitet ist. Diese chemischen Verbindungen stimulieren in der Zellkultur die Expression mancher CEACAM Moleküle (Gray-Owen et al. 1997; Muenzner et al. 2000; Muenzner et al. 2001), so dass auch die Invasion in die Epithelzellen verstärkt würde. Invadierte Epithelzellen bieten sowohl Schutz vor Teilen des Immunsystems, z.B vor polymorphkernigen Granulozyten, als auch die Möglichkeit der Transmission. *In vivo* finden sich in urogenitalen Ausscheidungen von Patienten mit Gonorrhö häufig aus dem Gewebeverband herausgelöste Epithelzellen mit intrazellulären Gonokokken (Apicella et al. 1996).

Die CEACAMs sind möglicherweise auch an der Penetration der Gonokokken in die Submukosa beteiligt. In Zellkulturen von Nasopharynx und *Fallopian tube* Organkulturen wurden Gonokokken beobachtet, wie sie die einschichtige Epithelzellbarriere überwinden, indem sie durch die Zellen wandern (Transzytose) und letztendlich in das subepitheliale Gewebe entlassen werden (Ward et al. 1974; Evans 1977; McGee et al. 1983; Mosleh et al. 1997). Untersuchungen mit polarisierten, humanen Epithelzellen ergaben, dass apikal-exprimierte CEACAM Proteine für die Transzytose von rekombinanten, Opa_{CEA}-exprimierenden *E. coli* Stämmen verantwortlich sind (Wang et al. 1998). Die Bakterien erreichen letztendlich die basolaterale Seite der einschichtigen Zellschicht, ohne die Barrierefunktion der polarisierten Zellen oder ihre *tight-junctions* zu beschädigen. Die Schädigung des epithelialen Zellverbandes, der im Verlauf von natürlichen Infektionen auftritt, scheint daher keine notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion zu sein noch muss sie ein Resultat der Gonokokkeninfektion sein. Vielmehr beruht sie vermutlich auf der inflammatorischen Reaktion der rekrutierten Granulozyten.

1.4 Bakterielle Virulenzfaktoren: Evasion der Immunantwort

1.4.1 Die IgA-Protease

Die Membran der Mukosa dient dem Körper als unspezifischer Verteidigungsmechanismus zur Abwehr von Pathogenen, indem sie als physikalische Barriere die Penetration der Bakterien in die Submukosa verhindert. Unterstützt wird die Membran durch mechanische Reinigung, extreme Umweltbedingungen und antimikrobielle Substanzen, wie Lysozym, Defensin, Hydrolasen und Immunglobuline. Die vorherrschenden Immunglobuline auf der Oberfläche der Mukosa und in Sekreten sind IgA-Antikörper, welche spezifische membrangebundene und sekretierte Antigene von Bakterien, Viren und Toxinen der Mikroben erkennen (Plaut 1983; Brandtzaeg 1997).

Die IgA Antikörper bilden ein Hauptmechanismen der humoralen Immunität auf der Mukosa und sie vermitteln Schutz, indem sie die Adhärenz der Bakterien an die Mukosa inhibieren, die Fc γ -abhängige-Phagozytose aktivieren und Antigene präzipitieren (Kilian et al. 1996).

Die pathogenen Neisserien sezernieren eine Endopeptidase, die spezifisch humanes IgA1, aber nicht IgA2 spaltet (Plaut et al. 1975). Da IgA1-produzierende Zellen in den lymphoiden Follikeln der Mukosa dominieren, ist die Spezifität der pathogenen Protease von außerordentlicher Signifikanz. Die IgA1 Protease der Neisserien sind Serin-Proteasen, die humanes IgA1 spezifisch in der sog. *hinge*-Region spalten und somit in den Antigen-bindenden Teil des IgA1 (F(ab)₂ Fragmente) und in den F_C-Teil des Immunglobulins teilen (Plaut et al. 1975).

Die Spaltung der Immunglobuline durch die IgA-Protease scheint aber für eine Besiedlung des Menschen nicht von essentieller Bedeutung zu sein, da Gonokokkenmutanten, die keine IgA-Protease exprimieren, trotzdem männliche Gewebe invadieren können (Cooper et al. 1984; Johannsen et al. 1999).

Dennoch spielt eine weitere Funktion der Protease eine vielleicht wichtigere Rolle während der Gonokokkeninfektion. Die IgA1-Protease der Gonokokken ist in der Lage das humane, lysosomale Membranprotein hLAMP1 zu spalten (Hauck and Meyer 1997; Lin et al. 1997). Es ist ein Marker für späte Endosomen und

Phagolysosomen und schützt vermutlich die Vesikelmembran vor aggressiven Enzymen innerhalb des Lysosoms. Interessanterweise wird die Spaltung des hLAMP1 mit einem vermehrten intrazellulären Überleben (Lin et al. 1997) und einer effizienteren Transzytose von *N. gonorrhoeae* durch polarisierte Epithelzellen in Verbindung gebracht (Hopper et al. 2000).

1.4.2 Antigen- und Phasenvariation

Die Gonokokken besitzen aber noch weitere Virulenzmechanismen, die es ihnen ermöglichen, die Immunabwehr des Wirtes zu umgehen. Die Oberflächenproteine PilE, PilC und die Opa Proteine, die für eine erfolgreiche Infektion außerordentlich wichtig sind, unterliegen alle einer starken Variabilität. Sie unterliegen der sog. Antigen- und der Phasenvariation, die es den Bakterien ermöglicht, die erworbene Immunantwort des Wirtes zu umgehen. Die Effektivität dieser Mechanismen erlaubt die Reinfektionen desselben Wirtes mit demselben Bakterienstamm (Blake and Wetzler 1995). In diesem Kapitel werden anhand der Phasenvariation der Opa Proteine und der antigenen Variation des Pilin exemplarisch die beiden Mechanismen vorgestellt.

Unter dem Begriff Phasenvariation versteht man den Wechsel zwischen distinkten Phänotypen bzw. das An- und Abschalten von Faktoren, die für den Wechsel der Phänotypen verantwortlich sind (Henderson et al. 1999). Vor allem die konstitutiv exprimierten Opa Proteine unterliegen diesem Mechanismus und können unabhängig voneinander an- und abgeschaltet werden (Meyer 1990). Jedes Opa Protein wird von einem einzelnen, vollständigen Gen von bis zu 12 loci kodiert. Deshalb sind Gonokokkenpopulationen bezüglich ihrer Opa-Expression äußerst heterogen, sie können keines, eines oder mehrere Opa Protein bilden. Die Phasenvariation beruht auf einem RecA-unabhängigen Mechanismus, der als *slipped strand mispairing* bezeichnet wird (Stern et al. 1986; Murphy et al. 1989; Henderson et al. 1999). In der Signalsequenz für die Opa Proteine kodierenden Region finden sich repetitive Pentanukleotidsequenzen (CTCTT), deren Anzahl sich bei der Replikation des Bakterienchromosoms verändern kann. Verschiebt sich aufgrund dessen das Leseraster, führt dies zu einer vollständigen Translation des Proteins oder zu einem vorzeitigen Abbruch. Die Variation dieser Oberflächenproteine, die für die Invasion verschiedener Zellen außerordentlich

wichtig sind, erlaubt es den Gonokokken, während der Infektion mit einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen spezifisch zu interagieren.

Der Begriff Antigene-Variation charakterisiert eine Modifikation von Oberflächenkomponenten, die zu einer veränderten immunologischer Erkennung führen kann (Henderson et al. 1999). Obwohl die Pili der Gonokokken aufgrund ihrer exponierten Lage und ihrer starken immunogenen Eigenschaften für die Entwicklung von Vakzinen prädisponiert sind, scheiterte jeder Versuch an der hohen Antigenen-Variabilität dieser Strukturen (Boslego et al. 1991; Johnson et al. 1991). Die Pilusvariation beruht auf einer RecA-abhängigen, homologen Rekombination zwischen zwei transkriptionell aktiven Genen für PilE (pilE1 und pilE2) und mehreren über das Genom verteilten, nicht transkribierten (stillen) Genloci (pilS) (Gibbs et al. 1989; Meyer 1990). Durch RecA-abhängige Rekombination von sog. Minikassetten zwischen den stillen pilS Genen und den aktiven pilE Genen entstehen Variationen in der Aminosäuresequenz in den immundominanten Teilen des Pilins (Haas and Meyer 1986; Koomey et al. 1987; Gibbs et al. 1989).

Die antigene Variation des Pilus und die Phasenvariation der Pilusbildung erzeugen in einer Gonokokkenpopulation eine hohe Heterogenität in den antigenen Eigenschaften der Pili, so dass trotz der exponierten Lage der Pili das Immunsystem keine protektiven Antikörper bilden kann.

1.5 Die CEACAM-vermittelte Interaktion der Opa_{CEA} Gonokokken mit Zellen des Immunsystems

Der menschliche Wirt besitzt zwei verschiedene, aber miteinander kommunizierende Mechanismen, um Bakterien abzuwehren. Die eher unspezifisch-agierende angeborene Immunität und die hochspezifische erworbene Immunität. Beide Reaktionen werden vor allem durch Leukozyten (Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten) vermittelt.

Die **angeborene Immunantwort** beruht vor allem auf einer schnellen Rekrutierung von Granulozyten und Makrophagen (oder deren zirkulierenden Vorläufern den Monozyten) aus dem Blutkreislauf. Das befallene Gewebe wird dabei aktiv infiltriert und fremde Partikel werden zerstört. Die Eliminierung von fremden Antigenen ist relativ unspezifisch (Muzio and Mantovani 2000) und führt meistens zu einer starken Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, also zu einer massiven lokalen Inflammation des betroffenen Gewebes.

Die **erworbene Immunantwort** zeichnet sich durch die Spezifität und die Etablierung eines immunologischen Gedächtnisses aus, das bei Reinfektionen durch denselben pathogenen Erreger eine effektivere Reaktion bewirkt.

An der spezifischen Immunantwort sind vor allem B- und T-Lymphozyten beteiligt, deren Mechanismen durch weitere Zellen unterstützt wird. Die spezifischen Abwehrmechanismen der erworbenen Immunantwort beruhen vor allem auf der klonalen Spezifität und der nachfolgenden klonalen Expansion antigenspezifischer B- und T-Lymphozyten. Darüber hinaus kann die adaptive Immunantwort zu einer lebenslangen Immunität führen (Sprent 1997). Die erworbene Immunität wird weiterhin in die humorale (B-Zell-vermittelte) und in die zelluläre (T-Zell-vermittelte) unterteilt.

Die **humorale Immunantwort** beruht vor allem auf der spezifischen Erkennung und Bindung von extrazellulären Mikroorganismen oder deren Toxine durch Antikörper. Dabei hat die Bindung der Antikörper zur Folge, dass die Adhäsion der Erreger an die Wirtszelle blockiert wird (Mandel 1976), der Erreger für die Phagozytose markiert wird (Opsonierung, (Ravetch and Kinet 1991) und die Fc-Domäne des Antikörpers

das Komplementsystem aktiviert (Loos et al. 1989; Boackle 1993). Die drei Mechanismen arbeiten zum Teil synergistisch zusammen und inhibieren so die Kolonisierung von Zelloberflächen und führen zur Elimination des Pathogen.

Aber auch die humorale Immunantwort beruht ursprünglich auf einer Zell-Zell-Interaktion. Die Antikörper werden von Antikörper-sezernierenden-Plasmazellen gebildet, welche aus B-Zellen, nach der Aktivierung durch Pathogene, entstehen (Parker 1993).

Die **zelluläre Immunantwort** richtet sich sowohl gegen fremdes Gewebe als auch gegen Pilze, Parasiten und virusbefallene Zellen. Die zelluläre Immunantwort wird durch sog. T-Lymphozyten (benannt nach ihrer Entwicklung und Selektion im Thymus) vermittelt.

Die T-Zellen reifen im Thymus und zirkulieren solange im Blut und den lymphatischen Organen, bis sie durch den Kontakt mit antigenen Determinanten pathogener Mikroorganismen aktiviert werden. Die Stimulation der naiven T-Zellen erfolgt dabei durch akzessorische, antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen: (Razi-Wolf et al. 1992); dendritische Zellen: (Steinman 1991); B-Zellen; (Lanzavecchia 1987) und führt zur Differenzierung sowie zur klonalen Expansion der T-Lymphozyten zu T-Effektorzellen (Lenschow et al., 1996; Fraser et al., 1991; Lindstein et al., 1989).

Es existieren drei funktionelle Klassen von T-Effektorzellen, die jeweils auf Antigene reagieren, die von unterschiedlichen Pathogenen stammen.

Antigene Determinanten von Pathogenen, die im Zytoplasma residieren, werden auf der Zelloberfläche der Wirtszelle CD8⁺ T-Zellen (Julius et al. 1993) präsentiert, die zu zytotoxischen T-Zellen differenzieren und infizierte Zellen abtöten können (Henkart 1994; Squier and Cohen 1994).

CD4⁺ T-Zellen hingegen erkennen Antigene von Krankheitserregern, die sich in intrazellulären Vesikeln befinden, und solche, die von aufgenommenen extrazellulären Bakterien und Toxinen abstammen (Julius et al. 1993). Die CD 4⁺ T-Zellen können zu zwei Arten von Effektorzellen differenzieren (Romagnani 1991).

Die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu TH-1 Zellen wird normalerweise durch intrazelluläre Pathogene, die in großer Zahl in Vesikeln von Makrophagen persistieren, ausgelöst. Die Differenzierung induziert die zelluläre Immunantwort, indem sie die keimtötenden Eigenschaften von Makrophagen (Stout and Bottomly 1989; Paulnock 1992) und außerdem die humorale Immunantwort aktiviert, indem sie

B-Zellen anregt, IgG-Antikörper zu synthetisieren. Die IgG-Antikörper opsonieren sehr effektiv extrazelluläre Pathogene für die Aufnahme durch phagozytierende Zellen.

Extrazelluläre Pathogene stimulieren die Bildung von TH2-Zellen, die eine humorale Immunantwort auslösen, indem sie naive antigenspezifische B-Zellen anregen, IgM- und IgE-Antikörper zu bilden. Somit fällt die Entscheidung, ob die humorale oder die zellvermittelte Immunität vorherrscht, mit der Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu TH1- oder TH2-Zellen. Die Diskriminierung zwischen diesen Zellen erfolgt meist über die TH1-Leitzytokine IL-2 und IFN γ auf der einen Seite und die TH2-Leitzytokine IL-4 und IL-5 auf der anderen Seite.

1.5.1 Die Opsonin-unabhängige Phagozytose der Gonokokken durch Granulozyten und die Modulation der erworbenen Immunantwort

Eins der typischen Symptome der Gonokokkeninfektion ist ein eitriger Ausfluss mit Gonokokken-enthaltenden Phagozyten (Ward et al. 1972; Handsfield 1990; Ryan 1990). Interessanterweise induziert die Bindung von Gonokokken an humane Epithelzellen die Synthese mehrere proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie z.B. TNF- α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF, und Membran-Kofaktor Protein-1 (Naumann et al. 1997). Die zuerst infizierten Zellen (Epithelzellen der Mukosa) funktionieren somit als Wachposten und aktivieren das Immunsystem, indem sie inflammatorische Signale ausschütten, die zur Rekrutierung und Infiltration des betroffenen Gewebes durch phagozytierenden Zellen, vor allem der polymorphkernigen Granulozyten (Neutrophile, PMNs), führen.

Trotz der massiven Präsenz von phagozytierenden Zellen in dem betroffenen Gewebe können die Gonokokken teilweise über Wochen und Monate im Wirt persistieren und die Mukosa als Plattform für Transmission zu neuen Wirten benutzen (Handsfield 1990). So ist nicht auszuschließen, dass die Gonokokken sogar in den polymorphkernigen Granulozyten überleben, da internalisierte Gonokokken durchaus intakt erscheinen (Shafer and Rest 1989; Meyer et al. 1994). Dennoch ist ein intrazelluläres Überleben der Gonokokken *in vitro* nicht nachweisbar (Swanson et al. 1975; Veale et al. 1976; Witt et al. 1976; Drutz 1978; Casey et al. 1979; Cooper and Floyd 1982; Mezzatesta and Rest 1983; Parsons et al. 1986; Rest and Shafer 1989; Swanson and Isberg 1996). Deshalb ist wahrscheinlicher, dass die

Gonokokken durch die Granulozyten effektiv erkannt und abgetötet werden (Rest 1979; Rest et al. 1982; Virji and Heckels 1986; Fischer and Rest 1988; Frangipane and Rest 1992; Virji et al. 1996; Gray-Owen et al. 1997).

Daher ist bis heute unklar, ob die Phagozytose durch die polymorphkernigen Granulozyten *in vivo* die Gonokokkeninfektion kontrolliert oder ob die internalisierten Gonokokken intrazellulär Überleben und so die Disseminierung und Transmission gefördert wird.

In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass die Antikörperimmunantwort auf die Neisserieninfektion im Vergleich zu anderen, venerischen Infektionen mit pathogenen Mikroorganismen äußerst schwach ist und auch wiederkehrende Infektionen keine protektive Immunität bewirken (Hedges et al. 1999). Dennoch können die oft milden Symptome der Gonorrhö trotz schwacher Immunantwort zurückweichen (Ryan 1990; Hedges et al. 1999; Schmidt et al. 2001), so dass die angeborene Immunantwort, vermittelt durch die professionellen Phagozyten, eine Schlüsselrolle in der Abwehr der Gonokokken spielen muss.

In der Tat, humane polymorphkernige Granulozyten sind für die Erkennung und Eliminierung von Gonokokken, vor allem des während natürlicher Infektionen prädominierenden opaquen Phänotyps (James and Swanson 1978; Swanson et al. 1988; Jerse et al. 1994; Cohen and Cannon 1999; Jerse 1999; Schmidt et al. 2001), bestens ausgestattet.

Die polymorphkernigen Granulozyten exprimieren vier verschiedene CEACAM Moleküle, nämlich CEACAM1, CEACAM3, CEACAM6 und CEACAM8, von denen CEACAM1, CEACAM3 und CEACAM6 mit Opa_{CEA} Bakterien interagieren können (Dehio et al. 1998). Die Granulozyten erkennen und eliminieren ohne vorherige Oponierung durch Antikörper oder Komplementfaktoren spezifisch Opa_{CEA} -exprimierenden Gonokokken, während nicht opaque, nicht pillierte (Opa^- , Pili^-) und pillierte, aber nicht opaque (Opa^- , Pili^+) Gonokokken *in vitro* ohne eine vorherige Oponierung nur in geringen Maß von isolierten Granulozyten phagozytiert werden (Virji and Heckels 1986; Fischer and Rest 1988; Frangipane and Rest 1992; Kupsch et al. 1993; Knepper et al. 1997). Die Internalisierung der Opa_{CEA} -exprimierenden Gonokokken ist abhängig von der Bindung der Opa Proteine an die CEACAMs der Granulozyten und kann durch Opa spezifische monoklonale Antikörper inhibiert werden (Elkins and Rest 1990; Belland et al. 1992; Virji et al. 1996).

Die Interaktion der Gonokokken mit den Neutrophilen führt zu einer starken Generierung von Sauerstoffradikalen [oxidative burst] (Belland et al. 1992; Virji et al. 1996). Dies ist einer der spezifischen bakteriziden Mechanismen der Neutrophilen, um Bakterien nach der Internalisierung abzutöten.

Trotz des breiten Repertoires an Opa-bindenden Rezeptoren ist die Menge an CEACAM Proteinen auf der Oberfläche der Granulozyten gering. Die CEACAM Moleküle sind vor allem in primären und sekundären Granula lokalisiert, die erst durch einen Stimulus, wie z.B. durch den Kontakt mit Gonokokken, auf die extrazelluläre Seite der Zellen freigesetzt werden und dann zu einer erhöhten Adhärenz der Opa_{CEA} Gonokokken führen (Densen and Mandell 1978; Farrell and Rest 1990).

Die CEACAM-vermittelte Aufnahme von Opa_{CEA}-exprimierenden Gonokokken in professionelle phagozytische Zellen ist im Gegensatz zu der CEACAM-vermittelten Aufnahme in Epithelzellen molekularbiologisch gut untersucht. Die Interaktion der Gonokokkenadhäsine mit den Rezeptoren induzieren spezifische Signaltransduktionskaskaden, die zur Internalisierung der Pathogene führen.

Erste Untersuchungen von Signalwegen in phagozytischen Zellen wurden anhand einer *in vitro* differenzierten, humanen myelomonozytären Zell-Linie (JOSK-M), die CEACAM1, CEACAM3 und CEACAM6 exprimiert, durchgeführt. Die Infektion der JOSK-M Zellen mit Opa_{CEA}-exprimierenden Gonokokken führt zu einer starken spezifischen Tyrosinphosphorylierung verschiedener Wirtsproteine (Hauck et al. 1998) und einer schnellen Aktivierung der Sauren Sphingomyelinase (ASM) (Hauck et al. 2000). Die Wirtsproteine werden ausgehend von den Mitgliedern der CEACAM-Familie durch die zwei tyrosinabhängigen Src Kinasen Hck und Fgr phosphoryliert. Zusammen mit der GTP-Beladung der kleinen GTPase Rac, welche die für die Phagozytose notwendige Umordnung des Zytoskeletts organisiert, sind die beiden Src Kinasen für eine effiziente Internalisierung der Gonokokken verantwortlich. Die Signalkette induziert dann die Aktivierung der p21-aktivierten Proteinkinase (PAK) und der Jun N-terminalen Kinase (Hauck et al. 1998), die Signale zur Induktion Stress-regulierter Gene in den Nukleus leiten. Parallel zu dieser Signalkaskade kommt es zu einer Herunterregulation der Aktivität der Tyrosinphosphatase SHP-1 (Hauck et al. 1999).

Die genaue Beteiligung der Rezeptoren ist noch nicht geklärt, doch steht eindeutig fest, dass diese Signalkaskade spezifisch für die Opsonin-unabhängige Phagozytose der Gonokokken ist, da die Opsonin-abhängige Internalisierung über den Fc γ -Rezeptor die Kinase Syk aktiviert.

CEACAM1 kann in 7 verschiedenen Splice-Varianten exprimiert werden. Diese unterscheiden sich in Art und Anzahl der extrazellulären IgG-ähnlichen Domänen und der Länge der zytoplasmatischen Domäne. Die lange zytoplasmatische Domäne von CEACAM1 scheint für die meisten Funktionen des Moleküls verantwortlich zu sein. Sie enthält zwei Tyrosin Reste, die in Konsensussequenz eines putativen ITAM und zweier putativen ITIM Motive liegen (*Immunoreceptor Tyrosin-based activation/inhibitory motif*). Vor allem in Leukozyten spielen diese Sequenzmotive eine wichtige Rolle. So werden Aktivierung und Inhibierung von T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen, die Ausschüttung von Zytokinen und vor allem phagozytische Prozesse wie die Fc γ -vermittelte Phagozytose über Signaltransduktionskaskaden von ITAM und ITIM tragenden Rezeptoren gesteuert (Cambier 1995; Daeron 1997; Isakov 1997; Ravetch and Lanier 2000). ITAM spielen meist eine aktivierende, ITIM Rezeptoren meist eine inhibierende Rolle bei den genannten Prozessen. Der Abstand zwischen den Tyrosinresten in CEACAM1 ist allerdings wesentlich größer (26 AS) als der in typischen ITAM-Sequenzen (6-8 AS). Der größte Abstand zwischen den YxxL Motiven in einem funktionellen ITAM beträgt 12 AS im Fc γ -RIIA (Cambier 1995; Isakov 1997). Die Funktionalität des ITAM von CEACAM1 muss daher erst bewiesen werden.

Die Sequenz um die beiden Tyr Reste in CEACAM1 bilden genau passende ITIM Motive. Eine Stimulierung von ITIM Rezeptoren führt auf molekularer Ebene zu einer Phosphorylierung der Tyrosinreste in den ITIMs durch Src Kinasen und nachfolgend zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Tyrosin-abhängigen Phosphatasen ,wie SHP-1 oder der Phosphoinositolphosphatase (SHIP). Durch Dephosphorylierung verschiedener Substrate können die aktivierten Phosphatasen dann ein Signal in den Zellen dämpfen oder ganz unterdrücken (Ravetch and Lanier 2000). Eine Tyrosin-Phosphorylierung der langen zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1 durch Kinasen der Src-Familie in Granulozyten (Lyn/Hck; Skubitz et al. 1995) und Epithelzellen (p60c-src; Brummer et al. 1995)) sowie die Interaktion mit SH2-Domänen enthaltenden Phosphatasen (SHP-1, SHP-2, (Beauchemin et al. 1997;

Huber et al. 1999; Boulton and Gray-Owen 2002)) in Epithelzellen wurde bereits beschrieben.

Es erscheint daher plausibel, dass CEACAM1 zumindestens für einen Teil der induzierten Signalwege in den JOSK-M Zellen verantwortlich ist, dennoch zeigen neueste Untersuchungen, dass die Phagozytose von Gonokokken über CEACAM1 möglicherweise unabhängig von der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors ist. So führt die Interaktion von Gonokokken in COS-7 und HeLa Zellen weder zu einer Aktin-abhängigen Zytoskelettumordnung, da der pharmakologische Inhibitor Cyto D nicht inhibierend wirkt (Billker et al. 2000; McCaw et al. 2004) noch lässt sich die Phagozytose durch dominant negative Varianten verschiedener GTPasen der Rho Familie inhibieren (Billker et al. 2002). Hinzu kommt, dass in diesen Zellen die CEACAM1-abhängige Phagozytose weder eine Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne induziert noch durch spezifische Tyrosinkinaseinhibitoren beeinflussbar ist (McCaw et al. 2004).

Die Funktionen von CEACAM1 auf Epithel-, Endothel- und myeloiden Zellen beinhaltet homophile Adhäsion, Tumorsuppression und die Regulation der Zelladhäsion und -proliferation. Außerdem fungiert es als Rezeptor für kommensale und pathogene Gonokokken, *Haemophilus influenzae* und das murine Corona Virus. Neueste Forschungsergebnisse belegen, dass CEACAM1 vermutlich auch an der Modulation der Immunantwort während einer Gonokokkeninfektion beteiligt ist. Die Infektion des humanen Wirtes durch die Gonokokken führt zwar in vielen Fällen zu einer massiven Inflammation des betroffenen Gewebes, aber eine protektive Immunität gegen wiederkehrende Infektionen wird dabei nicht aufgebaut. Dieses Phänomen kann unter anderem durch die exzessive Variabilität von Oberflächenstrukturen erklärt werden, wie z.B. der Pili und der Opa Proteine, die in Immunevasion resultiert. Aber zusätzlich wird vermutet, dass eine Gonokokkeninfektion Menschen für HIV oder chlamydiale Infektionen prädisponiert, indem die Gonokokken die lokale Immunantwort direkt beeinflussen.

Die Adhäsion der Gonokokken an T-Lymphozyten (CD4⁺-T-Zellen), die nur CEACAM1 exprimieren, scheint die Aktivität und die Proliferation der Zellen zu beeinflussen und so die typischen Symptome der Gonorrhö zu unterdrücken (Boulton and Gray-Owen 2002).

CEACAM1 wird als einziger Vertreter der CEACAM-Familie auf humanen Lymphozyten exprimiert und seine Oberflächenexpression korreliert mit dem Aktivierungsstatus der Lymphozyten. Wenn die Lymphozyten mit Opa_{HSPG}-exprimierenden Gonokokken infiziert werden, führt dies zu einer Aktivierung der Zellen, dokumentiert durch die Expression des frühen Markers CD69. Hingegen fehlt diese Aktivierung bei der Infektion mit Opa_{CEA}-exprimierenden Gonokokken. Zusätzlich reduziert die Infektion mit Opa_{CEA}-exprimierenden Gonokokken die Proliferation der CD4⁺-T-Zellen trotz der Inkubation mit ansonsten stimulierenden Substanzen, wie z.B. IL-2. Neben der Infektion mit lebenden Bakterien konnte derselbe Effekt mit CEACAM1-ligierenden Antikörpern beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die Ligandierung des CEACAM1 Proteins für die beobachteten Effekte verantwortlich ist (Boulton and Gray-Owen 2002).

Über die CEACAM5- bzw. CEACAM6-abhängige Phagozytose von Opa_{CEA}-exprimierenden Gonokokken ist bis heute noch wenig bekannt. Die homotypische Zell-Zell-Interaktion von CEACAM5 oder CEACAM6 moduliert die *in vitro* Differenzierung von Zellkulturen in Muskel- und Fettzellen (Screaton et al. 2000) und inhibiert die Apoptose (Anoikis) von Zellen, die den Kontakt mit der Substratoberfläche verloren haben (Ordonez et al. 2000; Duxbury et al. 2004). CEACAM6 und auch CEACAM5 sind über einen Glykosylphosphatidylanker in der Membran verankert, können aber auch ohne transmembran- und zytoplasmatische Domäne intrazelluläre Signalkaskaden modulieren und das Zellverhalten beeinflussen.

Diese Art der Membranverankerung von Proteinen wird neuerdings mit spezifischen Membrankompartimenten, den sog. „lipid rafts“ in Zusammenhang gebracht. *Lipid rafts* sind definierte Membranbereiche (Mikrodomänen), die sich aus Glykosphingolipiden und Cholesterin zusammensetzen (Simons and Ikonen 1997; Brown and London 1998). Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften interagieren die Moleküle miteinander und segregieren sich spontan von Glykophospholipiden der Zellmembran. Dabei entstehen definierte Membranareale, die sich durch einen hohen Gehalt an GPI-verankerten Proteinen auszeichnen. Durch die Stimulation der Proteine bilden sich sog. *signalling units*, welche für die zelluläre Signaltransduktion verantwortlich sind. Die Mikrodomäne *per se* stellt dabei vermutlich nur ordnende Strukturen dar, die eigentliche Signalweitergabe erfolgt durch die GPI-verankerten Proteine. Der Mechanismus der Signaltransduktion ist bis heute unbekannt, aber die

Signalübermittlung verläuft vermutlich über zytoplasmatische Proteine, die mittels eines Membrananker an die Innenseite der Membran gekoppelt sind. Interessanterweise werden die *lipid rafts* in Verbindung mit der Invasion von verschiedenen pathogenen Mikroorganismen (*E. coli*, *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, verschiedene Viren) in die Wirtszelle gebracht (Gatfield and Pieters 2000; Lauer et al. 2000; Rosenberger et al. 2000; Shin and Abraham 2001). Vor allem die Aktivierung der Sauren Sphingomyelinase und deren Produkt das Ceramid wird in Verbindung mit *lipid rafts* und der Aktivierung von Lipid-verankerten Kinasen der Src-Familie gebracht (Casey 1995; Simons and Ikonen 1997). Interessanterweise benötigt die CEACAM-vermittelte Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken in JosK-M Zellen ebenfalls die Aktivität der Sauren Sphingomyelinase für eine effektive Aufnahme des Pathogens. Es erscheint daher sinnvoll, die Interaktion der Opa_{CEA}-exprimierenden Gonokokken mit CEACAM6 und ebenso CEACAM5 mit Hilfe von Inhibitoren, die spezifisch Mikrodomänen angreifen (Filipin, Nystatin oder Methyl- β -cyclodextrin), zu untersuchen.

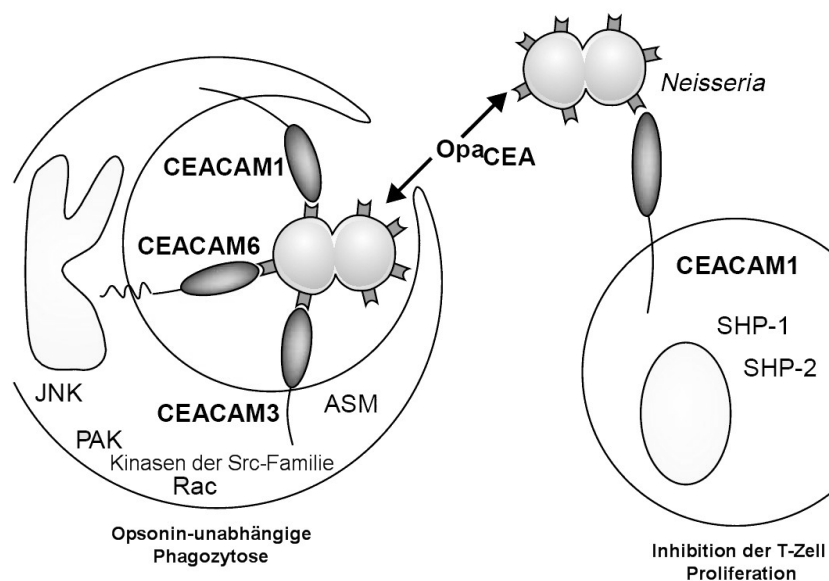


Abb. 1.4 **Interaktion Opa_{CEA}-exprimierender Bakterien mit Granulozyten und T-Zellen**
(Hauck and Meyer 2003)

Neben CEACAM1 und CEACAM6 exprimieren humane, polymorphkernige Granulozyten noch das CEACAM3 Protein, welches ebenfalls mit Opa_{CEA} Gonokokken interagiert. Die simultane Expression der drei CEACAMs auf

Granulozyten erschwert die distinkte Untersuchung der CEACAM-abhängigen Internalisierungsmechanismen.

CEACAM3 ist in dieser Familie einzigartig, da er nur auf Neutrophilen exprimiert wird und bis heute noch kein endogener Ligand für CEACAM3 bekannt ist. Die Opa Proteine der Gonokokken sind der einzig bekannte Agonist (Chen et al. 2001; McCaw et al. 2003). CEACAM3 besteht nur aus der stark konservierten extrazellulären N-terminalen Domäne und ist mit einer Transmembran- und zytoplasmatischen-Domäne verbunden. Im Gegensatz zu CEACAM1 besitzt CEACAM3 ein funktionelles ITAM-ähnliches Motiv in der zytoplasmatischen Domäne (Reth 1989; Cambier 1995; Chen et al. 2001), die ähnliche Funktionen wie die der Fc Rezeptoren übernimmt. Die Interaktion von CEACAM3 mit Opa_{CEA}-exprimierenden Gonokokken führt zu einer äußerst effektiven Internalisierung der gebundenen Bakterien. Der Phagozytosemechanismus gleicht sehr stark der Opsonin-abhängigen Internalisierung von Pathogenen über das ITAM des Fc γ -Rezeptors Fc γ RIIA (Daeron 1997). Die Phagozytose über CEACAM3 hängt von der Phosphorylierung der ITAM-ähnlichen Sequenz durch Kinasen der Src-Familie ab (Futterer et al. 1998; McCaw et al. 2003) und führt zur Aktin-abhängigen Umordnung des Zytoskeletts unterhalb der Bakterien (Billker et al. 2000; McCaw et al. 2003). Die Umgestaltung der Aktinstrukturen ist für die Phagozytose essentiell, da pharmakologische Inhibitoren, wie z.B. Cytochalasin D, die Aufnahme der Gonokokken komplett inhibieren (Billker et al. 2000; McCaw et al. 2003) und dominant negative Versionen der kleinen GTPasen Rac und Cdc42, die Hauptregulatoren der Cytoskelettumordnung sind, mit der Phagozytose interferieren (Billker et al. 2002). Die Phagolysosome verschmelzen schnell mit spezifischen lysosomalen Membranproteinen (LAMP-2, McCaw et al. 2003), es kommt zur Ansäuerung des Lysosomen (Booth et al. 2003) und die Gonokokken werden effektiv abgetötet (Billker et al. 2000; Booth et al. 2003; McCaw et al. 2003).

CEACAM3 präsentiert daher eine neue Art von potentiellen phagozytischen Rezeptoren, die Opsonin-unabhängig CEACAM-bindende Bakterien abtöten.

1.6 Parallelen in der CEACAM-abhängigen Pathogenese von Gonokokken und den CEACAM-bindenden Pathogenen *Neisseriae meningitidis*, *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae*

Die Interaktion von Opa_{CEA}-exprimierenden Neisserien mit Proteinen der CEACAM-Familie ist nicht nur auf dieselbe Spezies beschränkt, sondern betrifft auch weitere spezifisch die Mukosa-kolonisierende gram-negative Pathogene. Kürzlich veröffentlichte Studien konnten zeigen, dass auch *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* mit den CEACAMs interagieren (1991) (Virji et al. 2000; Hill et al. 2001; Hill and Virji 2003).

Da in der vorliegenden Arbeit neben Versuchen mit Gonokokken auch Experimente mit *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* durchgeführt wurden, wird im folgenden die Epidemiologie und Pathogenese dieser humanspezifischen Erreger erläutert.

Neisseria meningitidis gehört ebenfalls zu der Familie der Neisseriaceae und besiedelt als fakultative Kommensale die Mukosa des oberen Respirationstraktes. Im Gegensatz zu den Gonokokkeninfektionen können auch Gesunde (10-20% der Bevölkerung) Meningokokkenträger sein und Mitmenschen infizieren). Dennoch besitzen beide humanpathogene Neisserien ein sehr ähnliches Repertoire an Virulenzfaktoren, das es ihnen erlaubt, mukosale Oberflächen zu kolonisieren. Dass sie dabei unterschiedliche Bereiche der Mukosa besiedeln, ist auf die Art der Transmission zurückzuführen und nicht auf eine Spezialisierung verschiedener Nischen. Während die Gonokokken durch Geschlechtsverkehr übertragen werden, verbreiten sich die Meningokokken durch Töpfcheninfektion und besiedeln deswegen vorwiegend den Bereich des Nasopharynx.

In seltenen Fällen kommt es zur Disseminierung der Meningokokken in die Blutbahn, in der die Bakterien aufgrund einer Polysaccharidkapsel vor Antikörpern und Komplementfaktoren des Immunsystems geschützt sind. Im Verlauf der Sepsis zerstören die Meningokokken Endothelzellen, es kommt zur Inflammation von Gefäßwänden und in 40% der Fälle überwinden die Meningokokken die Blut-

Hirnschranke. Die Bakterien befallen dann das zentrale Nervensystem und nach einer Inkubationszeit von 2-4 Tagen setzt die Meningokokken-Meningitis schlagartig ein. Vor allem Kinder und Erwachsene unter 30 Jahren sind hiervon betroffen und unbehandelt beträgt die Letalität 80%.

Im Gegensatz zu den Gonokokken besitzen die Meningokokken nur drei bis vier verschiedene opa loci, doch übernehmen die Opa Proteine der Meningokokken dieselben Funktionen wie die der Gonokokken. Darüber hinaus besitzt *Neisseria meningitidis* ein äußeres Membranadhäsion (Opc), welches eine ähnliche Größe, aber eine andere Struktur wie die Opa Proteine besitzt. Opc interagiert mit HSPGs und Vitronektin in analoger Weise wie Opa_{HSPG} und unterliegt ebenso der Phasenvariation (Virji et al. 1993; de Vries et al. 1998).

Vor allem die HSPG-abhängige-, Integrin-vermittelte Adhärenz der Neisserien erlaubt eine effiziente Invasion von primären Epithelzellen (Virji et al. 1994; Unkmeir et al. 2002). Zusätzlich induziert die Neisserieninfektion von primären Endothelzellen die NF-κB abhängige Expression von CEACAM1 (Muenzner et al. 2001). Erst dies erlaubt den Bakterien, sich an die Primärzellen zu binden und sie zu invadieren, da diese Zellen den Rezeptor im unstimulierten Zustand nicht auf der Oberfläche präsentieren (Muenzner et al. 2001). Dieser Mechanismus kann möglicherweise die Disseminierung beider Neisserien Spezies in das Blutssystem oder in andere Gewebe erleichtern. Dennoch, solange nicht weitere Studien mit polarisierten Endothelzellen durchgeführt werden, bleibt unklar, ob die Opa-abhängige Invasion von Endothelzellen über die apikale oder basolaterale Oberfläche erfolgt und ob die Transzytose durch eine intakte Endothelzellschicht möglich ist.

Moraxella catarrhalis ist ein Gram-negatives, aerob lebendes Diplococci, das in Kleinkindern und Babys rezidivierende Mittelohrentzündungen (otitis media) und in Erwachsenen mit chronischer obstruktiver Lungenkrankheit (COPD) Entzündungen des unteren Respirationstraktes hervorruft (Karalus and Campagnari 2000). In immunsupprimierten Patienten kann in seltenen Fällen die Infektion zu schweren invasiven Erkrankungen, wie z.B. Pneumonie, Endokarditis, Sepsis und Meningitis, führen (Catlin 1990; Daoud et al. 1996).

M. catarrhalis galt lange Zeit als harmloser Kommensale, daher ist über die pathogenen Eigenschaften und Virulenzfaktoren relativ wenig bekannt. In der Literatur werden die Moraxellen als kaum invasiv beschrieben, doch neueste

Forschungsergebnisse legen nahe, dass die Bakterien Adhäsine exprimieren, die es ihnen unter Umständen ermöglichen, ebenso wie die Gonokokken der Immunantwort des Wirtes zu entgehen, indem sie in die Epithelschicht der Mukosa penetrieren (van Alphen et al. 1995). Vor allem hoch-molekulare Oberflächenproteine, die sog. ubiquitären Oberflächenproteine A (UspA, (Klingman and Murphy 1994)), binden extrazelluläre Matrixproteine, wie Vitronektin und Fibronektin, und vermitteln die Adhärenz an Epithelzellen *in vitro* (Aebi et al. 1997; McMichael et al. 1998). Es sind zwei UspA Gene (*uspA1* und *uspA2*) identifiziert worden, die strukturell verwandte, aber funktionell unterschiedliche Proteine exprimieren. Interessanterweise gehören beide UspA-Proteine in die Familie der oligomeren *coiled-coiled* Adhäsine (Oca, Nicht-Pili-assoziierte-Adhäsine), deren Prototyp das YadA Adhäsion von *Yersinia enterocolitica* ist (Roggenkamp et al. 2003), welches zugleich Adhäsion (Hoiczyc et al. 2000) und Serumresistenz vermittelt (Balligand et al. 1985; Pilz et al. 1992; Visser et al. 1996). Dementsprechend wird die putative Funktion von UspA2 mit der Serumresistenz der Moraxellen in Zusammenhang gebracht (Lafontaine et al. 2000; Attia et al. 2005), während UspA1 für die Adhärenz an Epithelzellen des Wirtes verantwortlich zu sein scheint (McMichael et al. 1998).

Neueste Ergebnisse belegen, dass das UspA1 Protein ebenso wie die Opa Proteine der Gono- und Meningokokken zumindestens an ein Molekül aus der CEACAM-Familie binden kann. Wie Hill und Virji (Hill and Virji 2003) zeigen konnten, bindet und erkennt UspA1 *in vitro* das CEACAM1 Molekül. Obwohl die CEACAM-bindenden-Adhäsine der anderen Pathogenen und die UspA1 Proteine kaum Sequenzähnlichkeit besitzen, binden sie an eng begrenzte Bereiche oder überlappende „Adhäsiothope“ der N-terminalen Domäne von CEACAM1 (Virji et al. 1999; Virji et al. 2000; Hill et al. 2001). Für die vorliegende Arbeit sollte daher untersucht werden, ob das Bindungsspektrum UspA1-exprimierender Moraxellen neben CEACAM1 auch weitere Moleküle der CEACAM-Familie enthält und welchen Einfluss die Adhärenz auf die Interaktion mit humanen polymorphkernigen Granulozyten besitzt (s. Kapitel 3).

Die Gram negative bakterielle Spezies ***Haemophilus influenzae*** kolonisiert als fakultative Kommensale den Respirationstrakt des Menschen und ist ein wichtiger Erreger von lokalisierten und systemischen Infektionen. Die klinischen Isolate von *Haemophilus influenzae* werden in bekapselte (typisierbar) und nicht-bekapselte

(nicht-typisierbar) Bakterien, in Übereinstimmung mit ihrer Fähigkeit, eine Kapsel zu bilden, unterteilt. Neben den echten nicht-bekapselten Bakterien, denen die genetische Ausstattung für die Kapselbildung fehlt, unterliegen die Gene für die Biosynthese der Kapselbildung der typisierbaren *Haemophilus* auch der Phasenvariation. In Konvergenz zu der Pathogenese der Neisserien exprimiert *Haemophilus influenzae* eine IgA Protease und auch die Antigene- und Phasenvariation exponierter Oberflächenproteine ist besonders ausgeprägt.

Die typisierbaren *H. influenzae* rufen schwerwiegende Erkrankungen wie Bakteriämie und Sepsis in Neugeborenen hervor. Die Einführung von Vakkzinen gegen die bekapselten Bakterien haben zu einer drastischen Reduktion der Inzidenzen in Europa und Amerika geführt. Dennoch sind vor allem die nicht bekapselten Bakterien verantwortlich für eine Bandbreite an Erkrankungen (van Alphen et al. 1997). Klinische Isolate von nichtbekapselten *H. influenzae* werden vor allem nach disseminierten Infektionen von Otitis media, Pneumonie, Endokarditis, Bakteriämie und Meningitis isoliert (Foxwell et al. 1998). Sie sind für 20-30% aller Fälle der akuten otitis media von Kindern verantwortlich (Foxwell et al. 1998) und sie sind wie die Moraxellen für akute rezidivierende und persistierende Erkrankung in Patienten mit chronischer, obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) verantwortlich (Murphy and Apicella 1987; van Alphen et al. 1995).

Die Fähigkeit der nicht-bekapselten *Haemophilus influenzae*, mit der Schleimhaut oder der extrazellulären Matrix des Nasopharynx zu interagieren, ist für die Kolonisierung des Wirtes essentiell (Makela 1988; Falkow 1991; Westerlund and Korhonen 1993). Ein Großteil der Bakterien, die in den Respirationstrakt eindringen, wird vermutlich durch die Zilienbewegung des respiratorischen Epithels abgewehrt (*mukoziliäre Clearance*). *In vitro* Versuche legen daher nahe, dass die nicht-typisierbaren Pathogene hauptsächlich mit respiratorischen Epithelzellen interagieren, die keine oder strukturell-beschädigte Zilien besitzen (Read et al. 1991) oder aktiv die mechanische Abwehrmechanismen des Wirtes behindern, indem sie bakterielle Substanzen, wie z.B. das LOS, absondern (Denny 1974; Johnson and Inzana 1986; Read et al. 1991).

Haemophilus influenzae besitzt eine Vielzahl an Adhäsine, die wie bei den Gonokokken der Antigenen- und Phasenvariation unterliegen, daher kann *Haemophilus influenzae* im Verlauf der Infektion mit verschiedenen Rezeptoren auf

unterschiedlichen Zelltypen interagieren. Einige der bakteriellen Proteine interagieren mit N-Acetylneuraminsäure-enthaltenden Oligosacchariden des Mucin, doch konnte allerdings bislang kein Rezeptor identifiziert werden, der für die Invasion von Epithel- (St Geme et al. 1994) oder Endothelzellen (Virji et al. 1992) verantwortlich ist. Allerdings kann *Haemophilus influenzae* *in vitro* durch Paracytose Lungenepithelzellen überqueren (van Schilfgaarde et al. 1995), und *in vivo* konnten in Gewebeproben von Kindern mit persistierender Otitis media sowohl subepithelial als auch in Makrophagen ähnlichen Zellen nachgewiesen werden.

Eines der Adhäsine das Protein P5, das von typisierbaren und nicht typisierbaren *H. influenzae* exprimiert wird, bindet unter anderem auch an die Rezeptoren aus der CEACAM-Familie (Virji et al. 2000). Wiederum ist das auf Epithelzellen ubiquitär exprimierte CEACAM1 das erste Molekül der CEACAM-Familie, dessen Interaktion mit den *H. influenzae* nachgewiesen wurde. Das P5 Protein bindet in ähnlicher Weise wie die Opa Proteine an die N-terminale Domäne von CEACAM1 in einer Protein-Protein-Bindung (Virji et al. 2000). Bislang konnte nur die Adhärenz des P5 Proteins an CEACAM1 nachgewiesen werden, ob P5 exprimierende *H. influenzae* möglicherweise Rezeptoren der CEACAM-Familie missbrauchen, um Zellen zu invadieren, ist bislang nicht untersucht worden.

Erste Hinweise auf eine CEACAM-abhängige Invasivität von P5-exprimierenden *H. influenzae* liefert die Interaktion mit humanen, polymorphkernigen Granulozyten, die zu einer spezifischen Elimination des Pathogens führt. Da CEACAM1 spezifische Antikörper die Abtötung und damit die Phagozytose beeinträchtigte, scheint die CEACAM-abhängige Interaktion der Bakterien zumindestens mit den Granulozyten zu einer effektiven Internalisierung zu(Virji et al. 2000).

1.7 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die zelluläre Signaltransduktion vor allem in professionellen Granulozyten zu untersuchen, die durch die Interaktion der opaquen Adhäsionsproteine der Gonokokken mit den zellulären CEACAM Molekülen induziert werden. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Adhärenz der Gonokokken an CEACAM-exprimierende Zellen verschiedene Signalwege generiert, die letztendlich zur Internalisierung der Bakterien führt, doch konnte in diesem Zusammenhang die Funktionen der einzelnen Rezeptoren nicht geklärt werden.

Die Symptome der Gonorrhö manifestieren sich vor allem in einer massiven Infiltration von polymorphkernigen Granulozyten in das betroffene Gewebe. Die Interaktion der Gonokokken mit Neutrophilen ist daher ein sehr wichtiges Ereignis in der Pathogenese des Erregers.

Vorherige Arbeiten hatten begonnen, einzelne Aspekte dieser Interaktion auf molekularer Ebene zu untersuchen. Allerdings wurden die meisten Experimente mit Zellen durchgeführt, die mehrere Moleküle der CEACAM-Familie koexprimieren. Eine Differenzierung der durch die einzelnen CEACAMs induzierten Signalwege war daher nicht möglich.

Deshalb bestand das erste Projekt dieser Arbeit darin, ein Zellsystem zu etablieren, in dem die CEACAM Rezeptoren isoliert, ohne einen endogenen Hintergrund, exprimiert werden, damitso der Beitrag jedes Opa_{CEA}-bindenden Moleküls zur Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken untersucht werden kann.

In einem zweiten Projekt sollte vor allem die Funktion des CEACAM3 Rezeptors charakterisiert werden. Dieses Molekül ist in der CEACAM-Familie einzigartig, da es spezifisch nur auf polymorphkernigen Granulozyten exprimiert wird und als einzigen Ligand Opa Proteine der Gonokokken erkennt. In ersten Experimenten wurde die Funktionalität des Rezeptors charakterisiert und anschließend die Bedeutung des ITAM Motiv für die CEACAM3-abhängige Phagozytose der Gonokokken untersucht.

Abschließend sollten die Ergebnisse auf humane polymorphkernige Granulozyten übertragen werden und weitere Komponenten der CEACAM-abhängigen Signalkaskade identifiziert werden.

2 Die Opa_{CEA}-Proteine der pathogenen Neisserien induzieren eine Src-Kinasen-abhängige- oder Lipid-raft-vermittelte-Aufnahme über distinkte CEACAM-Isoformen

2.1 Einleitung

Die Interaktion der Gonokokken mit den Zellen der Schleimhaut ermöglicht dem Pathogen die Kolonisierung des Wirtes, initiiert aber auch eine für das Pathogen unvorteilhafte inflammatorische Antwort der befallenen Gewebeabschnitte. Professionelle Granulozyten infiltrieren als erste Zellen des Immunsystems die infizierten Areale und bekämpfen dort lokal die Infektion. Der Ausgang dieser Begegnung mag entscheidend für die Etablierung einer Gonokokkeninfektion oder der Eliminierung des Erregers sein, führt aber in vielen Fällen zu den spezifischen Symptomen der Gonorrhö. Der eitrige Ausfluss der während der Urethritis produziert wird, besteht vor allem aus polymorphkernigen Granulozyten (Neutrophilen), die erstaunlicherweise intrazellulär immer wieder morphologisch intakte Gonokokken aufweisen (Ward et al. 1972; Simons et al. 2005). Zudem kann die heftige Abwehrreaktion des Körpers ohne Antibiotikabehandlung in vielen Fällen die Persistenz der Erreger über Wochen oder teilweise Monate nicht verhindern und begünstigt so die Transmission des Erregers. Diese Beobachtungen führten zur intensiven Diskussionen, ob die Phagozytose der Gonokokken durch Neutrophile zur Kontrolle des Pathogens *in vivo* beiträgt oder ob intrazelluläres Überleben der Gonokokken die Disseminierung und Transmission fördert.

In Bezug auf diese Problematik vermag die Untersuchung der molekularen Vorgänge während der Phagozytose der Gonokokken durch professionelle Phagozyten entscheidende Einsichten gewähren.

Die Phagozytose von Pathogenen verläuft über einen Aktin-abhängigen Mechanismus, der durch die Interaktion von spezifischen Oberflächenrezeptoren der Phagozyten mit Liganden auf der Oberfläche der Partikel initiiert wird. Die phagozytischen Rezeptoren lassen sich dabei in folgende Kategorien einteilen. Die Phagozytose über die klassischen und wohl am bekanntesten Proteine, wie z. B die Fc γ - oder Komplementrezeptoren, erfordern eine indirekte, humorale Markierung der

fremden Partikel (Opsonierung) durch spezifische Antikörper oder Komplementfaktoren. Hingegen erkennen sog. *pattern-recognition-receptors* (PRR) Opsonin-unabhängig konservierte Motive auf der bakteriellen Oberfläche, die sog. *pathogenen-associated-molecular patterns* (PAMPs; Janeway 1992). Neben bekannten konservierten bakteriellen Motiven (PAMPs), wie z.B. Mannose in der Zellwand von Hefen, formylierte Peptide von Bakterien sowie Lipopolysaccharide und Lipoteichonsäuren auf der Zelloberfläche von Gram negativen und Gram positiven Bakterien, scheinen auch die Opa-Adhäsionsproteine der Gonokokken zu den PAMPs zu gehören. Zelluläre Rezeptoren (PRR), wie z.B. der Mannose Rezeptor oder auch Integrine (CD11b/CD18) oder wie im Fall der Gonokokken die CEACAM Proteine, interagieren mit diesen Oberflächenstrukturen.

Der Beitrag der CEACAM-Rezeptoren in der bakteriellen Interaktion mit den Granulozyten ist vermutlich komplex. Allein die Tatsache, dass Granulozyten drei der vier Opa-erkennenden Rezeptoren aus der CEACAM-Familie exprimieren, nämlich CEACAM1, CEACAM3 und CEACAM6, erschwert die Evaluierung der Phagozytose auf molekularer Ebene. Für *in vitro* differenzierte myelomonozytäre Zellen und primäre Granulozyten konnte gezeigt werden, dass die Phagozytose von Opa_{CEA}-exprimierender Gonokokken die Aktivierung von Protein-Tyrosinkinasen (PTK) der Src-Familie und die Stimulation der kleinen GTPase Rac benötigt (Hauck et al. 1998). Eben dieser Signalweg wird auch bei der CEACAM3-vermittelten Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken in transfizierte Epithelzelllinien induziert und ist stark an ein funktionelles *immunoreceptor tyrosin based activation motif* geknüpft (Billker et al. 2000; Billker et al. 2002; McCaw et al. 2003; McCaw et al. 2004). ITAM Sequenzen besitzen eine Schlüsselrolle für die Weitergabe aktivierender Signale in die Zelle. Man findet solche Sequenzmotive bei verschiedenen Immunrezeptoren, wie z.B. Untereinheiten des T- und B-Zell Rezeptors sowie bei Mitgliedern der Fc γ -Rezeptoren (Cambier 1995). In allen Fällen führt die Ligation der Rezeptoren zur Phosphorylierung der Tyrosinreste des ITAM und damit zur Rekrutierung von Effektorproteinen, die spezifisch über eine sogenannte Src-homology 2 (SH2) Domäne an die phosphorylierten Tyrosinreste binden und die zelluläre Antwort vermitteln. In dieser Hinsicht verhält sich das CEACAM3-Protein höchstwahrscheinlich wie ein *single chain phagocytic receptor* (Fc γ RIIA): nach Kreuzvernetzung der Rezeptoren wird das funktionelle ITAM über Kinasen der Src-

Familie phosphoryliert und initiiert in der Folge die kleinen GTPasen der Rho Familie den für die Phagozytose typischen Umbau des Zytoskeletts. Während bei der Opsonin-abhängigen Phagozytose über die Fc γ -Rezeptoren nach der Phosphorylierung des ITAMs die Signalweitergabe über die Syk-Kinase verläuft, scheint diese bei der CEACAM3-vermittelte Opsonin-unabhängigen Phagozytose von Gonokokken keine Rolle zu spielen (Hauck et al. 1998).

Es erscheint daher plausibel, dass auch in humanen Granulozyten die posttranslationale Modifikation von CEACAM3 über Kinasen der Src-Familie abläuft und der Rezeptor *in vivo* eine phagozytische Funktion übernimmt.

Opa_{CEA}-exprimierende Gonokokken, die nicht an CEACAM3 binden, könnten trotzdem unabhängig von einer vorherigen Opsonierung in die Granulozyten internalisiert werden und zwar über CEACAM1 und/oder CEACAM6. Der Beitrag dieser beiden Moleküle aus der CEACAM-Familie zur Opsonin-unabhängigen Phagozytose in die myeloiden Modellzellen ist noch nicht geklärt, da sie neben CEACAM3 koexprimiert werden. Erstaunlicherweise finden sich beide Moleküle in einem Komplex mit denselben Kinasen wie CEACAM3, obwohl sie keine ITAM-ähnliche Sequenz besitzen (Skubitz et al. 1995). Doch benötigt weder die CEACAM1- noch die CEACAM6- vermittelte Internalisierung von Opa_{CEA} Gonokokken in stabil transfizierte HeLa Zellen die kleine GTPase Rac (Billker et al. 2002) oder Kinasen der Src-Familie (McCaw et al. 2003; McCaw et al. 2004). Obwohl das CEACAM1 Molekül ein Transmembranprotein mit zytoplasmatischer Domäne ist, scheint die Internalisierung der Gonokokken über ähnliche Mechanismen abzulaufen wie die des GPI-verankerten CEACAM6 Proteins. Die Interaktion mit den Gonokokken induziert weder eine Phosphorylierung der Rezeptoren noch lässt sich die Internalisierung durch pharmakologische Inhibition der Src Kinasen beeinträchtigen (McCaw et al. 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der Src Kinasen für die CEACAM3-vermittelte Internalisierung von opaquen Gonokokken untersucht werden. In humanen 293T Epithelzellen, die endogen kein Mitglied der CEACAM-Familie exprimieren, konnte durch transiente Transfektion der CEACAM-Rezeptoren spezifisch die Signalwege und deren Bedeutung für die Phagozytose der Gonokokken untersucht werden. Vor allem für die CEACAM3-vermittelte

Internalisierung sind Protein-Tyrosinkinase (PTK) der Src-Familie eine zentrale Komponente der Signalkette, während die CEACAM6-vermittelte Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken in transient transfizierte Epithelzellen nur geringfügig durch die Inhibition der Src Kinase-Aktivität beeinträchtigt wird. Hingegen führt die Zerstörung von cholesterinreichen Membrandomänen in transient transfizierten Epithelzellen zu einer starken Inhibition der CEACAM6-, CEACAM1-, und CEACAM5-vermittelten Aufnahme von Gonokokken, beeinträchtigt aber nicht die CEACAM3-vermittelte Phagozytose.

2.2 Ergebnisse

2.2.1 Proteine der CEACAM-Familie internalisieren Opa_{CEA} Gonokokken mit unterschiedlicher Effizienz

Professionelle Phagozyten internalisieren Opa_{CEA}-exprimierende Gonokokken über Moleküle der CEACAM-Familie ohne vorherige Oponierung durch Komplementfaktoren oder Antikörper. Hier wird eine schnelle und einfache Methode vorgestellt, um die Effektivität und Spezifität der Gonokokkeninternalisierung in Granulozyten mit Hilfe der FACS-Analyse zu evaluieren. Dafür wurden humane, polymorphkernige Granulozyten mit FITC-markierten opaquen (Ngo Opa_{CEA}) bzw. nicht-opaquen (Ngo Opa⁻) Gonokokken für 15 Minuten infiziert. Die Granulozyten können als Zellpopulation anhand ihres *Forward*- und *Sideward-Scatter*-Profils erkannt werden. Anhand des Fluoreszenzsignals der markierten Bakterien können spezifisch die Granulozyten einer Population im FACS detektiert werden, die sowohl internalisierte als auch mit der Membran assoziierte Gonokokken aufweisen. Durch Zusatz des Farbstoffes Trypanblau, welcher nicht in die Granulozyten einzudringen vermag, konnte die Fluoreszenz der

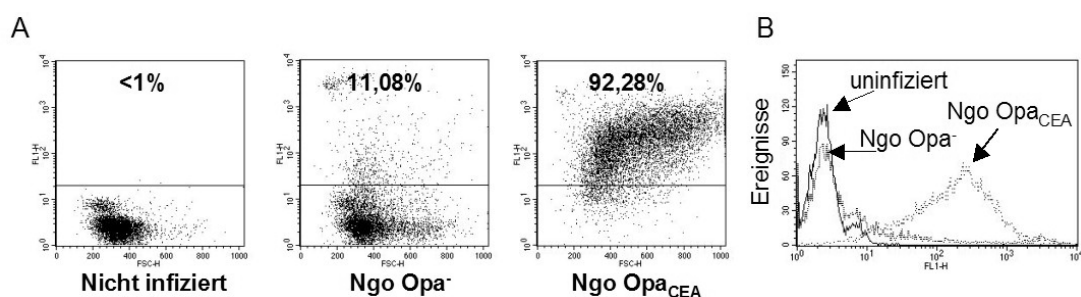


Abb. 2.1

Die Oponin-unabhängige Phagozytose von Gonokokken in humane Granulozyten beruht auf der Expression des bakteriellen Opa_{CEA}-Adhäsins. Isolierte humane Granulozyten wurden für 15 Minuten mit FITC-markierten, nicht-opaquen oder opaquen Gonokokken infiziert als Kontrolle dienten uninfizierte Zellen. Der Zusatz des Agens Trypanblau überdeckte das Fluoreszenzsignal assoziierter, extrazellulärer Bakterien und ermöglichte die ausschließliche Quantifizierung von Granulozyten mit intrazellulären Bakterien. (A) Bereits 15 Minuten nach Beginn der Infektion weisen mehr als 90% der Granulozyten intrazelluläre Opa_{CEA} Gonokokken auf, während nicht-opaque Bakterien kaum aufgenommen werden. (B) Die Ansicht der Ergebnisse im Histogramm verdeutlicht die starke und spezifische Fluoreszenzemission der internalisierten Opa_{CEA} Gonokokken. Die Grafik zeigt ein repräsentatives Experiment, welches mit ähnlichen Ergebnissen mit drei verschiedenen Blutspendern wiederholt wurde.

extrazellulären Bakterien selektiv unterdrückt und nur die Zahl der Granulozyten mit internalisierten Gonokokken ermittelt werden (Abb. 2.1 A und 2.1 B). Bereits nach 15 Minuten haben 90% der Zellen einer Granulozytenpopulation opaque Gonokokken internalisiert, während nicht-opaque Gonokokken in demselben Zeitraum nur von 11% der Zellen phagozytiert werden. Dieser erste Versuch bestätigt, dass Opa_{CEA}-exprimierende Gonokokken effizient Oponin-unabhängig phagozytiert werden, während nicht-opaque Gonokokken unter diesen Bedingungen kaum erkannt werden. Daher ist die Expression der bakteriellen Opa Proteine für die Oponin-unabhängige Phagozytose essentiell (Abb. 2.1 B).

Granulozyten koexprimieren drei der vier Opa_{CEA}-Adhäsionserkennenden CEACAM Proteine, nämlich CEACAM1, CEACAM3 und CEACAM6, deshalb ist es in diesen Zellen schwierig, den Beitrag der einzelnen Moleküle zur Phagozytose der Gonokokken auf molekularer Ebene zu untersuchen.

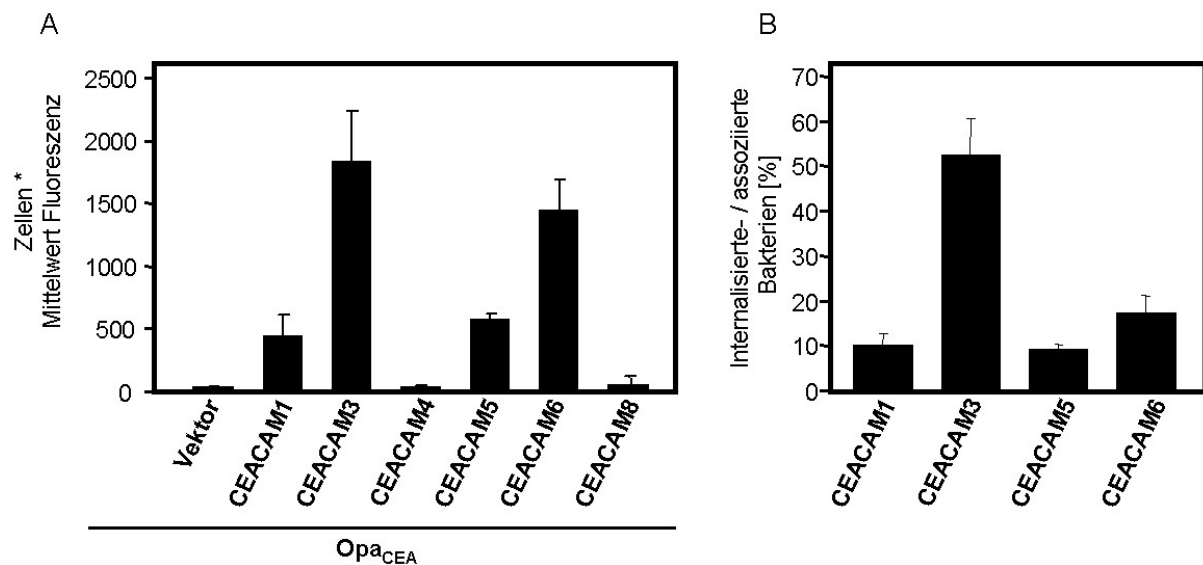


Abb. 2.2 **Opa_{CEA}-exprimierende Gonokokken werden am effizientesten über die CEACAM3-vermittelte Phagozytose internalisiert.** (A) 293T Zellen wurden mit dem kompletten Spektrum humaner CEACAMs transfiziert und mit Opa_{CEA}-exprimierenden Gonokokken für 1h infiziert. Alle Zellen, die Opa_{CEA}-bindende CEACAM Proteine exprimieren, können derartige Gonokokken internalisieren, wie die Analyse der Ansätze mittels FACS zeigt. (B) Die Effizienz der CEACAM-vermittelten Aufnahme wird durch den Quotient aus der Zahl der internalisierten und adhärenen Bakterien (nicht mit Trypanblau behandelt) in Relation zu den internalisierten Bakterien (Trypanblau behandelt) gebildet. Die Grafik zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Messungen pro Wert.

Erst der Einsatz von humanen 293 Epithelzellen, die endogen keine CEACAM exprimieren (Abb. 2.3) und sich zudem mit einfachen Mitteln transfizieren lassen,

erlaubt es, die Phagozytose-Effizienz des kompletten Spektrums menschlicher CEACAM Proteine miteinander zu vergleichen. Hierfür wurden 293 Epithelzellen, jeweils mit der cDNA für die Opa-bindenden CEACAMs, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 und CEACAM6 transient transfiziert und mit FITC-markierten Opa_{CEA} Gonokokken für eine Stunde infiziert. Als Kontrolle dienten der leere Expressionsvektor (pCDNA) sowie CEACAM4 und CEACAM8, die mit keinem bekannten Opa Protein interagieren. Die

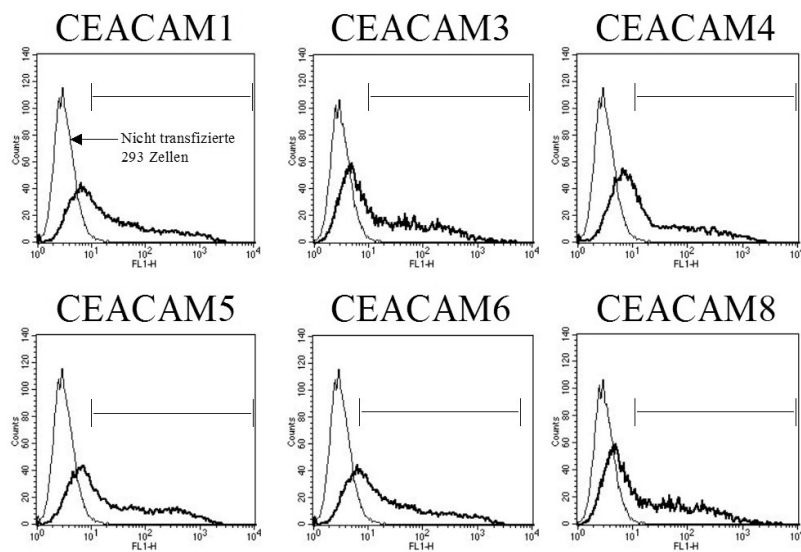


Abb. 2.3 **Effiziente Transfektion der CEACAMs in 239 Zellen.** Humane 293 Zellen wurden mit der cDNA der angezeigten CEACAMs transient transfiziert. Die Analyse erfolgte im FACS mit Maus monoklonalen α -CEACAM Antikörper und Hase α -Maus-Cy5 Antikörper als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen.

Analyse der Proben zeigte, dass nur die Opa-bindenden CEACAMs in der Lage sind, die Gonokokken zu internalisieren (Abb. 2.2 A). Doch zeigen die FACS Daten auch, dass

die Aufnahme der Bakterien über die CEACAM-Rezeptoren mit unterschiedlicher Effizienz abläuft. Während CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6 nur 10-20% der zellassoziierten Bakterien aufnehmen, befinden sich mehr als 50% der zellassoziierten Bakterien tatsächlich innerhalb CEACAM3-exprimierender Zellen (Abb. 2.2 B).

Die besonders effiziente Aufnahme der Opa_{CEA} Gonokokken über das granulozytische CEACAM3 Protein ist dabei nicht auf unterschiedliche Expressionsstärken der CEACAM Proteine zurückzuführen, denn die Oberflächenproteine wurden in allen transfizierten Zellen etwa gleich stark exprimiert

(Abb. 2.3). Aus diesen Befunden lässt sich ableiten, dass die CEACAM3-vermittelte Internalisierung scheinbar auf einem besonders effektiven Aufnahmemechanismus basiert.

2.2.2 Die CEACAM3-, aber nicht die CEACAM6-abhängige Internalisierung Opa_{CEA}-exprimierender Gonokokken beruht auf der spezifischen Stimulation von Kinasen der Src-Familie

In den nachfolgenden Experimenten soll vor allem der effiziente Aufnahmemechanismus über das CEACAM3 Protein im Vergleich zu den anderen Opa_{CEA}-bindenden CEACAMs untersucht werden. CEACAM3 ist insofern einzigartig, da es spezifisch nur auf Granulozyten exprimiert wird, nicht an homo- oder heterophilen Zell-Zell-Interaktionen mit anderen CEACAM Molekülen beteiligt ist und sein einzig bekannter Ligand das Opa_{CEA} Proteine der Gonokokken und Meningokokken ist. Die Erkenntnisse werden der CEACAM6-vermittelte Aufnahme gegenübergestellt, die höchstwahrscheinlich aufgrund der GPI Verankerung andere Signalwege und Mechanismen für die Internalisierung benötigt. Wie Hauck et al. 1998 bereits zeigen konnte, führt der Kontakt von Granulozyten mit Opa_{CEA}-exprimierenden Gonokokken zur zellulären Tyrosin-Phosphorylierung

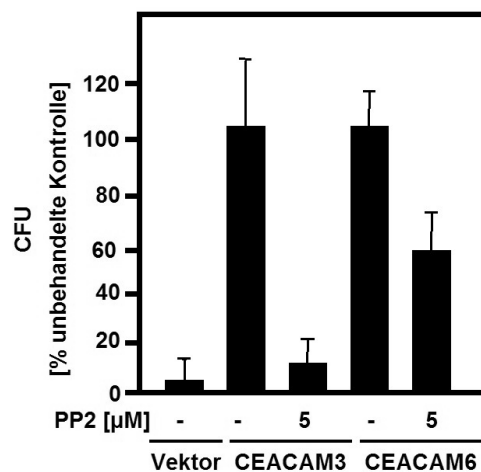


Abb. 2.4 **Die Inhibition von Kinasen der Src-Familie blockiert die CEACAM3-vermittelte Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken.** 293 Zellen wurden mit der cDNA für CEACAM3, CEACAM6 oder des entsprechenden Vektors transient transfiziert und in einem Gentamicin Assay eingesetzt. Die Zellen wurden vor der Infektion für 15 Minuten mit oder ohne 5 µM PP2 präinkubiert. Die Grafik zeigt die Zahl der lebensfähigen Bakterien in Prozent von drei unabhängigen Experimenten.

verschiedener Wirtsproteine vermittelt durch PTKs der Src-Familie. Um zu untersuchen, ob die CEACAM3-und/oder CEACAM6-vermittelte Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken die Stimulation von Kinasen der Src-Familie benötigt, wurden

293 Zellen mit der cDNA für CEACAM3, CEACAM6 oder des leeren Vektors (pCDNA) transfiziert. Vor der Infektion wurden die Zellen für 15 Minuten mit PP2 inkubiert. Der Einsatz von PP2 erlaubt es, spezifisch Signaltransduktionskaskaden zu unterbinden, die durch die Aktivierung von Kinasen der Src-Familie generiert werden. Die Infektion der Zellen erfolgt für eine Stunde mit 20 Bakterien pro Zelle (MOI) und die Zahl der internalisierten Bakterien wurde in einem Gentamicinassay ermittelt (Abb. 2.4 B).

Die Opa_{CEA}-exprimierenden Gonokokken werden ohne CEACAM-Rezeptor nur marginal internalisiert (Abb. 2.4). Dagegen ermöglicht die transiente Expression der CEACAM Proteine eine effektive Aufnahme Opa_{CEA}-exprimierender Gonokokken (Abb. 2.4). Der Einsatz von PP2 führt zu einer distinkten Beeinträchtigung der CEACAM-vermittelten Internalisierung der Bakterien. Die CEACAM6-abhängige Phagozytose wird durch die Blockade der Kinasen aus der Src-Familie deutlich schwächer inhibiert (25%) als die im Vergleich fast komplette Inhibition der CEACAM3-abhängigen Internalisierung (90%).

Die Internalisierung der Gonokokken über CEACAM3 scheint also deutlich stärker an die Kinasen der Src-Familie gekoppelt zu sein.

2.2.3 Die Src-SH2-Domäne bindet an die zytoplasmatische Domäne von CEACAM3 während der Aufnahme Opa_{CEA}-exprimierender Gonokokken

CEACAM3 ist, im Gegensatz zu dem GPI verankerten CEACAM6, in seiner am häufigsten vorkommenden Spleißvariante über eine Transmembrandomäne mit der Membran verbunden und verfügt über eine zytoplasmatische Domäne. Der C-terminale, zytoplasmatische Teil des CEACAM3 Proteins enthält zwei Tyrosinreste (Y231/241), die zusammen ein funktionelles *immunoreceptor tyrosin based activation motif* (ITAM) bilden.

ITAM Sequenzen spielen vor allem bei verschiedenen Rezeptoren des Immunsystems, wie z.B. dem T- und B-Zell Rezeptor oder Fc γ -Rezeptoren, eine zentrale Rolle in der Weiterleitung von positiv stimulierenden Signalen. Dabei initiiert die Phosphorylierung der Tyrosinreste der ITAM Sequenz durch Tyrosin-spezifische Proteinkinasen (vor allem Kinasen der Src-Familie) die Rekrutierung und Stimulation von weiteren SH2-Domänen enthaltenden Effektorproteinen.

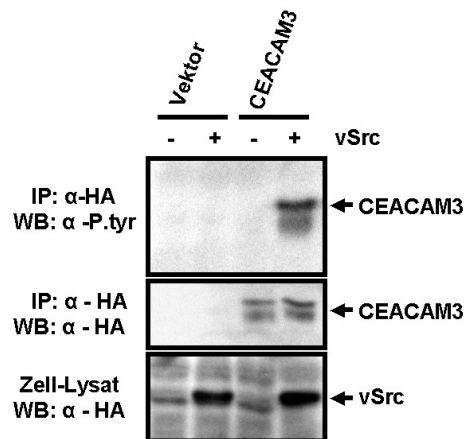


Abb. 2.5 **Hyperphosphorylierung der CEACAM3 ITAM-ähnlichen Sequenz durch die virale Src Kinase.** 293 Zellen wurden mit konstitutiv aktiven viralen Src (v-Src) und entweder dem leeren Kontrollvektor oder CEACAM3-HA kotransfiziert. Nach der Immunpräzipitation des Rezeptors wurden Duplikate des Ansatzes mit einem monoklonalen Maus α -Phosphotyrosin Antikörper (P.tyr; obere Abbildung) oder mit einem α -HA Antikörper (mittlere Abbildung) behandelt. Die Expression von v-Src wurde im Zell-Lysat durch α -v-Src Antikörper bestätigt (untere Abbildung).

Auch für das CEACAM3 Protein ist vorstellbar, dass Signalkaskaden durch die Phosphorylierung der Tyrosinreste innerhalb der ITAM-ähnlichen Sequenz generiert

werden. Indem 293T Zellen mit dem leeren Expressionsvektor oder CEACAM3 und einer konstitutiv-aktiven Form der Src Kinase (v-Src) kotransfiziert wurden, sollte geklärt werden, ob CEACAM3 durch Tyrosin-spezifische Kinasen phosphoryliert wird.

Abbildung 2.5 zeigt, dass *in vivo* CEACAM3 durch die v-Src hyperphosphoryliert wird. Die spezifische Phosphorylierung von CEACAM3 könnte erklären, weshalb die Inhibition von Kinasen der Src-Familie vor allem mit der CEACAM3-vermittelte Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken interferiert.

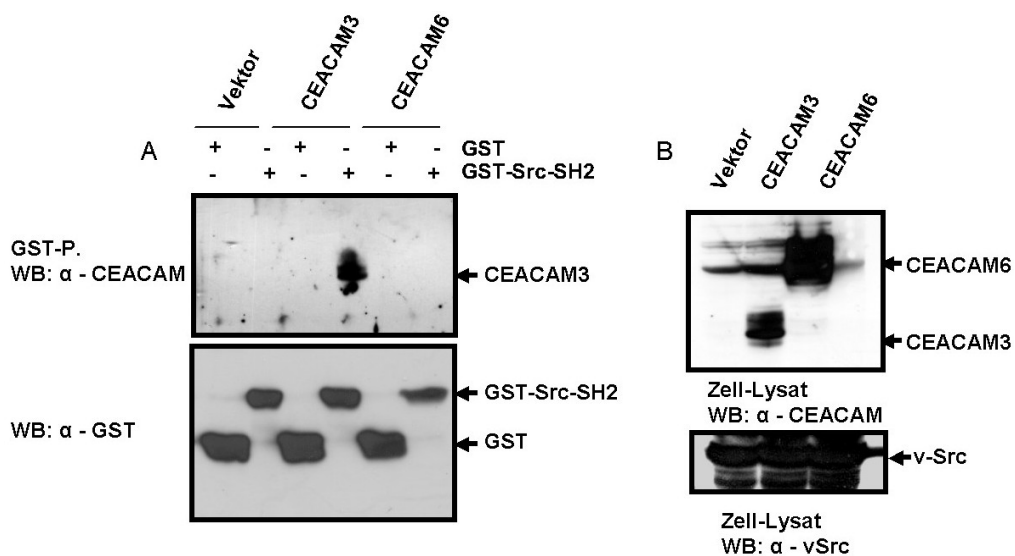


Abb. 2.6 **Die Src-SH2-Domäne bindet spezifisch an das phosphorylierte CEACAM3-ITAM.** 293 Zellen wurden mit konstitutiv aktiven viralen Src (v-Src) und entweder dem leeren Kontrollvektor oder CEACAM3 bzw. CEACAM6 kotransfiziert. Die Bindung der Src Kinase an das CEACAM3 Protein konnte mittels der GST-fusionierten SH2-Src Domäne nachgewiesen werden. Zell-Lysate wurden mit GST oder GST-Src-SH2-Fusionsprotein inkubiert und mittels Glutathione-Agarose präzipitiert. (A) Nach Blotten der Ansätze wurden die Präzipitate zum Nachweis der Rezeptoren mit monoklonalen α-CEACAM Antikörper behandelt (D14HD11; obere Abbildung) und gleiche Mengen der aufgereinigten Proteine mit einem monoklonalen α-GST Antikörper nachgewiesen (untere Abbildung). (B) Für die Präzipitation wurden gleiche Mengen an Lysat eingesetzt (D14HD11; oberer Blot) und die Expression des v-Src konnte durch einen monoklonalen v-Src Antikörper bestätigt werden (untere Abbildung).

Um zu überprüfen, ob die Kinasen aus der Src-Familie über ihre SH2-Domäne direkt mit CEACAM3 oder CEACAM6 interagieren können, wurden Zell-Lysate von Kontrollzellen (pCDNA), CEACAM3- oder CEACAM6-exprimierenden Zellen mit GST oder einem GST-Fusionsprotein der c-Src SH2-Domäne inkubiert, und nach der Präzipitation mit Glutathion-Agarose wurden die Proben mit α-CEACAM Antikörper analysiert. Interessanterweise präzipitiert nur das CEACAM3-Protein, aber nicht

CEACAM6 mit dem Src-SH2-GST Fusionsprotein (Abb. 2.6 A). Da das GST Protein nicht unspezifisch mit den Rezeptoren reagiert und gleiche Mengen an GST bzw. GST Fusionsprotein eingesetzt wurden (unterer Blot; Abb. 2.6 A), liegt eine spezifische Interaktion vor. Es ist wahrscheinlich, dass die CEACAM3-vermittelte Aufnahme von Gonokokken, im Vergleich zu CEACAM6 eine direkte Interaktion mit den Kinasen der Src-Familie benötigt. Dies kann durchaus ein Kriterium sein, um zwischen der CEACAM3- und CEACAM6-vermittelten Phagozytose auch in professionellen Granulozyten zu differenzieren.

2.2.4 Die CEACAM3-vermittelte Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken benötigt die Expression und Funktionalität von PTKs der Src-Familie

Um die wichtige Rolle der Src Kinasen für den Aufnahmemechanismus der CEACAM3-abhängigen Internalisierung der Gonokokken aus einer weiteren Richtung zu analysieren, wurde anstatt pharmakologischer Inhibitoren ein natürlicher, negativer Regulator der Src-Kinase-abhängigen Signaltransduktion in die Experimente der Opa_{CEA} -abhängigen Aufnahme miteinbezogen. Die C-terminale Src-

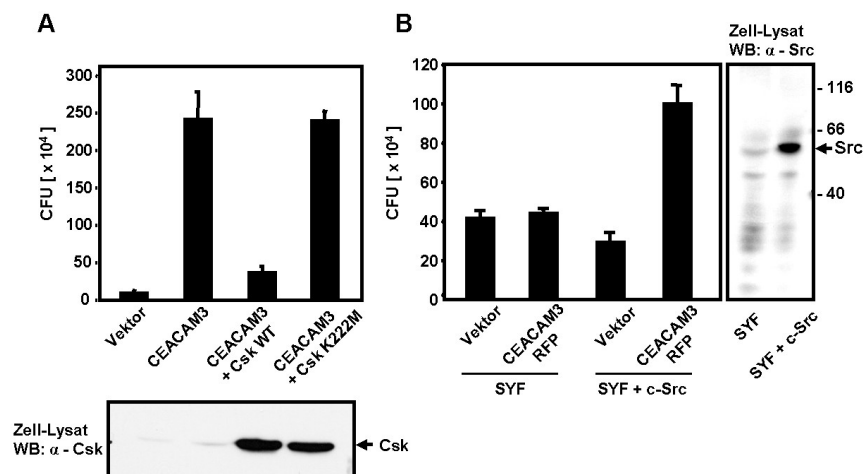


Abb. 2.7 **Tyrosinkinasen der Src-Familie sind für die CEACAM3-vermittelte Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken essentiell.** (A) CEACAM3-exprimierende Zellen kotransfiziert mit der C-terminalen Src Kinase (Csk WT) oder eine inaktiven Kinasemutante (Csk K222M) wurden für eine Stunde mit Opa_{CEA} -exprimierenden Gonokokken infiziert und in einem Gentamicinassay eingesetzt. Die Expression des Csk-Proteins wurde im Western-Blot mit einem monoklonalen Maus α -Csk Antikörper nachgewiesen. (B) Maus Fibroblasten defizient in den Kinasen Src, Yes, Fyn (SYF^{-/-}) und c-Src reexprimierende Zellen (SYF + c-Src) sind CEACAM-RFP oder dem leeren Kontrollvektor (pDS) transfiziert worden. Die Zellen wurden für eine Stunde mit Opa_{CEA} -exprimierende Gonokokken infiziert und in einem Gentamicinassay eingesetzt. Beide Grafiken zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten, die in Triplets durchgeführt wurden. Im Western-Blot der Zell-Lysate wurden mit dem α -Src Antikörper die Reexpression der c-Src Kinase kontrolliert

Kinase (Csk) phosphoryliert Kinasen der Src-Familie normalerweise an einem C-terminalen Tyrosinrest und führt so zu einer intramolekularen Assoziation der SH2-Domäne mit dem C-Terminus und damit einer sterischen Blockade der Tyrosinkinaseaktivität der Src Kinasen. Die Koexpression der C-terminalen Kinase in humanen 293 Zellen mit der cDNA des CEACAM3 Rezeptor beeinträchtigt die

CEACAM3-vermittelte Internalisierung der Gonokokken deutlich (Abb. 2.7 A). Wird hingegen eine inaktive Mutante der C-terminalen Src Kinase, die keine enzymatische Kinase-Aktivität mehr besitzt (Csk K222M), kotransfiziert, so wird die Aufnahme über CEACAM3 nicht beeinflusst (Abb. 2.7 A).

Der Einsatz von genetisch manipulierten Fibroblasten aus der Maus, die keine für diese Zellen typischen Kinasen der Src-Familie exprimieren (Src, Yes und Fyn defizient - SYF^{-/-}; (Klinghoffer et al. 1999), ermöglicht es, die Bedeutung der Src Kinasen für die CEACAM-abhängige Phagozytose auch in einem genetisch-defizienten Hintergrund zu betrachten.

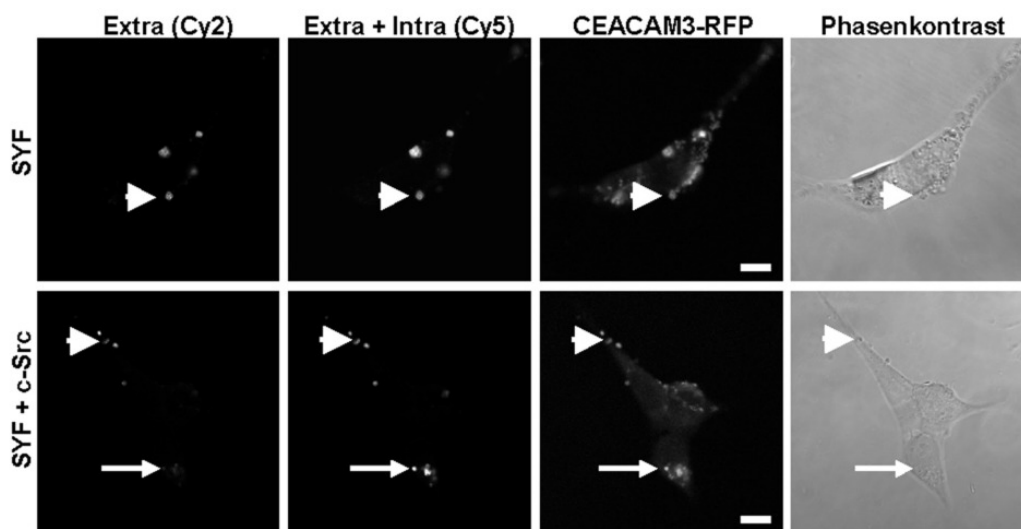


Abb. 2.8 **CEACAM3-transfizierte, SYF^{-/-}-defiziente Zellen internalisieren keine Gonokokken.** SYF^{-/-} und SYF^{-/-} + c-Src Fibroblasten transfiziert mit CEACAM3-RFP wurden, wie unter Abb. 2.7 B beschrieben infiziert. Nach der Fixierung wurden die extrazellulären Bakterien (Pfeilkopf) vor der Permeabilisierung der Zellen mit einem polyklonalen Hase α Gonokokken Antikörper und einem Ziege α -Hase-Cy2 Antikörper (Extra-Cy2) angefärbt. Nach der Permeabilisierung wurden extra- und intrazelluläre Bakterien (Pfeile) mit einem polyklonalen Hase α -Gonokokken- und Ziege α -Hase-Cy5 Antikörper (Extra+Intra-Cy5) angefärbt. CEACAM3-exprimierende Zellen konnten anhand der roten Fluoreszenz des RFP-Proteins detektiert werden.

Die Fibroblasten wurden transient mit der cDNA von CEACAM3-RFP transfiziert, wobei die Fusion des Rezeptors mit dem *red-fluorescent-protein* (RFP) die eindeutige Identifizierung der transfizierten Zellen im Mikroskop erlaubt. In 293 Zellen hatte die Fusion des RFP Proteins an die zytoplasmatische Domäne von CEACAM3 keinen negativen Einfluss auf die Funktionalität des Rezeptors und die Internalisierung der Gonokokken. Die Ansätze wurden für eine Stunde mit Opa_{CEA}-exprimierenden Gonokokken infiziert und die Zahl der internalisierten Bakterien

durch einen Gentamicinassay ermittelt. Ohne Kinasen der Src-Familie ist keine spezifische CEACAM3-abhängige Internalisierung der Gonokokken zu beobachten, während rekonstituierte Zellen, die c-Src reexprimieren, durchaus zu einer spezifischen Internalisierung der Gonokokken fähig sind (Abb. 2.7 B).

Die CEACAM3-vermittelte Internalisierung der Gonokokken in infizierte Fibroblasten wurde des Weiteren durch differentielle Markierung der intra- und extrazellulären und Bakterien und mikroskopischer Analyse bestätigt. In SYF^{-/-}-Zellen ist eine Anheftung der Bakterien an die Zelle und die Rekrutierung des RFP gekoppelten Rezeptors zu beobachten, aber keine Internalisierung der Bakterien (Abb. 2.8). Hingegen sind in CEACAM3-RFP exprimierenden, mit c-Src rekonstituierten SYF^{-/-}- Zellen (SYF^{-/-} + c-Src) sowohl adhärierende extrazelluläre Bakterien als auch internalisierte Bakterien zu entdecken (Abb. 2.8).

2.2.5 Die CEACAM6-abhängige, aber nicht die CEACAM3-vermittelte Internalisierung von Op_{CEA} -exprimierender Gonokokken beruht auf der Integrität von cholesterinreichen Membran-Mikrodomänen

Die unterschiedliche Membranverankerung von CEACAM3 und CEACAM6 ist repräsentativ für die gesamte CEACAM-Familie. CEACAM3 sowie CEACAM4 und CEACAM1 sind über eine Transmembran-Domäne in der Membran verankert. Hingegen sind CEACAM6, wie CEACAM5 und CEACAM8, über einen Glykosylphosphatidylinositolanker (GPI)-Anker mit der Membran verbunden. GPI verankerte Proteine kommen häufig in spezialisierten Arealen der Zellmembran vor, den sog. Mikrodomänen oder *lipid rafts*.

Um zu untersuchen, ob auch die GPI-verankerten Proteine der CEACAM-Familie in Mikrodomänen organisiert sind und ob diese spezialisierten Membranareale an der Aufnahme von Op_{CEA} Gonokokken beteiligt sind, wurden 293 Zellen mit CEACAM3, CEACAM6 oder einem leeren Kontrollvektor transfiziert. Vor der Infektion der Zellen

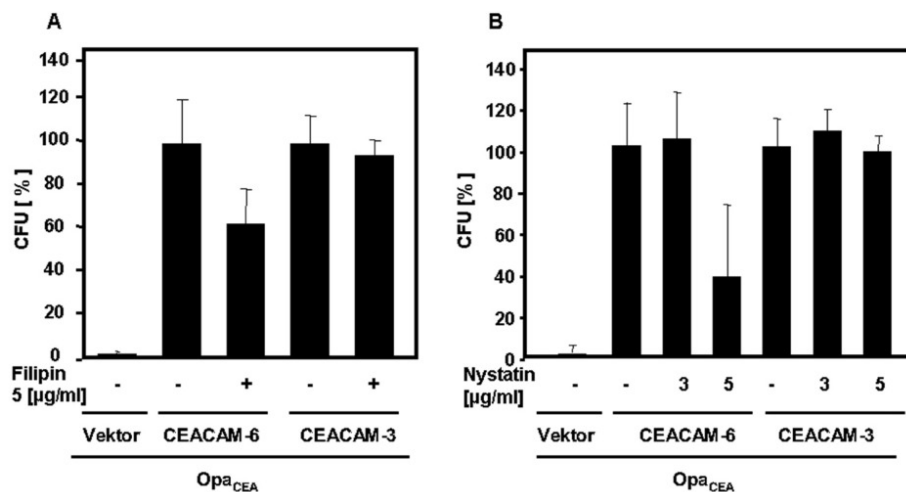


Abb. 2.9

Die Zerstörung von cholesterinreichen Mikrodomänen inhibiert die CEACAM6-, aber nicht die CEACAM3-vermittelte Aufnahme der Gonokokken. CEACAM3, CEACAM6 oder mit leerem Vektor transfizierte Zellen wurden in einem Gentamicinassay eingesetzt. (A) Die Zellen wurden für 15 Minuten vor der Infektion mit 5µg/ml Filipin inkubiert. Der Graph zeigt in Prozent die Zahl der internalisierten Bakterien in Relation zu den unbehandelten Zellen. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, die in Triplets durchgeführt wurden. (B) CEACAM3- und CEACAM6-transfizierte Zellen wurden mit der angezeigten Konzentration von Nystatin vor der Infektion präinkubiert. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, die in Triplets durchgeführt wurden.

wurden die Ansätze 15 Minuten mit den indizierten Konzentrationen der Cholesterol-Chelatoren Filipin oder Nystatin präinkubiert, anschließend wurde die Zahl der internalisierten Bakterien in einem Gentamicinassay ermittelt. Beide pharmakologischen Inhibitoren zerstören spezifisch die Integrität der cholesterinreichen Membranmikrodomänen und verhindern so die Kontinuität dieser Membranareale.

Nystatin und Filipin beeinträchtigen spezifisch die CEACAM6-vermittelte Internalisierung Opa_{CEA}-exprimierender Gonokokken, hingegen wird die Aufnahme in die CEACAM3-exprimierenden Zellen durch keinen der beiden Inhibitoren beeinflusst (Abb. 2.9 A und B).

Daher scheint vor allem das GPI-verankerte CEACAM6 Molekül mit Cholesterinreichen Mikrodomänen assoziiert zu sein und weist diesen spezifischen Membranarealen eine wichtige Rolle in der CEACAM6-vermittelten Aufnahme von Bakterien in Epithelzellen zu.

2.2.6 Die Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken über epitheliale CEACAMs benötigt cholesterinreiche Mikrodomänen

Da die CEACAM6-vermittelte Internalisierung durch Cholesterin-depletierende Reagenzien blockiert wurde, stellt sich die Frage, ob die Aufnahme der Gonokokken über die in Epithelzellen exprimierte CEACAM Proteine, wie CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6,

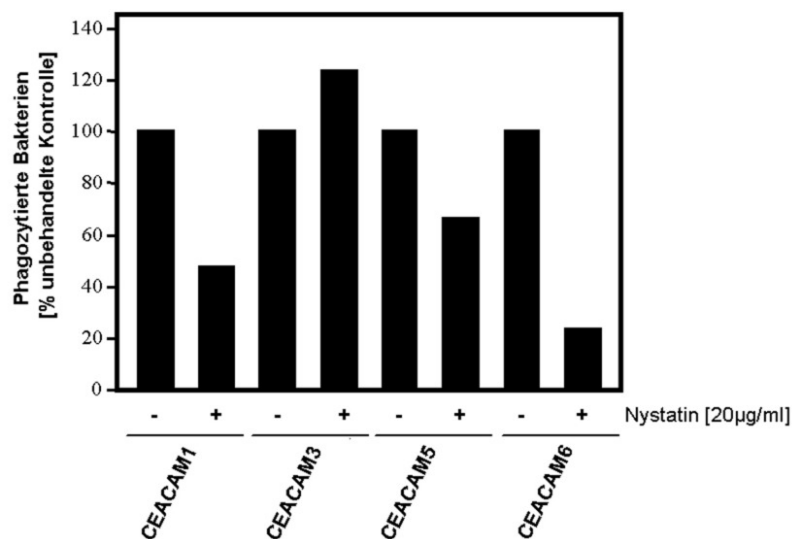


Abb. 2.10 **Epitheliale CEACAMs internalisieren Gonokokken über cholesterinreiche Mikrodomänen.** 293 Zellen wurden mit allen Opa-erkennenden CEACAMs transfiziert und für 1h mit FITC markierten Opa_{CEA} Gonokokken infiziert. Anschließend wurde die Zahl der internalisierten Bakterien mit Hilfe der FACS Analyse bestimmt. Die Grafik zeigt ein repräsentatives Beispiel und die Werte beziehen sich auf die unbehandelte Positiv Kontrolle.

generell über Mikrodomänen abläuft oder dies nur die GPI-verankerten, Opa_{CEA}-bindenden Moleküle der CEACAM-Familie betrifft.

Im Rahmen der Fragestellung wurden die Rezeptoren in 293 Zellen transfiziert und die Zahl der internalisierten Opa_{CEA} Gonokokken nach einer Stunde Infektion in Gegenwart von 20 µg/ml Nystatin in der FACS-Analyse ausgewertet. Wiederum hatte der Cholesterin-Chelator keinen Einfluss auf die CEACAM3-vermittelte Internalisierung, aber inhibierte die Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken über das CEACAM6-Protein (Abb. 2.10). Erstaunlicherweise interferierte das Agens nicht nur mit der Gonokokkeninternalisierung über das ebenfalls GPI-verankerte CEACAM5-Molekül, sondern beeinträchtigte auch die CEACAM1-abhängige Internalisierung

(Abb. 2.10). Obwohl die Inhibition der Phagozytose durch Nystatin über CEACAM1 (55%) und CEACAM5 (40%) im Vergleich zu CEACAM6 (80%) unterschiedlich stark beeinflusst wurde, behindert die Entfernung des Cholesterin aus der Membran auf jeden Fall die Aufnahme über die normalerweise epithelial exprimierten CEACAMs.

2.2.7 Die Internalisierung Opa_{CEA}-exprimierender Gonokokken durch Granulozyten wird nicht durch Cholesterin-Chelatoren beeinflusst

Die Internalisierung von Bakterien über verschiedene CEACAM-Isoformen differiert stark in Bezug auf die an der Aufnahme beteiligten biochemischen Komponenten. Prinzipiell scheint die Internalisierung über die epithelialen CEACAMs eher über cholesterinreiche Mikrodomänen abzulaufen, trotz der Transmembrandomäne von CEACAM1, wohingegen das Granulozyten-spezifische CEACAM3 Molekül eindeutig Kinasen der Src-Familie für die Aufnahme von Gonokokken benötigt.

Die Initiation unterschiedlicher Signalwege legte die Vermutung nahe, dass dies eine Methode sein könnte, um auch *in vivo* den Beitrag der verschiedenen Proteine an der Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken zu untersuchen. Daher wurden primäre humane Granulozyten isoliert und vor der Infektion mit FITC-markierten Gonokokken, mit verschiedenen Konzentrationen der pharmakologischen Inhibitoren PP2 (Abb. 2.11 A) oder Nystatin (Abb. 2.11 B) für 15 Minuten vorbehandelt. In beiden Experimenten dienten nicht-opaque, nicht-pilierte FITC markierte Gonokokken (Opa⁻, Pili⁻) als Negativkontrolle. Während diese von den PMNs nicht internalisiert werden, inhibiert der Einsatz von PP2 konzentrationsabhängig die Phagozytose der Opa_{CEA} Gonokokken (Abb. 2.11 A). Die von Src Kinasen vermittelte Phosphorylierung an Tyrosinresten von Wirtsproteinen ist daher ein zentraler Bestandteil der CEACAM-vermittelten Gonokokkenphagozytose.

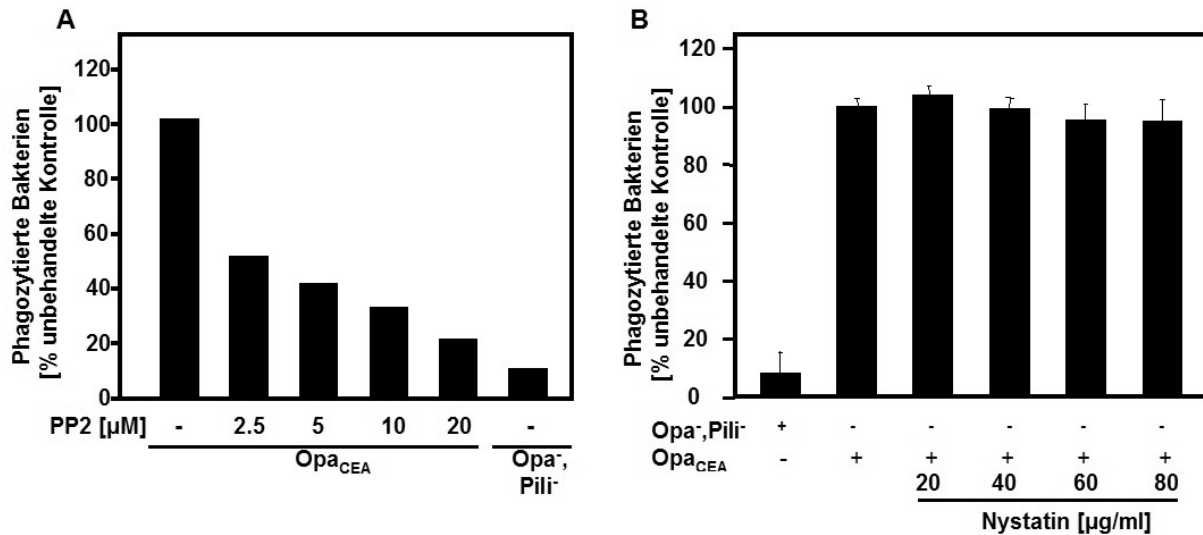


Abb. 2.11 **Die Aufnahme von Gonokokken in primäre Granulozyten verläuft über die CEACAM3-vermittelte Phagozytose.** Isolierte humane Granulozyten wurden für 15 Minuten mit den indizierten Konzentrationen von PP2 (A) oder Nystatin (B) präinkubiert und anschließend mit FITC markierten nicht-opaquen, nicht-pilierten oder mit opaquen Gonokokken für 15 Minuten infiziert. (A) Die Phagozytose der FITC markierten OpacEA Gonokokken wird dosisabhängig inhibiert. Die Werte repräsentieren die Prozentzahl an Granulozyten mit internalisierten, FITC-markierten Bakterien eines repräsentativen Experimentes. Ähnliche Resultate wurden mit drei verschiedenen Spendern erhalten. (B) Nystatin hat keinen Einfluss auf die Prozentzahl an Granulozyten mit internalisierten FITC-markierten Bakterien. Das Diagramm zeigt den Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Schon bei einer Konzentration von 2,5µM reduziert PP2 die Oposonin-unabhängige Aufnahme der OpacEA-exprimierenden Gonokokken um mehr als 50% und ist damit vergleichsweise ähnlich sensitiv gegenüber der Inhibition von Kinasen der Src-Familie wie die CEACAM3-vermittelte Internalisierung in 293 Zellen (Abb. 2.4 B).

Obwohl Nystatin bei einer Konzentration von 20 µg/ml die Aufnahme der Gonokokken in CEACAM1-, CEACAM5- und CEACAM6-exprimierende 293 Zellen distinkt blockiert (Abb. 2.10), hat der Cholesterin Chelator auf die Oposonin-unabhängige Phagozytose von OpacEA Gonokokken in Granulozyten auch bei einer hohen Konzentration von 80 µg/ml keinen Effekt.

Daher scheint tendenziell die Erkennung und Eliminierung CEACAM-bindender Pathogene in den Zellen der unspezifischen Immunabwehr vor allem auf der CEACAM3-vermittelten Phagozytose zu beruhen.

2.3 Diskussion

Professionelle Phagozyten des Immunsystems bilden die erste Verteidigungslinie gegen Mikroorganismen, indem PMNs, Makrophagen oder Monozyten Pathogene phagozytieren und eliminieren.

Granulozyten sind in der Lage, mittels Phagozytose Partikel (> 1µm), wie z.B. Bakterien oder apoptotische bzw. nekrotische Zellen, zu internalisieren. In den meisten Fällen verläuft die Phagozytose der Partikel indirekt über Opsonin-abhängige Rezeptoren, wie Fcγ- oder Komplementrezeptoren. Hingegen können die Opa_{CEA}-exprimierende Gono- und Meningokokken zusätzlich über Moleküle der CEACAM-Familie direkt internalisiert werden, also Opsonin-unabhängig ohne Markierung durch Komplementfaktoren oder Antikörper (Chen and Gotschlich 1996; Virji et al. 1996; Gray-Owen et al. 1997).

Die Granulozyten sind für die Interaktion mit Opa_{CEA} Gonokokken bestens ausgestattet, da sie drei der vier Opa-bindenden CEACAM Proteine, nämlich CEACAM1 und CEACAM6 sowie den nur in diesem Zelltyp exprimierten CEACAM3, exprimieren. Dies erlaubt ihnen mit dem kompletten Spektrum an Opa_{CEA}-Adhäsinen der Gonokokken und Meningokokken sowie mit weiteren humanspezifischen, CEACAM-erkennenden Bakterien zu interagieren (Chen and Gotschlich 1996; Virji et al. 1996; Gray-Owen et al. 1997). Die CEACAM-abhängige Internalisierung der Gonokokken ermöglicht dem Pathogen aber auch die Invasion in Epithelzellen und die Überquerung der epithelialen Barriere mittels Transzytose.

Die Gonokokkenpathogenese wird seit Jahrzehnten untersucht, trotzdem bleibt die Bedeutung der Interaktion des Pathogens mit den Zellen der unspezifischen Immunabwehr unklar. Vor allem die Frage, ob die symptomatische inflammatorische Immunreaktion die Bakterien eliminiert oder letztendlich deren Persistenz und damit die Transmission fördert, ist umstritten. Doch alleine die Tatsache, dass unbehandelte Gonokokkeninfektionen eliminiert werden, lässt eine wichtige Rolle der unspezifischen Immunabwehr vermuten.

Daher kann ein besseres Verständnis der Internalisierungsmechanismen über die verschiedenen CEACAM Proteine und der daran beteiligten Signalwege helfen, den Infektionsverlauf besser zu verstehen.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe der FACS-Analyse eine einfache und schnelle Methode etabliert werden, um die Opsonin-unabhängige Internalisierung von Opa_{CEA} über die CEACAMs sowohl in transient transfizierten Epithelzellen (Abb. 2.2 A) als auch in primären Granulozyten (Abb. 2.1) zu quantifizieren. Die humane Zell-Linie 293, welche endogen kein Mitglied der CEACAM Proteine exprimiert, lässt sich mit hoher Effizienz transfizieren (Abb. 2.3). So konnten die Bindungseigenschaften der gesamten CEACAM-Familie getrennt voneinander und ohne verfälschenden Hintergrund untersucht werden.

Die Ergebnisse bestätigen vorherige Forschungsarbeiten, dass die effiziente Aufnahme der Gonokokken auf der Expression des bakteriellen Opa_{CEA}-Adhäsins sowie unabhängig vom Zelltyp auf der Expression der CEACAM Proteine beruht (Chen and Gotschlich 1996; Virji et al. 1996; Bos et al. 1997; Gray-Owen et al. 1997). So werden nicht-opaque Gonokokken ohne vorherige Opsonierung nicht internalisiert (Abb. 2.1) und nur die Opa_{CEA}-bindenden CEACAMs, CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 und CEACAM6 interagieren mit diesem bakteriellen Phänotyp (Abb. 2.2 A). Ob die Internalisierung über die CEACAM Proteine vorteilhaft für die Gonokokken ist, bleibt ungeklärt, für die *in vivo* Infektion von Menschen scheint die Expression der Opa_{CEA}-Adhäsine eine Notwendigkeit zu sein, da 90% der klinischen Gonokokkenisolate diese exprimieren (James and Swanson 1978; Swanson et al. 1988).

Der Einsatz des Farbstoffes Trypanblau in der FACS-Analyse erlaubte es distinkt zwischen der Gesamtmenge an assoziierten Bakterien und der Menge an internalisierten Bakterien zu unterscheiden. Daher konnte zumindest bei den transient transfizierten Epithelzellen die Effizienz der CEACAM-abhängigen Internalisierung bestimmt werden (Abb. 2.2 B). Die Ergebnisse belegen, in Übereinstimmung mit McCaw et al. (2004), dass die Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken über verschiedene CEACAM Proteine mit unterschiedlicher Effizienz abläuft. Vor allem das granulozytäre CEACAM3, dessen einzige bekannten Liganden Opa-Adhäsine der Gonokokken sind, internalisiert die Gonokokken am wirkungsvollsten (Abb. 2.2 B). Bis zu 50% der assoziierten Gonokokken befinden sich innerhalb der Epithelzellen, während CEACAM1-, CEACAM5- und CEACAM6-transfizierte Zellen nur 10-20% der Bakterien internalisieren. Die Variation in der Aufnahmeeffizienz sind dabei nicht auf unterschiedliche Expressionsstärke der

Proteine zurückzuführen, da in der FACS Analyse ungefähr gleiche Mengen an CEACAM Protein auf der Zelloberfläche detektiert wurden (Abb. 2.3).

Das Ergebnis belegt, dass trotz der unterschiedlichen Aufnahmeeffizienz die Opa_{CEA} Gonokokken prinzipiell mit dem kompletten Spektrum Opa_{CEA}-erkennender CEACAMs interagieren können. Infolgedessen ermöglicht gerade das breit gefächerte Expressionsspektrum der CEACAM-Familie die Interaktion mit fast jedem Zelltyp während der Gonokokkeninfektion. Während CEACAM1 fast ubiquitär auf allen Zelltypen exprimiert wird, finden sich CEACAM5 und CEACAM6 verstärkt auf epithelialen Gewebe. Hingegen wird CEACAM3 ausschließlich auf Granulozyten (Thompson et al. 1991) exprimiert, die zusätzlich CEACAM1 und CEACAM6 bilden. In dieser Hinsicht stellt sich die Frage, ob die Qualität der Aufnahme Einfluss auf den Infektionsverlauf hat. Trotz der relativ niedrigen Aufnahmeeffizienz führt *in vitro* die Interaktion von Opa_{CEA} Gonokokken mit CEACAM1-, CEACAM5- oder CEACAM6-exprimierenden Epithelzellen zur Transzytose und/oder Invasion des Pathogens (Chen and Gotschlich 1996; Virji et al. 1996; Bos et al. 1997; Gray-Owen et al. 1997; Wang et al. 1998). Alle drei Moleküle werden hauptsächlich auf Zellen der Schleimhaut exprimiert, also den Gewebearealen, welche die Gonokokken zuerst kolonisieren (Prall et al. 1996; Ogihara and Kato 2000). Es ist daher denkbar, dass auch *in vivo* die Interaktion mit den eher epithelial exprimierten Molekülen der CEACAM-Familie die Kolonisierung des Wirtes begünstigt.

Die effektive CEACAM3-vermittelte Internalisierung der Gonokokken und die Expression des Proteins ausschließlich auf professionellen Phagozyten lassen eine Rolle in der Immunabwehr plausibel erscheinen. Dennoch finden sich gerade *in vivo* immer wieder morphologisch intakte Bakterien im Zytoplasma oder innerhalb der Phagolysosomen der Granulozyten (Ward et al. 1972; Simons et al. 2005). Die Komplexität der CEACAM-Expression auf den Granulozyten erschwerte es bislang, die Bedeutung der unspezifischen Immunabwehr auf die Gonokokkenpathogenese genauer zu untersuchen.

In ersten Experimenten wurden daher vor allem die molekularen Vorgänge während der CEACAM3-vermittelten Aufnahme von Gonokokken und insbesondere die Rolle der Src Kinasen untersucht. Die Ergebnisse könnten dann helfen, Methoden zu entwickeln, um die Aufnahme der Gonokokken über einzelne CEACAMs selektiv zu inhibieren und dementsprechend die Bedeutung der CEACAM-vermittelten Phagozytose in Granulozyten zu erforschen.

Eine mögliche Erklärung für die Effektivität der CEACAM3-vermittelten Aufnahme von Gonokokken könnte in der Spezifität der generierten Signaltransduktionskaskade liegen. Frühere *in vitro* Versuche weisen darauf hin, dass die Interaktion der CEACAMs mit dem Pathogen eine starke Tyrosin-abhängige Phosphorylierung verschiedener Wirtsproteine induziert (Hauck et al. 1998). Die Phosphorylierung von Tyrosinen in der Signaltransduktion ist ein weitverbreiteter Regulationsmechanismus für die Aktivierung und Rekrutierung von Effektorproteinen. Dabei binden Proteine über distinkte Domänen an phosphorylierte Tyrosinreste eines weiteren Proteins. Die Phosphorylierung erfolgt durch Tyrosin-spezifische Proteinkinasen, die selbst oft über Tyrosin-bindende Domänen (z. B. SH2-Domänen) mit ihrem Substrat interagieren können. Vor allem PTKs der Src-Familie sind an dieser Art von Signaltransduktionskaskaden beteiligt. Insbesondere für die CEACAM3-vermittelte Internalisierung der Gonokokken spielen Src Kinasen eine wichtige Rolle, während die Aufnahme der Opa_{CEA} Gonokokken über die epithelialen CEACAMs weitaus weniger durch pharmakologische Inhibitoren der Src Kinasen beeinträchtigt werden (Abb. 2.4; (McCaw et al. 2004)).

Über Kinasen der Src-Familie ist bekannt, dass sie über ihre SH2 Domäne spezifisch an phosphorylierte Tyrosinreste rekrutiert und gebunden werden (Thomas and Brugge 1997). Dementsprechend können auch die beiden Tyrosinreste innerhalb der ITAM-ähnlichen Sequenz von CEACAM3 durch eine aufgereinigte Src Kinase *in vitro* phosphoryliert werden (Streichert et al. 2001) ,und die Koexpression des CEACAM3 Rezeptors mit einer konstitutiv aktivierten Form der Src Kinase führt zu einer Hyperphosphorylierung der ITAM-ähnlichen Sequenz von CEACAM3 (Abb. 2.5). ITAM Sequenzen sind in verschiedenen Rezeptoren des Immunsystems enthalten und regulieren dort die Weitergabe von aktivatorischen zellulären Signalen (Ravetch 1997).

Diesbezüglich werden mit IgG opsonierte Latex Kugeln nur nach erfolgreicher Phosphorylierung der Tyrosinreste des ITAMs über Fc γ -Rezeptoren phagozytiert (Indik et al. 1995).

Interessanterweise führt die Interaktion der Opa_{CEA} Gonokokken mit den Molekülen der CEACAM-Familie nur im Falle des CEACAM3 Proteins zu einer spezifischen Tyrosinphosphorylierung des Moleküls (McCaw et al. 2004). Dementsprechend interagiert nur das CEACAM3 Protein direkt mit der Src-SH2-Domäne der Src Kinase (Abb. 2.6.) Die signifikante Rolle der Src Kinasen für die CEACAM3-vermittelte

Phagozytose konnte weiterhin bestätigt werden, indem zum einen ein natürlicher, negativer Regulator der Src Kinase in CEACAM3-transfizierten Zellen kotransfiziert wurde und zum anderen durch den Einsatz PTK-defizienter Mausfibroblasten.

Die C-terminale Src Kinase (Csk) reguliert die Kinaseaktivität des Src-Proteins durch Phosphorylierung eines C-terminalen Tyrosinrestes (Cooper and King 1986; Kmiecik and Shalloway 1987). Die Phosphorylierung des negativ-regulatorischen Tyrosinrests (Tyr527) der Src Kinase führt zur Umordnung der Sekundärstruktur, infolgedessen der phosphorylierte Tyrosinrest intramolekular mit der SH2-Domäne des Proteins interagiert und so die Kinasedomäne blockiert (Roussel et al. 1991; Bibbins et al. 1993). Die Überexpression des Csk Proteins (Csk-wt) in CEACAM3-transfizierten Zellen inhibiert die Aufnahme der Opa_{CEA} Gonokokken (Abb. 2.7 A). Hingegen hat die Kotransfektion einer inaktiven Csk-Mutante (Csk K222M) keinen Einfluss auf die Src-Kinase-abhängige Internalisierung der Gonokokken (Abb. 2.7 A).

In einem weiteren Experiment konnte mit Hilfe von Maus-Fibroblasten, die defizient für die in diesem Zelltyp normalerweise exprimierten Kinasen der Src-Familie sind (Src, Yes, Fyn defizient), die Bedeutung der PTKs aus der Src-Familie für die CEACAM3-abhängige Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken auch in einem genetischen Hintergrund bestätigt werden. Dafür wurden defiziente Zellen oder mit einer zellulären Src Kinase rekonstituiert Zellen (Abb. 2.7 B, Western-Blot.) mit CEACAM3-RFP transfiziert und mit Opa_{CEA} Gonokokken infiziert. Nur c-Src reexprimierende Zellen internalisieren Opa_{CEA} Gonokokken, während weder die CEACAM3-transfizierten noch die untransfizierten S/Y/F^{-/-} defizienten Fibroblasten diesen bakteriellen Phänotyp internalisieren (Abb. 2.7 B). Parallel prozessierte Ansätze für die Immunfluoreszenz verdeutlichen, dass CEACAM3-RFP exprimiert und in beiden Zelltypen zu adhätierenden Gonokokken rekrutiert wird. Doch nur in c-Src reexprimierenden Zellen befinden sich auch intrazelluläre Bakterien (Abb. 2.8). Die Inhibition der CEACAM3-vermittelten Aufnahme von Gonokokken durch den natürlichen Regulator Csk und die Unfähigkeit von Src-defizienten Zellen, trotz CEACAM3-Expression Gonokokken zu internalisieren, zeigt eindeutig die essentielle Bedeutung der Src Kinasen für die Phagozytose. Allerdings scheinen die Tyrosinkinase vor allem an der eigentlichen Aufnahme der Bakterien und der damit einhergehenden Signaltransduktion beteiligt zu sein, da die Adhärenz der Bakterien an das CEACAM3 Protein und damit die Rekrutierung der Rezeptoren nicht beeinflusst wurde.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse erweitern und bestätigen Erkenntnisse über die Mechanismen der CEACAM3-vermittelten Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken. Vor allem die Rolle der Src Kinase als eine Hauptkomponente der Signaltransduktion, die zur Aufnahme des Pathogens führt, ist deutlich erkennbar. In diesem Zusammenhang erinnert der Aufnahmemechanismus des CEACAM3 Proteins stark an die Oponin-abhängige Phagozytose über den Fc γ -Rezeptor, der ebenso an Phosphorylierungsereignisse der Tyrosinreste der ITAM Sequenz durch Kinasen der Src-Familie gebunden ist.

Die Src-abhängige CEACAM3-vermittelte Aufnahme der Gonokokken eignet sich auch hervorragend dafür, um zwischen der Internalisierung von Gonokokken über die epithelialen CEACAMs, CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6 und der CEACAM3-vermittelten granulozytären Phagozytose zu unterscheiden.

Da die Aufnahme über die epithelialen CEACAMs unabhängig von den Kinasen der Src-Familie abläuft, stellte sich die Frage, ob Unterschiede in der Membranverankerung dafür verantwortlich sind. Über GPI-verankerte Proteinen weiß man inzwischen, dass sie in spezialisierten Membrandomänen, den *lipid rafts*, vorkommen können. Die *lipid rafts* setzen sich vor allem aus Sphingolipiden und Cholesterin zusammen, die stark miteinander interagieren und sich daher spontan von den Glykophospholipiden der Zellmembran segregieren (Simons and Ikonen 1997; Brown and London 1998). So entstehen lateral organisierte Membrandomänen in der Zellmembran, die vor allem GPI-verankerte Proteine enthalten oder diese durch Stimulation rekrutieren. Sie bilden dabei kompakte Einheiten, sog. *signalling units*, die bei Stimulation Signale in die Zelle vermitteln können. Die *lipid rafts* bilden dabei aber nur ordnende Strukturen, die für die Anreicherung und lokale Konzentrierung von Proteinen verantwortlich sind, die eigentliche Signaltransduktion erfolgt über die konzentrierten Proteine.

Die *lipid rafts* haben in dem letzten Jahrzehnt auch in der Infektionsbiologie enorm an Bedeutung gewonnen. Sie sind für die Interaktion von bakteriellen, multimeren Toxinen, wie z.B. das porenformende Aerolysin oder das Cholera-Toxin, mit der Zellmembran essentiell (Abrami and van Der Goot 1999; Lafont et al. 2004). Aber auch Bakterien, wie z.B. *E. coli*, *S. flexneri*, *S. thyphimurium*, *Mycobacterium ssp* (Manes et al. 2003; Lafont et al. 2004) und *L. monocytogenes* (Seveau et al. 2004),

adhärieren und invadieren Zellen über Mikrodomänen, indem sie unter anderem GPI-verankerte Proteine als zelluläre Rezeptoren benutzen.

Auch die CEACAM6-vermittelte Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken scheint an diese lateral organisierten Mikrodomänen gebunden zu sein. Der Einsatz der Cholesterin-Chelatoren Nystatin und Filipin inhibiert nur die CEACAM6-, aber nicht die CEACAM3-vermittelte Aufnahme der Gonokokken (Abb. 2.9 A und B). In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass auch die Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken über das ebenfalls GPI-verankerte CEACAM5 Protein sowie überraschenderweise auch über das Transmembranprotein CEACAM1 durch den Einsatz von Nystatin inhibiert werden konnte (Abb. 2.10). Frühere Forschungsergebnisse konnten schon weitere Übereinstimmungen des Aufnahmemechanismus zwischen den GPI-verankerten Proteinen und CEACAM1 aufweisen. So hat die Inhibition der Src Kinase durch pharmakologische Inhibitoren keinen Einfluss auf die CEACAM1- CEACAM5- und CEACAM6-vermittelte Aufnahme der Opa_{CEA} Gonokokken, keins der Proteine wird im Verlauf der Internalisierung phosphoryliert und die Internalisierung beruht nicht auf der Aktin-abhängigen Umordnung des Zytoskeletts (McCaw et al. 2004). Daher lässt sich die Aufnahme der Opa_{CEA} Gonokokken tendenziell in zwei unterschiedliche Mechanismen unterteilen, die Src-abhängige-Internalisierung der Gonokokken über CEACAM3 und des Weiteren in eine *lipid raft*-abhängige-Internalisierung über die epithelialen CEACAMs.

Die Diskrepanz der CEACAM-vermittelten Aufnahmemechanismen liefert einen idealen Ansatz, um die *in vivo* Phagozytose der Opa_{CEA} Gonokokken in Granulozyten zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass die Aufnahme der Opa_{CEA} Gonokokken durch den pharmakologischen Inhibitor PP2 konzentrationsabhängig inhibiert werden kann, während verschiedene Konzentrationen des Cholesterin Chelators Nystatin keinen Einfluss auf die Phagozytose der Opa_{CEA}-exprimierender Gonokokken hat (Abb. 2.11 A und B). Infolgedessen scheint *in vivo* die Phagozytose der Opa_{CEA} Gonokokken in Granulozyten hauptsächlich über die Src-abhängige-CEACAM3-vermittelte Internalisierung abzulaufen, während die anderen CEACAMs auf diesem Zelltyp anscheinend nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Über die Bedeutung dieses Ergebnisses lässt sich nur spekulieren. Die Transfektion der cDNA in Epithelzellen zeigte eindeutig die Funktionalität der CEACAM-

vermittelten Aufnahme, wies aber schon daraufhin, dass die epithelialen CEACAMs mit unterschiedlicher Effektivität arbeiten. Wie McCaw et al (2004) zeigen konnten, liegt dem eine unterschiedliche Kinetik während des Internalisierungsprozess zu Grunde. Darüber hinaus konnten die Aufnahme der Gonokokken in alle drei CEACAM-transfizierten Zellen durch Chelatoren inhibiert werden, so dass die Funktionalität von sog. *lipid rafts* vermutlich eine wichtige Rolle spielt. Dies müsste durch weitere *in vivo* Versuche mit primären Granulozyten bestätigt werden, dabei sollten vor allem die unterschiedlichen Aufnahme-Kinetiken der CEACAM-Rezeptoren berücksichtigt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben dem sehr schnell phagozytierenden CEACAM3 Protein die restlichen Rezeptoren erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Phagozytose eine wichtige Rolle spielen. Hier wäre wiederum der Einsatz von pharmakologischen Inhibitoren vorteilhaft, um den Einfluss von *lipid rafts* zu untersuchen. Zudem müsste gerade die Bedeutung der *lipid rafts* für die CEACAM-vermittelte Aufnahme in die Epithelzellen und/oder in die Granulozyten mit weiteren pharmakologischen Inhibitoren bestätigt werden. Sicherlich lohnenswert ist auch der Einsatz von genetischen Inhibitoren, die spezifisch die Signalweiterleitung in *lipid rafts* inhibieren könnten. Allerdings wäre dieser Ansatz auf epitheliale Zellen beschränkt, da sich primäre Phagozyten sehr schlecht genetisch manipulieren lassen.

Ein sehr simpler Ansatz für die Klärung des Problems bietet die Bindungsspezifität der Opa_{CEA}-Adhäsine. In einem ersten Versuch mit Opa_{CEA} Gonokokken, die ausschließlich an CEACAM6 binden, konnte die Ineffizienz der CEACAM6-vermittelten Internalisierung in primäre Granulozyten bekräftigt werden. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass CEACAM1 und CEACAM6 zumindest nicht direkt an der eigentlichen Phagozytose der Bakterien beteiligt sind. Sie könnten aber durchaus indirekt die Phagozytose und/oder die weitere Prozessierung der Bakterien im Phago lysosom beeinflussen, indem sie entsprechende Signalkaskaden modulieren. Insbesondere für CEACAM1 konnte gezeigt werden, dass es über die ITIM Sequenz zelluläre Prozesse modulieren kann (Boulton and Gray-Owen 2002; Greicius et al. 2003; Pantelic et al. 2005). Dabei ist die Rekrutierung und Stimulation von Regulatoren stark an die Phosphorylierung des ITIMs gekoppelt. Interessanterweise setzt dies einen positiven Stimulus voraus, wie er unter anderem durch die ITAM-ähnliche Sequenz von CEACAM3 vermittelt wird.

3 CEACAM3 wird exklusiv auf Granulozyten exprimiert, und ist ein phagozytischer Rezeptor der angeborenen Immunantwort, welcher human-spezifische Pathogene erkennt und eliminiert

3.1 Einleitung

Die Pathogene *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae* sind spezifisch an ihren einzigen natürlichen Wirt, den Menschen, angepasst. Alle drei Erreger kolonisieren verschiedene, mukosale Oberflächen in unterschiedlichen Regionen des Körpers—den Nasopharynx im Falle von *N. meningitidis*, *M. catarrhalis* und *H. influenzae* oder den Urogenitaltrakt im Falle von *N. gonorrhoeae*. Die erfolgreiche Kolonisierung kann zur Invasion in Wirtszellen und zu lebensbedrohlichen Krankheiten führen, dennoch verläuft die Kolonisierung des Wirtes meist (*N. meningitidis*, *M. catarrhalis* und *H. influenzae*) oder häufig (*N. gonorrhoeae*) ohne Symptome (Ryan 1990). Vor allem die Symptome der Gonorrhö können abflauen ohne wesentlichen Beitrag der erlernten Immunität, so dass die angeborene Immunantwort anscheinend dieses Pathogen in die Schranken weist (Ryan 1990; Hedges et al. 1999; Schmidt et al. 2001).

Viele wissenschaftliche Publikationen der letzten Jahre haben sich vor allem mit der Invasion der Gonokokken in Wirtszellen über die Opa_{CEA}-Adhäsine und ihre zellulären Antagonisten, den carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecules (CEACAMs) befasst (Bos et al. 1997; Gray-Owen et al. 1997; Billker et al. 2002). Genetische Mechanismen, wie die Antigen- und die Phasenvariation, regulieren die Expression und die strukturelle Variabilität der bakteriellen Adhäsine, so dass die exzessive Modulation der Adhäsine zum Zelltropismus während der Infektion beiträgt (Hauck and Meyer 2003). Die endogene Funktion der CEACAM Proteine ist zurzeit Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Untersuchungen, aber sie scheinen an so unterschiedlichen zellulären Prozessen, wie der Insulin-Aufnahme, der Angiogenese, der Anoikis und Tumorbildung, beteiligt zu sein. Zudem scheint vor allem das CEACAM1 Protein regulierend in die Vermittlung der erlernten

Immunantwort über T-Zellen einzugreifen (Boulton and Gray-Owen 2002). Dies könnte erklären, weshalb die Kolonisierung des humanen Wirtes mit Gono- oder Meningokokken keine effektive Immunantwort generiert (Hedges et al. 1998; Hedges et al. 1999). Die Interaktion der bakteriellen Opa_{CEA}-Adhäsinen mit CEACAM1 Proteinen auf CD4⁺ T-Zellen inhibiert die Aktivierung und die Proliferation der T-Zellen (Chen et al. 2001; Boulton and Gray-Owen 2002). CEACAM1 besitzt zwei immunoreceptor tyrosin based inhibition motif (ITIM) in seiner zellulären Domäne: Die Ligation von ITIM-enthaltenden inhibitorischen Korezeptoren führt normalerweise zu einer Phosphorylierung von Tyrosinresten des ITIM durch Kinasen der Src-Familie mit anschließender Rekrutierung von Phosphotyrosin- oder Phosphoinositol-spezifischen Phosphatasen. Diese können dann positiv-aktivierende Signale der T-Zell Rezeptoren und/oder anderer Stimuli modulieren (Morales et al. 1999; Taylor et al. 2000). Die Interaktion mit T-Zellen während der Gonokokkeninfektion beeinträchtigt somit die Entwicklung einer effektiven Immunantwort des Wirtes, da die Aktivierung der T-Zellen und ihre Proliferation für die Produktion von inflammatorischen Zytokinen und pathogen-spezifischen Antikörpern unerlässlich ist. Dies könnte auch erklären, weshalb eine Gonokokkeninfektion keine Langzeitimmunantwort generiert, so dass der Wirt mit ein und demselben Stamm mehrmals reinfiziert werden kann.

Die Bedeutung der Opa_{CEA}-CEACAM-Interaktion konnte bislang *in vivo* nicht geklärt werden, da es keine geeigneten Säugetier-Modelle gibt. Doch werden nach der Infektion von menschlichen Freiwilligen, die mit Opa⁻ Gonokokken infiziert wurden, hauptsächlich Opa⁺ Gonokokken reisoliert (Swanson et al. 1988; Jerse et al. 1994). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch die human-spezifischen Pathogene *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* mit CEACAM1 interagieren (Virji et al. 2000; Hill et al. 2001; Hill and Virji 2003). Wie bei den Opa_{CEA}-Adhäsinen der Gono- und Meningokokken erfolgt die Bindung über eine direkte Protein-Protein Interaktion in der N-terminalen Domäne des CEACAM Proteins (Virji et al. 1996; Bos et al. 1997; Billker et al. 2000). Sowohl das P5 Proteine von *H. influenzae* als auch das UspA1 von *M. catarrhalis* sowie die Opa_{CEA} Proteine von Meningo- und Gonokokken binden an nicht glykosylierte Bereiche der N-terminalen Domäne der CEACAMs (Bos et al. 1998; Virji et al. 2000; Hill et al. 2001; Hill and Virji 2003). Diese Erreger scheinen unabhängig voneinander Adhäsine evolviert zu haben, die an eng benachbarte oder überlappende Adhäsotope der CEACAMs binden (Virji et

al. 1999). Für eine derartige konvergente Evolution spricht auch die äußerst niedrige Homologie der Aminosäuresequenz zwischen den CEACAM-bindenden Liganden der verschiedenen Bakterien; z.B. für das P5 Protein und für die Opa Proteine sind das nur 11% (Hill et al. 2001). Interessanterweise, weist das P5 Protein mit den Opa Proteinen strukturell gewisse Ähnlichkeiten auf, indem es ebenso die Membran achtmal durchspannt und vier extrazelluläre Domänen aufweist (Malorny et al., 1998), doch besteht für beide Proteine keine strukturelle Verwandtschaft mit dem USPA1 Protein der Moraxellen (Hill and Virji 2003). Weder das genaue CEACAM-Bindungsspektrum der P5 Proteine der *Haemophilus influenzae* Stämme noch das der UspA1 Adhäsine der Moraxellen ist bislang untersucht worden. Aber die bisherigen Daten legen nahe, dass auch sie vermutlich mit verschiedenen Mitgliedern der CEACAM-Familie interagieren können.

Die hohe Anpassung an den Wirt hat in allen genannten Pathogenen spezifisch an den Wirt adaptierte Virulenzfaktoren hervorgebracht, wie z.B. die Sekretion von spezifischen Ig Proteasen, die Invasion von Wirtszellen oder die Antigene Variation und Phasenvariation von Oberflächenproteinen, die es dem Pathogen ermöglichen, mit verschiedenen Zellen während der Infektion zu interagieren. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass auch die CEACAM-bindenden Pathogene *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* die erworbene Immunantwort supprimieren, indem sie mit CEACAM1 Proteinen der T-Zellen interagieren.

Die Bedeutung der angeborenen Immunantwort während einer Gonokokkeninfektion ist bis heute noch nicht geklärt. Granulozyten besitzen ein reichhaltiges Arsenal an Rezeptoren, die die Präsenz von invadierenden Mikroben erkennen und an opsonierte mikrobielle Oberflächen binden können. Membran-gebundene Scavenger-Rezeptoren, Lektine, Fc-Rezeptoren und Komplementrezeptoren wie auch die Signalweitergabe durch *Toll-like receptors* kooperieren, um die endgültige zelluläre Antwort zu bestimmen. Dies kann zur Phagosomenreifung, Aktivierung von antimikrobiellen Substanzen und der Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen führen, aber auch zur Phagozytose und mikrobiellen Degradation (Aderem and Underhill 1999). Unabhängig von der Art der Interaktion, ob Opsonin-abhängige Rezeptoren wie Fc γ - oder Komplementrezeptoren, oder Rezeptoren, die ohne vorherige Opsonierung Bakterien über spezifische mikrobielle (*pathogen recognition receptors*) Strukturen erkennen, erfordert die Phagozytose der Bakterien in den

meisten Fällen eine intensive Aktin-abhängigen Umordnung des Zytoskeletts (Aderem and Underhill 1999). Als Schlüsselfaktoren für die Umordnung sind kleine GTPase der Rho Familie verantwortlich. Sie nehmen Einfluss auf viele Aspekte des Zellverhaltens durch die Regulation verschiedener Signaltransduktionskaskaden (Van Aelst and D'Souza-Schorey 1997; Hall 1998). Die Rho GTPasen Rho, Rac und Cdc42 beeinflussen in allen eukaryontischen Zellen viele, wenn nicht sogar alle Aktin-abhängigen Prozesse, u.a. die Migration, Adhäsion, Morphogenese oder Phagozytose (Kaibuchi et al. 1999; Chimini and Chavrier 2000; Luo 2000). Die Rho GTPasen funktionieren als molekulare Schalter, die zwischen einem GTP-beladenen „stimulierten“ Zustand und durch die intrinsische GTPase Funktion einem GDP-beladenen „ruhenden“ Zustand wechseln. Nur in der GTP-beladenen, stimulierten Form können die kleinen GTPasen mit Effektoren interagieren und so Signale weitergeben.

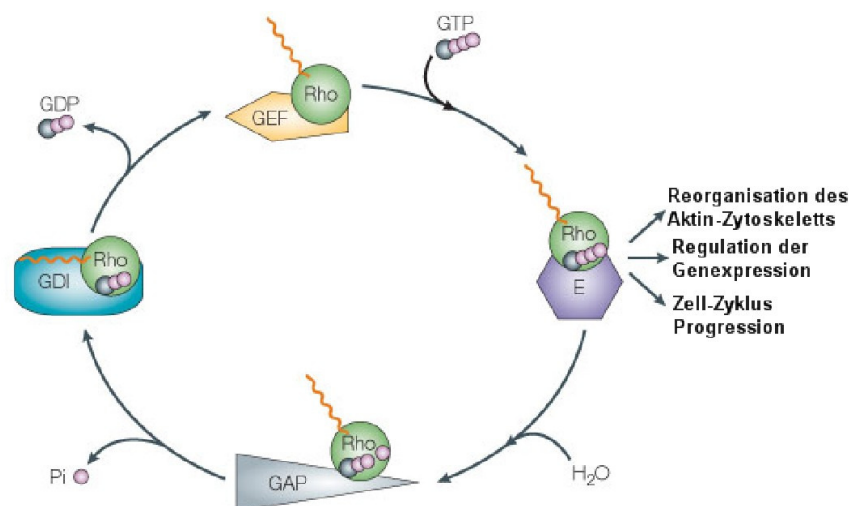


Abb.3.1 **Aktivitätszyklus der Rho GTPasen** (Rossman et al. 2005)

Für die direkte Aktin-Umordnung und die Nukleation der Aktinpolymerisierung ist in vielen Fällen der Arp2/3 Komplex verantwortlich, der den limitierenden Schritt der Aktin-Nukleation überwindet (Pantaloni et al. 2001). Die Rekrutierung und Stimulation dieses Protein-Komplexes erfolgt je nach involvierter Rho GTPase über die WAVE/SCAR- oder WASP/N-WASP Proteine (Takenawa and Miki 2001; Stradal et al. 2004). Interessanterweise führt die Opsonin-unabhängige Interaktion von *in vitro* differenzierten promyelomonzytären Zellen mit Op_{ACEA}-exprimierende Gonokokken ebenfalls zu einer spezifischen Stimulation der kleinen GTPase Rac und einer damit verbundenen Umordnung des Aktin-Zytoskeletts. (Hauck et al. 1998). Es besteht

daher die Möglichkeit, dass die CEACAM Proteine auf den Zellen der unspezifischen Immunabwehr phagozytischen Charakter besitzen und ebenso wie die Oponin-abhängigen Rezeptoren zur spezifischen Erkennung und Elimination von Pathogenen beitragen.

Die Granulozyten besitzen eine Reihe von unterschiedlichen bakteriziden Mechanismen, um internalisierte Bakterien abzutöten. Generell können sauerstoff-abhängige und sauerstoff-unabhängige Mechanismen unterschieden werden (Klebanoff 1992; Lehrer 1992). Die sauerstoff-abhängigen Prozesse, die auch als *oxidative burst* bezeichnet werden, führen in aktivierten Granulozyten zur Produktion von reaktiven, äußerst toxischen Sauerstoffderivaten, die sich mit geeigneten Substanzen als Chemolumineszenz nachweisen lassen. Die Elimination von Bakterien durch sauerstoff-unabhängige Prozesse beruht vor allem auf löslichen Proteinen, wie z.B. Defensine, Elastase oder Granulysin, die in besonderen Zellkompartimenten gespeichert werden. Nach der Phagozytose der Pathogene fusionieren die Phagosomen differenziell reguliert je nach Aktivierungszustand der Zellen mit unterschiedlichen Granula und vesikulären Zellkompartimenten, so dass letztendlich Phagolysosomen entstehen, in denen die Pathogene eliminiert werden.

Bakterien haben verschiedenste Strategien entwickelt, um der Phagozytose und Degradation durch Phagozyten zu entgehen, um sich so im Wirtsgewebe festzusetzen und zu proliferieren. Extrazelluläre Bakterien, wie z.B. *Yersinia enterocolitica* oder *Yersinia pseudotuberculosis*, enteropathogene *Escherichia coli* oder *Pseudomonas aeruginosa*, inhibieren die Phagozytose durch die Translokation von bakteriellen Proteinen, die mit der Phagozytose-spezifischen Signalkaskade interferieren oder das Zytoskelett der Wirtszellen desorganisieren und so die Aufnahme in Makrophagen oder Granulozyten verhindern (Finlay and Cossart 1997; Hornef et al. 2002; Gruenheid and Finlay 2003). Die Proteine werden in diesen Fällen über ein *type three secretion system* aus dem Bakterium direkt in das Zytoplasma der Wirtszellen injiziert, und dort kann z. B. die Phosphatase YopH von *Yersinia* essentielle Proteinkomponenten der Fc γ - oder Komplementrezeptoren vermittelten Phagozytose dephosphorylieren und inhibieren (Persson et al. 1997; Hamid et al. 1999). Ein weiteres Protein YopE imitiert ein für Rho GTPasen spezifischen *guanine nucleotide exchange factor*, das die GTPase in den ruhenden Zustand überführt und so letztendlich die Phagozytose inhibiert (Fallman et al. 1995; Black and Bliska 1997). Hingegen haben intrazelluläre Bakterien, wie z.B. *Legionella*

pneumophila, *Salmonella* ssp., *Shigella* ssp. oder *Listeria monocytogenes*, Mechanismen entwickelt, um innerhalb der Wirtszelle zu überleben und zu proliferieren. Fast alle invasiven Bakterien invadieren die Zelle in membran-gebundenen Vakuolen, persistieren/proliferieren aber in unterschiedlichen Zellkompartimenten. Einige Bakterien können in Vakuolen überleben, obwohl diese mit Lysosomen fusionieren. Andere haben Mechanismen entwickelt, um die Fusion der Pathogen-enthaltenden Vakuole mit Lysosomen zu verhindern, und weiter lysieren die Vakuole, um im Zytoplasma der Wirtszelle zu überleben (Finlay and Cossart 1997; Hornef et al. 2002; Gruenheid and Finlay 2003).

Die Gonokokken besitzen anscheinend keine derartig aktiven Virulenzfaktoren, um die Phagozytose durch Granulozyten zu blockieren oder intrazellulär in Immunzellen zu überleben. Das klinische Bild der klassischen Gonorrhö manifestiert sich in einer starken Inflammation der betroffenen Gewebe mit einer sukzessiven massiven Infiltration von Granulozyten. Das resultierende eitrige Exudat besteht vor allem aus Granulozyten, die zum Teil mit morphologisch intakten Gonokokken assoziiert sind (Ward et al. 1972; Handsfield 1990; Ryan 1990). Gerade diese Beobachtung führt immer wieder zu wissenschaftlichen Diskussionen, ob die Gonokokken auch in den Granulozyten intrazellulär überleben können. Dennoch führt die Interaktion mit Granulozyten *in vitro* unzweifelhaft zu einem starken *oxidative burst*, der für die Elimination der Gonokokken verantwortlich ist (Virji et al. 1996; Gray-Owen et al. 1997).

Die Oponin-unabhängige Interaktion und Phagozytose der Gonokokken in die Granulozyten verläuft ebenfalls über Proteine der CEACAM-Familie. Dies sind zum Teil dieselben Mitglieder der Familie, die von den Gonokokken für die Invasion in andere Zelltypen genutzt werden. Die Vorteile einer Invasion in Epithelzellen und die Transzytose über die Epithelbarriere kompensieren anscheinend für die Nachteile, die eine Expression von Adhäsinen darstellt, die eine Interaktion mit Granulozyten ermöglicht. Während CEACAM1 und CEACAM6 auch auf Epithelzellen exprimiert werden, binden einige Opa-Varianten auch CEACAM3, das exklusiv auf Granulozyten exprimiert wird.

In diesem Kapitel soll vor allem die Bedeutung der CEACAM3-vermittelten Internalisierung von Gonokokken, aber auch von weiteren CEACAM-bindenden Pathogenen wie *M. catarrhalis* und *H. influenzae*, in die Granulozyten untersucht werden. Wie in Kapitel 2 ausführlich beschrieben führt, die CEACAM3-vermittelte

Interaktion zur Stimulation der Src Kinase. *In vitro* Versuche mit künstlich differenzierten myelomonozytären Zellen wiesen darauf hin, dass neben der Src Kinase auch die kleine GTPase Rac eine wichtige Rolle in der CEACAM-vermittelten Phagozytose von Opa_{CEA} Gonokokken spielt. Aufgrund der komplexen CEACAM-Expression in Granulozyten, die es nicht erlaubt, die Signalwege der einzelnen CEACAM Protein zu studieren, werden die CEACAM-Varianten einzeln in Epithelzellen exprimiert. Durch den Einsatz eines dominant negativen Rac-Konstruktes und der spezifischen Isolation GTP-beladener Rac Proteine soll zum einen die Rolle der kleinen GTPase während der CEACAM-vermittelten Internalisierung von Opa_{CEA} Gonokokken untersucht werden und auch der Ausgangspunkt für die Signaltransduktionskaskade ermittelt werden.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Humane polymorphkernige Granulozyten erkennen und eliminieren Opa_{CEA} -exprimierende Gonokokken

Humane Granulozyten exprimieren drei der vier CEACAM Moleküle, namentlich CEACAM1, CEACAM3 und CEACAM6, die Opa_{CEA} -exprimierende Gonokokken binden können. Folglich können humane Granulozyten Opa_{CEA} -Neisserien ohne vorherige Opsonierung des Pathogens durch spezifische Immunglobuline oder Komplementfaktoren effektiv erkennen und eliminieren.

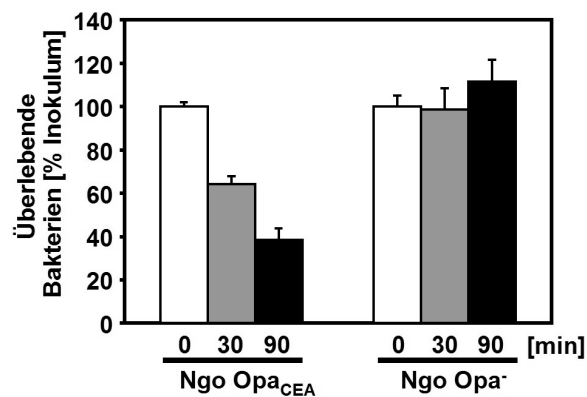


Abb. 3.2 **Opa_{CEA} -exprimierende Gonokokken werden effizient von humanen Granulozyten erkannt und eliminiert.** (A) Granulozyten wurden mit Opa_{CEA} Gonokokken (Ngo Opa_{CEA}) oder nicht-opaquen, pillierten Gonokokken (Ngo Opa^-) inkubiert. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde die Zahl der lebenden Gonokokken ermittelt und als Prozentzahl des initialen Inokulums dargestellt. Die Grafik zeigt den Mittelwert mit Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes das in Triplets durchgeführt wurde.

Die Infektion primärer humaner Granulozyten mit Opa_{CEA} -exprimierenden Gonokokken (Ngo Opa_{CEA}) in einem Verhältnis von zwei zu eins über einen Zeitraum von 90 Minuten führt dazu, dass 60 Prozent des initialen Inokulums abgetötet werden, während im selben Zeitraum nicht-opaque Gonokokken (Ngo Opa^-) durch die Granulozyten nicht eliminiert wurden (Abb. 3.2). Die Elimination der Gonokokken beruht daher auf der spezifischen Interaktion des Opa_{CEA} -Adhäsins mit den Proteinen der CEACAM-Familie, die auf mehr als 60% der Zellen einer Granulozytenpopulation exprimiert werden (Abb. 3.3 E)

Der Kontakt zwischen Granulozyten und Gonokokken induziert die Produktion von Sauerstoffradikalen (nicht gezeigt) und eine Umordnung des Zytoskeletts, die sich auf der extrazellulären Seite der Zellmembran als Lamellipoden-ähnliche Ausstülpungen manifestieren (Abb. 3.3 A und B).

Die fingerähnlichen Fortsätze sind aktiv an der Phagozytose beteiligt, indem sie die Pathogene umschließen und letztendlich einschließen. Die Inkubation mit nicht-opaquen (Ngo Opa⁻) Gonokokken generiert im Vergleich zu pathogenen Gonokokken (Ngo Opa_{CEA}) nur eine schwache Produktion von Sauerstoffradikalen (Daten nicht gezeigt), und wie bei den kommensalen (*N. cinerea*) Gonokokken induzieren sie auch keine Umordnung des Zytoskeletts (Abb. 3.3 C und D).

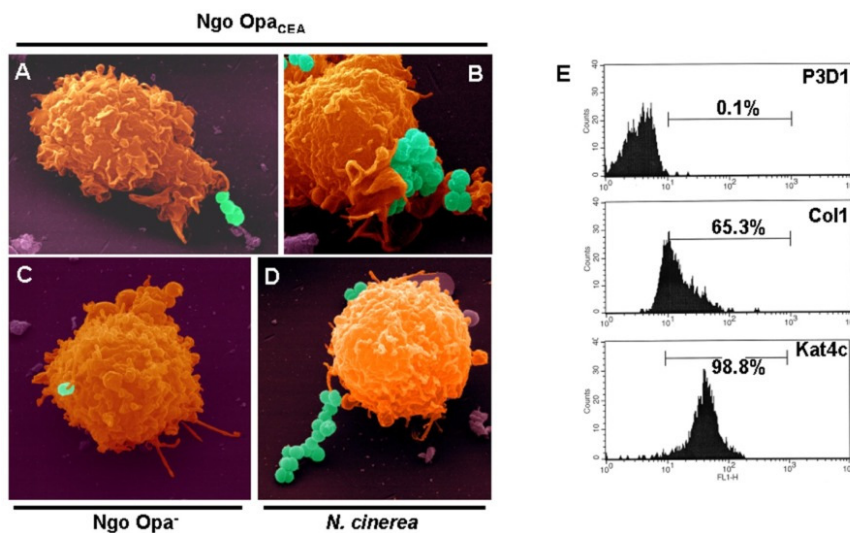


Abb. 3.3

Der Kontakt von Opa_{CEA} Gonokokken mit humanen Granulozyten induziert Lamellipodien-ähnliche Membranfortsätze auf den professionellen Fresszellen. (A-D) Nachkolorierte SEM Aufnahmen von Granulozyten, die für eine Stunde mit Opa_{CEA} *N. gonorrhoea* (A und B; Ngo Opa_{CEA}), nicht-opaquen *N. gonorrhoea* (Ngo Opa⁻) (C) oder nicht-pathogenen *N. cinerea* (D) infiziert wurden. (E) Die Granulozyten wurden mit monoklonalen Maus Antikörpern gegen CEACAM3 (Col1) sowie CEACAM1 und CEACAM6 (Kat4c) und einer Isotyp-Kontrolle (P3D1) behandelt. Mit Hilfe eines polyklonalen Hase α -Maus-Cy2 Antikörper konnte die Oberflächenexpression der CEACAMs mit Durchflußzytometrie nachgewiesen werden.

Daher beruhen die phänotypische Reaktion und die Generation von Sauerstoffradikalen der Granulozyten auf der Interaktion des Opa_{CEA}-Adhäsins der Gonokokken mit den CEACAM Proteinen. Diese Resultate lassen vermuten, dass die Granulozyten CEACAM Proteine mit phagozytischen Eigenschaften exprimieren. Da die Granulozyten mehrere CEACAM Proteine exprimieren (Abb. 3.3 E), ist nicht bekannt, ob ein oder mehrere Mitglieder dieser Familie für die beobachteten Prozesse verantwortlich sind.

3.2.2 CEACAM3 sowie CEACAM6 erkennen und eliminieren effektiv Opa_{CEA} -exprimierende Gonokokken

Um die Aufnahmeeffizienz einzelner CEACAM Proteine während der Gonokokken-Internalisierung zu untersuchen, wurden die Opa_{CEA} -bindenden CEACAMs in 293T Zellen isoliert exprimiert. Ein Vorteil dieser Zell-Linie ist, dass sie endogen kein Mitglied der CEACAM-Familie exprimiert und dass sie leicht zu transfizieren ist (Abb. 3.4 A und B). Zellen, die mit CEACAM1, CEACAM3, CEACAM6 oder einem leeren Kontrollvektor transfiziert wurden, exprimieren den respektiven Rezeptor mit einer Effizienz von bis zu 80% in der Zellpopulation (Abb. 3.4 A).

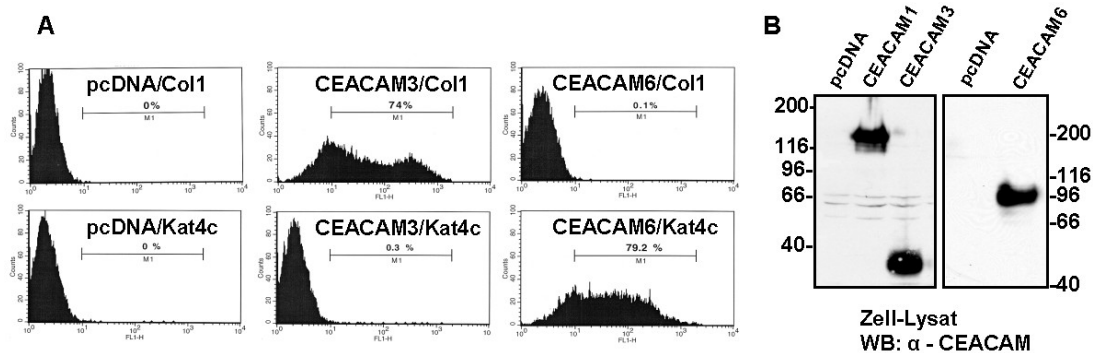


Abb. 3.4 **293 Zellen exprimieren endogen keine CEACAM Protein und lassen sich effizient transient transfizieren.** (A) Kontrolle der Oberflächenexpression verschiedener CEACAMs mittels FACS Analyse. 293 Zellen wurden mit der cDNA für CEACAM1 oder CEACAM3 sowie dem leeren Expressionsvektor (pCDNA) transient transfiziert. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS durch monoklonalen Maus α -CEACAM Antikörper Col1 (CEACAM5- und CEACAM3-spezifisch) und α -CEACAM Antikörper Kat4c (CEACAM1-, CEACAM5- und CEACAM6-spezifisch) und dem sekundären Antikörper Hase α -Maus-Cy5. (B) Expressionskontrolle der CEACAMs im Western-Blot. 293 Zellen wurden mit der cDNA für CEACAM1, CEACAM3 und CEACAM6 sowie dem leeren Expressionsvektor (pCDNA) für 2 Tage transient transfiziert. Die Detektion der CEACAMs im Zell-Lysat erfolgte mit einem spezifischen monoklonalen Maus α -CEACAM Antikörper (D14HD11).

Die CEACAM-transfizierten Zellen vermittelten eine starke Adhärenz der Gonokokken (Abb. 3.5 C, E und F) und eine effektive Internalisierung der Gonokokken in CEACAM3- und CEACAM6-transfizierte Zellen bereits 30-60 Minuten nach der Infektion (Abb. 3.6 A). Im Vergleich zu CEACAM3-exprimierende Zellen konnten nur 15% der Bakterien in CEACAM1-transfizierten Zellen reisoliert werden und die Aufnahme in die Kontroll-Zellen war um einen Faktor von 100 niedriger (Abb. 3.6 A).

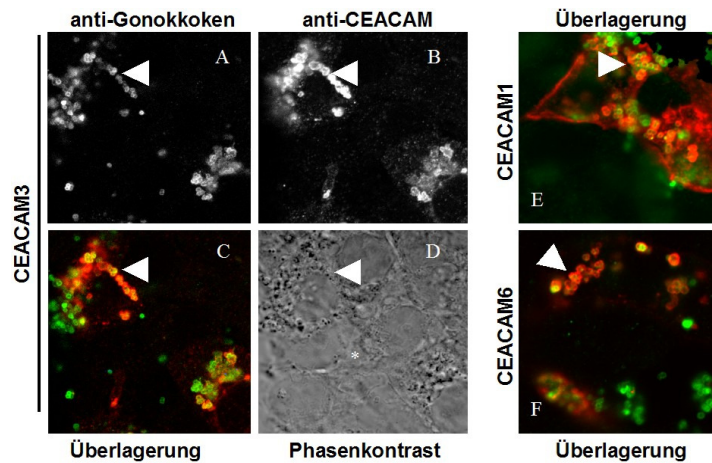


Abb. 3.5 **CEACAM-transfizierte 293 Zellen interagieren mit Opa_{CEA} Gonokokken.** Mit CEACAM3- (A-D), CEACAM1- (E) oder CEACAM6- (F) transfizierte Zellen wurden für 1 h mit Opa_{CEA} Gonokokken infiziert und anschließend fixiert. Die Gonokokken wurden mit polyklonalen α - Opa Antikörper (Grün) und die CEACAMs mit monoklonalen Maus α -CEACAM Antikörper (Rot) gefärbt. Vor allem transfizierte Zellen weisen adhärerende, mit dem CEACAM-kolokalisierte Gonokokken auf (Pfeil). Angrenzende nicht transfizierte Zellen (Phasenkontrast; Stern) dagegen weisen keine adhärierenden Gonokokken auf.

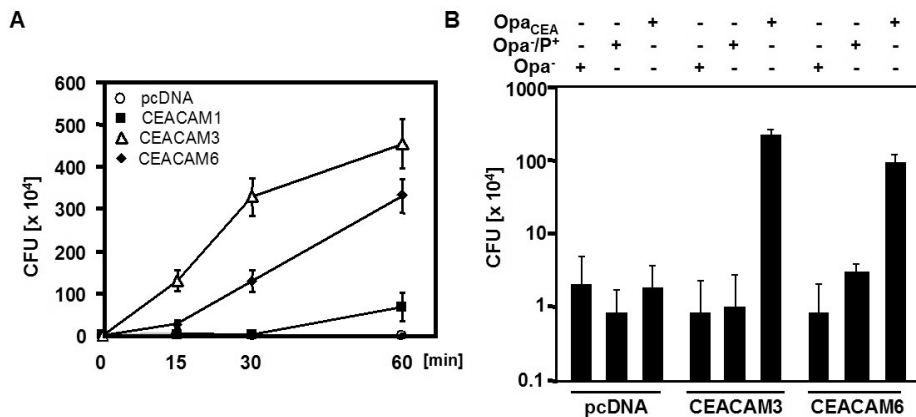


Abb. 3.6 **CEACAM-exprimierende Zellen internalisieren spezifisch Opa_{CEA} -exprimierende Gonokokken.** (A) 293 Zellen wurden mit der cDNA für CEACAM1-, CEACAM3- oder CEACAM6-transfiziert, als Negativ Kontrolle diente der leere Expressionsvektor (pcDNA). Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit Opa_{CEA} Gonokokken infiziert. Zu den angezeigten Zeitpunkten wurde in einem Gentamicinassay die Zahl der internalisierten Bakterien ermittelt. Die Grafik zeigt den Mittelwert mit Standardabweichung für drei in Triplets durchgeführte, unabhängige Experimente. (B) Transfizierte 293 Zellen wurden für 1 h mit nicht-opaque, nicht-pilierten (Opa^-), nicht-opaque, pilierten ($Opa^-/Pili^+$) oder Opa_{CEA} -exprimierende (Opa_{CEA}) Gonokokken infiziert und in einem Gentamicinassay eingesetzt. Die Grafik zeigt den Mittelwert mit Standardabweichung von zwei, in Triplets durchgeführten, unabhängigen Experimenten.

Des Weiteren beruht die effektive Aufnahme über CEACAM3 und CEACAM6 auch auf den korrekten Phänotyp der Bakterien, da weder nicht-opaque, pilierte (Ngo Opa^-/P^+) noch nicht-pilierte (Ngo Opa^-) Bakterien internalisiert wurden (Abb. 3.6 B).

Diese lässt vermuten, dass CEACAM3 und CEACAM6, aber nicht CEACAM1, für eine effektive Internalisierung in einem kurzen Zeitraum in Epithelzellen befähigt sind.

3.2.3 Die CEACAM3- aber nicht die CEACAM6-abhängige Aufnahme Opa_{CEA} -exprimierender Gonokokken ist mit der kleinen GTPase Rac verbunden

Die Oponin-unabhängige Phagozytose Opa_{CEA} -exprimierender Gonokokken durch humane Granulozyten geht einher mit Veränderungen des Zytoskeletts, die zur Bildung von Lamellipodien führen, und der Produktion von Sauerstoffradikalen. Diese Prozesse werden durch kleine GTPasen der Rho Familie reguliert. Um zu untersuchen, ob die GTPasen der Rho Familie auch an der CEACAM3- und/oder CEACAM6-abhängigen Phagozytose beteiligt sind, wurden 293T Zellen mit den entsprechenden cDNAs der CEACAMs und dominant negativen Versionen der GTPasen Rac (Rac-N17), Rho (nicht gezeigt) und Cdc42 (Cdc42-N17) kotransfiziert. Interessanterweise inhibierte nur die negative Version der kleinen GTPase Rac die Aufnahme der Opa_{CEA} Gonokokken über CEACAM3.

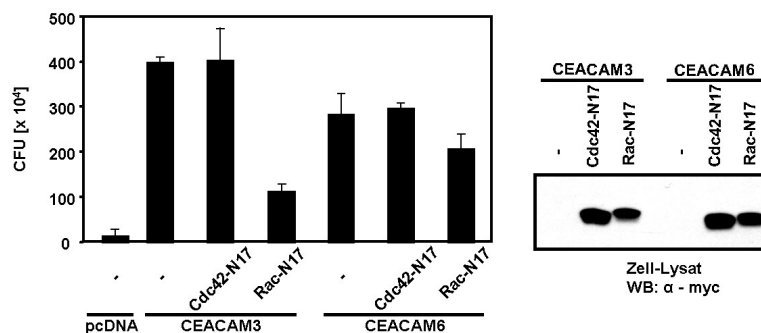


Abb. 3.7 **Die CEACAM3- aber nicht die CEACAM6-vermittelte Internalisierung von Opa_{CEA} Gonokokken benötigt die kleine GTPase Rac.** CEACAM3- oder CEACAM6-exprimierende 293 Zellen wurden mit dominant negativen Versionen der kleinen GTPase Rac (Rac-N17) oder Cdc42 (Cdc42-N17) kotransfiziert und mit Opa_{CEA} Gonokokken infiziert. Die Zahl der überlebenden Bakterien wurde in einem Gentamicinassay ermittelt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Messungen pro Wert. Die Expression der dominant negativen Rho GTPasen wurde parallel im Zell-Lysat der Ansätze mit einem monoklonalen Maus α -Myc Antikörper bestätigt.

Dagegen beeinträchtigte die dominant negative Version der GTPase Rac die CEACAM6-abhängige Internalisierung nur geringfügig, was darauf hindeutet, dass

CEACAM3 der granulozytische Rezeptor ist, der zur Rekrutierung der kleinen GTPase Rac führt. (Abb. 3.7). Darüber hinaus behindert weder die dominant negative Variante von Cdc42 noch die von RhoA die CEACAM3- oder CEACAM6-abhängige Aufnahme in 293T Zellen. Dies konnte mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie visualisiert werden. 293T Epithelzellen, die mit CEACAM3-transfiziert sind und für 30 Minuten mit Opa_{CEA} -exprimierenden Gonokokken infiziert wurden, weisen eine charakteristische Rekrutierung der kleinen GTPase Rac in die unmittelbare Umgebung von adhätierenden Gonokokken auf. Im Gegensatz dazu zeigten CEACAM6-transfizierte Zellen trotz zahlreich adhätierender Gonokokken diese Kolo-kalisation nicht (Abb. 3.8). Die biochemische „Stimulation“ der kleinen GTPase Rac wird durch die GTP-Beladung des Moleküls reflektiert. Die Infektion CEACAM3-transfizierter Zellen mit Opa_{CEA} Gonokokken führt zu einer starken GTP-Beladung der GTPase, bei gleicher Molekülmengen in den Zellen, im Vergleich zu uninfizierten Zellen. Die erhöhte GTP-Beladung des Rac-Proteins war bereits nach 15 Minuten Infektionsdauer detektierbar und erreichte in Übereinstimmung mit der Kinetik der CEACAM3-vermittelten Aufnahme ein Maximum nach 30 bis 60 Minuten (Abb. 3.9).

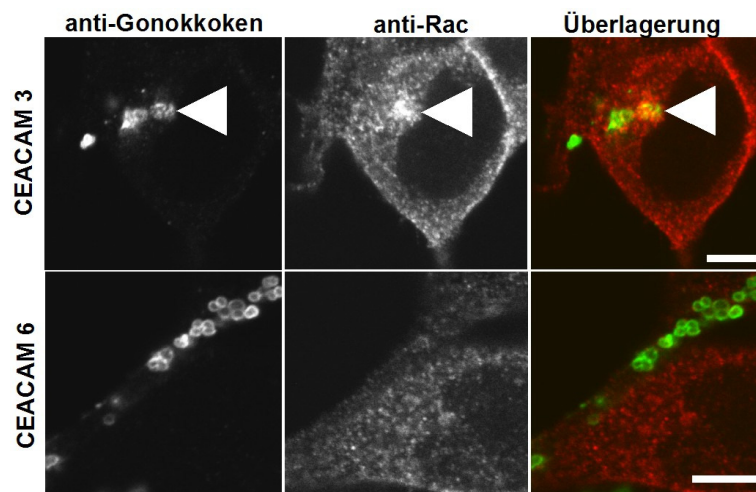


Abb. 3.8

Die kleine GTPase Rac wird nur in CEACAM3-exprimierende Zellen zu adhätierenden Opa_{CEA} Gonokokken rekrutiert. 293 Zellen transfiziert mit CEACAM3 oder CEACAM6 wurden für 1 h mit Opa_{CEA} Gonokokken infiziert, fixiert und mit polyklonalen Antikörpern gegen Gonokokken (Grün) und monoklonalen Antikörpern gegen Rac (Rot) behandelt. In CEACAM3-transfizierten Zellen kommt es zu einer lokalen Rekrutierung der GTPase Rac an Orte der Bakterien-Zell-Interaktion. (Pfeilkopf).

Im Gegensatz dazu war keine Zunahme der GTP Beladung nach der Infektion in Kontroll-transfizierte und CEACAM6-transfizierte Zellen zu beobachten (Abb. 3.9). Des Weiteren war eine Zunahme der GTP Beladung des Rac Proteins nur mit Opa_{CEA}-exprimierende Gonokokken zu detektieren und nicht mit nicht-opaen (Ngo Opa⁻) oder nicht-pathogenen Neisserien (*Neisseria cinerea*) (Abb. 3.10 A); die spezifische „Stimulation“ der GTPase Rac beruht daher auf dem bakteriellen Opa_{CEA}-

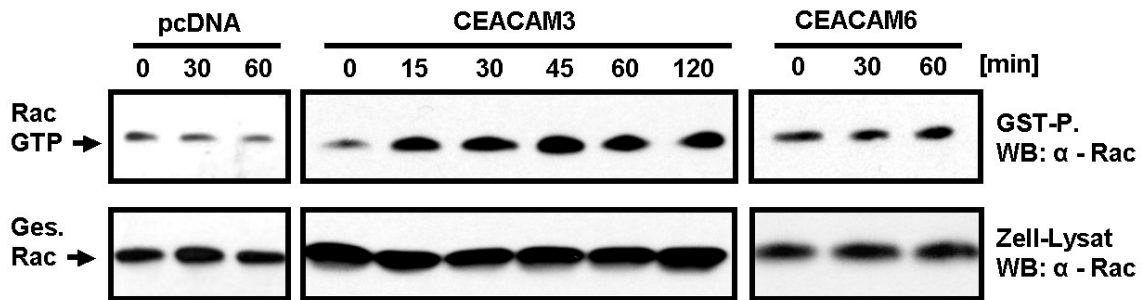


Abb. 3.9 **Die CEACAM3-vermittelte Internalisierung von Opa_{CEA} Gonokokken stimuliert die kleine GTPase Rac.** 293 Zellen wurden mit den angezeigten Konstrukten transfiziert und mit Opa_{CEA} Gonokokken für verschiedene Zeiträume infiziert. Die Ansätze wurden lysiert und nur die GTP gebunden Form der GTPase Rac mit der Rac-GTP-bindenden Domäne von PAK (GST-CRIB) präzipitiert und im Western-Blot mit einem monoklonalen Maus α-Rac Antikörper detektiert (obere Abbildung). Die Menge des gesamten Rac Proteins wurde im Zell-Lysat mit demselben Antikörper kontrolliert (untere Abbildung).

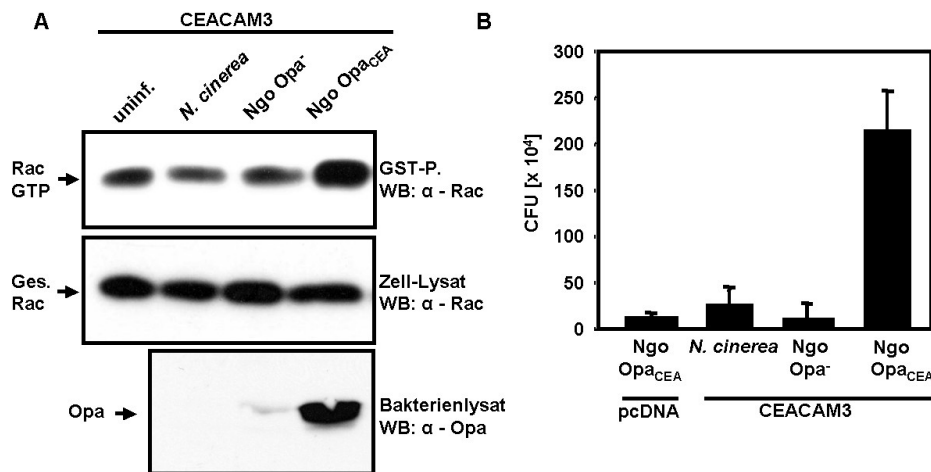


Abb. 3.10 **Die Rac-Stimulation über CEACAM3 benötigt das bakterielle Opa_{CEA}-Adhäsion.** (A) Mit CEACAM3-transfizierte 293 Zellen blieben uninfiziert oder wurden für 1 h mit nicht pathogenen *N. cinerea*, pillierten, nicht-opaen *N. gonorrhoeae* (Ngo Opa⁻) oder Opa_{CEA} *N. gonorrhoeae* (Ngo Opa_{CEA}) infiziert. Präzipitate von GTP-beladenen Rac (obere Grafik) oder Zell-Lysate (mittlere Grafik) wurden nach dem Western-Blot mit α-Rac Antikörper behandelt Die Bakterienlysate wurden mit einem polyklonalen α-Opa Antikörper behandelt (unterste Abbildung). (B) 293 Zellen wurden mit einem leeren Kontrollvektor oder CEACAM3-transfiziert und mit denselben Bakterien wie Abbildung A infiziert und in einem Gentamicinassay eingesetzt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Messungen pro Wert.

Adhäsion und seinem zellulären Rezeptor CEACAM3. Die Daten legen die Vermutung nahe, dass die CEACAMs mit verschiedenen Signalwegen verknüpft sind und dass im Speziellen CEACAM3 für die Stimulation der kleinen GTPase Rac verantwortlich ist.

3.2.4 Die ITAM-ähnliche Sequenz in der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM3 wird für eine effektive Phagozytose der Op_{CEA} Gonokokken und Stimulation der kleinen GTPase Rac benötigt

Die zytoplasmatische Domäne ist ein distinktes Charakteristikum des CEACAM3 Proteins und fehlt bei dem GPI-verankerten CEACAM6. Die unterschiedliche Verankerung per se impliziert distinkte Signalwege und wirft die Frage auf, ob der zytoplasmatische Teil des CEACAM3 Proteins bei der Aufnahme der Gonokokken und der damit einhergehenden Stimulation der GTPase Rac involviert ist.

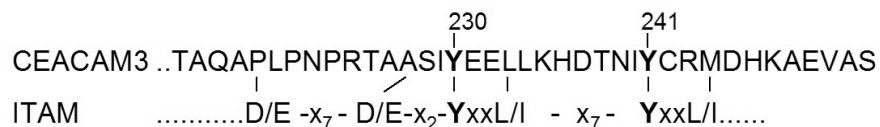


Abb. 3.11 **Die ITAM-ähnliche Sequenz der zytoplasmatischen Domäne des CEACAM3 Proteins.** Hervorgehoben sind die essentiellen Tyrosinreste (Y230 und Y241) im Vergleich zur Konsensussequenz des ITAM.

In dieser Hinsicht wurden mehrere distinkte Mutanten in die zytoplasmatische Domäne eingeführt, die komplette Deletion der zellulären Domäne (Δ CT), Punkt-Mutationen zur Unterbrechung der ITAM-ähnlichen Sequenz durch Austausch eines (Y230F, Y241F) Tyrosinrestes oder beider Tyrosinreste (Y230/241F) sowie die zusätzliche Addition C-terminaler HA-Epitope. Die transiente Transfektion der angegebenen Mutanten in 293T Zellen führte zur Expression äquivalenter Proteinmengen (Abb. 3.12 A). Das zusätzlich eingeführte Epitop beeinflusste die Funktionalität des CEACAM3 Proteins nicht, da die Aufnahmeeffizienz in etwa mit der des unveränderten CEACAM3 vergleichbar ist.

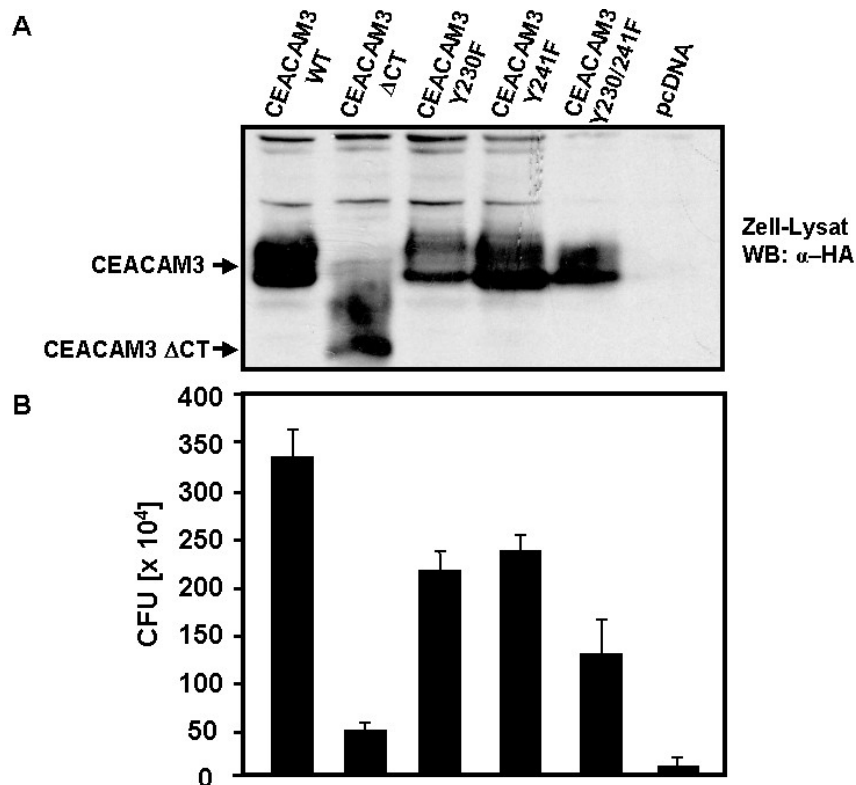


Abb. 3.12 **Die zytoplasmatische Domäne von CEACAM3 mit der ITAM-ähnlichen Sequenz ist essentiell für die Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken.** (A) 293 Zellen wurden mit dem leeren Kontrollvektor oder den verschiedenen CEACAM3-HA Konstrukten transfiziert und die Expression im Western-Blot mit einem monoklonalen Maus α-HA Antikörper kontrolliert. (B) Dieselben Ansätze wurden mit Opa_{CEA} Gonokokken infiziert und die Zahl der lebenden Gonokokken in einem Gentamicinassay ermittelt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Messungen pro Wert.

Die Deletion der kompletten zytoplasmatischen Domäne von CEACAM3 unterbindet die Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken fast vollständig (Abb. 3.12 B).

Auch die Integrität der ITAM-ähnlichen Sequenz scheint für die Aufnahme eine ebenfalls wichtige Rolle zu spielen, die Punktmutation des Tyrosinrestes Y230F oder Y241F resultiert in beiden Mutanten in einer ungefähr 30 % niedrigeren bakteriellen Aufnahme (Abb. 3.12 B). Werden beide Tyrosine der ITAM-ähnlichen Sequenz ausgetauscht, reduziert sich die Zahl der reisolierten Bakterien auf ungefähr 60% im Vergleich zu CEACAM3-wt (Abb. 3.12 B). Die Aufnahme der Opa_{CEA} Gonokokken über die Doppelmutante ist beständig höher als die der Deletionsmutante CEACAM3ΔCT, was darauf hindeutet, dass weitere Reste der zytoplasmatischen Domäne außerhalb der ITAM-ähnlichen Sequenz zur Aufnahme der Bakterien beitragen.

In parallelen Ansätzen wurde der Einfluss der ITAM-ähnlichen Sequenz auf die Stimulierung der GTPase Rac mit Hilfe der GST-Präzipitation untersucht. Wie bereits zuvor erwähnt, stimuliert die Infektion transient transfizierter CEACAM3 293T Zellen mit opaken Gonokokken die GTPase Rac. (Abb. 3.13).

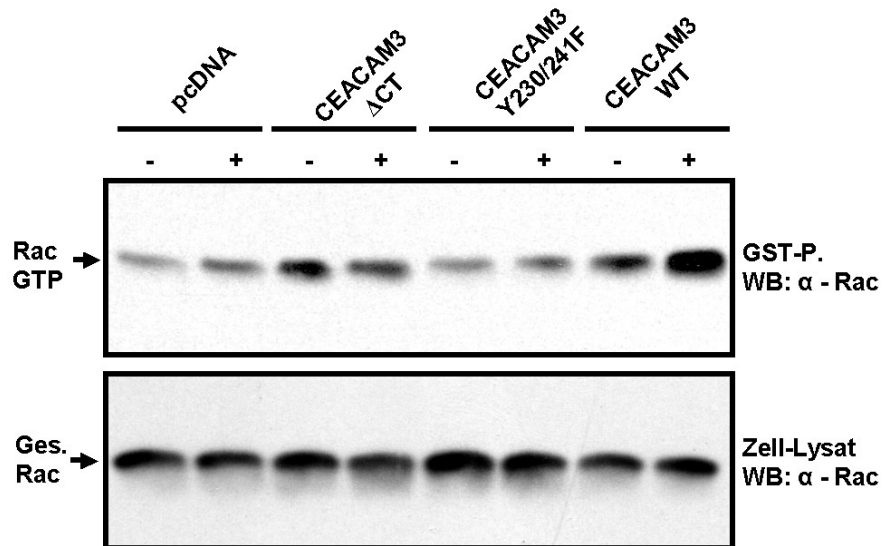


Abb. 3.13 **Die Stimulation der kleinen GTPase Rac ist an die ITAM-ähnliche Sequenz von CEACAM3 gekoppelt.** 293 wurden mit dem leeren Expressionsvektor oder den angezeigten CEACAM3-Konstrukten transfiziert und 1h mit oder ohne Opa_{CEA} Gonokokken infiziert. Die Zellen wurden nach der Infektion lysiert und entweder GTP gebundenes Rac Protein nach Isolierung mit GST-CRIB (obere Abbildung) oder die Expression des Rac Proteins im Zell-Lysat mit einem monoklonalen Maus α-Rac Antikörper detektiert.

Dagegen führt die Infektion von 293 Zellen, die mit der CEACAM3-Deletionsmutante CEACAM3ΔCT oder mit der CEACAM3-Doppelmutante CEACAM3 Y230F/Y241F transfiziert wurden, nicht zu einer erhöhten GTP Beladung der GTPase Rac (Abb. 3.13, oberer Blot). Die ITAM-ähnliche Sequenz der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM3 scheint daher für die Generierung der intrazellulären Signaltransduktionskaskade, die durch die Adhärenz der Opa_{CEA} Gonokokken an die extrazelluläre N-terminale Domäne von CEACAM3 hervorgerufen wird und letztendlich zur Stimulation der Rac-GTPase führt, essentiell zu sein.

3.2.5 Die effiziente Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken benötigt die Kinaseaktivität der Src Kinase

Die essentielle Bedeutung der zellulären Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) c-Src für die CEACAM3-vermittelte Aufnahme von Opa_{CEA}-exprimierenden Gonokokken wurde schon im vorherigen Kapitel eingehend untersucht. Es stellt sich nun allerdings die Frage, ob die Kinase und die kleine GTPase Rac Komponenten der gleichen Signalkaskade sind und wenn, wie sie in der Signalkette zueinander positioniert sind.

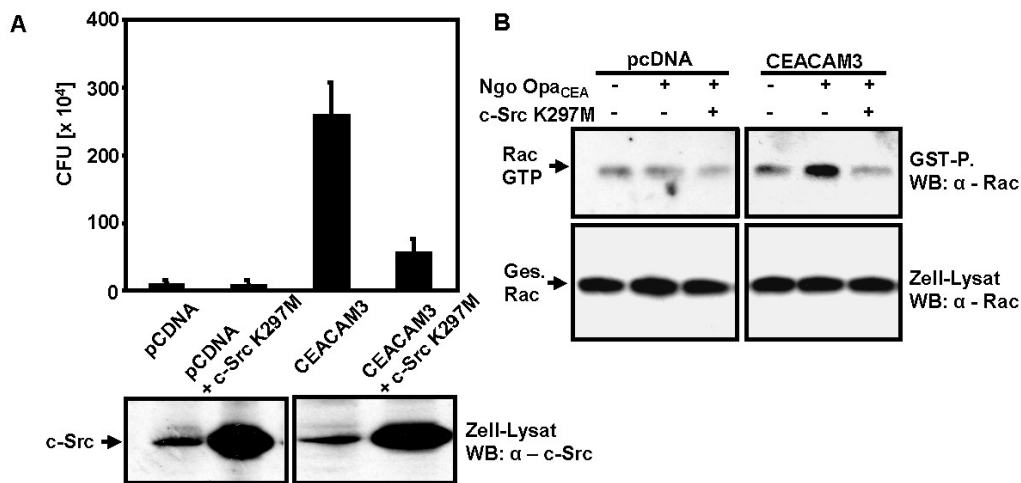


Abb. 3.14 **Kinasen der Src-Familie verbinden die CEACAM3-Ligation mit der Rac-Stimulation.** (A) 293 Zellen wurden mit dem leeren Expressionsvektor (pCDNA), CEACAM3 oder mit einer Kinase-inaktiven Mutante von c-Src (c-Src K297M) kotransfiziert. Nach der Infektion mit Opa_{CEA} Gonokokken wurden die Zellen in einen Gentamicinassay eingesetzt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten, mit jeweils drei Messungen pro Wert. Zell-Lysate der Ansätze wurden auf die Expression der Src-Mutante mit einem monoklonalen Maus α -Src Antikörper überprüft (untere Abbildung). (B) Dieselben Ansätze wie in A wurden vor und nach der Infektion mit Opa_{CEA} Gonokokken lysiert. Für die obere Abbildung wurde spezifisch GTP beladenes Rac Protein mit der CRIB Domäne präzipitiert und für die untere Abbildung das Rac Protein im Zell-Lysat nachgewiesen. Die Detektion der beiden Blots erfolgte mit monoklonalem Maus α -Rac Antikörper.

Um die Bedeutung von Kinasen der Src-Familie auf die CEACAM3-abhängige Stimulation der GTPase Rac zu untersuchen, wurde eine Kinase-inaktive-Mutante der zellulären c-Src Kinase (Src K297M) in 293T Zellen überexprimiert. Die Kotransfektion dieser Mutante mit CEACAM3 reduzierte die Aufnahme der Opa_{CEA} Gonokokken deutlich (Abb. 3.14 A). In parallelen Ansätzen wurden dieselben Zellen lysiert und mit Hilfe der CRIB Domäne die GTP Beladung der GTPase Rac

analysiert. Wiederum stimuliert die bakterielle Infektion CEACAM3-transfizierter Zellen die GTPase, während die Kotransfektion der Zellen mit c-Src K297M den Austausch von GDP zu GTP supprimiert (Abb. 3.14 B). Die Aufnahme der opaquen Gonokokken über CEACAM3 und damit die Stimulation der Rac GTPase scheint daher abhängig zu sein von einer initialen Aktivierung der Src Kinase.

3.2.6 Die sterische Blockade der N-terminalen Opa-Bindungsstelle interferiert mit der CEACAM3-abhängigen Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken

Um die funktionelle Rolle des CEACAM3 Proteins in Bezug auf die Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken und als Initiator der Signalkaskade zu untersuchen, wurde die Oponin-unabhängige Phagozytose opaquer Gonokokken in primäre, humane Granulozyten untersucht. Die Granulozyten wurden mit FITC-markierten Gonokokken für 20 Minuten infiziert und die Effizienz der Phagozytose mit Hilfe der FACS Analyse, nach der Behandlung des Ansatzes mit Trypanblau, evaluiert.

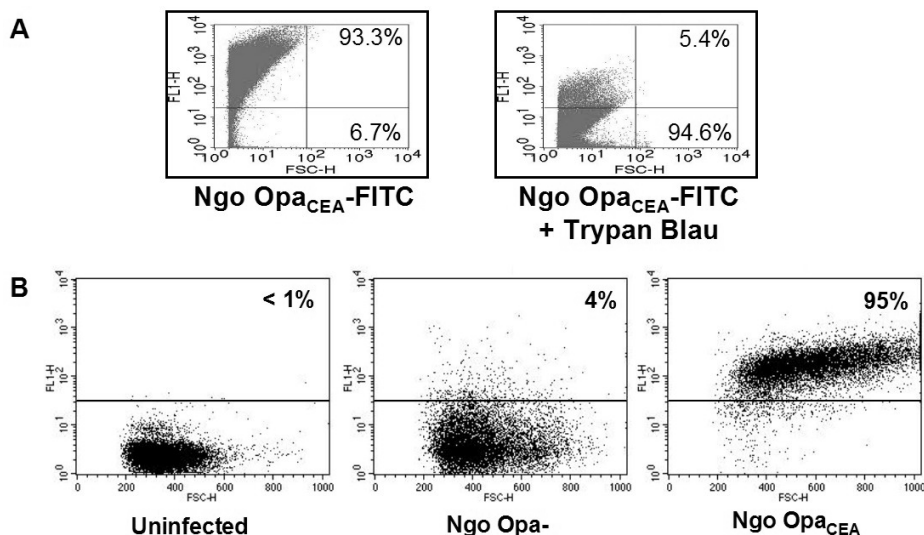


Abb. 3. 15 **Die effektive Phagozytose von Gonokokken in humane Granulozyten hängt von der Expression des bakteriellen Opa_{CEA}-Adhäsins ab.** (A) Mit FITC-markierte Opa_{CEA} Gonokokken können mit der FACS Analyse detektiert werden und der Farbstoff Trypanblau überdeckt das Fluoreszenzsignal effektiv. (B) Isolierte humane Granulozyten blieben uninfiziert oder wurden mit einer MOI von 1:20 mit nicht-opaquen, pilierten (Ngo Opa⁻) oder opaquen (Ngo Opa_{CEA}), FITC-markierten *N. gonorrhoeae* infiziert. Nach 20 Minuten Infektion und Behandlung mit Trypanblau wurden die Proben mit Hilfe der FACS Analyse evaluiert. Die Werte repräsentieren die Prozentzahl an Granulozyten einer Population mit internalisierten Gonokokken eines repräsentativen Experimentes. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Granulozyten von drei verschiedenen Spendern erhalten.

Der Farbstoff Trypanblau resorbiert das Fluoreszenzsignal extrazellulärer Bakterien bis zu 90% (Abb. 3.15 A), so dass spezifisch nur internalisierte Bakterien detektiert werden.

Nicht-opaque Gonokokken (Ngo Opa⁻) werden nur in ungefähr 10% der Granulozyten einer Population internalisiert und das intrazelluläre Fluoreszenz Signal entspricht in etwa dem von nicht infizierten Granulozyten (Abb. 3.15 B). Hingegen internalisieren 75-90% einer Granulozytenpopulation opaque Gonokokken (Ngo Opa_{CEA}). Werden die Zellen vor der Infektion mit einem für CEACAM3-spezifischen monoklonalen Antikörper präinkubiert, so werden bis zu 60% weniger Bakterien internalisiert (Abb. 3.16), während die gleiche Behandlung mit einem Antikörper gegen Endoglin als Isotyp-Kontrolle oder mit einem Antikörper gegen CEACAM6 die Zahl der phagozytierenden Granulozyten nur geringfügig beeinflusst (Abb. 3.16).

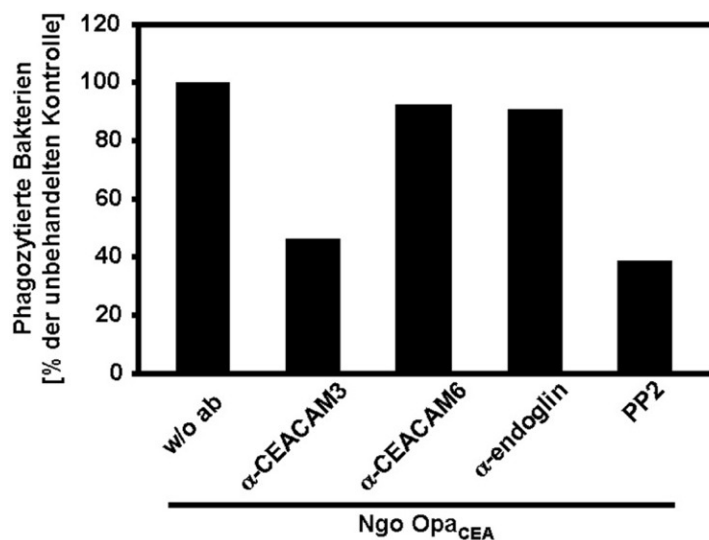


Abb. 3.16 **Die Funktionalität des CEACAM3 Proteins ist essentiell für die Internalisierung Opa_{CEA}-exprimierender Gonokokken durch primäre, humane Granulozyten.** Isolierte humane Granulozyten wurden für 20 Minuten mit Opa_{CEA} Gonokokken infiziert und zuvor mit 20 µg der angezeigten monoklonalen Antikörper oder 10µM des Src-spezifischen Kinase Inhibitors PP2 präinkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte mit der FACS-Analyse und das Diagramm zeigt die Mittelwerte eines repräsentativen Experimentes mit jeweils drei Werten pro Messung. Ähnliche Ergebnisse wurden mit isolierten Granulozyten von drei verschiedenen Spendern erhalten.

Die Inhibition von Kinasen der Src-Familie durch den pharmakologischen Inhibitor PP2 reduzierte ebenfalls deutlich den Prozentsatz der Granulozyten mit internalisierten Gonokokken. Dieses Ergebnis bestätigt, dass Phosphotyrosinkinasen der Src-Familie für die CEACAM3-vermittelte Phagozytose benötigt werden.

Dass die Behandlung der Granulozyten mit einem spezifischen α -CEACAM3 Antikörper die Phagozytosekapazität der Granulozyten beeinflusst, konnte mit der Hilfe der Immunfluoreszenz Mikroskopie visualisiert werden.

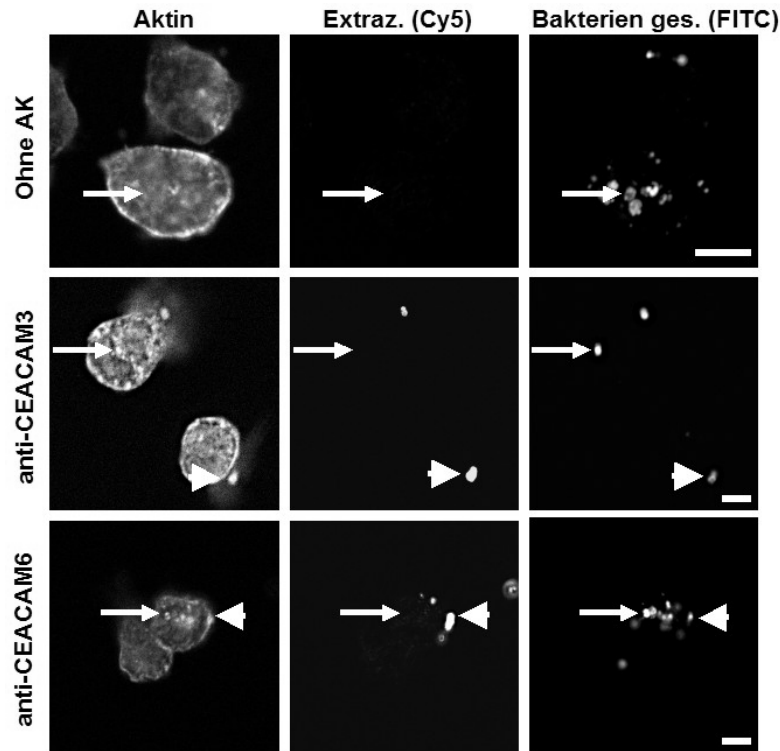


Abb. 3. 17 **Die Absättigung der N-terminalen Bindungsstellen des CEACAM3 Proteins verhindert die Phagozytose der Opa_{CEA} Gonokokken.** Humane Granulozyten wurden für 20 Minuten mit Opa_{CEA} Gonokokken infiziert und zuvor für 60 Minuten mit 20 μ g der indizierten Antikörper präinkubiert. Die Zellen wurden fixiert und differenziell für extra- (Cy5, Pfeilkopf) und intrazelluläre (Pfeil) Bakterien angefärbt. Das zelluläre Aktin wurde durch Phalloidin-TRITC sichtbar gemacht.

Hierfür wurden Granulozyten mit FITC-markierten Gonokokken infiziert und spezifisch extrazelluläre Bakterien mit Cy5 markiert. Die Ergebnisse der Mikroskopie zeigen, dass ohne blockierenden Antikörper oder in Anwesenheit des CEACAM6-spezifischen Antikörpers wesentlich mehr Gonokokken internalisiert werden, wohingegen die Vorbehandlung mit dem CEACAM3-spezifischen Antikörper die Zahl der internalisierten Bakterien deutlich reduziert (Abb. 3.17). Daher scheint für Granulozyten die Opa_{CEA}-unabhängige, CEACAM3-vermittelte Phagozytose von opa_{CEA}-markierten Gonokokken eine herausragende Rolle zu spielen.

3.2.7 Die Interferenz der CEACAM3-abhängigen Signalkaskade durch Inhibition der Rac-Stimulation beeinträchtigt die Phagozytose der Opa_{CEA} Gonokokken

Falls die CEACAM3-abhängige Phagozytose in die Granulozyten der prädominierende Weg für die Aufnahme der Gonokokken ist, sollte auch eine Interferenz der CEACAM3-abhängigen Signalkaskade die Internalisierung der opaquen Gonokokken entscheidend inhibieren. Die terminal differenzierten, primären Granulozyten lassen sich genetisch nur schlecht manipulieren, daher wurden die Zellen mit dominant negativen Proteinen der Rho GTPasen transduziert. TAT-Fusionsproteine interagieren aufgrund ihrer positiven Ladung in der TAT-Sequenz mit der negativen Oberfläche der Zellmembran und überwinden auf noch ungeklärte Weise die Membran. Die transduzierten Proteine interferieren dann intrazellulär effektiv mit Signaltransduktionskaskaden. In Bezug auf die Fragestellung wurde ein Fusionprotein bestehend aus der TAT-Sequenz und der kleinen GTPase Rac-dn (TAT-RacN17) oder Cdc42-dn (TAT-Cdc42N17) sowie der β -Galaktosidase (TAT-LacZ) als Kontrolle erstellt. Die Fusionsproteine wurden in *Escherichia coli* BL21 überexprimiert und anhand ihres His-Tags über Ni-NTA-Säulen in der Affinitätschromatographie aufgereinigt (Abb. 3.18 A). In Abb. 3.18 B wurden primäre Granulozyten mit FITC-markierten TAT-RacN17 für 15 Minuten inkubiert und für die Immunfluoreszenzmikroskopie präpariert.

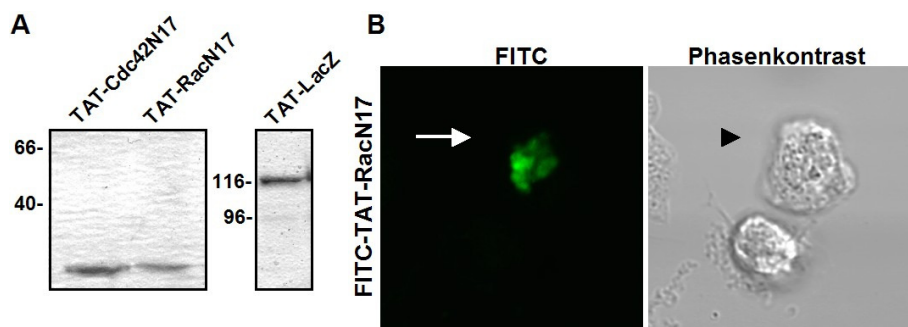


Abb. 3.18 **Expression der pTAT-Fusionsproteine.** (A) Die mit einem His-Epitop ausgestatteten pTAT Fusionsproteine Cdc42 (TAT-Cdc42N17-His) und Rac (TAT-RacN17-His), beides dominant negative Versionen der kleinen GTPasen sowie die β -Galaktosidase (TAT-LacZ-His) wurden in BL21 *E. coli* überexprimiert und mit Hilfe des His-Tag über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Abbildung zeigt die aufgereinigten Proteine nach SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie. (B) Das pTAT-RacN17 wurde mit FITC markiert und mit primären Granulozyten inkubiert. Das Bild wurde im LSCM erstellt und zeigt eine transduzierte Zelle (Pfeil)

Die GTPase Rac ist essentiell für die CEACAM3-vermittelte Phagozytose

Die Transduktionseffizienz lag ungefähr bei 60% innerhalb einer Population und die Transduktion von TAT-RacN17 führte zu einem deutlich vergrößerten adhäsiven Zellphänotyp (Abb. 3.18 B). Primäre Granulozyten wurden vor der Infektion mit Gonokokken mit aufgereinigten TAT-Fusionsproteinen, bestehend aus dominant negativen Rac (TAT-RacN17), β -Galaktosidase (TAT-LacZ) oder dominant negativem Cdc42 (TAT-Cdc42N17), für 15 Minuten präinkubiert und anschließend mit FITC-markierten Gonokokken infiziert. Die Inkubation mit Tat-RacN17 inhibierte konzentrationsabhängig die Aufnahme von Gonokokken in die Granulozyten (Abb. 3.19), wohingegen weder das TAT-LacZ noch das TAT-Cdc42N17 Fusionsprotein diesen Prozess beeinträchtigte (Abb. 3.19). Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, das CEACAM3 der dominierende Rezeptor für die Oponin-unabhängige Phagozytose von Opa_{CEA} Gonokokken ist.

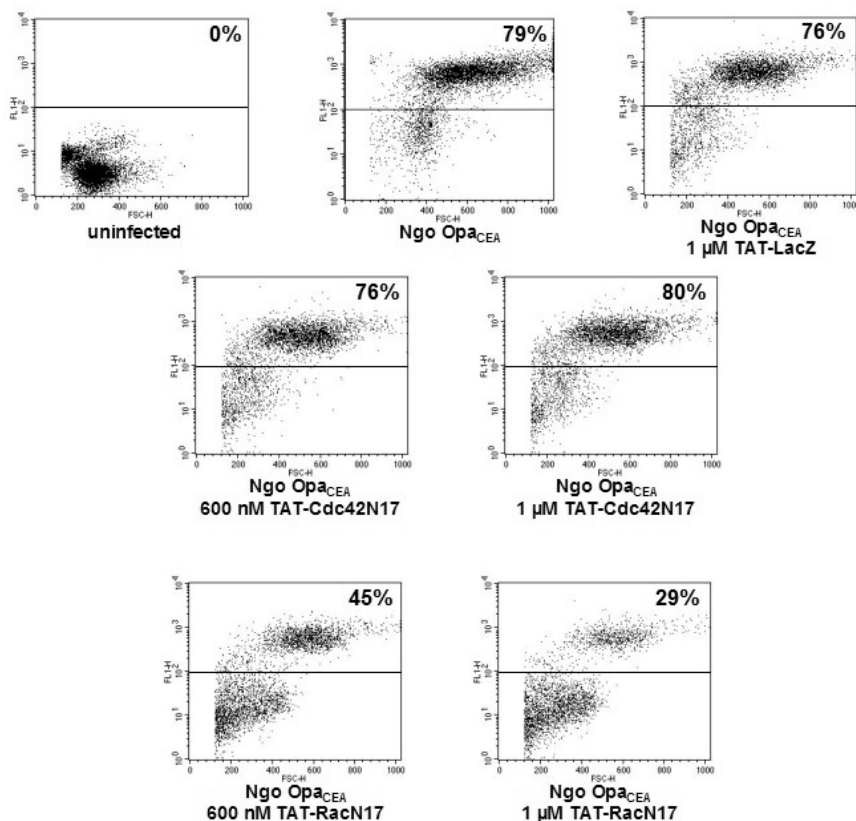


Abb. 3.19

Die CEACAM3-abhängige Rac-Stimulation ist für die Internalisierung von Opa_{CEA} Gonokokken in humane Granulozyten essentiell. Unbehandelte Zellen oder mit den angegebenen Konzentrationen an TAT-LacZ, TAT-Cdc42N17 oder TAT-RacN17 vorbehandelt Granulozyten wurden mit oder ohne FITC markierten Opa_{CEA} -exprimierende Gonokokken (Ngo Opa_{CEA}) für 20 Minuten inkubiert. Die Zahl der Granulozyten mit internalisierten Bakterien einer Population wurde mit der FACS Analyse ausgewertet. Das Diagramm zeigt ein repräsentatives Experiment, ähnliche Resultate wurden mit Granulozyten von drei verschiedenen Spendern erhalten.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die CEACAM3-vermittelte Aufnahme der Gonokokken auch zur Elimination des Pathogens führt. Dafür wurden primäre Granulozyten mit Opa_{CEA} Gonokokken für 60 Minuten inkubiert und die Zahl der lebensfähigen Gonokokken im initialen Inokulum und in den jeweiligen Ansätzen nach der Inkubation bestimmt. Nach einer Stunde waren ungefähr 60 Prozent des initialen Inokulum von Opa_{CEA} Gonokokken (Ngo Opa_{CEA}) eliminiert, während nicht-opaque Bakterien (Ngo Opa⁻) kaum abgetötet wurden (Abb. 3.20). Die Vorbehandlung der Granulozyten mit dem CEACAM3-spezifischen Antikörper führte zu einer deutlich höheren Überlebensrate der opaquen Gonokokken, während eine Isotyp-Kontrolle des Antikörpers oder der CEACAM6-spezifische Antikörper wenig Einfluss auf die Zahl der überlebenden Gonokokken hatte (Abb. 3.20).

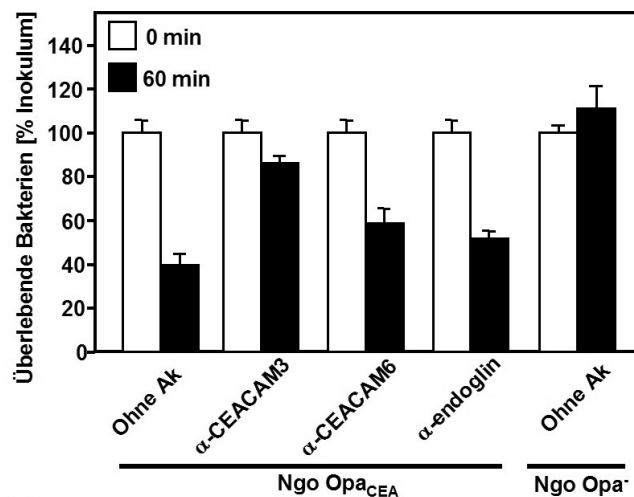


Abb. 3.20 **Die Elimination der Opa_{CEA} Gonokokken verläuft hauptsächlich über die CEACAM3-vermittelte Aufnahme.** Humane Granulozyten wurden in An- oder Abwesenheit von 20 µg der indizierten Antikörper mit Opa_{CEA} Gonokokken (Ngo Opa_{CEA}) oder nicht-opaquen, pilierten Gonokokken (Ngo Opa⁻) infiziert. Die Zahl der lebenden Bakterien im initialen Inokulum oder nach 60 Minuten Infektion wurde durch Ausplattieren der Ansätze auf GC-Platten determiniert. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes mit jeweils drei Werten pro Messung. Ähnliche Ergebnisse wurden mit isolierten Granulozyten von drei verschiedenen Spendern erhalten

Daher kann abschließend in Betracht gezogen werden, dass die Phagozytose von Opa_{CEA} Gonokokken und die Elimination des Pathogens vor allem über das CEACAM3 Protein vermittelt wird, während weder CEACAM1 noch CEACAM6 maßgeblich an der effektiven Internalisierung und Elimination beteiligt sind.

3.2.8 Die CEACAM3-vermittelte Stimulation der kleinen GTPase Rac wird auch durch die CEACAM-bindenden Bakterien *H. influenzae* und *M. catarrhalis* induziert

Neben den Gonokokken binden weitere human spezifische Pathogene an Rezeptoren der CEACAM-Familie. Daher habe ich untersucht, ob CEACAM3 und die entsprechenden Signalkomponenten auch eine entscheidende Rolle in der Internalisierung und Elimination von *M. catarrhalis* oder *H. influenzae* spielen.

Beide Pathogene führen zu einer GTP Beladung der GTPase Rac, wenn CEACAM3-transfizierte Zellen mit diesen Pathogenen infiziert werden. Sowohl die Infektion mit dem nicht-bekapselten *H. influenzae* Stamm Rd (Abb. 3.21 A) als auch mit dem UspA1-positiven Stamm *M. catarrhalis* (Abb. 3.22 A) führen zur GTP Beladung der

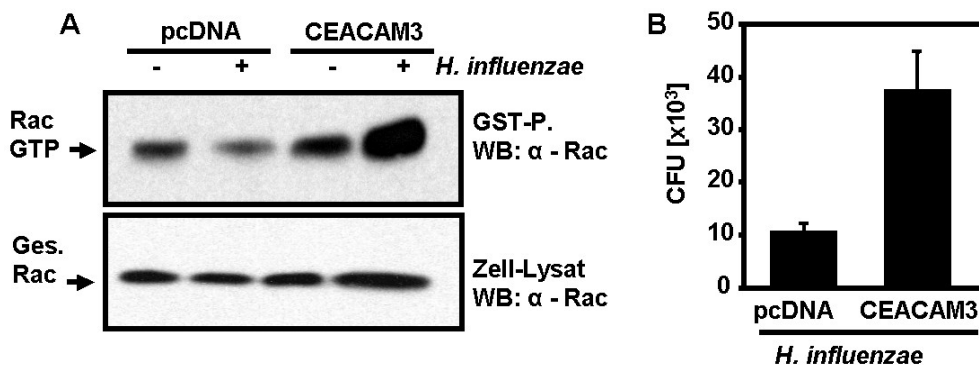


Abb. 3.21 ***Haemophilus influenzae* wird durch CEACAM3-exprimierende 293 Zellen erkannt und internalisiert.** (A) 293 Zellen wurden mit dem leeren Expressionsvektor (pcDNA) oder CEACAM3-transfiziert. Die Zellen wurden entweder nicht infiziert oder mit *H. influenzae* RD mit 20 Bakterien pro Zelle für 1 h infiziert. Nach Lyse der Zelle wurde die Menge der kleinen GTPase Rac im Zell-Lysat (untere Abbildung) und in parallelen Ansätzen nach Präzipitation mit GST-CRIB die GTP-beladene Form der GTPase (obere Abbildung) mit monoklonalen Maus α -Rac Antikörper nachgewiesen. (B) Dieselben Ansätze wurden für einen Gentamicinassay eingesetzt und für 1 h mit *H. influenzae* RD infiziert. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Werten pro Messung.

GTPase. Dennoch ist die deutlich geringere Zahl an reisolierten Bakterien nach dem Gentamicinassay mit *H. influenzae* (Abb. 3.21 B) und *M. catarrhalis* (Abb. 3.22 B) im Vergleich zu der CEACAM3-vermittelten Internalisierung von Opa_{CEA} Gonokokken zu beachten. *In vivo* Versuche mit primären Granulozyten zeigten, dass die Blockade des CEACAM3 Rezeptors in beiden Fällen dramatisch die Internalisierung des jeweiligen Pathogens inhibierte, während nur die Phagozytose von *H. influenzae* auch durch den CEACAM6-spezifischen Antikörper beeinflusst wurde (Abb. 3.23).

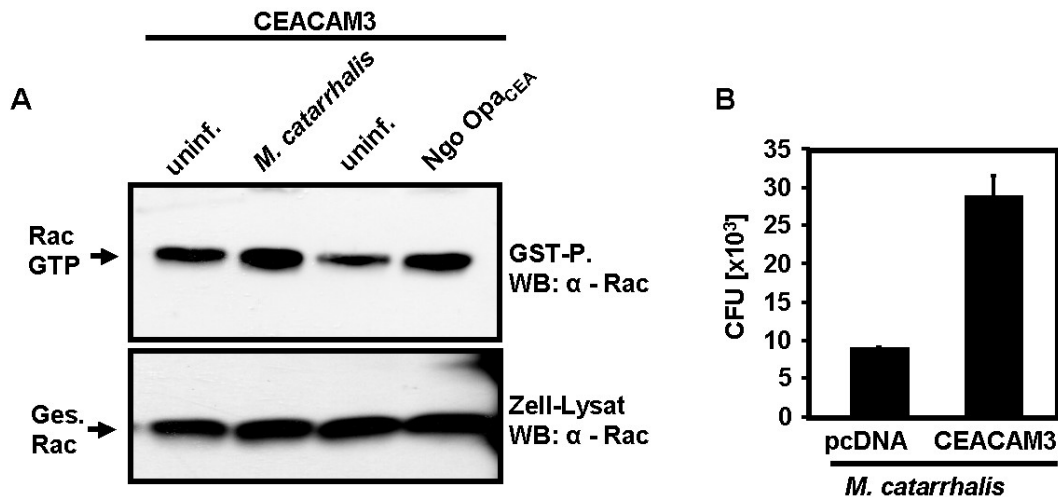


Abb. 3.22 ***Moraxella catarrhalis* wird durch CEACAM3-exprimierende 293 Zellen erkannt und internalisiert.** (A) 293 Zellen wurden mit dem leeren Expressionsvektor (pCDNA) oder CEACAM3 transfiziert. Die Zellen wurden entweder nicht infiziert oder mit *M. catarrhalis* oder Opa_{CEA} Gonokokken (Ngo Opa_{CEA}) mit 20 Bakterien pro Zelle für 1 h infiziert. Nach Lyse der Zelle wurde die Menge der kleinen GTPase Rac im Zell-Lysat mit einem monoklonalen Maus α -Rac Antikörper (untere Abbildung) nachgewiesen und nach Präzipitation mit GST-CRIB die GTP-beladene Form der GTPase (obere Abbildung). (B) Dieselben Transfektionsansätze wurden für einen Gentamicinassay eingesetzt und für 1 h mit *M. catarrhalis* infiziert. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Werten pro Messung.

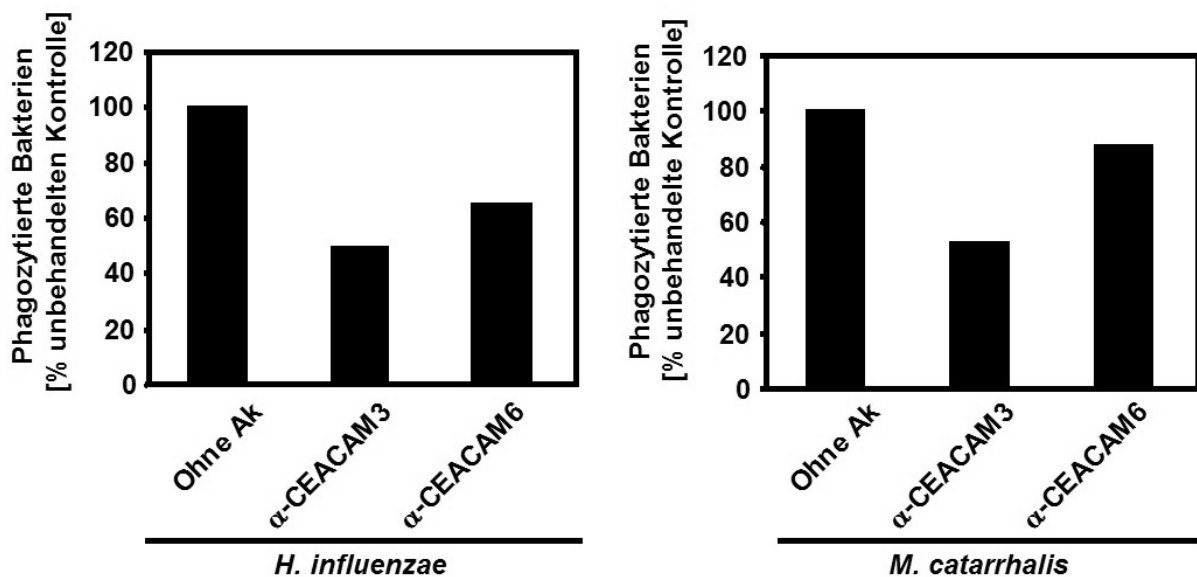


Abb. 3.23 **Humane Granulozyten phagozytieren CEACAM-bindende Bakterien über CEACAM3.** Isolierte humane Granulozyten wurden für 20 Minuten mit FITC-markierten *H. influenzae* oder *M. catarrhalis* (MOI: 20) in An- oder Abwesenheit von 20 μ g der indizierten Antikörper infiziert. Die Prozentzahl der Granulozyten einer Population mit internalisierten Bakterien wurde mit der FACS Analyse ausgewertet. Das Diagramm zeigt ein repräsentatives Experiment, ähnliche Resultate wurden mit Granulozyten von zwei verschiedenen Spendern erhalten.

Das CEACAM3 Protein scheint ein breites Spektrum an CEACAM-bindender Pathogene zu erkennen und zu eliminieren. Neben den bakteriellen Adhäsine von *H.*

influenzae und *M. catarrhalis* ist das Opa_{CEA}-Adhäsion der Gonokokken der einzig bekannte Ligand des CEACAM3 Proteins. Zusammen mit der Tatsache, dass das CEACAM3 Protein nur auf Granulozyten exprimiert wird und es in seinem charakteristischen Aufbau sehr stark dem FcγRIIA Rezeptor ähnelt, legt dies eine Rolle für CEACAM3 als Rezeptor für human-spezifische CEACAM-bindende Pathogene nahe.

3.3 Diskussion

Die Kolonisierung des menschlichen Wirtes durch pathogene Mikroorganismen führt in vielen Fällen zur Eliminierung des Pathogens durch bakterizide Abwehrmechanismen der erworbenen Immunantwort. Die Interaktion mit Zellen der Immunabwehr zu frühen Zeitpunkten der Infektion begünstigt die Entwicklung einer Langzeitimmunantwort, die letztendlich die schnelle und effektive Elimination reinfizierender Pathogene bewirkt. Human spezifische Pathogene haben dagegen Mechanismen entwickelt wie die Variation von exponierten Oberflächenstrukturen, die Sekretion von IgA-spezifischen Proteasen oder auch die direkte Manipulation von Zellen des Immunsystems, um der Immunantwort zu entkommen. Obgleich die human-spezifischen, CEACAM-bindenden Organismen *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoe*, *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* keine Virulenzfaktoren besitzen, wie z.B. das *type three secretion system*, um die Entwicklung einer Immunantwort aktiv zu manipulieren, führt die Infektion dennoch nur in wenigen Inzidenzen zu einer effektiv entwickelten, erworbenen Immunantwort. Besonders die Neisserien können anscheinend die Immunabwehr supprimieren, indem sie die natürliche Funktion von zellulären Rezeptoren, wie z.B. des CEACAM1 Proteins der T-Zellen, für ihren eigenen Vorteil nutzen. Dementsprechend kann ein Wirt mit demselben bakteriellen Serotyp reinfiziert werden, ohne dass inflammatorische Zytokine oder protektive Antikörper entwickelt werden. Dennoch führt die weitverbreitete Kolonisierung durch die CEACAM-bindenden Bakterien in erstaunlicherweise wenigen Fällen zu schwerwiegenden Erkrankungen. Daher scheinen gerade Zellen der angeborenen Immunantwort die Pathogene eliminieren zu können.

Nur bei 10-20% der weiblichen sowie 30-50% der männlichen Wirte kommt es zu den klassischen Symptomen einer Gonorrhö (Handsfield 1990). Diese zeichnet sich durch eine starke und massive Inflammation der betroffenen Gewebe und der sukzessiven Extravasation von Granulozyten aus, die in den meisten Fällen mit noch lebenden, morphologisch intakten Gonokokken assoziiert sind. Trotz jahrzehntelanger Forschung in der Gonokokkeninfektion ist gerade die Interaktion der Gonokokken mit Zellen der unspezifischen Immunabwehr ein Gegenstand ständiger wissenschaftlicher Diskussion.

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte vor allem die Bedeutung der CEACAM3-vermittelten Aufnahme der Gonokokken in humane Granulozyten und der darin involvierten Mechanismen untersucht werden. Gerade das CEACAM3 Protein ist innerhalb der CEACAM-Familie einzigartig, da es nur auf humanen Granulozyten exprimiert wird und sein einzig bisher bekannter Ligand das Opa_{CEA}-Adhäsins der Gonokokken ist. Frühere Studien mit nicht-phagozytischen Zellen, die die Opa_{CEA}-erkennenden Mitglieder der CEACAM-Familie stabil oder transient exprimieren, deuteten darauf hin, dass CEACAM-exprimierende Zellen zu einer äußerst spezifischen und effektiven Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken auch in diesem zellulären Hintergrund in der Lage sind (Bos et al. 1997; Gray-Owen et al. 1997; Billker et al. 2000). Dennoch ist die Bedeutung der einzelnen CEACAM Proteine für die Erkennung und Internalisierung von CEACAM-bindenden Bakterien in Granulozyten noch nicht geklärt. Vor allem die Tatsache, dass Granulozyten drei der vier Opa_{CEA}-erkennenden Proteine der CEACAM-Familie exprimieren (Abb. 3.3 E) sowie CEACAM8, das nicht mit Gonokokken interagiert, erschwert eine Untersuchung der molekularen Phagozytosemechanismen. Die spezifische Elimination der Opa_{CEA} Gonokokken (Abb. 3.2 A) sowie die Induktion des *oxidative burst* (Daten nicht gezeigt) und die Formation von Lamellipodien-ähnlichen Membranausstülpungen (Abb. 3.2 A bis D) während der Phagozytose beruhen eindeutig auf der Interaktion des bakteriellen Opa_{CEA}-Adhäsins mit Molekülen der CEACAM-Familie, da weder nicht-opaque (Ngo Opa⁻) noch kommensale Neisserien (*N. cinerea*) derartige zelluläre Reaktionen hervorrufen.

Um die zellulären Vorgänge während der bakteriellen Interaktion mit den einzelnen CEACAMs untersuchen zu können, wurde ein künstliches Modell bestehend aus 293 Epithelzellen verwendet. Diese Zellen lassen sich effektiv transient transfizieren und exprimieren endogen kein Protein der CEACAM-Familie (Abb. 3.4 A und B). Schon frühere Studien haben gezeigt, dass die Expression von phagozytischen Rezeptoren in nicht-myeloiden Zellen ein geeignetes Modell ist, um die Mechanismen der Partikel-Aufnahme zu untersuchen (Boros et al. 1991; Park et al. 1993; Davis et al. 1995; Downey et al. 1999). Die CEACAM-exprimierenden Zellen eignen sich deswegen ideal, um das Bindungsspektrum der granulozytären CEACAMs und die Kinetik der Gonokokken-Aufnahme zu untersuchen (Abb. 3.5 und Abb. 3.6). Dabei stellte sich in Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Forschergruppen heraus, dass vor allem die CEACAM3- und die CEACAM6-vermittelte Aufnahme innerhalb

einer kurzen Infektionsdauer mit hoher Effizienz Opa_{CEA} Gonokokken internalisieren (Abb. 3.6 A; Billker et al. 2002; McCaw et al. 2004) und dass die Aufnahme auf der direkten Protein-Protein Interaktion der CEACAMs mit den Opa_{CEA} -Adhäsinen beruht (Abb. 3.6 B).

Interessanterweise induziert die CEACAM-abhängige Interaktion mit Opa_{CEA} Gonokokken in pro-myelomonozytären Zellen eine spezifische Stimulation der kleinen GTPase Rac (Hauck et al. 1998). In Swiss 3T3 führt die Überexpression von aktiven Rac-Mutanten zur spezifischen Bildung von Lamellipodien (Ridley et al. 1992), die ähnliche Strukturen besitzen wie die Membranfortsätze der Granulozyten (Abb. 3.3 A bis D). Die Überexpression von konstitutiv aktiver Cdc42 und Rho GTPasen induziert respektive die Formation von Filopodien (Nobes and Hall 1995) oder Stress-Fasern (Ridley and Hall 1992). Daher war es naheliegend zu untersuchen, ob die kleine GTPase Rac auch an der CEACAM-vermittelten Aufnahme der Gonokokken beteiligt ist und welcher der drei granulozytären CEACAMs für die Stimulation der kleinen GTPase Rac verantwortlich ist. Die Phagozytose von Bakterien und damit eine mögliche Rolle der Rac-abhängigen Aktin-Umordnung in Granulozyten ist ein sehr schneller Prozess (Abb. 3.6 A), daher konzentrierten sich die ersten Versuche vor allem auf die CEACAM3- und CEACAM6-vermittelte Aufnahme der Gonokokken. Durch die Kotransfektion von dominant negativen Konstrukten der kleinen GTPasen mit den entsprechenden CEACAM Proteinen sollte der Einfluss der mutierten GTPasen auf die Aufnahme der Gonokokken untersucht werden. Während keine der dominant negativen Mutanten die CEACAM6-vermittelte Aufnahme beeinträchtigte, interferierte die Mutante der GTPase Rac mit der Aufnahme der Gonokokken in CEACAM3-exprimierende Zellen (Abb. 3.7). Dieses Ergebnis unterstützt auch die Fluoreszenzmikroskopie, in der eine Rekrutierung der kleinen GTPase Rac zu adhätierenden Opa_{CEA} Gonokokken an CEACAM3-, aber nicht an CEACAM6-exprimierende Zellen beobachtet wurde (Abb. 3.8).

Die biochemische Stimulation der GTPasen beruht auf dem Austausch von GDP zu GTP, nur wenn die Proteine mit einem Triphospho-Nukleotid beladen sind, können sie mit weiteren Effektoren interagieren und so Signale transduzieren. Mit Hilfe des sog. *GST-pull-down-assay* kann der biochemische Ladezustand der GTPasen während der Phagozytose oder anderer zellulärer Antworten auf Rezeptor-vermittelte Stimuli untersucht werden. Dafür werden an Kugeln-gebundene rekombinante

Domänen der Effektorproteine (PAK für Rac/Cdc42, rhotekin für Rho) mit Zell-Lysaten inkubiert und so letztendlich GTP-gebundenes Rac/Cdc42/Rho, aber nicht das GDP beladene Protein präzipitiert. Dementsprechend wird für die Präzipitation von GTP-Rac und GTP-Cdc42 die Cdc42/Rac-interacting binding domain (CRIB) der P₂₁-activated-Kinase (PAK) benutzt (Benard et al. 1999). Auch auf proteinbiochemischer Ebene zeigte sich, dass die Rac-Stimulation über die spezifische Interaktion von Opa_{CEA} Gonokokken, aber nicht durch nicht-opaque (Ngo Opa⁻) oder nicht-pathogene Neisserien (*N. cinerea*) mit CEACAM3 induziert wird (Abb. 3.10 A). Interessanterweise entspricht die Kinetik der Rac-Stimulation (Abb. 3.9) der schnellen und effizienten Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken in CEACAM3-transfizierte Zellen (Abb. 3.6 A). Bereits 15 Minuten nach der Infektion mit Opa_{CEA} Gonokokken ist die GTP-Beladung des Rac-Proteins detektierbar und erreicht ein Maximum nach 30 bis 60 Minuten (Abb. 3.9), während die CEACAM6-vermittelte Aufnahme der Gonokokken auch über eine 60-minütige Infektionsdauer keine Veränderung in der Rac-Stimulation hervorruft (Abb. 3.9).

Infolgedessen scheint vor allem die effiziente CEACAM3-vermittelte Elimination der bakteriellen Pathogene mit der Stimulation der kleinen GTPase Rac verknüpft zu sein. Die Rho GTPase Rac ist ein kritischer Regulator der Aktin-Polymerisierung, der Phagozytose und des *oxidative burst* in Granulozyten (Dinauer 2003). Obwohl die Überexpression von CEACAM6 in Epithelzellen auch zu einer effektiven Aufnahme der Gonokokken führt (Bos et al. 1997; Gray-Owen et al. 1997), scheint die CEACAM6-vermittelte Internalisierung der Gonokokken weder die kleine GTPase Rac zu stimulieren noch interferiert die Transfektion einer dominant negativen Rac Mutante mit der CEACAM-6 vermittelten Internalisierung der Gonokokken. Ein Grund für die Unterschiede in der generierten Signalkaskade der CEACAM3- und der CEACAM6-vermittelten Interaktion mit Gonokokken liegt vermutlich vor allem in der differentiellen Verankerung in der Membran. Während CEACAM6 über einen GPI-Anker an die Membran gebunden ist, ist CEACAM3 ein Transmembranprotein mit einer zytoplasmatischen Domäne. Die C-terminale Domäne enthält eine ITAM-ähnliche Sequenz, deren Funktion, die Generierung vor allem positiv aktivatorischen Signalketten, schon in anderen Proteinen charakterisiert wurde. Hauptsächlich Rezeptoren, die zur Ig Überfamilie gehören, wie die phagozytischen Rezeptoren der Fc-Familie oder auch Signal-vermittelnde Untereinheiten der T- und B-Zellen (Cambier 1995) enthalten derartige Motive.

Die Funktion der ITAM-Sequenz in diesen Rezeptoren ist direkt korreliert mit einer initialen Tyrosinphosphorylierung durch Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie (Thomas and Brugge 1997). Die Phosphorylierung der ITAM-Sequenzen erlaubt die Rekrutierung von Effektorproteinen, die über eine sog. SH2-Domäne spezifisch an phosphorylierte Tyrosinreste binden und so zelluläre Signale weiterleiten. Auch die zytoplasmatische Domäne von CEACAM3 wird *in vitro* durch Kinasen der Src-Familie phosphoryliert (Streichert et al. 2001) und die Phosphorylierung erfolgt *in vivo* durch die Interaktion des CEACAM3-Moleküls mit Opa_{CEA} Gonokokken (McCaw et al. 2004).

Dabei spielt die Integrität der ITAM-ähnlichen Sequenz eine wichtige Rolle in der CEACAM3-vermittelten Phagozytose der Opa_{CEA} Gonokokken. Die Punktmutation je eines Tyrosinrestes (CEACAM3Y230F oder CEACAM3Y241F) reduzierte die Aufnahme der Gonokokken um 30%, während der Austausch beider Tyrosinreste gegen Phenylalanin CEACAM3Y230F/Y241F zu einer 60-prozentigen Inhibition führte (Abb. 3.12 B). Die Tatsache, dass erst die Deletion der gesamten zytoplasmatischen CEACAM3-Domäne (CEACAM3 Δ CT) die Aufnahme der Gonokokken komplett blockiert, legt nahe, dass neben der ITAM-ähnlichen Sequenz weitere Aminosäurereste innerhalb der zytoplasmatischen Domäne für die Internalisierung verantwortlich sind (Abb. 3.12 B). Dennoch erfordert gerade die effektive Internalisierung der Gonokokken die Stimulation der kleinen GTPase Rac und damit eine funktionelle ITAM-Sequenz innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM3, da sowohl die Deletion der zytoplasmatischen Domäne als auch die simultane Punktmutation beider Tyrosinreste die GTP-Beladung des Proteins vollständig verhindert (Abb. 3.13). Die CEACAM3-vermittelte Stimulation der kleinen GTPase Rac beruht dabei auf einer Src-abhängigen Signalkaskade ausgehend von der ITAM-ähnlichen Sequenz des CEACAM3 Proteins, da eine Kinase-inaktive Mutante der Src Kinase (c-SrcK297M) die Stimulation der GTPase Rac nicht zulässt (Abb. 3.14 B) und die Aufnahme der Gonokokken inhibiert (Abb. 3.14 A).

Eines der größten Probleme in der Arbeit mit Gonokokken ist, dass keine geeigneten Säugetiermodelle verfügbar sind, um die Relevanz der *in vitro* Ergebnisse auch für den natürlichen Verlauf der Pathogenese *in vivo* darzustellen. In der vorliegenden Doktorarbeit habe ich daher versucht, die Erkenntnisse aus *in vitro* Versuchen über die CEACAM3-vermittelte Mechanismen der Gonokokkenaufnahme auch in primären

Zellen, humanen Granulozyten, zu bestätigen. Die Phagozytose der Gonokokken in Granulozyten kann mit Hilfe der Durchflußzytometrie (FACS) einfach untersucht werden (Abb. 3.15; Pils et al. 2005).

Primäre Granulozyten sind vollständig differenzierte Zellen und lassen sich genetisch nur unzureichend manipulieren, daher beschränkten sich die ersten Versuche darauf, die Interaktion der Op_{CEA} Gonokokken mit den CEACAMs der Granulozyten zu blockieren. In dieser Hinsicht können Antikörpern verwendet werden, um das Bindungsepitop der Op_{CEA} -Adhäsine auf den CEACAMs sterisch zu blockieren (Virji et al. 1996). Erstaunlicherweise interferierte nur der CEACAM3-spezifische, monoklonale Maus Antikörper α -Col1 Antikörper mit der CEACAM3-vermittelten Phagozytose der Op_{CEA} Gonokokken sowohl in der FACS-Analyse als auch in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Im Gegensatz dazu wird weder die CEACAM1- noch die CEACAM6-abhängige Aufnahme der Op_{CEA} Gonokokken in die Granulozyten durch spezifische CEACAM-bindende Antikörper inhibiert (Abb. 3.16 und 3.17).

Die relativ neue Technik der Proteintransduktion ermöglicht die Erforschung der Funktion von Primärzellen, indem durch rekombinante Fusionsproteine die zellulären Signalprozesse oder andere zelluläre Mechanismen aktiviert und/oder inhibiert werden (Wadia und Dowdy, 2005). Das *human immunodeficiency virus* (HIV) exprimiert ein Protein, das *trans-activator-protein* (TAT), welches essentiell für die virale Genexpression ist. Es überquert die Zellmembran von Wirtszellen ohne Beteiligung von Rezeptoren oder anderen Transportmechanismen (Frankel and Pabo 1988; Green and Loewenstein 1988). Die positiv geladenen Argininreste der *protein transduction domain* (PTD) Sequenz interagieren dabei mit der negativ geladenen Oberfläche der Membran, und die Interaktion erzeugt vermutlich ein Momentum, dass die Proteine über die Membranbarriere in das Zytoplasma der Zelle befördert (Schwarze et al. 2000).

Der Einsatz der Proteintransduktionsmethode erlaubt es daher, auch die Funktion der CEACAM3-vermittelten Stimulation der GTPasen in primären Zellen zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wurde die dominant negative Variante von der Rac-N17 und der Cdc42-N17 GTPase mit der TAT-PTD fusioniert und aufgereinigt (Abb. 3.18 A). Das Tat-LacZ Protein, welches keine intrinsische Funktion in Zellen besitzt, wurde als Negativ Kontrolle verwendet, um zu bestätigen, dass die Transduktion *per se* keinen Einfluss auf die Phagozytosemechanismen der humanen Zellen hat (Abb. 3.19). Im Jahr 2002 hatte die Gruppe um Billker gezeigt, dass die

CEACAM3-vermittelte Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken in transfizierte Affen-/Hamsterzellen auch durch eine inaktive Mutante des Cdc42 Proteins *in vitro* inhibiert wird. Im Gegensatz dazu inhibierte nur die dominant negative Version der Rac GTPase und dies konzentrationsabhängig, die CEACAM-abhängige Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken in primäre humane 293Zellen und Granulozyten (Abb. 3.19). Die CEACAM3-vermittelte Stimulation der kleinen GTPase Rac und die damit induzierte Umordnung des Aktin-Zytoskeletts hat daher entscheidenden Einfluss auf die Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken. Deswegen ist das CEACAM3 Protein entscheidend für die Elimination der Gonokokken *in vivo*, da auch die Abtötung der Opa_{CEA} Gonokokken *in vivo* hauptsächlich über dieses Protein der CEACAM-Familie erfolgt (Abb. 3.20).

Die hier präsentierten Daten zeigen zum erstenmal, dass sowohl biochemisch als auch funktionell vor allem die CEACAM3-vermittelte Aufnahme Opa_{CEA}-exprimierender Pathogene zur effektiven Erkennung und Aufnahme der Bakterien in humane Granulozyten führt (Abb. 3.19). Auch die anschließende Elimination der Bakterien durch Zellen der angeborenen Immunantwort verläuft über CEACAM3-spezifische Phagozytosemechanismen, da die CEACAM3-abhängige Aufnahme der Opa_{CEA} Gonokokken durch spezifische α -CEACAM3 Antikörper blockiert wurde (Abb. 3.20). Da kein endogener CEACAM3-Ligand bekannt ist, beweisen die hier präsentierten Daten, dass das CEACAM3 Protein eine entscheidende Rolle in der angeborenen Immunantwort während der Gonokokkeninfektion spielt.

Wie die Gono- und Meningokokken sind die anderen bislang bekannten CEACAM-bindenden Bakterien, wie *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae*, human-spezifische Pathogene. Sie interagieren, soweit bekannt, spezifisch mit dem ubiquitär exprimierten CEACAM1 Protein (Virji et al. 2000; Hill et al. 2001; Hill and Virji 2003). Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Doktorarbeit zusätzliche eine spezifische Interaktion mit CEACAM3 nachgewiesen werden. Sowohl P5-exprimierende Bakterien des *H. influenzae* RD-Stammes (Abb. 3.21 B) als auch UspA1-exprimierende Bakterien der Moraxellen (Abb. 3.22 B) invadieren humane, CEACAM3-exprimierende Epithelzellen und induzieren dabei eine CEACAM3-abhängige Stimulation der kleinen GTPase Rac (Abb. 3.21 A und 3.22 A). Zudem kann die Interaktion mit und die Internalisierung in Zellen der angeborenen Immunantwort in beiden Fällen vor allem durch CEACAM3-spezifische Antikörper blockiert werden (Abb. 3.23).

Letztendlich ist es reizvoll zu spekulieren, dass die Elimination von CEACAM-bindender Pathogene über die CEACAM3-vermittelte Phagozytose durch Granulozyten für die menschliche Evolution vorteilhaft war, indem die Gefahr für die Nachkommenschaft durch *Trimester abortion* oder Unfruchtbarkeit eingeschränkt wurde. Auf der anderen Seite könnte es sein, dass CEACAM-bindende Bakterien Mechanismen, wie z.B. die Antigene Variation von Oberflächenproteinen, entwickelt haben, um der Elimination durch die CEACAM3-abhängige Phagozytose zu entgehen und dennoch über epitheliale CEACAM Proteine, wie CEACAM5 oder CEACAM1, Wirtszellen invadieren können. Diese Adhäsine würden eine Adhärenz und Kolonisierung der mukosalen Epithelzellen erlauben, ohne der Elimination durch Granulozyten ausgesetzt zu sein. Diesbezüglich ist es interessant, dass verschiedene Meningo- und Gonokokken derartige Opa_{CEA}-Adhäsine exprimieren und das gerade die Isolate, die nicht mit CEACAM3 interagieren, symptomatische Erkrankungen hervorrufen können.

Die hier präsentierten Ergebnisse beschreiben das granulozytäre CEACAM3 Protein als einen neuen, monomeren phagozytischen Rezeptor der angeborenen Immunantwort. Dieser Rezeptor spielt vermutlich eine wichtige Rolle in der Abwehr der Pathogene, die keine protektive erworbene Immunantwort hervorrufen.

Da verschiedene mit der menschlichen Schleimhaut assoziierte kommensale und pathogene Bakterien die intrinsische Funktion von Proteinen der CEACAM-Familie missbrauchen, könnte im Gegenzug die CEACAM3-vermittelte, Oponin-unabhängige Phagozytose der CEACAM-bindenden Bakterien durch Granulozyten einen generellen Abwehrmechanismus der angeborenen Immunantwort darstellen.

4 Die effiziente Phagozytose über CEACAM3 beruht auf der direkten Assoziation mit dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav

4.1 Einleitung

Die angeborene Immunantwort besteht aus mehreren zellulären Komponenten, die Partikel wie z.B. bakterielle Pathogene oder aber auch apoptotische bzw. nekrotische Zellen eliminieren. Neben den Makrophagen und ihren Vorläufern den Monozyten sind vor allem Granulozyten auf die Phagozytose körperfremder Substanzen spezialisiert und besitzen daher ein reichhaltiges Arsenal verschiedener Rezeptoren und Mechanismen, um diese zu erkennen und zu eliminieren. Interessanterweise werden Gonokokken auch ohne eine vorherige Opsonierung durch Antikörper oder Komplementfaktoren in Granulozyten aufgenommen. Die Opsonin-unabhängige CEACAM-vermittelte Phagozytose setzt die Expression von Opa_{CEA}-Adhäsinen voraus, da nicht-opaque bzw. nicht-pathogene Neisserien nicht internalisiert werden (Virji and Heckels 1986; Fischer and Rest 1988; Frangipane and Rest 1992; Kupsch et al. 1993; Knepper et al. 1997). Bei der CEACAM-abhängige Aufnahme der Opa_{CEA} Neisserien sowie der anderen CEACAM-bindenden Bakterien scheint vor allem das CEACAM3 Protein eine tragende Rolle zu spielen (Schmitter et al. 2004; Kapitel 2 und 3). Zwar exprimieren humane Granulozyten auch die Opa_{CEA}-bindenden CEACAM Proteine, CEACAM1 und CEACAM6, doch zeigen Versuche mit primären Granulozyten, dass die Funktionalität dieser beiden Moleküle für die effektive Phagozytose und Elimination der Gonokokken durch primäre Granulozyten keine entscheidende Rolle spielt (Schmitter et al. 2004; Kapitel 2 und 3).

Die genaue Funktion der beiden Proteine und ihre Bedeutung für die Phagozytose durch Granulozyten ist Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Jedoch scheint das CEACAM3 Protein für die Phagozytose der Gonokokken prädestiniert zu sein, da es nur auf diesen spezifisch exprimiert wird und bislang außer dem Opa_{CEA}-Adhäsin der Gonokokken kein weiterer natürlicher Ligand bekannt ist (Chen et al. 2001; McCaw et al. 2003).

Das CEACAM3 Protein besitzt als einziges Mitglied der Opa_{CEA}-bindenden CEACAM-Familie ein sog. *immunoreceptor tyrosin based activation motif* (ITAM) das für die Signalweiterleitung und letztendlich die Phagozytose essentiell ist (Chen et al. 2001; Billker et al. 2002; McCaw et al. 2003; Schmitter et al. 2004). Dieses Sequenzmotiv findet sich auch innerhalb der zytoplasmatischen Domäne verschiedener Rezeptoren, wie z.B. B- und T-Zell Rezeptoren sowie den Fc γ -Rezeptoren (Reth 1989; Cambier 1995). Die Signalweitergabe und somit die zelluläre Antwort ist dort mit der Phosphorylierung der Tyrosinreste der ITAM-Sequenz durch Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) der Src-Familie verknüpft. Die phosphorylierte Sequenz dient dabei als Erkennungssequenz für SH2-tragende Effektorproteine, die die zelluläre Reaktion steuern (Isakov 1997; Aderem and Underhill 1999).

In Analogie zu der Funktionsweise des phagozytischen Fc γ -Rezeptors induziert die Adhärenz der Gonokokken an CEACAM3 eine spezifische Phosphorylierung der Tyrosinreste innerhalb der ITAM-ähnlichen Sequenz durch PTKs der Src-Familie (McCaw et al. 2004; Kapitel2). Die Src Kinase selbst bindet über ihre SH2-Domäne an die ITAM-ähnliche Sequenz von CEACAM3 und ist vermutlich auch an der zellulären Signaltransduktion beteiligt. Darüber hinaus wurde berichtet, dass im weiteren Verlauf der CEACAM3-abhängigen Signalkaskade die Klasse 1 PI3-Kinase (Booth et al. 2003) und die Phospholipase PLC γ (Chen et al. 2001) aktiviert werden und, wie in Kapitel 3 bereits beschrieben, es zur Stimulation der kleinen GTPase Rac kommt (Schmitter et al. 2004; Kapitel3). Kleine GTPase der Rho Familie sind unter anderem für die Umordnung des Aktin-Zytoskeletts und damit auch für die CEACAM3-stimulierte Aufnahme und Elimination der Gonokokken verantwortlich. Generell erfordert die Aktivierung oder genauer gesagt die Stimulation von GTPasen die Beladung des Proteins mit GTP, da nur die GTP (stimulierte), aber nicht die GDP-beladene (ruhende) Proteinvariante mit Effektorproteinen interagiert (Van Aelst and D'Souza-Schorey 1997). Rho GTPasen regulieren die Polymerisierung von F-Aktin, indem sie im stimulierten GTP-beladenen Zustand Aktin-synthetisierende Proteine wie den ARP2/3 Komplex über N-WASP oder Wave/Scar, rekrutieren (Van Aelst and D'Souza-Schorey 1997; Ridley 2001).

Kleine GTPasen der Rho-Familie sind in vielen, wenn nicht sogar in allen Zellen, an Aktin-abhängigen Prozessen beteiligt, wie sie für die Migration, Adhäsion, Morphogenese und Phagozytose benötigt werden (Kaibuchi et al. 1999; Chimini and

Chavrier 2000; Luo 2000). Neben ihrer fundamentalen Rolle in der Modulation des Zytoskeletts, kontrollieren Rho GTPasen die Mikrotubuli des Zytoskeletts die Zellpolarität, den Zellzyklus und den Membrantransport (Van Aelst and D'Souza-Schorey 1997; Daub et al. 2001; Etienne-Manneville and Hall 2002).

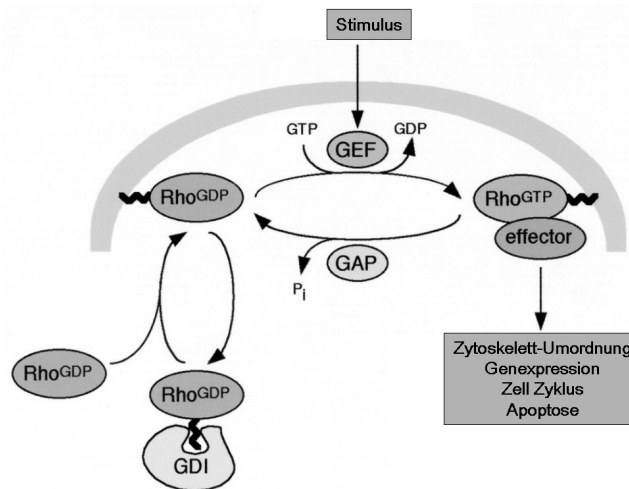


Abb. 4.1 **Regulation der Rho GTPase-Aktivität** (Schmidt and Hall 2002)

Die vielfältigen Aufgaben der GTPasen in unterschiedlichsten zellulären Prozessen erfordert eine strikte Kontrolle dieser Proteinfamilie. Die Zelle moduliert die Aktivität dieses molekularen Schalters, indem sie die Interkonversion und die Verfügbarkeit des inaktiven (GDP-beladen) und des aktiven (GTP-beladen) Zustandes der Rho GTPasen kontrolliert. *Guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) stimulieren den Austausch von GDP zu GTP, um die aktive Form zu generieren, die anschließend mit Effektorproteinen interagieren kann. *GTPase activating proteins* (GAPs) beschleunigen die intrinsische GTPase-Aktivität der Rho GTPasen und inaktivieren so die Proteine. Die sog. *guanine nucleotide dissociation inhibitors* (GDIs) interagieren mit prenylierten, GDP-gebundenen Formen der Rho GTPasen und kontrollieren so deren Lokalisation. Theoretisch könnte die Stimulation der Rho GTPase durch GEFs oder durch die Inhibition der GAPs ablaufen, doch experimentelle Ansätze sprechen für die GEFs als kritische Mediatoren der Rho GTPase-Aktivität.

Die GEF Aktivität wird durch die DH (*D*bl *h*omology) Domäne vermittelt, die nach dem ersten isolierten menschlichen GEF Dbl benannt ist (Hart et al. 1991). Im Menschen gibt es über 60 verschiedene GEFs (Venter et al. 2001) und die Homologie der verschiedenen DH-Domänen ist äußerst gering. Selbst GEFs mit

derselben Substratspezifität haben selten mehr als 20% Sequenzidentität. Trotzdem besitzen sie eine ähnliche dreidimensionale Struktur und zwei konservierte Regionen der GEFs, die sich über 10-20 Aminosäuren erstrecken, bilden die Bindungsregion für die Rho GTPasen. GEFs binden die GTPasen im inaktiven, GDP-beladenen Zustand und destabilisieren die GDP-GTPase Bindung, während sie zugleich das Nukleotid-freie Intermediat stabilisieren (Cherfils and Chardin 1999). Aufgrund der hohen intrazellulären Konzentration von GTP, wird das entbundene GDP durch GTP ersetzt und so die GTPase aktiviert.

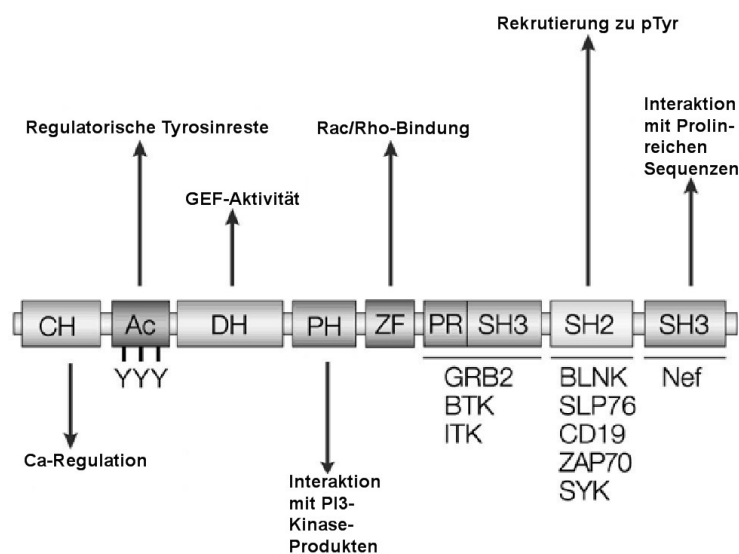


Abb. 4.2 **Struktur des Vav Proteins** (Turner and Billadeau 2002)

Neben den klassischen, Rho GTPase-spezifischen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren, die durch eine tandemartige Anordnung der DH-Domäne und PH-Domäne charakterisiert werden, belegen Forschungsergebnisse der letzten Jahre, dass die GTP-Beladung der Rho GTPasen auch durch GEFs katalysiert wird, die nur sehr geringe (SWAP-70) oder gar keine Sequenzhomologie (Dock) zu der funktionellen DH-Domäne der klassischen GEFs besitzen (Brugnera et al. 2002; Shinohara et al. 2002).

Das SWAP-70 Protein wird hauptsächlich in aktivierten B-Zellen und in nicht-differenzierten Mastzellen exprimiert, obwohl die Präsenz des Proteins im Zytoplasma anderer Zelltypen nicht ausgeschlossen werden kann (Borggreffe et al. 1998; Borggreffe et al. 1999; Masat et al. 2000). SWAP-70 ist unter anderem verantwortlich für eine PI3-K-abhängige Umordnung des Aktin-Zytoskeletts, die zu

den sog. *membrane ruffles* führt (Shinohara et al. 2002). Die kleine GTPase_Rac vermittelt derartige Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts und SWAP-70 fungiert als PIP3-abhängiger, Rac-spezifischer Nukleotid-Austauschfaktor (Shinohara et al. 2002). SWAP-70 kann Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphate (PIP3), die *second messenger* Produkte der PI3-K, über seine zentral gelegene *pleckstrin homology* (PH) Domäne (Lemmon et al. 2002) binden. Die Interaktion mit PIP3 ist für die Membran-Lokalisation und die Rac-spezifische Stimulation von SWAP-70 notwendig (Shinohara et al. 2002). Die putative DH-Domäne von SWAP-70 besitzt nur geringe Homologie zur Aminosäuresequenz anderer DH-Domäne-tragender GEFs (Das et al. 2000; Fleming et al. 2000). Des Weiteren ist die putative DH-Domäne des Proteins nicht C-terminal bezüglich der PH-Domäne wie bei den klassischen GEFs (vgl. auch Figur 4.2), sondern N-terminal positioniert. Daher wird SWAP-70 als neuartiger, Rac-spezifischer Nukleotid-Austauschfaktor charakterisiert.

Auch Proteine die mit Dock1 verwandt sind, werden als echte GEFs für Rho GTPasen beschrieben. Bislang sind 11 humane Proteine identifiziert worden, deren GTPase-Spezifität aber nur unzureichend charakterisiert ist. Dock1 (Dock180), Dock2 und Dock3 sind Rac-spezifische GEFs (Brugnera et al. 2002; Namekata et al. 2004), wohingegen Dock9 (zizimin) spezifisch für Cdc42 ist (Meller et al. 2002).

Dock1-3 besitzen keine Homologie in ihrer Primärsequenz zur DH-Domäne anderer GEFs. Stattdessen haben sie zwei konservierte Sequenzen, die als *Dock-homology region-1* und *-2* (DHR1 und DHR2) bezeichnet werden.

Dock180 wurde ursprünglich als Interaktionspartner des Adaptorproteins Crk identifiziert (Hasegawa et al. 1996). Der Proteinkomplex aus Dock180-Crk findet sich in fokalen Adhäsionspunkten sowie *membrane ruffles*, und greift vermutlich modulierend in die Zell-Migration und Phagozytose apoptotischer Zellen ein (Albert et al. 2000). Brugnera und Kollegen (2002) konnten zeigen, dass Dock180 *in vitro* als Rac-spezifischer Austauschfaktor fungiert. Die isolierte, sog. Docker-Domäne von Dock180 katalysiert *in vitro* die GTP-Beladung der kleinen GTPase Rac. Aber *in vivo* ist die Bindung zwischen Dock180 und Rac nicht ausreichend für die GTP-Beladung der GTPase und erfordert eine zusätzliche Dock180-ELMO-Interaktion. ELMO besitzt keine Sequenzhomologie zu Rac-GEFs und aufgereinigtes ELMO kann *in vitro* die GTPase Rac nicht stimulieren (Harada et al. 2001), daher ist das Protein also nicht selbst für die GEF-Funktion verantwortlich. *In vivo* dagegen findet sich ein trimerer Protein-Komplex bestehend aus ELMO, Dock180 und Rac. Die Interaktion mit ELMO

ist notwendig für die Dock180-abhängige, GTP-Beladung von Rac (Brugnera et al. 2002). Der Proteinkomplex aus Dock180-ELMO funktioniert daher vermutlich als ein unkonventioneller, zweiteiliger Rac-spezifischer Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor.

Eine zentrale Funktion der GEFs, die Induktion der Aktin-abhängigen Umordnung des Zytoskeletts durch Stimulation der Rho GTPasen spielt primär auch für die zelluläre Infektionsbiologie eine herausragende Rolle. Sie stellen eine ganz entscheidende Komponente der Signalwege dar, die letztendlich die Phagozytose und die Elimination körperfremder Substanzen durch Zellen der angeborenen Immunabwehr initiieren. Vor allem die Phagozytose über Fc γ -Rezeptoren, welche ähnliche Mechanismen und Signalwege wie die CEACAM3-vermittelte Internalisierung der Op_a_{CEA} Gonokokken beinhaltet, erfordert erstaunlicherweise ausschließlich die spezifische Stimulation der GTPase Rac (Patel et al. 2002). Die GTP-Beladung von Rac wird dabei von Vav induziert. Dieses Protein ist in der Familie der GEFs insofern einzigartig ist, da es eine SH2-Domäne besitzt, die zwischen zwei SH3-Domänen eingebettet ist. Vav verknüpft so die charakteristischen Eigenschaften eines Adaptorproteins mit der GEF-Aktivität.

Jedoch Pathogene manipulieren die GTPasen der Rho-Familie auch aktiv, indem sie die Proteinfunktion von GEFs/GAPs gezielt imitieren oder modulieren. So können Vertreter der Gattung *Salmonella* und *Shigella* gezielt die Invasion in nicht-phagozytischen Zellen steuern, indem sie über das *type three secretion system* (TTSS) bakterielle Proteine in die Wirtszelle einbringen, welche die Funktion von GEFs modulieren oder imitieren. Diese Proteine interagieren mit kleinen GTPasen der Rho-Familie und induzieren eine Umordnung des Aktin-Zytoskeletts, die letztendlich zur Aufnahme der Bakterien führt (Zhou and Galan 2001; Buchwald et al. 2002). Nach erfolgreicher Invasion inhibiert *Salmonella* die Modulation des Zytoskeletts wieder, indem das Pathogen ein weiteres Protein mit GAP-Aktivität in die Zelle übermittelt und so die Aktivität der Rho GTPasen unterbindet (Fu and Galan 1999).

In diesem Teil der vorliegenden Doktorarbeit soll vor allem der Austauschfaktor identifiziert werden, welcher die CEACAM3-abhängige Stimulation der kleinen GTPase Rac während der Aufnahme von Op_a_{CEA} Gonokokken vermittelt.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Die CEACAM3-vermittelte Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken kann durch eine dominant negative Version des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors Vav inhibiert werden

Die Opsonin-unabhängige Phagozytose und Elimination CEACAM-bindender Bakterien durch humane Granulozyten verläuft vor allem über CEACAM3 und geht mit einer starken und spezifischen Stimulation der kleinen GTPase Rac einher (Hauck et al. 1998; Schmitter et al. 2004). Die Interaktion von CEACAM3 mit CEACAM-bindenden Bakterien generiert eine zelluläre Signaltransduktionskaskade, die zur spezifischen Aufnahme der Pathogene in die Granulozyten führt. Dabei induziert die Phosphorylierung der ITAM-ähnlichen Sequenz durch PTKs der Src-Familie, wie z.B. Hck und Fgr, eine spezifische Stimulation der Rac GTPase, die letztendlich für die lokale Umordnung des Aktin-Zytoskeletts und der Internalisierung der Bakterien verantwortlich ist (Billker et al. 2002; McCaw et al. 2003; Schmitter et al. 2004). Die genaue, molekulare Verbindung zwischen der CEACAM3-Aktivierung, der anschließenden Phosphorylierung der zytoplasmatischen ITAM-ähnlichen Sequenz und der GTP-Beladung der Rac GTPase ist bislang noch nicht bekannt. In dieser Hinsicht habe ich in der vorliegenden Doktorarbeit den Einfluss verschiedener, auch in Granulozyten exprimierter Proteine, den sog. guanine-nucleotide-exchange-factors (GEFs) untersucht, welche die Stimulation und damit die GTP-Beladung kleiner GTPasen der Rho Familie regulieren. Neben dem klassischen DH-GEF Vav, wurden auch Rho-spezifische Nukleotid-Austauschfaktoren untersucht, die ohne DH-Domäne die GTP-Beladung modulieren (Dock2, SWAP-70).

Das Vav Protein besitzt neben der für die klassischen GEFs charakteristischen DH-PH Domäne eine für die Adaptorfunktion verantwortliche C-terminale SH3-SH2-SH3-Domäne. Wird der komplette N-terminale Teil des Proteins, bis auf die SH3-SH2-SH3-Domäne deletiert, so entsteht ein Protein, das die Funktion der endogenen Vav Proteine kompetitiv inhibiert (Vav-dn; Wu et al. 1996).

Das SWAP-70 Protein besitzt im C-terminalen Teil der Primärsequenz eine putative DH-Domäne, die nur geringe Homologie zur echten Domäne aufweist, aber trotzdem für die Rac-GTP-Beladung essentiell ist. Wird dieser Teil des Proteins deletiert, so inhibiert das restliche N-terminale Protein die Stimulation der Rac GTPase und wirkt dominant negativ (SWAP-70-dn; Shinohara et al. 2002).

Auch Dock2 katalysiert den Austausch von GDP zu GTP während der Rac-Stimulation ohne eine DH-Domäne. Es ist eng verwandt mit Dock180, wird aber spezifisch in hämatopoetischen Zellen exprimiert (Nishihara et al. 1999) und ist gerade deswegen für die CEACAM3-vermittelte Internalisierung interessant. Um eine mögliche Rolle von Dock2 in der CEACAM3-abhängigen Stimulation der kleinen GTPase Rac zu untersuchen, wurde bis auf die N-terminale SH3-Domäne des Proteins das C-terminale Ende deletiert und so eine dominant negative Variante des Proteins erstellt (Dock2-dn; Nishihara et al. 1999; Nishihara et al. 2002). Aufgrund der Tatsache, dass in vivo die GEF-Aktivität von Dock180 nur in einem Komplex mit ELMO vermittelt wird, wurde zusätzlich dieses Protein mutiert, um die Dock-abhängige Rac-Stimulation von beiden Seiten zu untersuchen. Wie die Gruppe um Ravichandran (Brugnera et al. 2002) zeigen konnte, inhibiert die Deletion der C-terminalen Proteinsequenz in vivo, die Dock180-abhängige Beladung der kleinen GTPase Rac (ELMO-dn).

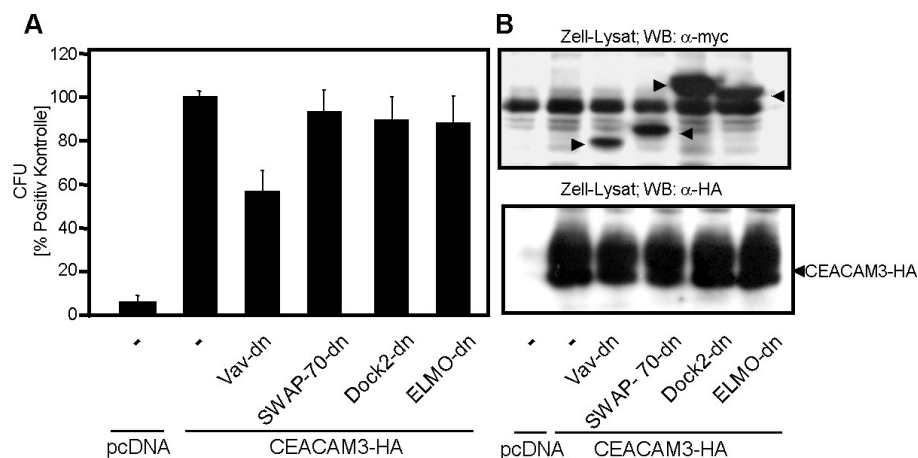


Abb. 4.3 **Die CEACAM3-vermittelte Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken braucht den Guanin Nukleotid Austauschfaktor Vav.** (A) 293 Zellen wurden mit pCDNA oder CEACAM3-HA transfiziert oder mit CEACAM3-HA und den indizierten dominant negativen Mutanten verschiedener GEFs kotransfiziert. Die Ansätze wurden für 1 h mit Opa_{CEA} Gonokokken infiziert und in einem Gentamicinassay die Zahl der Internalisierten Bakterien ermittelt. Das Diagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Messungen pro Wert. (B) Dieselben Ansätze wie in A wurden lysiert und die Expression der GEFs und des CEACAM3 Proteins im Western-Blot detektiert. Die GEFs konnten mittels ihres myc-Tag mit einem monoklonalen Maus α -myc Antikörper (oberer Blot) nachgewiesen werden und die Expression der CEACAM3 Proteine wurde mit einem monoklonalen Maus α -HA Antikörper bestätigt (unterer Blot).

Das CEACAM3 Protein wird nur auf humanen Granulozyten exprimiert und da diese Zellen der genetischen Manipulation durch Transfektion nicht zugänglich sind, wurden humane 293 Epithelzellen als Modellsystem transient transfiziert. Humane 293 Zellen exprimieren endogen kein Mitglied der CEACAM-Familie, internalisieren aber effektiv Opa_{CEA} Gonokokken nach der Transfektion mit CEACAM3 (Agerer et al. 2004; Schmitter et al. 2004). In einem ersten Versuch wurden die dominant negativen Versionen folgender GEFs, Vav (Vav-dn), SWAP (SWAP-dn), Elmo (Elmo-dn) und Dock (Dock-dn) mit CEACAM3 (CEACAM3-HA) oder mit dem leeren Expressionsvektor (pCDNA) kotransfiziert und mit Opa_{CEA} Gonokokken infiziert (Abb. 4.3). Nach einer Stunde Infektionsdauer wurde den Ansätzen das Antibiotikum Gentamicin zugesetzt und für weitere 45 Minuten inkubiert, um so spezifisch extrazelluläre Bakterien abzutöten. Das Gentamicin wurde anschließend entfernt und die Zellen mit Saponin lysiert. Die Lysate wurden entsprechend verdünnt, auf GC-Platten ausplattiert und für 24 h bebrütet (37 °C/5 % CO_2).

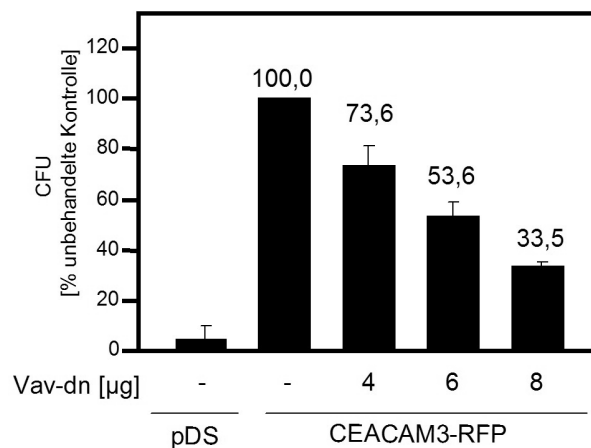


Abb. 4.4 **Die Aufnahme Opa_{CEA} -exprimierender Gonokokken in CEACAM3-transfizierte Zellen wird durch das dominant negative Vav konzentrationsabhängig inhibiert.** 293T Zellen wurden mit CEACAM3-RFP und den indizierten Konzentrationen an Vav-dn kotransfiziert oder nur mit dem leeren Expressionsvektor (pDS) oder CEACAM3-RFP transfiziert. Die Ansätze wurden für 1h mit Gonokokken infiziert und in einen Gentamicinassay eingesetzt. Die Ergebnisse geben die Zahl der reisolierten Bakterien in Prozent im Vergleich zur Positiv Kontrolle wieder. Das Diagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplets durchgeführt wurden.

Nach der Inkubation kann die Zahl der internalisierten Bakterien ausgewertet werden. 293 Zellen, die nur mit dem leeren Expressionsvektor (pCDNA) transfiziert wurden, internalisieren kaum Bakterien, während die Expression des CEACAM3 Proteins (CEACAM3-HA) zu einer spezifischen Aufnahme der Bakterien führt (Abb. 4.3 A). Interessanterweise interferiert nur die dominant negative Version von Vav (Vav-dn) mit

der CEACAM3-vermittelten Aufnahme der Opa_{CEA} Gonokokken (Abb. 4.3 A), während keine andere dominant negative GEF-Mutante die CEACAM3-vermittelte Internalisierung inhibiert (Abb. 4.3 A). Die verminderte Aufnahme in diesem Ansatz beruht dabei auf einer spezifischen inhibitorischen Wirkung des Vav Protein, da CEACAM3 in den entsprechenden Transfektionsansätzen ungefähr in gleichen Mengen exprimiert wird (Abb. 4.3 B; unterer Blot). Zudem zeigt die Expressionsanalyse der mit einem myc-Epitop ausgestatteten, dominant negativen GEF-Mutanten, dass in Relation zu den anderen GEFs vor allem das Vav-dn Protein nur schwach exprimiert wird (Abb. 4.3 B; oberer Blot). Um die schwache Expression des Vav Proteins auszugleichen, wurde die Menge kodierende cDNA schrittweise erhöht. Dafür wurden 293 Zellen entweder mit dem leeren RFP-Expressionsvektor (pDS) transfiziert oder mit CEACAM3-RFP und den indizierten Stoffmengen der Vav-dn-cDNA. Die Zellen wurden mit Opa_{CEA} Gonokokken für eine Stunde bei einer MOI: 20 infiziert und in einem Gentamicinassay eingesetzt.

Die Fusion des *red-fluorescent-proteins* (RFP) mit dem CEACAM3 Protein hat dabei keine Auswirkungen auf die CEACAM-vermittelte Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken. Zellen, die mit dem RFP-exprimierenden leeren Expressionsvektor transfiziert wurden internalisierten nur wenige Bakterien, während die Expression des CEACAM3-RFP zur spezifischen Aufnahme der Bakterien führte (Abb. 4.4). Die absolute Zahl der internalisierten Bakterien entspricht in etwa der Zahl, die über den CEACAM3-wt ohne Fluoreszenz-Tag aufgenommen werden. Eine Erhöhung der eingesetzten Vav-dn-cDNA Menge für die Transfektion führte zu einer mengenabhängigen Inhibition der CEACAM3-vermittelten Internalisierung der Gonokokken (Abb. 4.4).

Um letztendlich zu kontrollieren, dass nur die CEACAM3-vermittelte, Rac-abhängige Internalisierung der Gonokokken durch die dominant negative Variante des Vav Proteins inhibiert wird, wurden 293 Zellen mit pCDNA, CEACAM1, CEACAM3 oder CEACAM6 und mit oder ohne der cDNA für Vav-dn kotransfiziert. Die Zellen wurden mit Opa_{CEA} Gonokokken infiziert und die Zahl der internalisierten Gonokokken wurde anschließend in einem Gentamicinassay ermittelt. Weder die CEACAM1- noch die CEACAM6-abhängige Internalisierung der Gonokokken wird durch die dominant negative Vav Mutante entscheidend inhibiert. Das Vav-dn Protein interferierte ausschließlich mit der CEACAM3-vermittelten Aufnahme der Opa_{CEA} Gonokokken (Abb. 4.5).

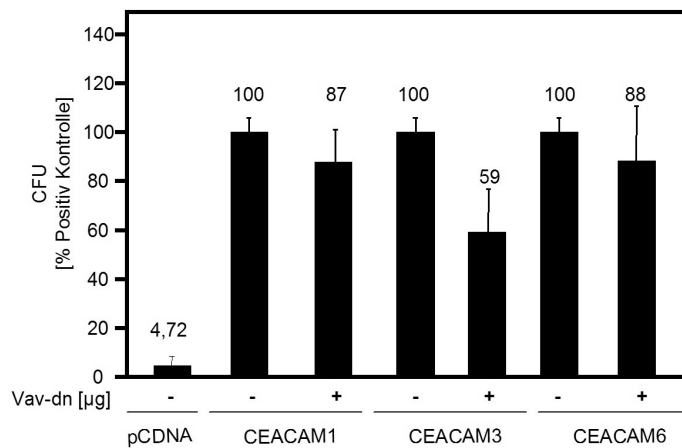


Abb. 4.5 **Ausschließlich die CEACAM3-vermittelte Aufnahme der Opa_{CEA} Gonokokken benötigt die Aktivität des Vav Proteins.** 293T Zellen wurden mit pCDNA, CEACAM1, CEACAM3 oder CEACAM6 und mit oder ohne Vav-dn kotransfiziert. Die Ansätze wurden für 60 Minuten mit Opa_{CEA} Gonokokken (MOI: 20) infiziert und in einen Gentamicinassay eingesetzt. Die Ergebnisse geben die Zahl der reisolierten Bakterien in Prozent im Vergleich zur Positiv Kontrolle wieder. Das Diagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplets durchgeführt wurden.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass von den verschiedenen dominant negativen Versionen der GEFs nur das Vav Protein mit der CEACAM3-vermittelten Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken interferiert.

4.2.2 Die genetische Manipulation der Vav2-Expression in stabil transfizierte CEACAM3-HeLa Zellen interferiert mit der CEACAM3-vermittelten Internalisierung Opa_{CEA}-exprimierender Gonokokken und der Stimulation der kleinen GTPase Rac

Um die Funktion von Vav in der CEACAM3-abhängigen Stimulation der kleinen GTPase Rac weiter zu festigen, wurden stabil transfizierte CEACAM3-exprimierende HeLa Zellen verwendet. Diese Zellen verhalten sich wie Granulozyten, was die CEACAM3-vermittelte Phagozytose von Opa_{CEA} Gonokokken und die Phosphorylierung der zytoplasmatischen, ITAM-ähnlichen Sequenz betrifft (Billker et al. 2002; McCaw et al. 2003). In diesen Zellen sollte nicht die intrinsische GEF-Funktion des endogenen Vav Protein kompetitiv gehemmt werden, sondern die Expression des endogenen Vav Proteins durch die siRNA-Technik blockiert werden. Der Einsatz der siRNA-Technik erlaubt es, die Translation von spezifischen Genen zu blockieren, so dass die Expressionsstärke des Gens und damit auch die intrinsische Funktion des Genproduktes temporär reduziert werden. Die transfizierten Zellen sind anschließend quasi genetisch defizient und so kann die Bedeutung des fehlenden Genproduktes für verschiedenste zelluläre Funktionen untersucht werden. Der Guanine-Nukleotid-Austauschfaktor Vav kommt in drei verschiedenen Isoformen vor, während Vav1 ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, sind Vav2 und Vav3 ubiquitär verbreitet. Aber die Vav2-Isoform des GEFs prädominiert in humanen Epithelzellen, so dass für die folgenden Experimente eine spezifische Vav2-siRNA eingesetzt wurde. In einem Vorversuch wurde die optimale Inkubationszeit für eine effektive Transfektion und Wirkung der siRNA Oligonukleotide in die HeLa Zellen ermittelt. Dafür wurden die Zellen entweder ohne siRNA, mit der Vav2-siRNA oder mit der Luziferase-siRNA für 48 bzw. 72 h transfiziert. Um eine toxische Wirkung des Transfektionsmediums auf die Zellen zu verhindern, wurde es nach 24 h gegen normales Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden nach der entsprechenden Inkubationszeit lysiert und ein Teil des Lysates wurde für eine Vav2-spezifische Immunpräzipitation präpariert. Das restliche Lysat wurde für einen Western-Blot eingesetzt, um die Proteinmenge der Ansätze mit einem spezifischen α - β -Aktin Antikörper zu kontrollieren. Die Immunpräzipitation von

Vav2 mit einem polyklonalen Hase α -Vav2 Antikörper und die anschließende Detektion des Proteins zeigte die spezifische Inhibition der Vav2-Expression durch die Vav2-siRNA. Nach 48 h und nach 72 h wird die Expression des Vav2 Proteins im Vergleich zu den Negativ-Kontrollen ohne Oligonukleotid und der siRNA-Luziferase bis zu 90% reprimiert (Abb. 4.4, oberer Blot). Die Transfektionsmethode per se hat keinen Einfluss auf das Zellwachstum oder die Vav2-Expression, da ohne siRNA-Oligonukleotid transfizierte Zellen dieselbe Menge an β -Aktin exprimieren (Abb. 4.6, unterer Blot) und keine Inhibition der Vav2-Expression zu beobachten ist (Abb. 4.6, oberer Blot).

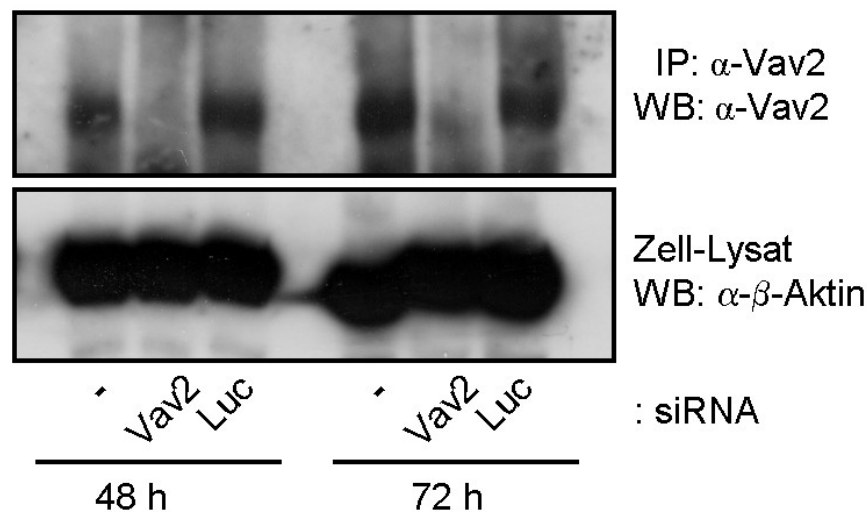


Abb. 4.6 **Die Transfektion von Vav2-siRNA unterdrückt spezifisch die endogene Expression von Vav2.** CEACAM3-exprimierende HeLa Zellen blieben unbehandelt oder wurden mit Vav2 bzw. Luziferase siRNA-Konstrukten transfiziert. Das Transfektionsmedium wurde nach 24 h gegen normales Medium ausgetauscht und die Ansätze wurden nach 48 h bzw. 72 h lysiert. Die Expression des Vav2 Proteins wurde mittels Immunpräzipitation (polyklonaler Hase α -Vav2 Antikörper; oberer Blot) kontrolliert. Der untere Blot zeigt, dass für die Präzipitate gleiche Mengen an Lysat eingesetzt wurden.

Um die Zellen dem Transfektionsmedium so kurz wie nötig auszusetzen, wurden die HeLa Zellen für weitere Experimente nur zwei Tage lang transfiziert. Im Anschluss an den Vorversuch wurden stabil exprimierende CEACAM3-HeLa Zellen mit derselben Methoden und denselben Ansätzen für 48 h transfiziert, mit *Opac_{CEA}* Gonokokken infiziert und die Zahl der internalisierten Bakterien in einem Gentamicinassay ermittelt. Wie zuvor reduzierte nur die Transfektion mit der Vav2-siRNA die Expression des Vav2 Proteins (Abb. 4.7 B). Zellen, die nur mit Transfektionsmedium ohne siRNA behandelt bzw. Zellen, die mit dem siRNA Kontroll-Oligonukleotid siRNA-Luziferase transfiziert wurden, interferierten weder mit der endogenen

Expression des Vav2 Proteins (Abb. 4.7 B) noch mit der CEACAM3-vermittelte Aufnahme der Opa_{CEA} Gonokokken (Abb. 4.7 A).

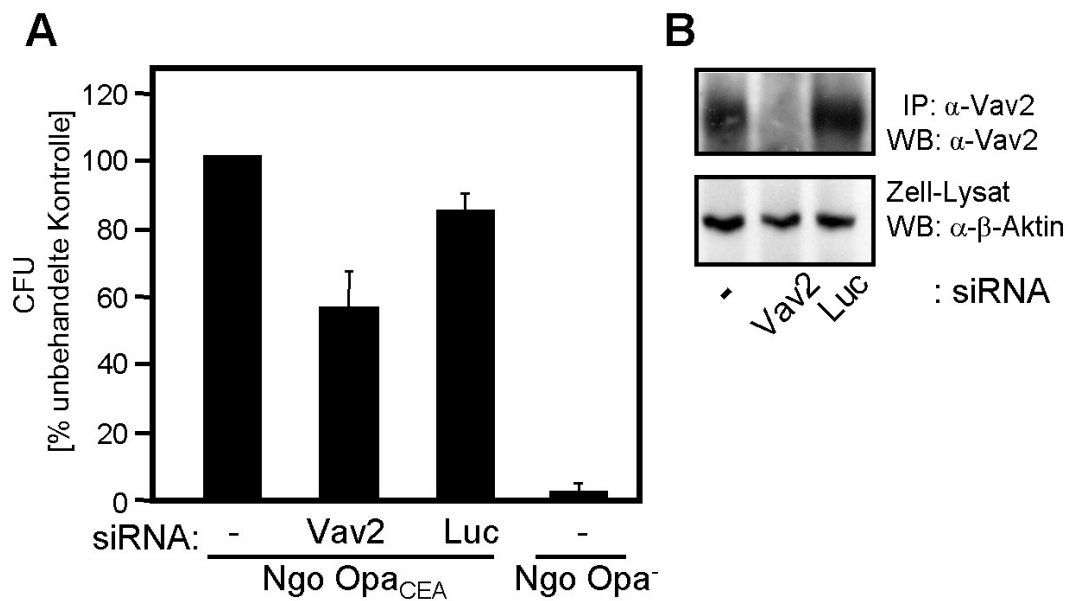


Abb. 4.7 **Die Transfektion von Vav2-siRNA in stabil transfizierte CEACAM3-HeLa Zellen beeinträchtigt die Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken.** CEACAM3-exprimierende HeLa Zellen wurden blieben unbehandelt oder wurden mit siRNA-Oligonukleotiden von Vav2 und Luziferase transfiziert. (A) Die Ansätze wurden für 1 h mit Opa_{CEA} (Ngo Opa_{CEA}) oder nicht-opaen Gonokokken (Ngo Opa⁻) infiziert und die Zahl der internalisierten Bakterien in einem Gentamicinassay ermittelt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Werten pro Ansatz. (B) Dieselben Ansätze wurden lysiert und die Expression des Vav2 Proteins mittels Immunpräzipitation (polyklonaler Hase α-Vav2 Antikörper; oberer Blot) kontrolliert. Der untere Blot zeigt, dass für die Präzipitate gleiche Mengen an Lysat eingesetzt wurden.

Nur die Inhibition der Vav2-Expression (Abb. 4.7 B) reduzierte spezifisch die CEACAM3-vermittelte Aufnahme der Opa_{CEA} Gonokokken (Abb. 4.7 A).

Eine der entscheidenden Fragen, ob das Vav Protein auch biochemisch an der CEACAM3-induzierten Signaltransduktionskaskade partizipiert, sollte ebenfalls mit der siRNA-Methode untersucht werden. Dafür wurden HeLa Zellen ohne siRNA und mit Vav2- bzw. Luziferase-siRNA transfiziert. Nach zwei Tagen der Inkubation wurden die Ansätze mit Opa_{CEA} Gonokokken infiziert und nach einer Stunde Infektion lysiert. Die Lysate der Zellen wurden entweder für eine GST-CRIB *pull down assay* (GST-P., Abb. 4.8 A) eingesetzt oder die Proteinexpression der Proben mittels des α-β-Aktin Antikörpers im Western-Blot verglichen (Abb. 4.8 B).

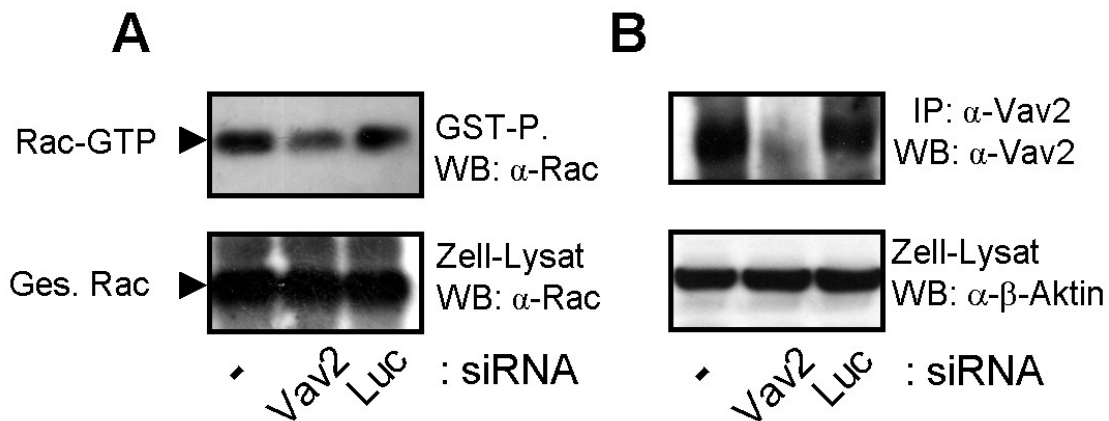


Abb. 4.8

Die Inhibition der Vav2-Expression interferiert mit der CEACAM3-vermittelten Stimulation der kleinen GTPase Rac. Stabil transfizierte CEACAM3-HeLa Zellen wurden ohne Oligonukleotid transfiziert oder mit der siRNA für Vav2 bzw. Luziferase transfiziert. (A) Nach der Infektion mit Opa_{CEA} Gonokokken für eine Stunde wurden die Ansätze lysiert und GTP-beladenes Rac Protein mittels GST-CRIB Fusionsprotein präzipitiert (oberer Blot). Die Detektion des GTP-beladenen Racs sowie der Menge an Rac-Protein (Ges. Rac; unterer Blot) wurde mit einem monoklonalen Maus α -Rac Antikörper im Western-Blot detektiert. (B) Nur die siRNA von Vav2 hemmt die endogene Expression von Vav2 (oberer Blot), obgleich dieselbe Menge an Zell-Lysat (unterer Blot) eingesetzt wurde.

Die Interaktion von Gonokokken mit dem CEACAM3 Protein führt zu einer distinkten Stimulation der kleinen GTPase Rac. Die GTP-Beladung der Rho GTPase beruht dabei zum einen auf der Expression der Opa_{CEA} -Adhäsine und zum anderen auf der Integrität der ITAM-ähnlichen Sequenz (Schmitter et al. 2004; Kapitel3). Interessanterweise inhibiert die Vav2-siRNA-vermittelte Repression der Vav2-Protein-Synthese (Abb. 4.8 B) die Stimulation der kleinen GTPase Rac (Abb. 4.8 A), während in Vav2-exprimierenden Zellen weder die Transfektion der Luziferase-siRNA noch die Transfektion der Zellen ohne Oligonukleotid mit der GTP-Beladung interferiert (Abb. 4.6 A). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass das Vav Protein eine essentielle Komponente der CEACAM3-induzierten Signaltransduktionskaskade ist und seine intrinsische Funktion die Stimulation der kleinen GTPase Rac reguliert.

4.2.3 Die CEACAM3-vermittelte Interaktion mit Opa_{CEA}-exprimierenden Gonokokken führt zur Rekrutierung des Austauschfaktors Vav

Die Fc γ -Rezeptor-vermittelte Phagozytose von IgG opsonierten Partikeln führt zur Phosphorylierung des Rezeptors über Kinasen der Src-Familie und zu einer GTPase-abhängigen Phagozytose der Partikel (Cox et al. 1997; Caron and Hall 1998; Massol et al. 1998). Das Vav Protein wird während der Phagozytose zu entstehenden Phagosomen rekrutiert, kolokalisiert dort mit F-Aktin und ist spezifisch für die Stimulation der kleinen GTPase Rac, aber nicht Cdc42, verantwortlich (Patel et al. 2002). Das Vav Protein kann über seine SH2-Domäne direkt mit der PTK Syk (Deckert et al. 1996) interagieren, welche ihrerseits selbst über SH2-Domänen an die phosphorylierte ITAM-Sequenz des Fc γ -Rezeptor bindet (Darby et al. 1994; Greenberg et al. 1996).

In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob die Aufnahme der Gonokokken über CEACAM3 auch zur Rekrutierung des GEFs führt. Humane 293 Zellen wurden mit CEACAM3-RFP und Vav2-wt-HA kotransfiziert. Die Zellen wurden mit FITC-markierten Opa_{CEA} Gonokokken infiziert und für die konfokale Mikroskopie prozessiert. Interessanterweise führt die Assoziation der Gonokokken mit CEACAM3-RFP (Pfeile) zu einer spezifischen, lokalen Rekrutierung des Vav Proteins (Abb. 4.9).

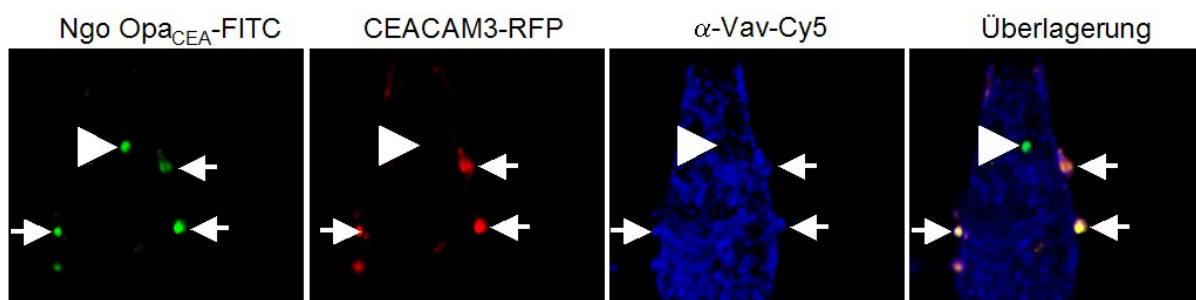


Abb. 4.9 **Die Interaktion von Opa_{CEA} Gonokokken mit CEACAM3 führt zur Rekrutierung des Vav2 Proteins.** 293 Zellen wurden mit CEACAM3-RFP transfiziert und mit Opa_{CEA} FITC-markierten Gonokokken (Ngo Opa_{CEA}) für 1 h infiziert. Die Ansätze wurden für die Mikroskopie prozessiert und das endogene Vav mittels polyklonalen-Hase α -Vav2 Antikörper und mit Cy5-markierten Ziege α -Hase Antikörper detektiert. Mit CEACAM3 assoziierte Bakterien führten zu einer lokalen Rekrutierung von Vav (Pfeil), während nicht adhärierende oder bereits internalisierte Bakterien der Zelle kein Vav Protein rekrutieren (Pfeilkopf).

Um zu bestätigen, dass das Vav Protein direkt mit dem CEACAM3 Protein interagieren kann, wurden 293 Zellen mit einem leeren GFP-Expressionsvektor oder CEACAM3-GFP und mit oder ohne Vav2-HA kotransfiziert sowie alle Ansätze mit Opa_{CEA} Gonokokken infiziert. Die Zellen wurden lysiert und CEACAM3-GFP der jeweiligen Ansätze mit einem polyklonalen Hase α -GFP Antikörper präzipitiert. Die Expressionskontrolle der verschiedenen Konstrukte erfolgte mittels Western-Blot des Zell-Lysates. Sowohl das Vav2-wt-HA Protein (Abb. 4.10; mittlerer Blot) als auch CEACAM3-GFP (Abb. 4.10; unterster Blot) werden entsprechend der Transfektionsansätze und zudem in etwa gleicher Menge exprimiert. Des weiteren ist die Koimmunpräzipitation spezifisch, da das Vav Protein nicht unspezifisch mit dem GFP-Protein interagiert und in Präzipitaten von CEACAM3 in Zellen ohne Vav2-wt-HA cDNA keine unspezifische Proteinbande nachzuweisen ist (Abb. 4.10; oberster Blot). Nur in CEACAM3-GFP und Vav2-wt-HA exprimierende Zellen führt die Infektion des Ansatzes zur spezifischen Kopräzipitation des Vav2 Proteins (Abb. 4.10; oberster Blot). Die Ergebnisse bestätigen, dass die Interaktion von CEACAM3

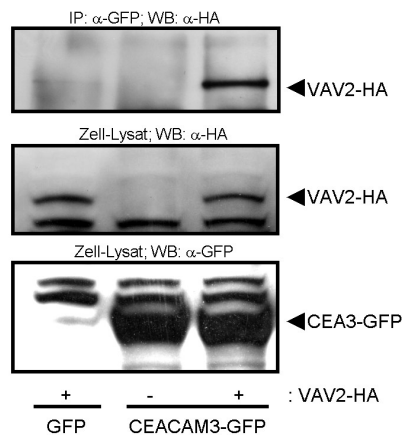


Abb. 4.10 **Das Vav2 Protein interagiert mit dem CEACAM3 Protein.** 293 Zellen wurden mit dem leeren GFP-Expressionsvektor oder mit CEACAM3-GFP und mit oder ohne Vav2-wt-HA kotransfiziert sowie mit Opa_{CEA} Gonokokken für eine Stunde (MOI: 50) infiziert. Die Lysate wurden für eine Koimmunpräzipitation mit einem polyklonalen Hase α -GFP Antikörper behandelt und kopräzipitierendes Vav2 anhand des monoklonalen α -HA Antikörpers detektiert (oberster Blot). Die Expression der induzierten Vav- (mittlerer Blot) bzw. CEACAM3-GFP-Konstrukte (unterster Blot) wurde im Zell-Lysat anhand des monoklonalen α -HA Antikörpers bzw. des polyklonalen Hase α -GFP Antikörpers kontrolliert.

mit Opa_{CEA} Gonokokken zu einer Rekrutierung des Vav-GEFs führt und vermutlich ein Proteinkomplex aus Vav und CEACAM3 entsteht, der auf physikalischer Interaktion der beiden Proteine beruht.

4.2.4 Der Tyrosinrest 230 der CEACAM3 ITAM-ähnlichen Sequenz ist für eine direkte Proteininteraktion mit Vav verantwortlich

Das CEACAM3 Molekül besitzt als einziger Vertreter der Familie eine ITAM-ähnliche Sequenz. Die Integrität der zytoplasmatischen Domäne und die Funktionalität der ITAM-ähnlichen Sequenz ist essentiell für die CEACAM3-vermittelte Internalisierung der Gonokokken, da die Deletion der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM3 oder die Mutation beider Tyrosinreste innerhalb der ITAM-ähnlichen Sequenz die Stimulation der kleinen GTPase Rac inhibiert (Billker et al. 2002; Schmitter et al. 2004). Interessanterweise besitzt die dominant negative Variante des Vav Proteins, das mit der CEACAM3-vermittelten Internalisierung der Gonokokken interferiert, eine SH2-

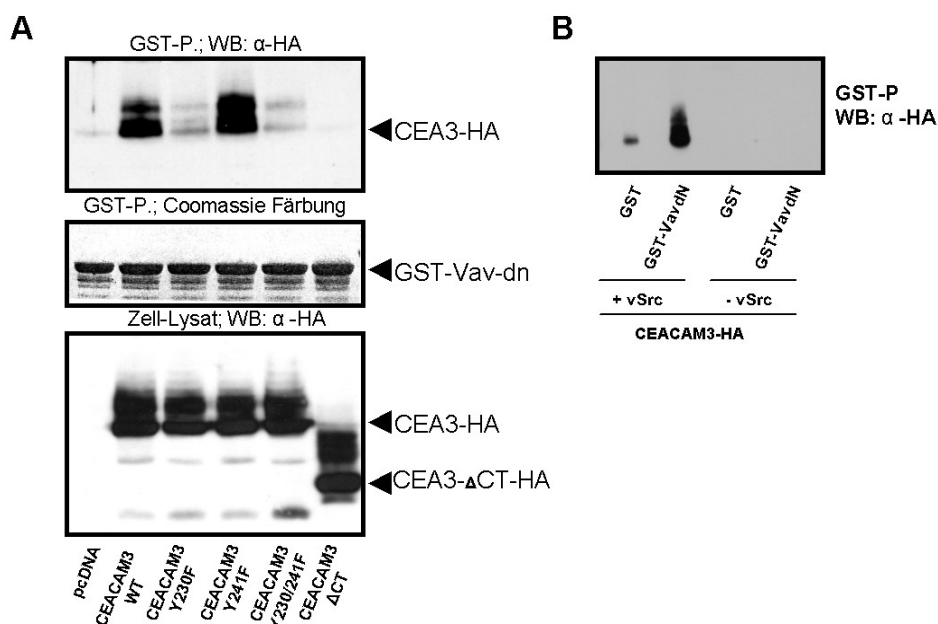


Abb. 4.11

Der Tyrosinrest Y230 der ITAM-ähnlichen Sequenz von CEACAM3 interagiert spezifisch mit der SH3-SH2-SH3 Domäne von Vav. (A) 293 Zellen wurden mit den indizierten Konstrukten von CEACAM3 transfiziert und nach 2 Tagen lysiert. Die Lysate wurden mit einem GST-Vav-dn Fusionsprotein für drei Stunden inkubiert. Gleiche Mengen des Fusionsproteins wurden in einem mit Coomassie gefärbten Polyacrylamidgel (mittlerer Blot) und ähnliche Mengen der verschiedenen CEACAM3-Mutanten mit einem monoklonalen Maus α-HA Antikörper (unterster Blot) nachgewiesen. Das Vav-dn Protein präzipitiert spezifisch mit CEACAM3-wt-HA und mit der CEACAM3Y230F-Punktmutante (oberster Blot). (B) 293 Zellen wurden mit oder ohne v-Src und CEACAM3-HA kotransfiziert und nach 2 Tagen lysiert. Die Lysate wurden mit einem GST-Vav-dn Fusionsprotein für 3 h inkubiert und die Präzipitate mit einem monoklonalen Maus α-HA Antikörper untersucht. Nur phosphoryliertes CEACAM3-HA präzipitiert mit GST-Vav-dn.

Domäne und könnte daher direkt über die Phosphotyrosin-erkennende Domäne mit den phosphorylierten Tyrosinresten der ITAM-ähnlichen Sequenz von CEACAM3 interagieren.

In dieser Hinsicht wurde die dominant negative Domäne des Vav Proteins mit einem GST-Protein fusioniert und in *E. coli* überexprimiert. 293 Zellen wurden mit v-Src und dem leeren Expressionsvektor (pCDNA), CEACAM3-wt oder den verschiedenen CEACAM3-Mutanten kotransfiziert. Die CEACAM3-Mutanten sind entweder Punktmutanten, in denen jeweils ein Tyrosinrest der ITAM-ähnlichen Sequenz gegen ein Phenylalanin ausgetauscht wurde (CEACAM3Y230F oder CEACAM3Y241F), die entsprechende doppelte Punktmutanten (CEACAM3Y230/241F) oder Deletionsmutanten, deren komplette zytoplasmatische Domäne entfernt wurde (CEACAM3 Δ CT). Die virale Src Kinase (v-Src) vermag die ITAM-ähnliche Sequenz zu hyperphosphorylieren (Schmitter et al. 2004). Um die Interaktion mit dem Vav Protein zu erleichtern, wurden die Zellen mit der entsprechenden cDNA kotransfiziert. Die Zellen wurden lysiert und mit dem aufgereinigten Vav-dn-Fusionsprotein inkubiert. Das Fusionsprotein wurde anschließend mit Glutathion-Agarose präzipitiert und die Präzipitate im Western-Blot mit einem monoklonalen Maus α -HA Antikörper auf kopräzipitierende CEACAM Proteine untersucht. Das Vav-dn Protein interagiert dabei direkt mit dem intakten CEACAM3 Protein (CEACAM3-wt) und der Punktmutane CEACAM3Y241F (Abb. 4.11 A, oberster Blot), während weder die doppelte Punktmutante (CEACAM3Y230/241F) noch die Deletionsmutante (CEACAM3 Δ CT) mit dem Fusionsprotein interagiert (Abb. 4.11 A, oberster Blot). Das Ergebnis beruht auf der spezifischen Präzipitation des CEACAM3 Proteins, da die verschiedenen Konstrukte in etwa gleichen Mengen exprimiert werden (Abb. 4.11 A, unterster Blot) und für die Präzipitation dieselben Mengen an Fusionsprotein eingesetzt wurden (Abb. 4.11 A, mittlerer Blot). Zudem ist die Tyrosin-Phosphorylierung der ITAM-ähnlichen Sequenz von CEACAM3 für die Interaktion mit Vav-dn essentiell. Nur hyperphosphoryliertes CEACAM3 (s.a. Abb. 2.5) präzipitiert mit dem GST-Vav-dn Fusionsprotein (Abb. 4.11 B)

Die hier vorgestellten Ergebnisse weisen auf eine essentielle Rolle des Vav Proteins während der CEACAM3-vermittelten Internalisierung der Gonokokken hin.

4.2.5 Die Internalisierung von Opa_{CEA}-exprimierenden Gonokokken in humane Granulozyten beruht auf der Vav-abhängigen Stimulation der kleinen GTPase Rac

Um zu untersuchen, ob die Guanin-Nukleotid-Austauschfunktion des Vav Protein auch an der CEACAM3-induzierten Signalkaskade in primären Granulozyte beteiligt ist, wurden isolierte humane Granulozyte mit Hilfe der TAT-Proteine transduziert. Dafür wurde die dominant negative Version des Vav Protein (TAT-Vav-dn) und des SWAP-Proteins (TAT-SWAP-dn) in *Escherichia coli* angereichert, die Bakterienzellen durch Ultraschall aufgebrochen und die Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie über Ni-NTA Agarose aufgereinigt (Abb. 4.12). Je 2 µM der dominant negativen GEF-Fusionsproteine wurden mit isolierten humanen Granulozyten für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden den Ansätzen FITC-markierte opaque (Ngo Opa_{CEA}) Gonokokken hinzugefügt ohne das Medium zu wechseln. Als Kontrolle dienten Granulozyten die mit nicht-opaque *Neisseria gonorrhoeae* (Ngo Opa⁻) infiziert wurden. Die Zellen

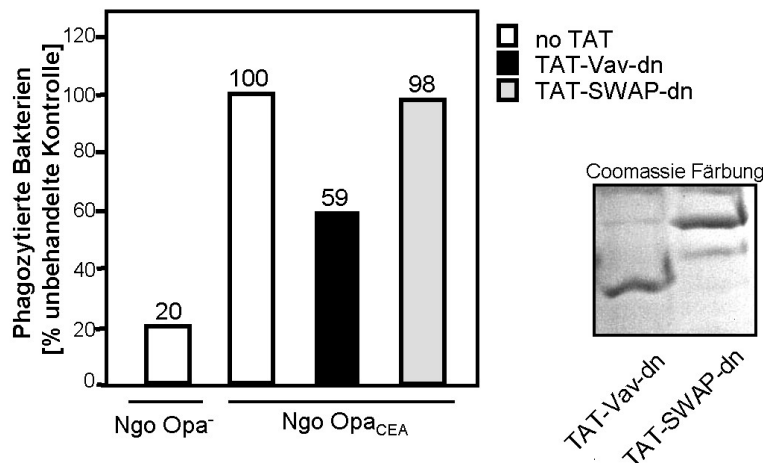


Abb. 4.12

Die Phagozytose von Opa_{CEA} Gonokokken in humane Granulozyten lässt sich durch die Proteintransduktion von TAT-Vav-dn beeinträchtigen. Isolierte humane Granulozyten wurden für 20 min mit FITC-markierten opaquen (Ngo Opa_{CEA}) oder nicht-opaquen (Ngo Opa⁻) Gonokokken infiziert. Vor der Infektion wurden die Granulozyten mit oder ohne 2 µM der TAT-Fusionsproteine TAT-Vav-dn oder TAT-SWAP-dn für 1 h präinkubiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte in der FACS-Analyse. Das Diagramm zeigt die Zahl an phagozytierten Bakterien in Bezug zur unbehandelten Positiv-Kontrolle eines repräsentativen Experimentes. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Zellen von zwei verschiedenen Spendern erhalten. Die Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgte mittels Ni-NTA Agarose und konnte in der SDS-PAGE mittels Coomassie Färbung visualisiert werden.

wurden für eine Stunde mit 20 Bakterien pro Zelle (MOI: 20) ebenfalls bei 37°C inkubiert und anschließend mit 1 x PBS / 2% FCS zweimal gewaschen und für die FACS-Analyse präpariert. Vor der Auswertung der Ansätze wurde jedem Ansatz der Farbstoff Trypanblau zugesetzt. Trypanblau überdeckt das Fluoreszenzsignal des FITC-Markers. Es vermag nicht in intakte Zellen einzudringen und absorbiert daher selektiv die Fluoreszenz extrazellulärer Bakterien. So wird in der FACS-Analyse die Zahl der Zellen einer Granulozytenpopulation mit internalisierten FITC-markierten Gonokokken und die Stärke des Fluoreszenzsignals ermittelt.

Nicht-opaque Gonokokken (Ngo Opa⁻) werden ohne vorherige Opsonierung kaum phagozytiert (Abb. 4.12). Dies bestätigt Forschungsergebnisse, wonach für eine effektive Aufnahme der Gonokokken in Granulozyten die Expression des Opa_{CEA}-Adhäsins nötig ist (Abb. 4.12). Dagegen werden die Opa_{CEA} Gonokokken in ungefähr 90% der Zellen einer Granulozytenpopulation internalisiert. Die Granulozyten exprimieren zwar drei der vier Opa_{CEA}-erkennenden CEACAM Proteine, nämlich CEACAM1, CEACAM3 und CEACAM6, aber die Aufnahme und die Elimination der Opa_{CEA} Gonokokken wird vor allem durch das CEACAM3 Protein vermittelt. (Kapitel 2 und 3; Schmitter et al., 2004). Interessanterweise hat die Transduktion des TAT-SWAP-dn Fusionsproteins im Vergleich mit dem unbehandelten Ansatz keinen Einfluss auf die CEACAM-vermittelte Phagozytose der Opa_{CEA} Gonokokken in die Granulozyten. (Abb. 4.12). Dagegen führt die Präinkubation der Zellen mit dem TAT-Vav-dn Fusionsprotein zu einer starken Reduktion der internalisierten Bakterien (Abb. 4.12).

Auch die Auswertung parallel angefertigter Ansätze für die Immunfluoreszenzmikroskopie bekräftigen die Ergebnisse. Humane Granulozyten wurden mit TAT-SWAP-dn oder Tat-Vav-dn für eine Stunde präinkubiert, mit FITC-markierten Opa_{CEA} Gonokokken für 20 Minuten infiziert und für konfokale Fluoreszenzmikroskopie fixiert. Die spezifische Markierung der extrazellulären Bakterien mit einem polyklonalen Hase α -Gonokokken Antikörper und einem sekundären anti-Hase-Cy5 Antikörper (blau), erlaubt die distinkte Unterscheidung zwischen extrazellulären (blau-Cy5/grün-FITC) und intrazellulären (grün-FITC) Bakterien. Die transduzierten Fusionsproteine konnten anhand des HA-Epitops mit einem monoklonalen Maus α -HA Antikörper und einem Cy3-konjugierten sekundärem Antikörper (rot) nach der Permeabilisierung der Granulozyten in der Mikroskopie detektiert werden.

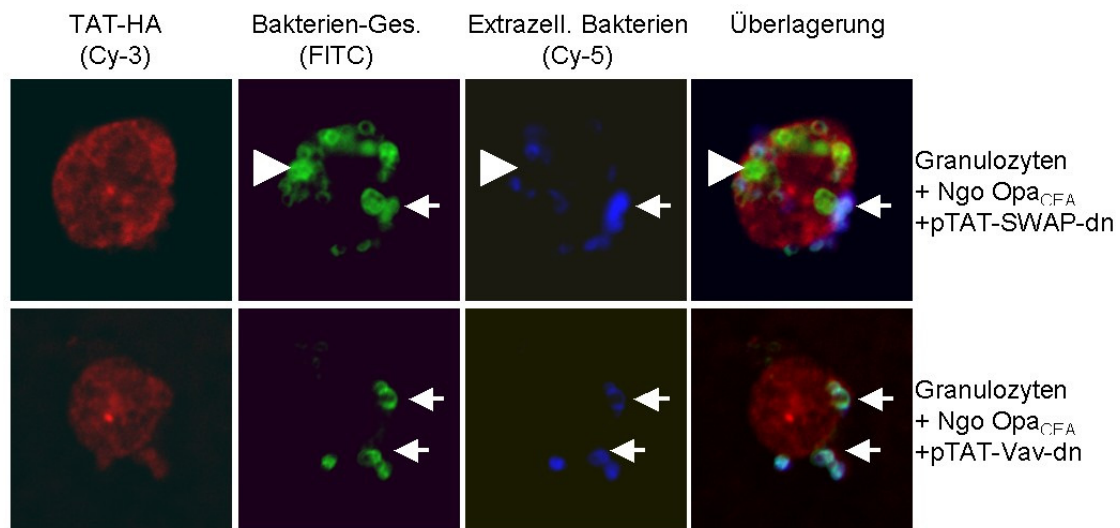


Abb. 4.13 **Die Transduktion des TAT-Vav-dn Fusionsprotein in primäre Granulozyten interferiert mit der CEACAM-vermittelte Aufnahme Opa_{CEA} Gonokokken.** Isolierte humane Granulozyten wurden mit je $2\mu\text{M}$ TAT-Vav-dn bzw. TAT-SWAP-dn für eine Stunde präinkubiert, anschließend mit FITC-markierten Opa_{CEA} Gonokokken (MOI: 20) für 20 Minuten infiziert und für die Immunfluoreszenzmikroskopie präpariert. Extrazelluläre Bakterien wurden mit einem polyklonalen Hase α -Opa Antikörper und einem sekundären Cy5-konjugierten Ziege α -Hase Antikörper detektiert. Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert und die TAT-Fusionsproteine anhand des HA-Epitops mit einem monoklonalen Maus α -HA Antikörper und einem sekundären Hase α -Maus-Cy3 Antikörper angefärbt. Extrazelluläre Bakterien sind FITC/Cy5 positiv (grün/blau; Pfeil), während intrazellulär lokalisierte Gonokokken nur mit FITC markiert sind (grün; Pfeilkopf).

Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass trotz der Inkubation der Granulozyten mit Tat-SWAP-dn viele intrazelluläre Bakterien zu finden sind (Abb. 4.13; Pfeilkopf). Diese weisen eine charakteristische FITC-Färbung auf. Hingegen finden sich nur wenige extrazelluläre, mit der Zellwand-assoziierte Bakterien, die sowohl FITC als auch Cy5 positiv sind (Abb. 4.13; Pfeil). Dagegen befinden sich in TAT-Vav-dn transduzierten Zellen keine intrazellulären Bakterien. Sämtliche Bakterien befinden sich außerhalb der Zelle oder sind mit der Zellmembran assoziiert, da sie die typische FITC/Cy5 Markierung aufweisen (Abb. 4.13; Pfeilkopf).

Zusammenfassend beweisen die Daten, dass die CEACAM3-abhängige Aufnahme der Gonokokken die enzymatische Funktion des Vav Protein benötigt. Zudem spielt die Vav-vermittelte Stimulation der kleinen GTPase Rac auch in der Oponin-unabhängigen, CEACAM-vermittelten Phagozytose der Opa_{CEA} Gonokokken in humane Granulozyten eine wichtige Rolle.

4.3 Diskussion

Die Opsonin-unabhängige Phagozytose von Gonokokken in Experimenten mit humanen Granulozyten setzt die Expression des Opa_{CEA}-Adhäsins voraus, da nicht-opaque Gonokokken nicht internalisiert werden. Auf zellulärer Seite zeichnen sich die Proteine der CEACAM-Familie für die Internalisierung und die effektive Elimination der Gonokokken verantwortlich. Die Granulozyten exprimieren drei der vier Opa_{CEA}-bindenden CEACAM Proteine, nämlich CEACAM1, CEACAM3 und CEACAM6. Doch nur die Interaktion mit CEACAM3 führt zu einer effizienten Internalisierung und distinkten Elimination CEACAM-bindender Pathogene. Das CEACAM3 Protein ist in der CEACAM-Familie einzigartig, da sein einzig bekannter natürlicher Ligand das Opa_{CEA}-Adhäsins der Gonokokken ist, es nur auf Granulozyten exprimiert wird und zudem als einziges Opa_{CEA}-bindendes Protein der Familie in der zytoplasmatischen Domäne eine Sequenz besitzt, die dem *immunoreceptor tyrosin based activation motif* (ITAM) verschiedener immunogener Rezeptoren ähnlich ist. Es ist durchaus denkbar, dass die ITAM-ähnliche Sequenz ein kritischer Faktor für die effiziente CEACAM3-vermittelte Internalisierung von Gonokokken ist. Nur die Interaktion mit CEACAM3 erfordert die Beteiligung von Kinasen der Src-Familie sowie der kleinen GTPase Rac, während weder die CEACAM1- noch die CEACAM6-vermittelte Internalisierung diese Zellkomponenten stimuliert. Die Adhärenz der Gonokokken an CEACAM3 führt zu einer Phosphorylierung der Tyrosinreste der ITAM-ähnlichen Sequenz durch Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie und diese intrazelluläre Modifikation der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM3 ist essentiell für die Stimulation der kleinen GTPase Rac sowie der CEACAM3-vermittelten Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken.

GTPasen der Rho Familie, wie die drei bekanntesten Rho, Rac und Cdc42, sind für fast alle Aktin-abhängigen Prozesse in der Zelle, zu denen auch die CEACAM3-vermittelte Umordnung des Zytoskeletts während der Phagozytose der Gonokokken zählt, verantwortlich. Die Stimulation der Rho GTPasen führt zur Beladung der Proteine mit GTP und nur im GTP-beladenen (stimulierten) Zustand können diese mit Effektorproteinen interagieren, während GDP-beladene (ruhende) Proteine nicht erkannt werden. Die eigentliche enzymatische GTPase-Aktivität führt zur Abspaltung

eines der drei Phosphatreste des gebundenen GTPs und damit zur Inaktivierung des Proteins. Die Aktivität dieser molekularen Schalter unterliegt aber nicht nur einer autonomen Selbstregulation, sondern wird auch durch die Zelle distinkt moduliert. Verschiedene Regulatoren beeinflussen die Stimulation, also den Austausch des gebundenen GDPs zu GTP, die Lokalisation der GTPasen innerhalb der Zelle und die Verfügbarkeit des GDP- sowie des GTP-gebundenen Proteins. Es ist bekannt, dass die Generierung von GTP-gebundenen (stimulierten) GTPasen vor allem durch die sog. guanine nucleotide exchange factors (GEFs) vermittelt wird. Bis heute sind ungefähr 60 verschiedene GEFs bekannt, die die 15 GTPasen der Rho-Familie regulieren (Venter et al. 2001). Dabei stimulieren einige der GEFs spezifisch nur eine einzelne GTPase, während andere simultan mehrere Rho Proteine modulieren. Die Zelle besitzt demnach ein breites Netzwerk, um die Funktionen der GTPasen zu regulieren. Es lässt sich aber nur spekulieren, weshalb den Zellen diese offensichtliche funktionelle Redundanz, dass die Zellen dreimal mehr GEFs als GTPasen besitzen, zur Verfügung steht. Vermutlich reflektiert dies Zelltyp-spezifische und/oder Signal-spezifische-Voraussetzungen, um distinkte Kombinationen der Rho Proteine zu stimulieren.

Verschiedenen GEFs muss es daher möglich sein, in vivo ein und dieselbe GTPase zu stimulieren. Die Möglichkeit besteht, dass die offensichtliche funktionelle Redundanz eine Zelltyp-spezifische Expression reflektiert, die optimale Funktionalität in verschiedenen differenzierten Zeller erlaubt. Obwohl dies in einigen Fällen zutrifft, wird die Mehrzahl der GEFs in einer Bandbreite von Zellen exprimiert. Eine zweite Möglichkeit ist, dass verschiedene Rezeptoren unterschiedliche GEFs benutzen, um dieselbe GTPase zu stimulieren und dass der jeweilige GEF optimal an den Rezeptor angepasst ist. Zudem könnten GEFs eine entscheidende Rolle für die zelluläre Lokalisierung der Rho GTPasen spielen und selektiv die involvierten Effektorproteine bestimmen.

Bislang ist die molekulare Verbindung zwischen der CEACAM3-Bindung, der Phosphorylierung der ITAM-ähnlichen Sequenz und der verstärkten GTP-Beladung der Rac GTPase unbekannt. Um die molekulare Verbindung zwischen CEACAM3 und Rac-Stimulation besser zu verstehen, sollte in der vorliegenden Doktorarbeit der Austauschfaktor identifiziert werden, der für die Stimulation der Rac GTPase

während der Gonokokkeninternalisierung verantwortlich ist. Dafür wurden verschiedene GEFs ausgesucht, die zum einen mit der GTPase Rac interagieren und zum anderen vor allem in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. Die GEFs wurden genetisch derart manipuliert, dass sie als dominant negative Konstrukte fungieren (s. a. Kapitel 4.2.1) und die GEF-vermittelte GTP-Beladung der Rac GTPase inhibieren.

Um zu untersuchen, ob die GEFs an der CEACAM3-vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind, müssen sie mit der CEACAM3-cDNA kotransfiziert werden. Da CEACAM3 ausschließlich auf Granulozyten vorkommt und diese sich nicht transfizieren lassen, wurden die Konstrukte in 293 Zellen exprimiert. 239 Zellen exprimieren endogen kein Mitglied der CEACAM-Familie, internalisieren aber effektiv Opa_{CEA} Gonokokken nach der Transfektion mit CEACAM3 (Agerer et al. 2004; Schmitter et al. 2004). In einem ersten Versuch behinderte nur das dominant negative GEF-Protein Vav-dn die CEACAM3-vermittelte Internalisierung der Gonokokken (Abb. 4.3 A). Die Interferenz lässt sich dosis-abhängig steigern (Abb. 4.4) und ist für das CEACAM3 Protein spezifisch, da weder die CEACAM1- noch die CEACAM6-vermittelte Aufnahme der Gonokokken durch das Vav-dn Konstrukt behindert wurde (Abb. 4.5). Daher ist die CEACAM3-induzierte Stimulation der kleinen GTPase Rac abhängig von GEFs, die eine DH-Domäne besitzen, da die dominant negativen Konstrukte von SWAP-70, ELMO und DOCK2, welche von der DH-Domäne unabhängig die Rac-spezifische GTP-Beladung katalysieren können, nicht mit der CEACAM3-abhängigen Rac-Stimulation interferieren. Der Austauschfaktor Vav wird in drei verschiedenen Isoformen exprimiert, Vav1, Vav2 und Vav3. Vav1 wird spezifisch auf hämatopoetischen Zellen exprimiert, während Vav2 und Vav3 ein deutlich breiteres Expressionsspektrum aufweisen. Vor allem Vav2 prädominiert in Epithelzellen. Für die Inhibitionsversuche wurde allerdings die cDNA des Vav1 Protein mutiert, indem der komplette N-terminale Teil des Vav Proteins entfernt wurde. Der C-terminale Teil des Proteins bestehend aus einer SH3-SH2-SH3 Domäne fungiert dann als dominant negative Variante des Vav Proteins. Diese Vorgehensweise ist ohne weiteres möglich, da gerade diese Domäne zwischen den einzelnen Isoformen hochkonserviert ist und die Überexpression in T-Zellen, Mastzellen und Fibroblasten zu dominant negativen Effekten führt (Wu et al. 1996; Arudchandran et al. 2000).

Das Vav Protein nimmt in der GEF-Familie eine besondere Rolle ein, da es als einziger Vertreter der GEF-Proteine eine SH2-Domäne besitzt, die eine Bindung mit phosphorylierten Tyrosinresten erlauben sollte. Zudem ist diese Domäne zwischen zwei SH3-Domänen, die mit Prolin-reichen Abschnitten auf anderen Proteinen interagieren, eingebettet (Bustelo 2000). Diese strukturelle Anordnung ist jedoch eher ein Charakteristikum aus der Familie der Adaptorproteine und in der Tat wurde das Vav Protein initial als solches isoliert. Erst die Identifizierung der DH Domäne, welche die GEF-Aktivität vermittelt, erlaubte eine Zuordnung des Proteins zur GEF-Familie (Crespo et al. 1997).

Daher ist das Vav Protein von außerordentlichem Interesse, da es die typischen Eigenschaften eines Adaptorproteins mit der GEF-Aktivität verbindet. Es scheint auch beide Funktionen auszuüben, da es sowohl GEF-Aktivität vermittelt als auch von der DH-Domäne-unabhängig, als reines Adaptorprotein an Signalkaskaden partizipiert (Bustelo 2000; Bustelo 2001). Die Funktion als Adaptorprotein beschränkt sich dabei aber auf hämatopoetische Zellen. In T- und B-Lymphozyten vermittelt das Vav Protein die Expression von Interleukin-2 und generiert stabile Ca^{2+} -Ionenströme in stimulierten Lymphozyten (Fischer et al. 1995; Wu et al. 1995; Turner et al. 1997; Fischer et al. 1998; Costello et al. 1999; Billadeau et al. 2000). Verschiedenste Ergebnisse belegen, dass die Prozesse unabhängig von der Rho/Rac-Stimulation sind und das Vav Protein ausschließlich als Adaptor funktioniert (Wu et al. 1995; Lopez-Lago et al. 2000).

Um hingegen die Rolle des Vav Proteins während der CEACAM3-vermittelten Aufnahme der Gonokokken als Austauschfaktor der kleinen GTPase Rac weiter zu festigen, wurden stabil transfizierte, CEACAM3-exprimierende HeLa-Zellen verwendet. Diese Zellen verhalten sich wie Granulozyten, was die CEACAM3-abhängige Internalisierung der Gonokokken betrifft (Billker et al. 2002; McCaw et al. 2003).

Der Einsatz der siRNA-vermittelten Repression spezifischer Genprodukte erlaubt es distinkt, die Expression des Vav2 Proteins also der Vav-Isoform, die in diesem Zelltyp prädominiert, zu blockieren (Abb. 4.6, Abb. 4.7 B und Abb. 4.8 B). Der Einsatz der Vav2-siRNA verringert die Expression des Proteins bis zu 90% und führt zu einer verringerten Zahl an internalisierten Opa_{CEA} Gonokokken (Abb. 4.7 A), während weder Kontroll-transfizierte noch mit der Luziferase-siRNA-transfizierte Zellen

ähnlichen Einschränkungen unterliegen (Abb. 4.7 A). Ein Grund für die Interferenz mit der CEACAM3-vermittelten Internalisierung der Gonokokken zeigt sich auf molekularer Ebene. Für eine effektive Aufnahme der Opa_{CEA} Gonokokken über das CEACAM3 Protein ist die Integrität der ITAM-ähnlichen Sequenz entscheidend, die demzufolge die kleine GTPase Rac spezifisch stimuliert (Schmitter et al. 2004). Hingegen verhindert die Transfektion der Vav2-siRNA die spezifische, CEACAM3-abhängige GTP-Beladung der kleinen GTPase Rac in CEACAM3-exprimierenden HeLa Zellen (Abb. 4.8 A). Da weder die Transfektionsmethode *per se* (ohne Oligonukleotid) noch die siRNA-Kontrolle (siRNA-Luziferase) die Vav2-Expression inhibiert (Abb. 4.8 B) oder mit der Rac-Stimulation interferiert (Abb. 4.8 A), scheint das Vav Protein eine signifikante Rolle in der CEACAM3-vermittelten Signaltransduktion und der spezifischen Rac-Stimulation zu spielen.

Proteine der Vav-Familie können *in vitro* und *in vivo* neben der Rac GTPase auch verschiedene Isoformen der Rho GTPasen stimulieren (Crespo et al. 1996; Schuebel et al. 1998; Movilla and Bustelo 1999), während anscheinend kein GEF der Vav-Familie die funktionell eng verwandte GTPase Cdc42 reguliert (Crespo et al. 1996; Schuebel et al. 1998; Movilla and Bustelo 1999; Aghazadeh et al. 2000). Die Interaktion der Opa_{CEA} Gonokokken mit CEACAM3 führt aber ausschließlich zu einer GTP-Beladung der Rac GTPase (Schmitter et al. 2004; Kapitel 3) und die molekularen Vorgänge während der CEACAM3-vermittelten Aufnahme weisen damit erstaunliche Parallelen zu der Fc γ -Rezeptor-vermittelten Phagozytose von IgG-opsonierten-Partikeln auf. Die Fc γ -Rezeptor-vermittelte Phagozytose führt ebenfalls zur Tyrosin-Phosphorylierung der ITAM-Sequenz des Rezeptors über Kinasen der Src-Familie und zu einer Vav-vermittelten, GTPase-abhängigen Phagozytose der Partikel (Cox et al. 1997; Caron and Hall 1998; Massol et al. 1998). Ausschließlich die kleine GTPase Rac, aber nicht Cdc42, ist für die Umordnung des Aktin-Zytoskeletts während der Fc γ -Rezeptor-Phagozytose verantwortlich. Das Vav Protein wird während der Phagozytose zu adhärierenden Partikeln rekrutiert, kolokalisiert dort mit F-Aktin der entstehenden Phagosomen und reguliert die Stimulation des Rac-induzierten Umbau des Zytoskeletts (Patel et al. 2002).

Es ist daher durchaus denkbar, dass das Vav Protein während der CEACAM3-vermittelten Internalisierung der Gonokokken eine ähnliche Funktion übernimmt. Infolge dessen wurde die Lokalisierung des Vav2 Proteins während der Phagozytose der Gonokokken untersucht. Die Internalisierung der Gonokokken führt zu einer

lokalen Anreicherung des CEACAM3-RFP Proteins zu adhärierenden Gonokokken und simultan zu einer Kolokalisation des Vav2 Proteins in die unmittelbare Umgebung der adhärierenden, aber nicht zu bereits internalisierten Gonokokken (Abb. 4.9). Die Rekrutierung des Vav Proteins führt dabei zu einer physikalischen Assoziation zwischen einem aktivierten CEACAM3-Proteinkomplex und dem Vav Protein, da das Vav Protein spezifisch mit CEACAM3-GFP, aber nicht mit dem GFP-Protein alleine, koimmunpräzipitiert (Abb. 4.10).

Eines der Charakteristika des CEACAM3 Proteins ist die ITAM-ähnliche Sequenz seiner zytoplasmatischen Domäne. Die genetische Mutationen der beiden darin enthaltenden Tyrosinreste zu Phenylalanin verhindert die Phosphorylierung der ITAM-ähnlichen Sequenz, inhibiert die CEACAM3-induzierte GTP-Beladung der kleinen GTPase Rac und interferiert mit der Opsonin-unabhängigen Internalisierung der Gonokokken (Billker et al. 2002; Schmitter et al. 2004). Die Phosphorylierung der ITAM-ähnlichen Sequenz ist daher ein essentieller Schritt für die CEACAM3-induzierte Signaltransduktion und der damit verbundenen Internalisierung von Opa_{CEA} Gonokokken. Die zytoplasmatische Domäne von CEACAM3 wird *in vitro* durch Kinasen der Src-Familie phosphoryliert (Streichert et al. 2001), die Koexpression des CEACAM3 Proteins mit einer konstitutiv aktivierten Form der Src Kinase führt zur Hyperphosphorylierung der ITAM-ähnlichen Sequenz von CEACAM3 (Abb. 2.5) und die Phosphorylierung erfolgt *in vivo* durch die Interaktion des CEACAM3 Proteins mit Opa_{CEA} Gonokokken (McCaw et al. 2004). Die Phosphorylierung von Tyrosinen in der Signaltransduktion ist ein weitverbreiteter Regulationsmechanismus für die Aktivierung und Rekrutierung von Effektorproteinen. Dabei binden die Proteine über Tyrosin-bindende Domänen (z. B. SH2-Domänen) an phosphorylierte Tyrosinreste eines weiteren Proteins. Interessanterweise umfasst die Sequenz des dominant negativen Vav-dn-Proteins, welches mit der CEACAM3-vermittelten Internalisierung der Gonokokken interferierte, eine SH2-Domäne. Als einziges Protein der GEF-Familie besitzt Vav diese Phosphotyrosin-erkennende SH2-Domäne und verschiedene Studien haben gezeigt, dass diese Domäne direkt mit autophosphorylierten Tyrosinkinase, mit verschiedenen Tyrosin-Kinasen-Rezeptoren und Korezeptoren und indirekt mit aktivierten Rezeptoren über phosphorylierte Adaptorproteine interagieren kann (Bustelo 2000; Koretzky and Myung 2001).

Da das Vav2-wt Protein während der Opsonin-unabhängigen Aufnahme der Gonokokken mit dem CEACAM3 Protein-Komplex physikalisch assoziiert, sollte untersucht werden, ob einerseits die Phosphotyrosin-erkennende SH2-Domäne des Vav Proteins für die Interaktion verantwortlich ist und andererseits ob die Tyrosinreste der ITAM-ähnliche Sequenz von CEACAM3 an der Assoziation beteiligt sind. In dieser Hinsicht wurden 293 Zellen mit verschiedensten CEACAM3-Mutanten und v-Src kotransfiziert (Abb. 4.11 A). Die Mutation des CEACAM3 Proteins beschädigt dabei vor allem die Integrität der ITAM-ähnlichen Sequenz, indem die einzelnen Tyrosinreste gegen Phenylalanin ausgetauscht werden (CEACAM3Y230F oder CEACAM3Y241F), simultan beide Tyrosinreste mutiert werden (CEACAM3Y230/241F) oder die komplette zytoplasmatische Domäne deletiert wird. Nach der Lyse der Zellen wurden die Ansätze mit gleichen Mengen des GST-Vav-dn-Fusionsproteins inkubiert. Dabei zeigte sich, dass die Vav-SH3-SH2-SH3 Domäne spezifisch mit CEACAM3-wt und CEACAM3Y241F präzipitiert (Abb. 4.9 A), während die Mutation des Tyrosinrestes 230 (CEACAM3Y230F) die Interaktion unterbindet. Zudem interagiert Vav-dn nur mit der ITAM-ähnlichen Sequenz von CEACAM3, wenn die Tyrosinreste phosphoryliert sind (Abb. 4.11 B). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Phosphorylierung des Tyrosinrestes Y230 der ITAM-ähnlichen Sequenz von CEACAM3, induziert durch die Interaktion mit CEACAM-bindenden Opa_{CEA} Gonokokken, eine Plattform schafft, welche die spezifische und direkte Assoziation mit der Vav-SH2-Domäne des Proteins erlaubt. Wäre eine der beiden SH3-Domänen oder auch beide Domänen des Vav Proteins an der Interaktion beteiligt, wären Präzipitate detektierbar, die unabhängig von der Integrität und damit auch vom Phosphorylierungsstatus der ITAM-ähnlichen Sequenz mit dem CEACAM3 Protein interagieren. Interessanterweise finden sich auch in der Literatur Belege für derartig spezifische, vom Phosphorylierungsstatus eines Tyrosins abhängige Interaktionen. So bindet das Vav Protein über seine Vav-SH2-Domäne bevorzugt an phosphorylierte Tyrosinreste, welche die Sequenz $\text{Y}^{\text{P}}\text{-X-Glu-P}$ (X steht für Met, Leu oder Glu) aufweisen (Songyang et al. 1994). Dieses optimale Bindungsmotiv entspricht in etwa der Sequenz die den Tyrosinrest Y^{230} innerhalb der ITAM-ähnlichen Sequenz von CEACAM3 ($\text{Y}^{230}\text{-Glu-Glu-L}$) umgeben.

Die Assoziation des Vav Proteins über die SH2-Domäne mit aktivierten Rezeptoren kann wie im Falle des T-Zell-Korezeptors CD19 direkt erfolgen, indem die SH2-Domäne die phosphorylierte Sequenz $\text{Tyr}^{391}\text{-Glu-Glu-Pro}$ in der zytoplasmatischen

Domäne von CD19 erkennt (Weng et al. 1994; O'Rourke et al. 1998; Doody et al. 2000) oder indirekt über phosphorylierte Kinase wie z.B. Syk, Zap-70 oder Adaptorproteine wie Grb, Slp76, BLNK (Bustelo 2001; Turner and Billadeau 2002; Hornstein et al. 2004). Allerdings ist bislang keine direkte Interaktion zwischen einem Vav Protein und ITAM-tragenden Rezeptoren bekannt. So bindet das Vav Protein während der Fc γ -vermittelten Phagozytose über seine SH2-Domäne an die PTK Syk (Deckert et al. 1996), welche ihrerseits selbst über die SH2-Domäne an die phosphorylierte ITAM-Sequenz des Fc γ -Rezeptor bindet (Darby et al. 1994; Greenberg et al. 1996).

Insofern zeigen die vorliegenden Ergebnisse zum erstenmal, dass das Vav Protein über die SH3-SH2-SH3-Domäne direkt mit phosphorylierten Tyrosinresten einer ITAM-ähnlichen Sequenz interagiert. Vermutlich ist die Phosphotyrosin-bindende SH2-Domäne des Vav Proteins für die direkte Protein-Protein-Interaktion verantwortlich. Um dies zu beweisen, könnte z.B die Bindungssequenz der SH2-Domäne mutiert werden, da dieses Protein nicht mehr in der Lage sein sollte mit der ITAM-ähnlichen Sequenz zu interagieren bzw. um die Spezifität der Bindung zu analysieren, ausschließlich die isolierte mit einem GST-Protein fusionierte Vav SH2-Domäne für Bindungsstudien eingesetzt werden. Dieselben Konstrukte könnten auch eingesetzt werden, um in einem *Far-Western-Blot* die direkte Bindung zwischen CEACAM3 und Vav nachzuweisen. Mit Hilfe dieser Technik werden Protein-Protein-Bindungen untersucht, nachdem Zell-Lysate über die SDS-PAGE aufgetrennt wurden. So ist auszuschließen, dass weitere Adaptorproteine an der direkten Interaktion beteiligt sind.

Abschließend sollte die Rolle des Nukleotid-Austauschfaktors Vav für die CEACAM3-vermittelte Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken in humanen Granulozyten untersucht werden. In dieser Hinsicht wurden Fusionsproteine hergestellt, die aus der sog. *protein-transduction-domain* des TAT-Proteins und des Vav-dn oder SWAP-dn Proteins bestehen. Die relativ neue Technik der Proteintransduktion ermöglicht die Erforschung der Funktion von Primärzellen, indem durch rekombinante Fusionsproteine die zellulären Signalprozesse oder andere zelluläre Mechanismen aktiviert und/oder inhibiert werden (Wadia and Dowdy 2003; Wadia and Dowdy 2005). Die TAT-Fusionsproteine überqueren die Zellmembran von Wirtszellen ohne Beteiligung von Rezeptoren oder anderen Transportmechanismen (Frankel and Pabo 1988; Green and Loewenstein 1988). Die Transduktion der Proteine *per se* hat

keinen Einfluss auf die Opsonin-unabhängige Internalisierung der Gonokokken, da das Kontroll-Protein, TAT-LacZ, mit der Phagozytose des Pathogens nicht interferierte (Abb. 3.18). Hingegen inhibiert die Transduktion des TAT-Vav-dn Proteins, aber nicht des TAT-SWAP-dn Fusionsproteins, spezifisch die Aufnahme der Op_{CEA} Gonokokken in humane Granulozyten (Abb. 4.12). Dieses Ergebnis konnte auch visuell mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. Nur Granulozyten, die mit dem TAT-SWAP-dn-Protein transduziert wurden, internalisieren auch Op_{CEA} Gonokokken (Abb. 4.13), während TAT-Vav-dn-behandelte Granulozyten nur extrazelluläre, adhärierende Gonokokken aufweisen (Abb. 4.13).

Die Opsonin-unabhängige Phagozytose in humane Granulozyten verläuft *in vivo* hauptsächlich über das CEACAM3 Protein, obwohl auf Granulozyten ebenfalls die Op_{CEA} -bindenden-Proteine CEACAM1 und CEACAM6 exprimiert werden. Die Überexpression der Proteine erlaubt die Invasion Op_{CEA} -exprimierender Gonokokken in humane Epithelzellen. Jedoch konnte in der vorliegenden Doktorarbeit gezeigt werden, dass ausschließlich das CEACAM3 Protein für die effektive Internalisierung und Elimination der Gonokokken verantwortlich ist.

Die Integrität der ITAM-ähnlichen Sequenz des CEACAM3 Proteins und die Phosphorylierung der Tyrosinreste durch Kinasen der Src-Familie (Kapitel 2) ist für die CEACAM3-vermittelte Signaltransduktion essentiell und führt zur GTP-Beladung der kleinen GTPase Rac. Die Stimulation der GTPase leitet die Aktin-abhängige Umordnung des Zytoskeletts ein und infolge dessen kommt es zur Bildung von Lamellipodien-ähnlichen Membranfortsätzen, welche die Op_{CEA} Gonokokken umschließen und internalisieren (Abb. 3.2).

Bislang war die molekulare Verbindung zwischen den phosphorylierten Tyrosinresten der ITAM-ähnlichen Sequenz und der Stimulation der Rac GTPase nicht bekannt. Der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav scheint die Weiterleitung des CEACAM3-abhängigen Signals zu übernehmen und die Aktivierung des CEACAM3 Proteins mit der Stimulation der Rac GTPase zu verknüpfen. In dem vorliegenden Kapitel konnte gezeigt werden, dass das Vav-dn Protein ausschließlich die CEACAM3-vermittelte Internalisierung der Op_{CEA} Gonokokken inhibiert und dass auf molekularer Ebene durch die siRNA-vermittelte Repression der Vav-Translation die Stimulation der Rac GTPase ausbleibt. Infolge dessen kommt es zur Inhibition der CEACAM3-

vermittelten Aufnahme der Gonokokken. Das Vav Protein interagiert vermutlich direkt mit der phosphorylierten, zytoplasmatischen ITAM-ähnlichen Sequenz von CEACAM3. Dennoch muss eine physikalische Assoziation noch in weiteren Versuchen bewiesen werden. *In vivo* interferiert die dominant negative Vav-Variante (TAT-Vav-dn), welche mittels Proteintransduktion in humane Granulozyten eingebracht wird, ebenfalls die Opsonin-unabhängige Aufnahme der Gonokokken (Abb. 4.11). Da die Phagozytose und Elimination CEACAM-bindender Pathogene *in vivo* vornehmlich über das CEACAM3 Protein verläuft, scheint die CEACAM3-induzierte Stimulation der kleinen GTPase Rac auch *in vivo* über den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav abzulaufen.

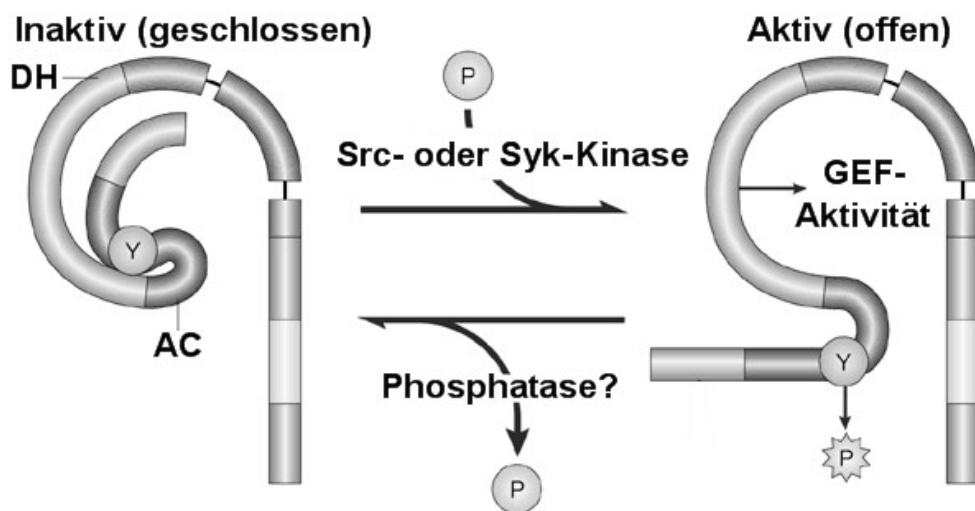


Abb. 4.14 **Phosphotyrosin-abhängige Regulation der Vav GEF-Aktivität** (Turner and Billadeau 2002)

Einige wesentliche Aspekte der Vav-Regulation und der Rac-abhängigen Stimulation konnten wegen Zeitmangels nicht untersucht werden. Neben den einzigartigen strukturellen Charakteristika des Vav Proteins, ist eine weitere distinkt-funktionelle Eigenschaft des Proteins die Modulation der katalytischen Aktivität über direkte Tyrosinphosphorylierung (Crespo et al. 1997; Han et al. 1997; Schuebel et al. 1998; Movilla and Bustelo 1999). Magnetresonanzstudien konnten die strukturellen Mechanismen der Vav-Aktivierung aufklären. Sie beruht auf der Freisetzung einer autoinhibitorischen Domäne, die spezifisch mit einer Sequenz um den Amino-terminalen Tyrosinrest (Y¹⁷⁴) in der *acidic-rich-region* (AC) des Proteins interagiert (Aghazadeh et al. 2000). Im nicht-phosphorylierten Zustand interagiert der

Tyrosinrest mit Seitenketten von Aminosäuren, die in der Rac Bindungsdomäne der katalytischen Vav-Region liegen und inhibiert so die Bindung des Substrates (Aghazadeh et al. 2000). Die Phosphorylierung des Vav Proteins induziert eine strukturelle Umordnung des Proteins, da die Phosphatgruppe mit Aminosäureresten der DH Region interferiert. Die so entstehende offene Konfiguration des Proteins erlaubt die Etablierung einer stabilen Bindung mit Rac1 (Aghazadeh et al. 2000). Die Modulation der Vav-Aktivierung durch Tyrosinphosphorylierung ist noch nicht eindeutig bewiesen, da das Vav Protein auch reine Adaptorfunktion übernehmen kann, unabhängig von dem Phosphorylierungsstatus des Proteins (Bustelo 2001). Doch ist der Tyrosinrest (Y174) und die umgebende Sequenz in allen humanen Vav-Isoformen konserviert und eine Tyrosin zu Phenylalanin Mutation führt in allen Proteinen zu einer hyperaktiven, onkogenen Form des Proteins (Bustelo 2000). In dieser Hinsicht ist es sicherlich interessant, den Phosphorylierungsstatus des Vav Proteins während der Internalisierung der Gonokokken zu untersuchen und zu evaluieren, ob die Vav-abhängige Stimulation der Rac GTPase einer Regulation durch Phosphorylierung unterliegt und wenn ja, welche Tyrosinkinasen für die Aktivierung des Vav Proteins verantwortlich sind. Zudem müsste in weiteren Experimenten untersucht werden, ob die Isoformen des Vav Proteins die Funktion des Vav1 Proteins, welches spezifisch in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, komplementieren könnten. Dies würde zumindest in einigen Experimenten, wie z.B. der Vav2-siRNA-vermittelten Interferenz mit der CEACAM3-abhängigen Aufnahme der Gonokokken, die mäßige Inhibition erklären.

Trotz der noch ausstehenden Experimente steht zweifelsfrei fest, dass die Stimulation der Rac GTPase und die damit verbundene Aktin-abhängige Internalisierung der Gonokokken durch den Nukleotid-Austauschfaktor Vav reguliert werden. Die Beteiligung des Vav Proteins an der CEACAM3-abhängigen Signaltransduktion eröffnet die Möglichkeit, über die einzigartige Rolle des CEACAM3 Proteins während der Gonokokkeninfektion zu spekulieren. Die Funktion des CEACAM3 Proteins als neuartiger phagozytischer Rezeptor der angeborenen Immunantwort, der für die spezifische und vor allem effektive Internalisierung und Elimination CEACAM-bindender Bakterien verantwortlich ist, konnte in den letzten Kapiteln detailliert nachgewiesen werden. Dennoch stellt sich die Frage, ob die Proteine der CEACAM-Familie, CEACAM1 und CEACAM6, die ebenfalls mit Opa_{CEA}

Gonokokken interagieren und neben CEACAM3 auf Granulozyten koexprimiert werden, bedeutungslos für die Phagozytose der Gonokokken sind. So konnte vor allem für das CEACAM1 Protein gezeigt werden, dass es über sein *immunoreceptor-tyrosin-based inhibition motif* als negativer Regulator ITAM-vermittelter, positiv-stimulierender Signalkaskaden agiert. Dementsprechend moduliert z.B. die Interaktion des CEACAM1 Proteins auf T-Zellen mit Opa_{CEA}-Adhäsinen der Gonokokken die Stimulation und Proliferation von CD4 Zellen, trotz der Inkubation mit normalerweise stimulierenden Substanzen (Boulton and Gray-Owen 2002). Daher stellt sich die Frage, ob ähnliche Mechanismen auch die Phagozytose der Gonokokken beeinflussen und Auswirkungen auf die Elimination der Gonokokken haben. Wahrscheinlich lässt sich diese Frage erst klären, wenn Tiermodelle zur Verfügung stehen, die die spezifische Manipulation der CEACAM-Expression auf Granulozyten zulassen und damit auch *in vivo* Versuche ermöglichen.

Aber gerade die Rolle des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors Vav während der CEACAM3-vermittelten Phagozytose, erlaubt die Spekulation, dass die schnelle Internalisierung der Pathogene in die Granulozyten durch eine Art von Kurzschlussmechanismus erfolgt, der die Bindung der Opa_{CEA} Gonokokken an CEACAM3 sozusagen direkt mit der Stimulation von Rac und der Phagozytose der Gonokokken verbindet. Dafür spräche eine Verknüpfung der phosphorylierten ITAM-ähnlichen Domäne mit der Stimulation der kleinen GTPase Rac über eine physikalische Assoziation des Vav Proteins mit beiden Proteinen. Dies würde zum einen die äußerst schnelle Kinetik der Gonokokken-Phagozytose erklären und zum anderen negativen-regulatorischen Signalen, wie die des CEACAM1, ITIM-abhängigen Signalweges, keine Möglichkeit für die Modulation der CEACAM3-vermittelten Phagozytose der Opa_{CEA} Gonokokken offerieren.

5 Schlussbetrachtung

Bei Mikroorganismen, die eng mit ihrem eukaryontischen Wirten zusammenleben beobachtet man in vielen Fällen eine koevolutionäre Adaption, die durch gegenseitige Erkennung, Kontakt und Modulation zellulärer Regulationsmechanismen geprägt ist. Die zelluläre Mikrobiologie ist ein relativ neuer Forschungszweig der medizinischen Mikrobiologie und vereint viele der klassischen biologischen Bereiche, wie z.B. die Bakteriologie, Immunologie und Zellbiologie. Das Hauptthema des Gebietes ist die Interaktion der Pathogene mit Wirtszellen, dabei werden vor allem die Induktion oder Modulation von Signaltransduktionskaskaden, Genregulation, Umordnung des Zytosekeletts und intravesikuläre Lokalisierung bakterieller Komponenten in Wirtszellen wissenschaftlich erfasst.

Die Entdeckung der Antibiotika führte zu der falschen Annahme, dass bakterielle Erkrankungen auf lange Sicht besiegt wären, doch entwickeln Bakterien gerade durch diesen Selektionsdruck in immer kürzeren Zeiträumen effektive Mechanismen, um die Wirkung der Antiinfektiva zu umgehen.

Die oft prophylaktische und in vielen Fällen inkonsequent durchgeführte Antibiotikatherapie hat zur rasanten Entwicklung von Antibiotikaresistenzen beigetragen, die, durch den horizontalen Austausch von Resistenzgenen zwischen Bakterien begünstigt, sogar zu Multiresistenzen gegen verschiedene Klassen von Antibiotika führt. Zusätzlich treten neue Erreger (*Legionella pneumophila*) in Erscheinung und schwer behandelbare Formen besiegt geglaubter Krankheiten wie Tuberkulose oder Cholera tauchen an vielen Orten der Welt wieder auf. Gleichzeitig sind seit Jahrzehnten keine neuen Antibiotikaklassen entdeckt worden, so dass die Pharmaindustrie nur Derivate bereits bekannter Antibiotika produziert.

Die zelluläre Infektionsbiologie könnte einen Ausweg aus dem Dilemma aufzeigen, da dieses Fachgebiet die Interaktion zwischen Pathogen und Wirt auch auf molekularer Ebene untersucht. Dies könnte Anhaltspunkte für eine neue Art von antibakteriellen Substanzen und Zielstrukturen liefern.

In dieser Hinsicht kann die Erforschung der Gonorrhö als klassische human-spezifische Infektionskrankheit exemplarisch das Verständnis für die bakterielle Interaktion mit Zellen erweitern.

Die Kolonisierung der Schleimhaut und die Invasion in Zellen der Epithelschicht ist für alle Erreger ein entscheidender Schritt während der Infektion (Duguid 1959; Punsalang and Sawyer 1973; McNeish et al. 1975; Eden et al. 1976; Beachey 1981) und viele verschiedene Bakterien benutzen zelluläre Adhäsionsrezeptoren für die Adhäsion an Zelloberflächen bzw. die Invasion von Zellen. Viele unterschiedliche Proteinfamilien sind an dieser essentiellen Funktion beteiligt und spielen dabei nicht nur eine entscheidende Rolle für die strukturelle Integrität, sondern übertragen auch Signale in die Zelle. Die primäre Aufgabe von Adhäsionsrezeptoren dient der Verankerung von Zellen an Substratoberflächen bzw. der Zell-Zell Adhäsion, indem sie respektiv mit Proteinen der extrazellulären Matrix interagieren oder den Zellkontakt durch homo-/heterotypische Bindungen festigen.

Die Gonokokken sind ein charakteristisches Beispiel dafür, wie Bakterien zelluläre Adhäsionsrezeptoren missbrauchen, um einen engen Kontakt mit der Wirtszelle herzustellen. In der vorliegenden Arbeit lag das Hauptaugenmerk auf der CEACAM-vermittelten Adhärenz und der Internalisierung der Opa_{CEA} -exprimierenden Gonokokken. Von den bislang sieben bekannten Proteinen der CEACAM-Familie interagieren vier mit Opa_{CEA} -Adhäsinen der Gonokokken, nämlich CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 und CEACAM6 (Chen and Gotschlich 1996; Virji et al. 1996; Bos et al. 1997; Gray-Owen et al. 1997; Popp et al. 1999). *In vitro* vermitteln alle vier Opa_{CEA} -erkennenden Rezeptoren die Adhärenz und eine Opsonin-unabhängige Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken, doch induziert nur das CEACAM3 Protein eine Rac-abhängige Umordnung des Zytoskeletts (Dehio et al. 1998; Hauck et al. 1998; Billker et al. 2002; Schmitter et al. 2004). Die Interaktion mit Opa_{CEA} Gonokokken führt dabei zur spezifischen Phosphorylierung der Tyrosinreste der ITAM-ähnlichen Sequenz von CEACAM3 durch Kinasen der Src-Familie (McCaw et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte das Vav Protein als ein kritischer Faktor identifiziert werden, der die CEACAM3-abhängige Signaltransduktion, induziert durch die bakterielle Bindung an CEACAM3, mit der Formation von Lamellipodien-ähnlichen Membranausstülpungen verbindet. Das Vav Protein bindet dabei über seine SH2-Domäne an eine der phosphorylierten Tyrosinreste der ITAM-ähnlichen Sequenz von CEACAM3 und vermittelt die Rac-abhängige Umordnung des

Zytoskeletts durch seine intrinsische Guanin-Nukleotid-Austauschfunktion. Auch die Beteiligung des Vav Proteins während der CEACAM3-vermittelten Internalisierung der Gonokokken bestätigt die Ähnlichkeiten zu der Fc γ -Rezeptor-abhängigen Phagozytose von IgG opsonierten Partikeln, die ebenfalls über das GEF Vav zur Rac-Stimulation führt (Patel et al. 2002). Doch im Gegensatz zu der Opsonin-abhängigen Phagozytose kann das Vav Protein direkt, ohne zusätzliches Adaptorprotein an die phosphorylierten Tyrosinreste der ITAM-Sequenz von CEACAM3 binden. Es lässt sich daher spekulieren, dass die effiziente, CEACAM3-vermittelte Internalisierung der Gonokokken auf einer Art Kurzschlussreaktion beruht, welche die Adhärenz der Gonokokken an CEACAM3 sozusagen direkt mit der Stimulation von Rac und damit der Internalisierung des Pathogens verbindet. Interessanterweise könnte dieser Mechanismus zum einen die schnelle Kinetik der CEACAM3-vermittelten Aufnahme der Bakterien erklären. Zum anderen ließe dieser Kurzschluss keinen Platz für negativ modulierende Signale, wie sie eventuell durch ITIM-tragende Proteine (Ravetch and Lanier 2000; Boulton and Gray-Owen 2002), wie dem CEACAM1 Protein, induziert würden.

Der distinkte Signalweg der CEACAM3-abhängigen Aufnahme der Gonokokken ermöglichte es, die Beteiligung und die Bedeutung der CEACAM Proteine während der Opsonin-unabhängigen Phagozytose der Gonokokken in Granulozyten zu untersuchen. Granulozyten exprimieren drei der vier Opa-bindenden CEACAMs, nämlich CEACAM1, CEACAM3 und CEACAM6 (Dehio et al. 1998). Während CEACAM1 und CEACAM6 ein breites Expressionsspektrum aufweisen und oft auch an den Eintrittspforten der Gonokokken exprimiert werden, findet sich CEACAM3 ausschließlich auf Granulozyten (Thompson et al. 1991; Prall et al. 1996; Ogihara and Kato 2000). Welchen Zweck kann es für ein Pathogen haben, Adhäsine zu exprimieren, die mit Wirtsproteinen interagieren, welche auch auf Zellen der angeborenen Immunantwort vorliegen? Anscheinend kompensiert die Interaktion mit CEACAM1 und/oder CEACAM6 auf verschiedenen Zelltypen die unvorteilhafte CEACAM-vermittelte Internalisierung der Gonokokken in Granulozyten. Die Experimente mit infizierten Granulozyten ergaben, dass vor allem die Interferenz mit der CEACAM3-vermittelten Signalkaskade durch die Proteintransduktion eines dominant negativen Rac-Fusionsprotein die Zahl der internalisierten Gonokokken stark reduziert (Schmitter et al. 2004). Zudem beeinträchtigt die Blockade der CEACAM1- bzw. CEACAM6-vermittelten Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken in

humane Granulozyten mit monoklonalen Antikörpern weder die effektive Internalisierung noch die Elimination der Gonokokken (Schmitter et al. 2004). Es erscheint daher möglich, dass CEACAM1 und CEACAM6 bei der effektiven Phagozytose der Gonokokken in humane Granulozyten nur eine untergeordnete Rolle spielen und wahrscheinlich in diesem Zusammenhang eine bislang unbekannt funktionelle Rolle übernehmen.

Es lässt sich daher spekulieren, dass die Elimination der Gonokokken durch Zellen der angeborenen Immunantwort vor allem durch CEACAM3 vermittelt wird. Darüber hinaus konnte zum erstenmal gezeigt werden, dass nicht nur Opa_{CEA}-exprimierende Gonokokken, sondern auch weitere CEACAM-bindende Bakterien mit CEACAM3 interagieren. Sowohl für das USPA1 Protein von *Moraxella catarrhalis* als auch für das P5 Protein von *Haemophilus influenzae* konnte bislang nur eine Interaktion mit dem CEACAM1 Protein nachgewiesen werden (Virji et al. 2000; Hill et al. 2001; Hill and Virji 2003). Die Tatsache, dass beide Pathogene auch mit CEACAM3 interagieren können und vornehmlich durch die CEACAM3-vermittelte Internalisierung in Granulozyten eliminiert werden, lässt vermuten, dass das CEACAM3 Protein spezifisch CEACAM-bindende Pathogene eliminiert.

Bisher ist kein endogener Ligand für dieses Protein bekannt und daher kann in der vorliegenden Doktorarbeit CEACAM3 erstmals eine funktionelle Rolle als spezifischer Rezeptor der angeborenen Immunantwort zugeordnet werden.

In dieser Hinsicht ist signifikant, dass die meisten der CEACAM-bindenden Pathogene humanspezifisch sind und CEACAM3 nur auf humanen Granulozyten exprimiert wird. Zudem gibt es keine homologe Isoform in Nagetieren oder Affen (Hammarstrom and Baranov 2001; Zhou et al. 2001). Mit den vorliegenden Daten lässt sich daher ein evolutives Szenario skizzieren, das die Kolonisierung des menschlichen Wirtes mit einer bestimmten Gruppe von Pathogenen zu einer mutualistischen Koevolution zwischen bakteriellen Adhäsinen und den Abwehrmechanismen der angeborenen Immunantwort führt. Die Elimination CEACAM-bindender Bakterien durch Zellen der angeborenen Immunabwehr könnte während der Evolution des Menschen durchaus ein selektiver Vorteil gewesen sein, zieht man in Betracht, dass bei schweren Krankheitsverläufen der Gonorrhö auch die Fortpflanzung des Menschen durch Sterilität betroffen sein kann (Tapsall 2002). Andererseits wäre es denkbar, dass die Pathogene Varianten ihrer CEACAM-bindenden Adhäsine hervorbringen, die die Bindungsfähigkeit mit den epithelialen

CEACAMs beibehalten, aber nicht mehr von CEACAM3 erkannt werden. Diese Adhäsine würden die Adhärenz und die Invasion von Epithelzellen ermöglichen, aber der CEACAM3-vermittelten Immunantwort ausweichen. Dementsprechend sind schon mehrere Opa_{CEA}-Proteine charakterisiert worden, welche dementsprechende Eigenschaften aufweisen (Bos et al. 1997; Gray-Owen et al. 1997; Virji et al. 1999; Muenzner et al. 2000). Leider stehen bislang keine geeigneten Tiermodelle zur Verfügung, um die Frage zu klären, ob die Infektion der Tiere mit diesen Varianten der Opa_{CEA} Gonokokken auch schwerere Krankheitsverläufe hervorruft.

Aber auch klinische Studien von Patienten, die typische Merkmale einer Gonorrhö und infolgedessen auch schwerere Krankheitsverläufe aufweisen, könnten wichtige Einblicke in die Bedeutung der CEACAM3-vermittelten Phagozytose gewähren. Voraussetzung dafür wäre die Isolation des bakteriellen Erregers und gleichzeitige Isolation der Granulozyten, um diese Isolate auf die Bindungsfähigkeit an CEACAM3 bzw. die Granulozyten auf CEACAM3-Expression zu untersuchen. Es wäre auch in diesen Fällen durchaus denkbar, dass entweder die Bakterien Opa-Varianten besitzen, die nicht an CEACAM3 binden, oder aber dass CEACAM3 Mutationen vorliegen, die wichtige Funktionen des Proteins, wie z.B. die Integrität der ITAM-ähnlichen Sequenz oder die extrazelluläre Bindungsdomäne, beeinträchtigen. Derartige Punktmutationen sind als *single nucleotide polymorphism* (SNP) bekannt. Sie beruhen auf Variationen von einzelnen Basenpaaren in einem DNA-Strang, die bei mindestens 1% der jeweiligen Population vorkommen. SNPs stellen ca. 90% aller genetischen Varianten im menschlichen Genom dar. Sie treten nicht gleich verteilt auf, sondern nur ungleichmäßig stark an bestimmten Regionen. Sie werden im Allgemeinen als "erfolgreiche" Punktmutationen bezeichnet, d.h. als genetische Veränderungen, die sich zu einem gewissen Grad im Genpool einer Population durchgesetzt haben. Einige SNPs korrelieren z.B. mit bestimmten Reaktionen des Organismus bei bestimmten Infektionen oder Kontakt mit speziellen Substanzen.

Allerdings sind bislang keine SNPs bekannt, welche die extrazelluläre Bindungsdomäne bzw. die ITAM-ähnliche Sequenz von CEACAM3 betreffen. Es ist daher wahrscheinlicher, dass die Gonokokken Varianten der Opa_{CEA}-Adhäsine generieren, die nicht mehr mit CEACAM3 interagieren. Derartige Pathogene würden von den Zellen der angeborenen Immunantwort nicht mehr erkannt bzw. eliminiert und wären für schwerere Krankheitsverläufe der Gonorrhö verantwortlich.

6 Material

6.1 Bakterien

6.1.1 *Neisseria* – Stämme

N280 (MS11-F ₃)	PilE _{F3} , P ⁺ , Opa ₃₀ ⁻ , opaC::cat, (Cm ^R)
N302 (MS11-B ₁)	PilE _{B1} (S), Opa ₃₀ ⁻ , opaC::cat, (Cm ^R), pTH6a (Tet ^R), (Erm ^R)
N309 (MS11-B ₁)	PilE _{B1} (S), Opa ₃₀ ⁻ , opaC::cat, (Cm ^R), pTH6a::opa ₅₂ (pEMK62), (Tet ^R), (Erm ^R)
N340	<i>Neisseria cinerea</i>

6.1.2 *Moraxella* – Stämme

<i>M. catarrhalis</i>	ATCC 11994 (von DSMZ)
-----------------------	-----------------------

6.1.3 *Haemophilus* – Stämme

<i>H. influenzae</i>	RD, nicht bekapselt (von A. Reidl, ZINF Würzburg)
----------------------	---

6.1.4 *Escherichia coli* – Stämme

NovaBlue	endA1, hsdR17(r _{k12} ⁻ m _{k12} ⁺), supE44, th-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F ⁻ proA ⁺ B ⁺ lacI ^q ZΔN15::Tn10(tet ^R)], (Novagen)
BL21 (DE3)	F ⁻ , ompT, hsdS _B , (r _B ⁻ m _B ⁻), gal, dcm (DE3), (Novagen)
BL21 (DE3) pLys	F ⁻ , ompT, hsdS _B , (r _B ⁻ m _B ⁻), gal, dcm (DE3), pLysS (cam ^R), (Novagen)

6.2 Zell-Linien

293T	humane, embryonale Nierenzelllinie (adhärent, fibroblastoid)
HeLa	humane Cervixkarzinom-Zelllinie (epithelähnlich)
SYF	embryonale Mausfibroblasten aus triple - knock - out Mäusen (Src, Yes, Fyn) (adhärent, fibroblastoid) (Klinghoffer 1999)
SYF + c - Src	embryonale Mausfibroblasten aus triple - knock - out Mäusen (Src, Yes, Fyn) mit c - Src rekonstituiert (adhärent, fibroblastoid) (Klinghoffer 1999)

6.3 Nährmedien für Bakterien und Zellkultur

6.3.1 Medien und Platten für Bakterien

LB-Medium	10g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl, pH 7,0, ad 1l A. bidest.
LB-Platten	10g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl, 10ml MgCl ₂ (1M), 1g Agar-Agar, pH 7,0, ad A. bidest.
GC-Platten	36g GC-Agar, ad 1l A. bidest., 10ml Vitaminmix
BHI-Agar	31,5g BHI-Agar (Becton Dickinson), ad 600ml A. bidest., 1:50 Haemin, NAD 1:1000 (Applichem), 6µg/ml Ampicillin
BHI-Medium	37g BHI-Medium ad 1000 ml A. bidest. (Becton Dickinson)
Einfriermedium	600µl LB-Medium, 600µl Glycerin (50%)
Hemin	1mg/ml Hemin, 1mg/ml Histidin, 4% Triethanolamin (Applichem)
Vitaminmix	20g Dextrose, 2g L-Glutamin, 3,2g L-Cystein, 0,02g Cocarboxylase, 0,004g Fe(NO) ₃ , 0,0006g Thiamin-HCL, 0,05g NAD, 0,002g Vitamin B12, 0,03g L-Arginin, 0,0026g p-Aminobenzoesäure, 0,22g L-Cystin, 0,2g Adenin, 0,1g Uracil, 0,006g Guanin, pH 3.5. ad 200ml A. bidest., sterilfiltrieren (10ml auf 1l GC-Agbar)
Antibiotika	Ampicillin 100µg/ml Chloramphenicol 30µg/ml in LB-Medium, 10µg/ml in GC-Agar Erythromycin 7µg/ml Kanamycin 30µg/ml Penicillin 10mg/ml (PAA Laboratories) Streptomycin 10mg/ml (PAA Laboratories) Gentamicin 50µg/ml (PAA Laboratories)

6.3.2 Medien für Zellkultur

DMEM	Synthetisches Zellkulturmedium L-Glutamin (PAA Laboratories)
RPMI1640	Synthetisches Zellkulturmedium L-Glutamin (PAA Laboratories)
Einfriermedium	70ml DMEM, 20 ml CS, 10ml DMSO
FCS	Fötales Kälberserum (PAA Laboratories)
CS	Kälberserum (PAA Laboratories)
hi CS	hitzeinaktiviertes Kälberserum

Zusätze für Infektionsversuche:

Gentamicin	50 µg/ml (PAA Laboratories)
PP2	5µM (Calbiochem)
Cytochalasin D	1µg/ml (Calbiochem)

6.4 Antikörper, Enzyme und Proteine

6.4.1 Antikörper

Antikörper/Spez.	Typ	Name	Herkunft	Konz.	Bezug
CD66 (CEA;human)	mono.	Gran10	Maus	1:200	PeliCluster
CD66 (CEA;human)	mono.	D14HD11	Maus	1:200	Genovac
CD66 (CEACAM1, -5, -6)	mono.	Kat4c	Maus		DAKO
CD66 (CEACAM3, -5)	mono.	Col1	Maus		Zymed
CD66 (CEACAM6)	mono.	9A6	Maus		Genovac
CsK	mono.	52	Maus		BD Bioscience
N. gonorrhoeae	poly.	Ak92	Hase	1/200	Prof. Meyer
Opa Proteine	mono.	4B12	Maus		Prof. Achtmann
VSV-Epitop	mono.	P5D4	Maus		Sigma-Aldrich
myc-Epitop	mono.	9E10	Maus		Santa Cruz
Endoglin	mono.	P3D1	Maus		Hybridoma Bank
GFP	mono.	JL-8	Maus		BD Bioscience
His Epitop	mono.	H-3	Maus		Santa Cruz
c-Src (human)	poly.		Hase	1:100	Sigma-Aldrich
c-Src (human)	mono.	2-17	Maus	1:200	Hybridoma
Vav	mono.	B-2	Maus		Santa Cruz
Vav2	poly.	H-200	Hase		Santa Cruz
GST	mono.	B-14	Maus		Santa Cruz
GFP	poly.	ab290	Hase		Abcam
Cdc42	mono.	B-8	Maus		Santa Cruz
HA-Epitop	mono.	F7	Maus		Santa Cruz
HA-Epitop	mono.	12CA5	Maus		Hybridoma
Rac1	mono.	23A8	Maus		Upstate Biotechnology

2. Antikörper/Spezifität
Peroxidase, konjugierter Hase- α -Maus
Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Hase
Cy2-konjugierter Ziege- α -Maus
Cy3-konjugierter Ziege- α -Maus
Cy5-konjugierter Ziege- α -Maus
Cy 2-gekoppelter Ziege-anti-Hase AffiniPure
Cy2-konjugierter Haase- α -Maus

AK-unabhängige Markierungsagenzien
Phalloidin-TRITC
FITC (5-(6)-carboxyfluorescein-succinylester)
Rhodamin (5-(6)-carboxytetramethylrhodamine-succinimidyl-ester)

Phalloidin-TRITC und sekundäre Antikörper wurden von Sigma, Molecular Probes oder Jackson ImmunoResearch Laboratories bezogen. Streptavidin-Kojugate, FITC und Rhodamin wurden von Molecular Probes bezogen.

6.4.2 Enzyme und Proteine

Taq-DNA-Polymerase (BioLabs), Hind III (BioLabs), Trypsin(PAALaboratories), Vent-DNA-Polymerase (BioLabs), Cre-Rekombinase (Bio-Labs), In-Fusion Enzyme (BD-Bioscience), Protein A/G-Plus Sepharose (Santa Cruz Biotechnology), Lysozym (Serva)

6.5 Plasmide und Oligonukleotide

6.5.1 Plasmide

pDNR-Dual	<i>ori_{pUC}</i> , <i>loxP</i> , MCS, 6xHN-tag, (Cam ^R), <i>SacB</i> (BD Bioscience)
pET-28(+)- <i>loxP</i>	<i>ori_{f1}</i> , <i>ori_{pBR322}</i> , MCS, His-tag, <i>lacI</i> , (Kan ^R) (Novagen)
pLPS-3'EGFP	<i>ori_{pUC}</i> , <i>loxP</i> , MCS, SA, EGFP, (Kan ^R), (Neo ^R) (BD Bioscience)
pGEX4Ti	<i>ori_{BR322}</i> , MCS, GST-tag, <i>lacI</i> , (Amp ^R) (Amersham Pharmacia)
pLP-CMV-Myc	<i>ori_{pUC}</i> , <i>loxP</i> , MCS, SA, c-Myc-tag, (Amp ^R) (BD Bioscience)

- DNA-Konstrukte von Forschungseinrichtungen

Elmo1	Vektor: pSPORT1; RZPD; Klon: DKFZp434B0819Q2
Swap-70	Vektor: pOTB7; RZPD; Klon: IMAGp958H17135Q2
Vav	Vektor: pOTB7;RZPD; IMAGp958K22536Q2
Dock2	Vektor: pCMVSPORT6; RZPD; Klon: IMAGp998A1110418Q3
pTAT	Klonierungsvektor für TAT-Proteine, S. Dowdy (UCSD School of Medicine, La Jolla, CA / USA)
pTAT-HA	Klonierungsvektor für TAT-Proteine, S. Dowdy
pTAT-Rac-dn	Expressionsvektor für TAT-Rac-dn, S. Dowdy
pTAT-Cdc42-dn	Expressionsvektor für TAT-Cdc42-dn, S. Dowdy
pTAT-LacZ	Expressionsvektor für TAT-LacZ, S. Dowdy

6.5.2 Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' – 3'
Check1-sense	GCTCACCGTCTTTCATTGCC
Check2-antisense	TCCGCTCATGAGACAATAACC
SWAP-70-DN-Nco1-sense	TTATCCATGGGGAGCTTGAAGGAGGAGC
SWAP-70-DN-Xho1-anti	TTATCTCGAGTCACTGCAGCTTTAGGTACATGTCTTCC
Vav1-DN-Xho1-sense	TTATCTCGAGGGTACCTTCTATCAGGGCTACC
Vav1-DN-EcoR1-anti	TTATGAATTCTCAGCAGTATTCAGAATAATCTTCC
Vav1-dn-EcoR1-pGEX-sense	ATAGAATTCGGTACCTTCTATCAGGGCTACC
Vav1-dn-Xho-pGEX-anti	ATACTCGAGTCAGCAGTATTCAGAATAATCTTCC
SWAP70-IF-sense	GAAGTTATCAGTCGACATGGGGAGCTTGAAGGAGGAGC
SWAP70-dCT-IF-anti	ATGGTCTAGAAAGCTTCTACTGCAGCTTTAGGTACATGTCTTCC
VAV-IF-sense	GAAGTTATCAGTCGACGGTACCTTCTATCAGGGCTACC
VAV-IF-anti	ATGGTCTAGAAAGCTTTCAGCAGTATTCAGAATAATCTTCC
ELMO-IF-sense	GAAGTTATCAGTCGACATGCCGCCACCCGCGGAC
ELMO-IF-dct-anti	ATGGTCTAGAAAGCTTTCACATATGAGGGCAGTCCTTTC
Dock2-IF-sense	GAAGTTATCAGTCGACATGGCCCCCTGGCGCAAAGC
Dock2-dCS-IF-ant	ATGGTCTAGAAAGCTTTCAGTCATGGAATCCATCGTGTAGAG

Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech bezogen.

6.5.3 siRNA-Oligonukleotide

Vav2-siRNA (Dharmacon)
Luziferase-siRNA (Eurid, MPI Infektionsforschung Berlin)

6.6 Lösungen und Puffer

6.6.1 Lösungen und Puffer für eukaryontische Zellen

PBS (1x)	24g NaCl, 0,6g KCl, 3,45g Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O, 0,6g KH ₂ PO ₄ , pH 7,4, ad 1l mit A.bidest.
PBS++	1xPBS, 0,35mM CaCl ₂ , 0,25mM MgCl ₂
Paraformaldehyd	4g PFA in 80ml warmem A.bidest. lösen, 1N NaOH zugeben bis Lösung geklärt, pH 7,4 mit 1N HCl einstellen, 10ml 10xPBS zugeben und mit A.bidest. auf 100ml auffüllen
Saponinlösung	1% Saponin in 1xPBS lösen
CaCl ₂ -Lösung	2,5M CaCl ₂
2x HBS	16,4g NaCl, 11,9g Hepes, 0,21g Na ₂ HPO ₄ , in 1l A.bidest. lösen, pH 7,05; sterilfiltrieren
RIPA-Puffer	1% Triton X-100, 50mM Hepes, 10% Glycerin, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 1,5mM MgCl ₂ , 10mM Natriumpyrophosphat, 100mM Natriumfluorid, 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS), 1% Deoxycholol, 1mM Natriumorthovanadat, 10µg/ml Leupeptin, 10µg/ml Aprotinin, 10µg/ml Pefabloc, 10µg/ml Pepstatin, 10µM Benzamidin; ad 250ml mit A.bidest.
Triton-Puffer	25mM HEPES (pH 7,4), 1% Triton X-100, 150mM NaCl, 20mM MgCl ₂ , 10% Glycerol, 10mM Natriumphosphat, 100mM NaF, 1mM NaVO ₄ , 10µg/ml Leupeptin, 10µg/ml Aprotinin, 10µg/ml Pefabloc, 10µg/ml Pepstatin, ad 250ml mit A. bidest.
MgCl ₂	10% Glycerol, 10mM Natriumphosphat, 100mM NaF, 1mM
PVA/NaCl	1% PVA (Applichem), 0,9% NaCl ad 0,5l A. bidest
Citratlösung	3,8% Na-Citrat ad 0,2l A. bidest

6.6.2 Lösungen für die Molekularbiologie

TAE-Puffer (1x)	4,84g Tris-Base, 1mM EDTA, 1,14ml Eisessig, ad 1l mit A. bidest.
TE-Puffer	10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8
GEBS	50mM EDTA, 20% (v/v) Glycerin, 0,5% (w/v) Sarcosyl, 0,05% (w/v) Bromphenolblau
dNTPs	1,25mM dNTPs in TE-Puffer pH 8 lösen
P1-Puffer	50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A, pH 8,0
P2-Puffer	200mM NaOH, 1% (w/v) SDS, RT
P3-Puffer	3M Kaliumacetat, pH 4,8, RT
Größenstandard	1kb DNA Ladder, Mass Ruler DNA Ladder (Fermentas)

6.6.3 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE, Coomassiefärbung und Western Blot

2xSDS Probenpuffer	125mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% (v/v)- β -Mercaptoethanol, 5% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 20% (v/v) Glycerin
SDS-PAGE Standard	1% (w/v) Lysozym, 1% (w/v) Sojabohne-Trypsin-Inhibitor, 1% (w/v) Peroxidase, 1% (w/v) BSA, 1% (w/v) Lipoxidase, 5ml Triton-Puffer, 5ml 2x Probenpuffer
Acrylamidlösung	40% Polyacrylamid
Sammelgel-Puffer	0,5M Tris-HCl pH 6,8
Trenngel-Puffer	1,5M Tris-HCl pH 8,8
APS	10% Ammoniumperoxodisulphat
TEMED	0,1% N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
SDS	20% (w/v) SDS
Laufpuffer	25mM Tris-HCl, 192mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
Färbelösung	25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Eisessig, 0,03% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250
Entfärbelösung	10% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Eisessig
Kathoden-Puffer (5x)	125mM Tris-Base, 200mM 6-Aminohexansäure, pH 9,4
Anoden-Puffer (5x)	125mM Tris-Base, pH 10,4
Transferpuffer	6,0g Tris-Base, 28,8g Glycin, 430ml Methanol, 0,1% (w/v) SDS, ad 2l mit A.bidest.
TBS	25mM Tris (pH 7,5), 125mM NaCl
TBS/Tween	25mM Tris (pH 7,5), 125mM NaCl, 0,1% Tween-20
Blocklösung	2% (w/v) BSA in TBST, 0,05% (w/v) NaN ₃
ECL	0,225mM p-Coumaratsäure, 1,25mM Luminol, 0,1M Tris-Base pH 8,5
H ₂ O ₂ -Lösung	30% (v/v) Wasserstoffperoxid
<i>stripping</i> -Puffer	0,8% (w/v) SDS, 0,8% (v/v)-Mercaptoethanol, 80mM Tris-HCl, pH 6,8

6.6.4 Lösungen und Puffer für die Proteinaufreinigung

Affinitätschromatographie: His-tag-Fusionsproteine

X-Gal	200mg X-Gal in 10ml N,N-Diformamid
IPTG	100mM Isopropylthiogalactosid
Lysepuffer	8M Harnstoff, 100mM NaCl, 10mM Tris, 10% (v/v)Glycerin, 20mM Imidazol
Imidazolösung	5M Imidazol
Waschpuffer	8M Harnstoff, 100mM NaCl, 10mM Tris, 10% (v/v) Glycerin, 20 mM Imidazol
Elutionspuffer	250mM NaCl, 10 mM Tris, 10%(v/v)Glycerin, 250mM Imidazol
Dialysepuffer	20mM Hepes, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 10%(v/v) Glycerin
Hepes-Puffer	1M Hepes, pH 7,4

Affinitätschromatographie: GST-tag-Fusionsproteine

IPTG	100mM Isopropylthiogalactosid
T-Puffer	100mM Tris (pH8,0), 5mM EDTA
Lysis-Puffer	50mM Tris (pH8,0), 10 mM EDTA, 10% Glycerin, 2,5mM DTT, 1mM PMSF (Applichem)
10%TritonX-100	TritonX-100 (v/v) in A. bidest.
Elutionspuffer	50mM Tris-HCl (pH8,0), 10mM reduziertes Glutathione
Dialysepuffer	20mM Hepes, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 10%(v/v) Glycerin

6.7 Chemikalien und Kits

Acrylamid (Roth), Agar-Agar (Roth), Agarose (Roth), Ammoniumsulfat (AppliChem), Antibiotika (Roth, AppliChem), APS (Roth), BSA (Roth), Cytochalasin D (Calbiochem), Ethanol (AppliChem), Ficoll Paque Plus (Amersham Pharmacia); GC-Agar (Difco), Glycerin (Roth), Glycin (AppliChem), Glutathione Fast4Flow (Amersham Pharmacia), Harnstoff (Riedel-De-Häen), Hefeextrakt (Roth), Hemin (Fluka), Imidazol (Upstate), Methanol (AppliChem), mounting Medium (Sigma), NAD (Applichem), Natriumchlorid (AppliChem), Nucleotide (BioLabs), Paraformaldehyd (AppliChem), PP2 (Calbiochem), Polyvinylalkohol (Applichem), Saccharose (Roth), Saponin (Roth), TEMED (Roth), Triethanolamin (Applichem), Tris-Base (AppliChem), Triton-X-100 (Roth), Trypanblau (Sigma), Trypton (Roth), Tween-20 (Roth), Mercaptoethanol (Roth), Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen), In-Fusion PCR Cloning Kit (BD Bioscience), BD Creator DNA Cloning Kit (BD Bioscience)

6.8 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Autoklav (Varioklav), Brutschränke (Heraeus, Memmert), Deckgläschen/Objektträger (Knittel), Elektrobrot-Apparatur (Bio-Rad, Schleicher & Schuell), Entwickler (Agfa), FACS-Calibur (Becton Dickinson), Fluoreszenzmikroskop (Nikon), FPLC (Bio Rad), Gelapparat für Polyacrylamidgelelektrophorese (Bio-Rad), Geldokumentation (Bio-Rad), Gelkammern für Agarosegele (Bio-Rad), Glaswaren (Schott, VWR Brand), Heizblöcke (Roth, Grant Boekel), Konfokales Mikroskop (Zeiss), Kühl- und Gefrierschränke (Privileg), Magnetrührer (Ika), Master Cycler Gradient (Eppendorf), Mikrowelle (Electronia), pH-Meter (Beckman), Photometer (Hach), Pipetten (Gilson), Plastikwaren (Eppendorf, Greiner, Costar), PVDF-Membranen (Millipore), Röntgenfilme (Retina), Schüttler (Bühler), Sequenzierer (Abi-Prism), Spannungsgeräte (Bio-Rad), Sterilbank (Heraeus), Thermomixer (Eppendorf), Vivaspin concentrator 50K (Vivascience), Vortexer (Ika), Waagen (Kern, Scaltec), Wasserbäder (Mettler, Julabo), Zählkammer (Neubauer), Zentrifugen (Heraeus, Sorvall)

7 Methoden

7.1 Kultur von Bakterien

7.1.1 Kultur von *Neisseria gonorrhoeae*

Die kommensalen Gonokokken und die verschiedenen Varianten von *Neisseria gonorrhoeae* MS11 wurden auf GC Platten, falls erforderlich mit entsprechendem Antibiotikazusatz, bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und täglich überimpft. Bei jeder Passage wurde die Morphologie der Gonokokkenkolonien überprüft.

7.1.2 Kultur von *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae*

Moraxella catarrhalis und *Haemophilus influenzae* wurden auf BHI-Agar-Platten kultiviert. Für die Kultivierung von *H. influenzae* waren die Agar-Platten zusätzlich mit Haemin und NAD supplementiert. Die Bakterien wurden täglich weitergestrichen.

7.1.3 Kultur von *Escherichia coli*

Escherichia coli und Expressionsstämme wurden auf LB-Platten kultiviert, die bei Bedarf die zur Selektion notwendigen Antibiotika enthielten. Für die Übernachtskulturen wurden 2-10ml LB-Medium mit einer Kolonie beimpft, welche mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen wurde und bei 37°C mit 200-250rpm geschüttelt.

7.1.4 Transformation von *Escherichia coli*

E. coli, die zuvor künstlich kompetent gemacht und bei -80°C eingefroren wurden, wurden auf Eis aufgetaut. Zu 100µl kompetenter *E. coli* wurde die gewünschte Menge des vorbereiteten Ligations- bzw. Rekombinationsansatzes gegeben (5-10µl, 0,2-1µg DNA) und gut vermischt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 75 Sekunden bei 42°C im Wasserbad erhitzt und danach sofort wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1ml LB-Medium wurde die Kultur eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert und die gewachsenen Bakterien anschliessend durch Zentrifugation (3Minuten, 3000U/Minuten) pelletiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 100µl dekantiert und das Pellet im verbleibenden Medium resuspendiert. Anschliessend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum oder sonstigen Zusätzen ausplattiert.

7.1.5 Einfrieren von Bakterien

600µl LB-Medium und 600µl 50% Glycerin wurden in ein 2ml Röhrchen mit Schraubverschluß pipettiert. In diese Suspension wurde die Hälfte der Bakterien einer dicht bewachsenen Agarplatte suspendiert und anschliessend bei -80°C eingefroren.

7.2 Isolierung und Kultur von Zellen

7.2.1 Zell-Linien

HEK 293T (*human embryonal kidney cell line*) Zellen wurden in Zellkulturschalen in DMEM-Medium supplementiert mit 10 % CS kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Konfluente Kulturen wurden mit 2 ml einer Trypsinlösung 3-5 Minuten bei 37°C inkubiert und nach Ablösung der Zellen in frischem Medium verdünnt und weiterkultiviert.

Die beiden Varianten der Src-Fibroblasten aus der Maus (SYF, SYF + c-Src) wurden in DMEM-Medium supplementiert mit 10% FCS/nAA (*nonessential Amino Acids*), Pen (Penicillin)/Strep (Streptomycin) kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Konfluente Kulturen wurden mit 2 ml einer Trypsinlösung 3-5 Minuten bei 37°C inkubiert und nach Ablösung der Zellen in frischem Medium verdünnt und weiterkultiviert.

HeLa-CEACAM3-wt Zellen wurden in Zellkulturschalen in DMEM-Medium supplementiert mit 10% FCS kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Konfluente Kulturen wurden mit 2ml einer Trypsinlösung 3-5 Minuten bei 37°C inkubiert und nach Ablösung der Zellen in frischem Medium verdünnt und weiterkultiviert.

7.2.2 Isolation primärer Zellen

Für die Isolierung primärer Granulozyten wurden jeweils 20-25ml frisches, humanes Blut abgenommen und direkt mit 3ml 3,8% Na-Citrat als Antikoagulans versetzt. Das Blut wurde im gleichen Volumenverhältnis mit 1xPBS versetzt und 15ml Ficoll Paque Plus mit je 10ml Blut überschichtet. Anschließend wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 20°C und 1000 rpm zentrifugiert. Dabei separieren aufgrund der unterschiedlichen Dichte, die verschiedenen Bestandteile des Blutes in distinkte Phasen. Die Granulozyten befinden sich zusammen mit den Erythrozyten am Boden des Gefäßes und die darüberliegenden Schichten können entfernt werden.

Um die Erythrozyten von den Granulozyten zu separieren wird die Lösung aus Granulozyten/Erythrozyten mit PVA/NaCl versetzt und für 45 Minuten inkubiert. Während der Inkubationszeit sinken die Erythrozyten auf den Grund des Gefäßes und die Granulozyten befinden sich im Überstand. Um die Granulozyten von verbliebenen Erythrozyten zu säubern wird der Überstand für 4 Minuten bei 1000rpm pelletiert und für 30 Sekunden mit A. bidest inkubiert. Dies führt zur osmotischen Lyse der restlichen Erythrozyten. Anschließend wird durch die Zugabe von 5xPBS ein physiologischer Salzgehalt hergestellt. Die Granulozyten werden nochmals bei 1000 rpm für drei Minuten zentrifugiert und das Pellet in 1xPBS/10mMGlucose/1% h.i. Serum aufgenommen. Im Schnitt wurden mit dieser Methode 2-4x10⁷ lebende Granulozyten pro 20ml Blut isoliert. Bis zur Weiterbearbeitung wurden die Zellen auf Eis gelagert.

7.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Eine wichtige Bedingung für die Reproduzierbarkeit von Infektionsversuchen besteht darin variable Faktoren zu minimieren. So sollten für die Experimente wenn möglich immer die gleiche Anzahl Zellen verwendet werden. Daher wurde die Zellzahl in einer Neubaukammer ermittelt und für gleichartige Versuche die Zellen auf dieselbe Anzahl verdünnt und die jeweilige Kulturschale eingebracht. Für die Zählung der Zellen wurden 10µl einer Zellsuspension eingesetzt und am Mikroskop ausgewertet.

Anzahl der Zellen pro Großquadrat $\times 10^4$ (Volumen des Großquadrates = 10^{-4}) =
Zellzahl /ml

7.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden semikonfluente Zellkulturen nach Trypsinierung durch Zentrifugation bei 600rpm für drei Minuten pelletiert. Das Pellet (mit einer Zelldichte von ca. 5×10^6 Zellen/ml) wurde in 1ml DMEM/20%CS/10%DMSO vorsichtig aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Da der Einfrierprozess langsam und stufenweise erfolgen muß, wurden diese Röhrchen in einer Styroporbox über Nacht bei -80°C gekühlt und anschließend zur Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-180°C) überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen schnellstmöglich in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde mit frischen DMEM Medium versetzt und bei 600rpm für drei Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in entsprechendem Medium aufgenommen und in einer Zellkulturschale für 24 -48 h inkubiert. Nach diesem Zeitraum erfolgte die erste Subkultivierung der Zellkultur

7.3 Infektionsexperimente

7.3.1 Vorbereiten der Bakterien

Neisseria gonorrhoeae wurden auf GC-Agar kultiviert. Die verwendeten Stämme besitzen auf dem, das rekombinante Opa-Gen tragenden Plasmid, Resistenzen gegen Erythromycin sowie Chloramphenicol. *Neisseria gonorrhoeae* wurden zwei Tage vor dem Infektionsexperiment aus der -80°C Kultur entnommen und dünn auf Antibiotikum-enthaltenden GC-Platten ausgestrichen. Tags darauf wurden lichtmikroskopisch selektierte, Opa-Protein exprimierende Kolonien flächig auf GC-Agarplatten (ohne Antibiotikum) ausplattiert um eine ausreichende Menge Gonokokken zur Infektion zur Verfügung zu haben. Eine Platte ergab $\sim 1 \times 10^8$ CFU (Richtwert) wenn 1-2 Kolonien der Ursprungsplatte weitergestrichen wurden. Zum Einsatz für Infektionsexperimente wurden die Bakterien von der Agarplatte abgenommen und in DMEM+0,5% h.i. CS suspendiert.

Haemophilus influenzae wurde auf BHI-Agar supplementiert mit Haemin und NAD und *Moraxella catarrhalis* auf BHI-Agar ohne Supplement kultiviert. Die Bakterien wurden zwei Tage vor dem Infektionsexperiment aus der -80°C Kultur entnommen und dünn auf den entsprechenden Agar-Platten ausgestrichen. Tags darauf wurden lichtmikroskopisch selektierte, nicht-typisierbare, *H. influenzae/M. catarrhalis* flächig auf BHI-Agarplatten ausplattiert um eine ausreichende Menge Bakterien zur Infektion zur Verfügung zu haben. Zum Einsatz für Infektionsexperimente wurden die Bakterien von der Agarplatte abgenommen und in DMEM+0,5% h.i. CS suspendiert.

Alternativ zum direkten Einsatz der Gonokokken von der Agarplatte konnten auch 2-4 Platten in eine Flüssigkultur gebracht und für weitere drei Stunden inkubiert werden. Hierzu wurden 20ml BHI-Medium mit 200µl Vitamin-Mix und 100µl 8,4% NaHCO₃ (für *H. influenzae* zus. mit 1:1000 NAD und 1:50 Haemin) supplementiert. Die Gonokokken wurden in diesem Medium suspendiert und bei 37°C unter Schütteln drei Stunden inkubiert. Anschliessend wurde die Kultur durch Zentrifugation (3000U/Minuten, 5Minuten) pelletiert und in DMEM+0,5%h.i. CS resuspendiert.

Um Bakterien für den späteren Nachweis via Mikroskopie oder Durchflusszytometrie zu markieren wurden die Bakterien mittels FITC oder Rhodamin direkt angefärbt. Dafür wurde 1ml einer Bakteriensuspension mit 1µl der vorhandenen FITC- oder Rhodamin-Stammlösung versetzt und 20-30 Minuten bei 37°C schüttelnd inkubiert. Danach musste überschüssiger Farbstoff durch Waschen mit PBS entfernt werden. Drei Waschschritte waren meist ausreichend, im Zweifelsfall wurde aber solange gewaschen bis der Überstand nach dem Abzentrifugieren keine intensive Färbung mehr aufwies.

7.3.2 Transfektion der Zellen

7.3.2.1 cDNA-Transfektion mittels Calcium-Phosphat Kopräzipitationsmethode

In 500µl steriles, bidestilliertes Wasser wurde die gewünschte Menge DNA (1-10µg pro 10cm Schale 293T-Zellen) pipettiert. Die eingesetzte DNA stammte für gewöhnlich aus Midi-Präparationen. Nach Zugabe von 500µl kaltem 2xHBS wurden unter ständigem Schütteln (Vortexer) 50µl sterile 2,5M CaCl₂-Lösung zugetropft. Der Ansatz wurde 10-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde der zu transfizierenden Zellkulturschale 25mM Chloroquin im Verhältnis 1:1000 zugegeben und die Schale bis zum Ende der Inkubationszeit wieder im Brutschrank aufbewahrt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Ansatz tropfenweise, vorsichtig und flächig über die Zellen verteilt. Nach 6-8 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium gegen frisches Zellkulturmedium ausgetauscht und die Zellen weitere 12-20 Stunden inkubiert.

7.3.2.2 Weitere Transfektionsmethoden

- Die Transfektion von cDNA in SYF⁻/SYF⁺-c-Src Maus-Fibroblasten erfolgte mittels Lipofektamin (Invitrogen, nach Vorschrift des Herstellers).
- Die Transfektion der siRNA-Oligonukleotide in HeLa-CEACAM3-wt Zellen erfolgte mittels Oligofektamin (Invitrogen, nach Vorschrift des Herstellers).

7.3.3 Infektion von Phagozyten

Die Infektion frisch isolierter humaner Granulozyten (1x10⁶ Zellen) erfolgte standardisiert mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 20 Bakterien pro Zelle für 15 Minuten bei 37°C. Die Ansätze wurden während der Infektion ständig suspendiert, um die Adhärenz der Granulozyten an das Trägermaterial zu verhindern. Nach Ablauf der Infektionsdauer wurden die Ansätze direkt auf Eis gestellt, um so die Phagozytose zu unterbrechen. Anschließend wurde die Phagozytoseeffizienz der verschiedenen Ansätze in der Durchflußzytometrie untersucht (s. 7.4.2).

Für die verschiedenen Untersuchungen wurden die Granulozyten entweder mit verschiedenen CEACAM-spezifischen Antikörpern, mit pharmakologischen Inhibitoren oder TAT-Proteinen für eine Stunde ebenfalls bei 37°C präinkubiert.

7.3.3.1 Elimination CEACAM-bindender Bakterien durch Granulozyten

In diesen Experimenten wurde untersucht, ob CEACAM-bindende Bakterien der Phagozytose durch Granulozyten widerstehen können. Dafür wurden isolierte, humane Granulozyten (1x10⁶ Zellen) in 24-well Platten überführt und mit zwei Bakterien pro Zelle für die angezeigten Zeiträume infiziert. Die Zahl überlebender, nur extrazellulärer Bakterien zu den jeweiligen Zeitpunkten wird in Relation zu der Bakterienzahl im initialen Inokulum gesetzt.

7.3.4 Infektion von Epithelzellen

7.3.4.1 Gentamicinassay

8×10^4 - 5×10^5 transfizierte 293T-Zellen wurden pro Well einer 24-Well-Platte eingesät. In eine weitere 6cm Zellkulturschale wurden 1×10^6 Zellen ausgesät um Lysate zur Expressionskontrolle herstellen zu können. Die Zellen wurden über Nacht in DMEM+10% CS bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Bakterien wurden von der Agarplatte abgenommen und in DMEM+0,5%h.i. CS suspendiert. Die optische Dichte wurde bei 550nm bestimmt. Die Zellen wurden mit einer multiplicity of infection (MOI) von 20 infiziert. Nach 60 Minuten Infektionszeit bei 37°C 5% CO₂ wurde das Medium abgenommen und durch DMEM+10%CS ersetzt, welches 50µg Gentamicin pro Milliliter enthielt. Die Gentamicinbehandlung wurde für 45 Minuten unter Inkubation zu vorgenannten Bedingungen aufrechterhalten um extrazelluläre Bakterien abzutöten.

Anschließend wurde das Medium restlos abgenommen und die Zellen in genau 1ml 1% Saponin in PBS lysiert. Hierfür wurde 1ml der steril filtrierte Saponinlösung mit einer Eppendorf-Pipette in die Vertiefung pipettiert und die Zellen zusätzlich durch mehrfaches Aufsaugen und Ausblasen der Lösung auch mechanisch zerstört. Nach 15 Minuten Inkubation wurde das Lysat nochmals homogenisiert und anschliessend eine Verdünnungsreihe erstellt. Von den Verdünnungsstufen 1:100 und 1:1000 wurden standardmässig je zweimal 20µl auf einer GC-Agarplatte ausplattiert. Je nach Experiment wurden auch andere Verdünnungsstufen zusätzlich verwendet.

7.3.5 Immunofluoreszenzfärbung

7.3.5.1 Präparate für die Immunofluoreszenzfärbung

5×10^4 - 1×10^5 Zellen wurden auf in 24-Wellplatten befindliche, beschichtete Deckgläser ausgesät und über Nacht in DMEM+10%CS bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 10-40. Bei Bedarf mussten die Bakterien mit FITC oder Rhodamin gefärbt werden. Die Infektionszeit betrug 30-60 Minuten. Im Anschluß wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Nach 30 minütiger Fixierung in 300-400µl 4% PFA wurden die Zellen zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Um zwischen intra- und extrazellulären Bakterien unterscheiden zu können war eine differentielle Färbung nötig. Wenn die Bakterien bereits mit FITC-markiert waren, wurden nur die extrazellulären Bakterien mit einem Gonokokken-spezifischen- α -Opa-Antikörper markiert. In einem zweiten Schritt wurde ein spezifisch gegen den ersten Antikörper gerichteter, Cy5-gekoppelter zweiter Antikörper eingesetzt. Die Ansätze wurden mit 20µl der Antikörper-Lösung für 45 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine Austrocknung zu verhindern, wurden die Präparate in der 24-Wellplatten in eine mit feuchten Zellstofftüchern versehene, verschliessbare Plastikbox gegeben.

Nach Abschluß der Färbeschritte wurden die Präparate nochmals mit PBS⁺⁺ gewaschen. Die Deckgläschen wurden nun mit einem Tropfen „mounting medium“ (Sigma) versehen und mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger aufgebracht. Überschüssiges Medium wurde abgenommen und das Präparat mit Nagellack luftdicht umschlossen. Die Lagerung erfolgt bei +4°C bis zur Betrachtung am Fluoreszenzmikroskop.

Wenn keine Fluoreszenz-markierten Proteine zur Verfügung standen, waren zum Anfärben einer Struktur jeweils zwei Schritte nötig. Der Erste Schritt war immer die Markierung der gewünschten Struktur mit einem Antikörper, der in einem zweiten Schritt mittels fluorochromgekoppelter Antikörper detektiert wurde. Vor Zugabe der Antikörper, die jeweils 45 Minuten mit den Zellen bei Raumtemperatur inkubiert wurden, erfolgte jeweils ein Waschschrift mit PBS⁺⁺/10%CS. Nach abgeschlossener Inkubation mit der Antikörperlösung wurden die Zellen zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Wenn die Färbung der extrazellulären Strukturen abgeschlossen war wurde die Zellmembran mit einer 0,2%igen Saponin-Lösung in PBS⁺⁺/10%CS permeabilisiert. Die intrazellulären Strukturen konnten nun wie zuvor für die extrazellulären Strukturen beschrieben gefärbt werden.

7.4 FACS Analyse

7.4.1 FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) mit Epithelzellen

1×10^6 Zellen wurden in 6cm Schalen gesplittet und über Nacht inkubiert. Die Infektion erfolgte mit FITC-markierten Bakterien mit einer MOI von 20 für 60 Minuten. Anschliessend wurde das Medium abgenommen und die Zellen aus den Schalen gelöst. Das erhaltene Pellet wurde in einem Milliliter FACS-Puffer (1%(F)CS in 1xPBS) resuspendiert und ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Proben auf jeweils zwei FACS-Probenröhrchen verteilt und bis zur Messung auf Eis abgedunkelt gelagert. Zum Waschen wurden die Zellen zwei Minuten bei 2000U/Minuten in der auf 4°C gekühlten Tischzentrifuge pelletiert.

7.4.2 FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) mit Granulozyten

Die Phagozytose von Gonokokken in Granulozyten wurde ebenfalls mit Hilfe der FACS-Analyse analysiert (Voyich et al., 2002; Pils et al., 2005). 1×10^6 Zellen wurden mit 2×10^7 FITC-markierten Bakterien in 1ml 1xPBS (supplementiert mit 10mM Glukose, 1% h.i. Serum, MgCl₂ und CaCl₂) für 15 Minuten bei 37°C infiziert. Die Phagozytose wurde beendet, indem die Ansätze auf Eis gestellt wurden. Die Zellen wurden anschließend einmal mit FACS-Puffer (1%CS in 1xPBS) gewaschen und in 1ml FACS-Puffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte mit dem FACS-Calibur und bei Bedarf wurde den Proben Trypanblau zugesetzt. Um die Zahl der internalisierten Bakterien abzuschätzen, wurde die Prozentzahl der FITC-positiven Granulozyten mit dem Mittelwert der Fluoreszenzintensität der Zellen multipliziert.

7.4.3 Rezeptorfärbung für FACS

Zur quantitativen Kontrolle der Expression von extrazellulären, zellassozierten Proteinen konnten diese mittels Antikörpern fluoreszenzmarkiert werden. Hierzu wurde eine nicht für das Infektionsexperiment herangezogene Schale mit Zellen gesplittet. Allerdings wurde hierfür das eingesetzte Trypsin 1:5 in PBS verdünnt um die exponierten Proteine möglichst zu schonen. Nach zweimaligem Waschen in 1ml FACS-Puffer wurden die Zellen in 300µl FACS-Puffer resuspendiert. Zu dieser Suspension wurde der entsprechende Antikörper gegen das nachzuweisende Protein (hier meist Gran10, der CEACAM1, -3, -5 und -6 bindet) 1:200 hinzugegeben und 30 Minuten bei 4°C unter ständigem Invertieren inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder 2-3 mal in FACS-Puffer gewaschen und wieder in 300µl resuspendiert. Der Zweitantikörper wurde ebenfalls 1:200 eingesetzt und auch für 30 Minuten unter ständigem Invertieren bei 4°C mit den Zellen inkubiert. Nach abschliessendem zwei- bis dreimaligem Waschen konnte die Probe in ein FACS-Probenröhrchen überführt und bis zur Messung auf Eis und abgedunkelt gelagert werden.

War eine Messung nicht innerhalb von ca. 2-5 Stunden nach Fertigstellung der Präparate möglich, konnten diese pelletiert und in 4% PFA resuspendiert einige Wochen bei 4°C im Dunkeln gelagert werden

7.4.4 Quenchen des FITC-Fluoreszenzsignals mittels Trypanblau

Für die distinkte Differenzierung zwischen adhätierenden Bakterien und intrazellulären Bakterien wurde der Farbstoff Trypanblau (0,4%(v/v),Sigma) verwandt. Zuerst wurde in der FACS-Analyse die Zahl der adhätierenden und intrazellulären Bakterien determiniert. Parallelen Ansätzen wurde der Farbstoff Trypanblau in einem Verhältnis von 1:1 (2mg/ml) zugesetzt. Da Trypanblau nicht in intakte Zellen eindringen kann wird so das Fluoreszenzsignal der extrazellulären Bakterien selektiv absorbiert (*quenching*) und nur die Zellen detektiert, die intrazelluläre Bakterien aufweisen.

7.5 Protein

7.5.1 Natrium Dodecyl-Sulfate–Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine ihrer Größe nach auftrennen zu können, bedient man sich der SDS-PAGE. Natriumdodecylsulfat bindet an die Seitenketten der (meisten) Aminosäurereste in Proteinen. Hierdurch wird das Protein denaturiert und erhält über die Sulfatgruppe eine negative Ladung. Die Proteine können nun in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

Je nach Größe der Proteine, die nachgewiesen werden sollten wurden Polymergele verschiedener Dichte verwendet. Je größer das Protein und je dichter das Gel desto langsamer bewegt sich das Protein durch das Gel. Um die Proteine vor der Auftrennung auf eine enge Lauffront zu fokussieren kamen Sammelgele mit 5% Polyacrylamid zum Einsatz. In dieser Arbeit wurden Trenngele mit 10 und 12,5% Polyacrylamid verwendet.

Zunächst muss das Trenngel hergestellt und gegossen werden. Hierzu wurden für ein 10%iges Gel 2,5ml der 40% (Bis-)Acrylamid-Lösung (Roth) mit 5ml bidestilliertem Wasser sowie 2,5ml 1,5M Tris pH8,8 in einen Kolben gegeben, vermischt und entgast. Für ein 12,5%iges Gel wurden 3,1ml Acrylamidlösung, 4,3ml Wasser und 2,5ml 1,5M Tris pH8,8 zusammenpipettiert. Anschliessend wurden 50µl einer 20% SDS-Lösung zugegeben und die Polymerisation mittels Zugabe von 30µl einer 10%igen Lösung des Radikalstarters APS (Ammoniumpersulfat) und 15µl des Radikalstabilisators TEMED (Tetra-Methyl-Ethylen-Diamin) in Gang gesetzt.

Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit bidestilliertem Wasser vorsichtig überschichtet. Nachdem das Gel vollständig polymerisiert war wurde das Sammelgel aus 1,25 ml Acrylamidlösung, 6,15 ml Aqua bidest. und 2,5ml 0,5M Tris pH6,8 wie für das Trenngel beschrieben hergestellt. Nach Entfernen des Wassers wurde das Sammelgel über das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und mit einem Kamm versehen, der die gewünschte Anzahl Probenaschen formte. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgeles wurde der Kamm entfernt, die Taschen mit demineralisiertem Wasser ausgewaschen und das Gel in die Elektrophoresevorrichtung eingesetzt. Die Elektrophoresekammer wurde nun mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die mit Probenpuffer versehenen Proben, nach fünfminütigem Erhitzen bei 90°C, aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei 100V durchgeführt und dauerte 1,5-2 Stunden.

Zur Coomassie-Färbung wurde das Gel für 5-15 Minuten in einer Coomassie-Färbelösung fixiert und gefärbt. Zur Entfärbung wurden die Gele in einem Methanol-Eisessig-Entfärber geschüttelt, bis alle Banden klar sichtbar waren.

7.5.2 Western Blot Analyse

7.5.2.1 Nass-Transfer und Semidry-Verfahren

Beim Nasstransfer wurde das Gel zusammen mit einer PVDF-Membran (mit Methanol und Wasser vorbehandelt) in eine Elektrophoresekammer, die ganz mit Transferpuffer aufgefüllt war eingespannt und für 12-14 h bei 30 V dem Transfer unterzogen. Beim Semidry-Verfahren wurden das Gel und die PVDF-Membran nur zum Teil mit Elektrodenpuffer (Anoden- und Kathodenpuffer) befeuchtet und in einer Apparatur bei 70-90 mA für 2 h der Elektrophorese unterzogen.

Die Membran wurde anschließend, um den Größenstandard sichtbar zu machen, in einer verdünnten Coomassie-Färbelösung gefärbt. Nach der Entfärbung in einer Methanol-Lösung wurde die Membran für 2h in einer BSA-haltigen Blockierlösung inkubiert. Dies diente zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen.

Anschließend wurde die Membran für mindestens 4 h bei 4°C mit einem entsprechenden Erstantikörper (z.B. α -Rac Antikörper) inkubiert. Nach dreimaligen 15-minütigem Waschen in TBS/Tween wurde die Membran für 2 h in einer Lösung mit HRP-gekoppelten Protein G (für monoklonale Erstantikörper; 3 μ l AK auf 15 ml TBST) oder HRP-gekoppelten Protein A (für polyklonale Erstantikörper) inkubiert.

Die Membran wurde erneut dreimal 15 Minuten gewaschen und anschließend mittels des ECL-Systems (10 ml ECL-Lösung, 3 μ l H₂O₂) oder eines industriell hergestellten ChemiGlow (zur Detektion von besonders schwachen Signalen) für 1 Minute entwickelt.

Zumeist wurde nach primärer Benutzung die Membran zur erneuten Beprobung von den gebundenen Antikörpern befreit (stripfen). Dafür wurde die Membran für 5-10 Minuten bei 75°C mit einer SDS- β -Mercaptoethanol-haltigen Lösung behandelt. Diese Membranen konnten nach 2 h Blockieren wieder erneut mit einem Erstantikörper inkubiert werden, was die Detektion von verschiedenen Proteinen innerhalb derselben Ausgangsprobe ermöglichte.

7.5.3 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die in der vorliegenden Arbeit erzeugten rekombinanten DNA-Konstrukte wurden teilweise durch prokaryontische Expressionsstämme exprimiert. Für die Proteinsynthese in Bakterien wurden die entsprechenden Gene in den Expressionsvektor pGEX 4Ti kloniert. Dieser Vektor besitzt einen induzierbaren prokaryontischen Promotor, der mit der inserierten cDNA gekoppelt ist. Weiterhin zeichnet sich dieser Vektor durch eine GST-kodierende Sequenz aus, die im exprimierten, rekombinanten Protein ein Glutathione S-Transferase (GST)-Protein am N-terminalen Ende bildet. Der GST-Tag ermöglicht die Aufreinigung des daran gekoppelten Proteins durch Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose.

Folgende Proteine wurden unter nativen Bedingungen nach dieser Methode isoliert:

- GST-Protein
- GST-PBD
- GST-Src-SH2
- GST-Vav-dn

Für die Isolation der GST-gekoppelten Proteine wurde anfangs eine 2l Bakterienkultur der plasmid-tragenden Expressionsstämme angesetzt, die bis zu einer OD_{600} von 0,8 bis 1,0 angezogen wurden. In der exponentiellen Phase wurde die Expression und somit die Proteinbiosynthese durch Zugabe von IPTG (finale Konz. 0,1M) induziert und die Kolben anschließend für weitere 4 – 6 h inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 4°C, 15 Minuten und 6000rpm konzentriert. Der Überstand wurde verworfen, je zwei Bakterienpellets in 10ml T-Puffer resuspendiert und jeweils mit 25mg/ml Lysozym für 30 Minuten inkubiert.

Der vollständige Zellaufschluß erfolgte durch eine Ultraschallbehandlung (Impuls 50%, 20 sec, 3-5x) im Eisbad. Die Suspension wurde anschließend mit einer Sepharoselösung versetzt, die es ermöglichte die bakterielle DNA und Überreste der Zellmembran durch Zentrifugation zu pelletieren und aus der Proteinlösung zu entfernen. Dafür wurden die Lysate bei 16000rpm, bei 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Das geklärte Lysat wurde anschließend mit 1-2ml GST-Sepharose-Lösung (GST-Fast4Flow) versetzt, welche zuvor dreimal mit T-Puffer gewaschen wurde. Die Ansätze wurden für 2-12 Stunden bei 4°C unter ständigem Schütteln inkubiert und anschließend wurde die GST-Sepharose mit dem GST-Fusionsprotein dreimal mit 1xPBS bei 1000rpm gewaschen. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde mittels SDS-PAGE in Coomassie gefärbten Polyacrylamidgelen überprüft. Die isolierten, aufgereinigten Proteine können direkt für die GST-Präzipitation eingesetzt werden.

Für eine längere Aufbewahrung wurden die GST-gebundenen Fusionsproteine durch die Inkubation mit 10mM Glutathion eluiert und anschließend das Eluat gegen einen physiologischen Puffer dialysiert. Das Dialysat wird bis zum Einsatz bei -80°C gelagert.

7.5.4 Aufreinigung von His-Fusionsproteinen

Die Kultur von His-Tag-Protein-exprimierenden Bakterien verläuft nach demselben Schema wie das der GST-Proteine. Das His-Tag ermöglicht die Aufreinigung der daran gekoppelten Proteine durch die Affinitätschromatographie über Ni²⁺-NTA-Säulen (Quiagen). Folgende Proteine wurden mittels dieser Technik aufgereinigt:

- pTAT-Rac-dn
- pTAT-Cdc42-dn
- pTAT-LacZ
- pTAT-Vav-dn
- pTat-Swap-dn

Die konzentrierten Bakteriensuspensionen werden aber in denaturierenden Lysepuffer aufgenommen, der aus 8M Harnstoff besteht. Die vollständige Lyse der Ansätze erfolgt durch Ultraschallbehandlung und die Ansätze werden ebenfalls von DNA und Zelltrümmern durch den Zusatz von Sepharose und anschließender Zentrifugation geklärt. Die Lösung wird vor der eigentlichen Aufreinigung mit Imidazol (finale Konzentration 20mM) äquilibriert. Die Proteinaufreinigung wurde an einem programmierbaren Affinitätschromatographen mit Photometer und Schreiber von BioRad durchgeführt. In den Fließkreislauf des Affinitätschromatographen wurde eine Ni²⁺-NTA-Säule mit 2ml Bettvolumen eingebracht. Nachdem der Kreislauf mit Wasch-Puffer gespült worden ist, wurde das Photometer auf den Wasch-Puffer geeicht. Das Bakterienlysat wurde danach mit einer Geschwindigkeit von 1ml/Minute in den Affinitätschromatographen eingezogen. Im Anschluss wurde der Kreislauf wiederum mit Wasch-Puffer (2 ml/Minute) gewaschen, bis der Schreiber des Photometers die Nulllinie erreicht hat. Nachdem kein Protein mehr aus der Säule ausgewaschen wurde, wurde das an die Säule gebunden Protein mittels eines Imidazolgradienten (20-1000mM, 1 ml/Minuten) eluiert. Der Durchfluß wurde nach Erreichen eines Schreiberausschlages fraktioniert gesammelt. Die Säule wurde mit einer 20%igen EtOH-PBS-Lösung regeneriert und bei 4°C bis zur Wiederverwendung aufbewahrt. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Das Imidazol und der Harnstoff wurden aus der Lösung entfernt, indem die proteinreiche Fraktion gegen einen physiologischen Puffer dialysiert wurde. Die Entfernung dieser Reagenzien ist erforderlich, damit das denaturierte Protein seinen nativen Faltungszustand annimmt und seine Funktionalität wieder erreicht.

7.5.5 Herstellung von Zell-Lysaten

Um die Expression von Proteinen überprüfen zu können mussten diese aus den Zellen freigesetzt werden. Zunächst wurde das Medium von den Zellen abgenommen, und die Zellen mit PBS gewaschen. Für Lysate, die der Expressionskontrolle dienen, wurden 1x10⁶ Zellen in einer 6cm Zellkulturschale in 500µl RIPA Puffer lysiert. Das zähflüssige Lysat wurde mittels eines Zellschabers am Rand der Schale gesammelt und mit einer 1ml Spritze samt Einwegkanüle aufgenommen und in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um die im Lysat enthaltene DNA mechanisch zu zerstören („scheren“) wurde das Lysat mehrmals durch die Kanüle aufgesogen und ausgeblasen. Es wurden nun 100µl einer Suspension von Sepharose in Triton-Puffer zugegeben, die DNA und andere

störende Zellreste bindet. Die Sepharose-Kügelchen wurden, nach mindestens fünfminütiger Koinkubation unter ständigem Invertieren, durch 15 minütige Zentrifugation aus dem Lysat entfernt. 100-200µl des Überstandes wurden in ein frisches 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit der gleichen Menge 2xSample Buffer versetzt. Das Lysat konnte nun einige Wochen bei +4°C gelagert werden.

Lysate für Immunpräzipitationen und GST-Präzipitationen wurden aus konfluenten 10cm Schalen angefertigt. Hier wurden 1ml Puffer verwendet. Wenn die Isolation von Proteinkomplexen angestrebt wurde müssen die Lysebedingungen gegebenenfalls angepasst werden. Hierfür gibt es keine festen Regeln, es bleibt nur die Variation der Bedingungen und nachträgliche Analyse. Nach Lyse der Zellen und Klärung des Lysates durch Koinkubation mit Sepharosekügelchen wurde der Überstand aufgeteilt. Zwei Aliquots zu je 800µl wurden bei -80°C eingefroren, 200µl wurden zur Expressionskontrolle in ein frisches 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit der gleichen Menge 2xSample Buffer versetzt.

7.5.6 Immunpräzipitation

Ein 800µl Aliquot eines Zelllysates wurde auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 3µl des geeigneten Antikörpers wurde das Gemisch vier Stunden bei 4°C unter ständigem Invertieren inkubiert. Im Folgenden wurden 25µl einer Protein-A/G-Sepharose Suspension hinzu gegeben und eine weitere Stunde mit dem Lysat unter ständigem Invertieren bei 4°C inkubiert. Die Antikörper samt erkanntem Protein sowie assoziierte Proteine sollten nun an die mit Protein AG beschichteten Sepharosekügelchen gebunden sein und wurden mit diesen zusammen durch kurze Zentrifugation pelletiert (Quick Run, 20 sek bis auf 10000U/Minute). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet 2-3 mal durch Resuspendieren und Abzentrifugieren gewaschen. Im letzten Schritt wurde der Überstand bis auf ca. 40µl abgenommen und mit 15µl 4xSample Buffer versetzt. Die Probe wurde gut gemischt und komplett auf das SDS-GEL aufgetragen.

7.5.7 GST-Präzipitation

Die GST-Präzipitation (GST-P.) ermöglicht, wie die Immunpräzipitation, die selektive Anreicherung von Proteinen aus Zelllysaten. Die spezifische Erkennung beruht dabei auf der Interaktion der GST-Fusionsproteine mit deren natürlichen Interaktionspartnern, wie z.B. Tyrosin-phosphorylierte Proteine im Falle der SH2-Domäne von Vav-dn, Src-SH2 oder GTP-beladene Rac/Cdc42 GTPasen durch die GST-PBD. Dafür wurden 5-10µg des GST-Fusionsproteins mit dem geklärten Lysat bei 4°C unter ständiger Bewegung für 1-3 Stunden inkubiert. Für Ansätze, die mit eluierten GST-Fusionsproteinen durchgeführt wurden musste in einem zusätzlichen Schritt Glutathione-Sepharose für weitere 2 Stunden zugefügt werden. Ansonsten erfolgte die Präzipitation der Komplexe aus GST-Fusionsprotein, Zielprotein und GST-Sepharose mittels Zentrifugation bei 4°C, 13000rpm. Anschließend wurden die Ansätze dreimal mit Triton-Puffer gewaschen und mit 2x Sample Buffer versetzt. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

7.6 DNA

7.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden Agarosegele mit Konzentrationen zwischen 0,7% und 1,4 % verwendet. Zur Herstellung wurde die benötigte Menge Agarose durch Aufkochen in 1xTAE gelöst und nach dem Abkühlen („handwarm“) in eine Gelkassette gegossen, in die zuvor ein Kamm mit der gewünschten Anzahl an taschenformenden Zähnen montiert wurde. Nach vollständigem Abkühlen und damit einhergehender Erstarrung des Geles wurde die Kassette in Laufrichtung gedreht und der Kamm gezogen. Als Laufpuffer kommt 1xTAE zum Einsatz. Die aufzutragenden Proben wurden zuvor mit GEBS-Puffer 1:1 gemischt.

Als Größenstandard wurde vorwiegend „Gene Ruler 1kb Ladder“ von Fermentas verwendet. Die Färbung der DNA mit Ethidiumbromid erfolgte nach der elektrophoretischen Auftrennung in einer 0,3%igen Ethidiumbromidlösung. Sichtbar wurden die Banden nach kurzer Entfärbung des Gels in demineralisiertem Wasser unter UV-Licht, welches das Ethidiumbromid zur Fluoreszenz anregte.

7.6.1.1 Agarose-Gelelektrophorese (analytisch)

Für die analytische Gelelektrophorese kamen je nach Größe der zu überprüfenden DNA 0,7 oder 1,4%ige Gele zum Einsatz. Nach Auftrennung bei 50-90V wurden die Gele im Ethidiumbromidbad gefärbt und fotografiert.

7.6.1.2 Agarose-Gelelektrophorese (präparativ)

Für die präparative Gelelektrophorese wurden 1,0 oder 1,4%ige Gele verwendet. Nach Auftrennung bei niedriger Spannung und Färbung in Ethidiumbromidlösung wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht als Blöcke aus dem Gel geschnitten und die DNA eluiert.

7.6.2 Cre-vermittelte, loxP-spezifische Rekombination

Für die Herstellung von Expressionsvektoren wurde das *Clontech Creator DNA Cloning Kit* verwendet. Die Rekombination mittels des 38kDa schweren, aus dem Bakteriophagen P1 stammenden Enzyms erfolgt zielgerichtet an bestimmten DNA-Sequenzen, den sogenannten loxP-sites. Eine loxP-site besteht aus zwei palindromischen, 13 Basen langen Sequenzen die durch ein 8 Basen langes Zwischenstück getrennt sind (ATA ACTTCG TAT A NN NNN NNN T ATA CGA AGT TAT). Die Sequenz des Zwischenstückes ist entscheidend für die Ausrichtung des Fragmentes im Akzeptorvektor. Zusätzlich enthält das aus dem Donorvektor übertragende Fragment ein Chloramphenicolresistenzgen ohne Promotor. Der Promotor für dieses Gen liegt im Akzeptorvektor. Daher konnte nach erfolgter Rekombination auf chloramphenicolresistente Klone selektiert werden, da nur

korrekte Rekombinanten das benötigte Protein exprimieren sollten. Als zusätzliches, negatives Selektionsmerkmal trägt der Donorvektor das *SacB* Gen, welches die Sucrase von *B. subtilis* codiert und Träger dieses Plasmids auf saccharosehaltigem Medium im Wachstum hemmt.

Die Rekombinationsreaktion wurde in 10µl Volumen bei Raumtemperatur durchgeführt. Entgegen dem Herstellerprotokoll wurden Donor- und Akzeptorvektor im Verhältnis 1:2 eingesetzt. Die Konzentrationen der Vektoren wurden mittels analytischer Agarosegelelektrophorese relativ zueinander und zu einem dritten Vektor bekannter Konzentration abgeschätzt.

Rekombinationsansatz:

100ng	Donorvektor
200ng	Akzeptorvektor
0,5µl	Cre-Rekombinase
1µl	10x Cre-Rekombinations-Puffer
auf 10µl Aqua bidest.	

Nach möglichst genau 15 Minuten Inkubation musste die Rekombinase durch Erhitzen des Ansatzes auf 70°C für 5 Minuten inaktiviert werden. Längere Inkubationszeiten führen zu unerwünschten Rekombinationsprodukten und vermindern so die Ausbeute an angestrebten Rekombinanten.

Nach Hitzeinaktivierung der Rekombinase wurde der Ansatz direkt zur Transformation von kompetenten *E. coli* Nova-Blue verwendet. Die fertig transformierten Bakterien wurden auf LB-Agar der 7% Saccharose und 30µg/ml Chloramphenicol enthielt ausplattiert. Über Nacht bei 37°C gewachsene Klone wurden auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum (Resistenz auf Akzeptorvektor) weitergestrichen. Nach erneuter Inkubation über Nacht bei 37°C konnten Plasmide gut angewachsener Klone per Mini-Präparation isoliert und in einem ersten Überprüfungsschritt mittels analytischer Gelelektrophorese auf die korrekte Größe hin untersucht werden. Plasmide die eine korrekte Größe aufwiesen wurden mittels Restriktionsanalysen weiter überprüft. Klone, deren Plasmide alle Testkriterien erfüllten, wurden weitergestrichen um am nächsten Tag bei -80°C eingefroren. Nach einer Plasmidisolierung im größeren Maßstab (Midi-Präparation) konnte das Plasmid zur Transfektion eukaryotischer Zellen eingesetzt werden. Als finale Kontrolle diente dann die Überprüfung auf Expression des Proteins mittels Fluoreszenzmikroskopie (im Falle von GFP/RFP Fusionsproteinen) sowie Kontrolle auf Expression und korrekte Größe mittels SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot.

7.6.3 DNA-Isolierung aus Agarosegel

Es kam das „*QIAquick gel extraction*“-Kit und das zugehörige Protokoll zum Einsatz, das im Folgenden kurz beschrieben wird.

Die aus dem präparativen Gel ausgeschnittenen Gelblöcke wurden gewogen (Waage mit leerem Eppendorf-Reaktionsgefäß der selben Größe tarieren). Das dreifache Volumen an QG-Puffer wurde zugegeben, wobei pro 100mg Gel ein Volumen von 100µl angenommen wurde. Der Gelblock wurde nun im Puffer bei 50°C inkubiert bis er sich vollständig aufgelöst hatte (ca. 10 Minuten). Um den Vorgang zu unterstützen konnte der Inhalt des Eppendorf-Reaktionsgefäßes alle 2-3 Minuten durch vortexen vermischt werden. Wenn die Farbe des Puffers in einen orangen oder violetten Farbton umgeschlagen hat, musste der pH-Wert durch Zugabe einer 3M

NaCOOH-Lösung mit pH-Wert 5,0 angepasst werden, sodass der Puffer wieder eine gelbe Farbe annahm. Hat das Fragment eine Größe unter 500bp oder über 4kbp sollte Isopropanol im Verhältnis 1:1 bezogen auf das Volumen des Gelblockes zugegeben werden um die Ausbeute zu erhöhen. Der Inhalt des Eppendorf-Reaktionsgefäßes wurde nun auf die Säule geladen und für eine Minute bei 13000 U/Minuten zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Nach optionalem Waschen mit weiteren 500µl QG-Puffer wurde die Säule mit 750µl PE-Puffer 2-3 Minuten inkubiert und dann durch Zentrifugation gewaschen. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde die Säule nochmals zentrifugiert um Pufferreste zu entfernen. Die Säule wurde nun in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß platziert und die DNA mit 50µl EB-Puffer oder Wasser, das mittig auf die Säule aufgetropft wurde, eluiert.

7.6.4 In-Fusion Reaktion

Es wurde das *In-Fusion Dry-Down* Kit von Becton Dickinson verwendet. In der Anleitung des Herstellers wird ein 10µl Ansatz beschrieben. Da sich die Reaktion in der Praxis allerdings als sehr effizient erwiesen hat, wurden pro vorbereitetem Reaktionsansatz drei Ligationen durchgeführt. Hierfür wurde der getrocknete Reaktionsansatz in 8µl sterilem, bidestilliertem Wasser gelöst und 100ng des linearisierten Vektors zugegeben (1µl bei von BD geliefertem pDNR-Dual). Die so vorbereitete Lösung wurde auf drei 0,2ml PCR Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt und eine entsprechende Menge des einzubringenden Fragmentes bis zu einem maximalen Gesamtvolumen von 4µl zugegeben. Das molare Verhältnis von Fragment zu Vektor sollte 2:1 betragen.

Beispielsweise wurden zu 25ng eines 4kbp großen Vektors 12,5ng eines 1000bp großen Fragmentes gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion auf Eis gestoppt und direkt im Anschluß in *E. coli* transformiert. Sollte eine Transformation nicht zeitnah durchführbar sein kann der Reaktionsansatz bei -20°C gelagert werden. Transformierte Bakterien wurden auf LB-Agar mit geeignetem Antibiotikum (Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Klone wurden einzeln weitergestrichen, die Plasmide am Folgetag per Mini-Präparation isoliert und überprüft.

Für eine Ligation stehen von Becton Dickinson zwei Zielvektoren zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich pDNR-Dual verwendet, der als Donorvektor für die Cre-lox-spezifische Rekombination, nicht aber als Expressionsvektor in eukaryotischen Zellen verwendet werden kann. Gegenüber dem zweiten von BD angebotene Vektor pDNR-CMV der direkt als Expressionsvektor in eukaryotischen Zellen verwendet werden kann bietet pDNR-DUAL jedoch die Möglichkeit klonierte Proteine über eine Splice-Donor-Site im Donorvektor in entsprechenden Akzeptorvektoren, die eine Splice-Acceptor-Site aufweisen am C-Terminus zu markieren.

Die Infusion Reaktion basiert auf einem proprietären Enzym, welches laut Handbuch des Herstellers in einem 15 Basenpaaren langen homologen Abschnitt von Vektor und Fragment einzelsträngige DNA erzeugt, die daraufhin hybridisiert und durch das In-Fusion Enzym ligiert wird. Dieses Verfahren funktioniert laut Hersteller mit jeder Kombination aus linearisiertem Vektor und Fragment die jeweils komplementäre 15bp-lange Sequenzen an ihren Enden aufweisen.

7.6.5 PCR

Um Fragmente zur Klonierung in zufriedenstellender Qualität und Menge zu erhalten wurde eine Kombination aus Taq und Vent – Polymerase verwendet. Beide Polymerasen sind thermostabil aber im Gegensatz zur Taq- bietet die Vent-Polymerase zusätzlich eine „proofreading“ Funktion, die Punktmutationen in der amplifizierten Sequenz verhindern soll. Da meist mehr als eine PCR simultan angesetzt werden sollten, wurden Reaktions- und Enzymmix getrennt angemischt und der Enzymmix direkt vor Start der PCR zu den Reaktionsansätzen gegeben. Ein typischer 50µl Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Reaktionsmix:

H ₂ O	30,5µl
10xPuffer	4µl (-MgCl ₂)
MgCl ₂ 25mM	1,5µl
Primer1	1µl (10pmol)
Primer2	1µl (10pmol)
Template	1µl (~100ng)
dNTP-Mix	1µl
Gesamt	40µl

Enzymmix:

H ₂ O	8 µl
10xPuffer	1µl (-MgCl ₂)
Taq-Polymerase	0,5µl
Vent-Polymerase	0,5µl
Gesamt	10µl

Wenn neue Primer verwendet wurden, deren Hybridisierungsoptimum noch nicht bekannt war, wurde ein PCR-Programm mit Temperaturgradient verwendet:

1 hot start	94 °C	
2 Denaturierung	94 °C	20 sek
3 Hybridisierung	52-60 °C	20 sek
4 Elongation	72 °C	60 sek pro 1000bp
5	30 Wiederholungen der Schritte 2-4	
6 Elongation	72 °C	5-10 Minuten
7 Stop	8 °C	

Bei der Überprüfung von Klonierungen sind Mutationen in den amplifizierten Sequenzen unkritisch, da hier nur die Länge entscheidend ist. Daher kann hier auf die Vent-Polymerase verzichtet werden. Auch hier wurden Reaktions- und Enzymmix getrennt angemischt und der Enzymmix direkt vor Start der PCR zu den Reaktionsansätzen gegeben.

Ein typischer 20 μ l Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Reaktionsansatz:

H ₂ O	11 μ l
10xPuffer	1,5 μ l (-MgCl ₂)
MgCl ₂ 25mM	1,3 μ l
Primer1	0,4 μ l (10pmol)
Primer2	0,4 μ l (10pmol)
Template	0,2 μ l (~10ng)
dNTP-Mix	0,2 μ l
Gesamt	15 μ l

Enzymmix:

H ₂ O	4,3 μ l
10xPuffer	0,5 μ l (-MgCl ₂)
Taq-Polymerase	0,2 μ l
Gesamt	5 μ l

Im Unterschied zur quantitativen PCR wurde nur eine Temperatur für die Hybridisierung verwendet und die Anzahl der Zyklen auf 20 reduziert, da das Signal der amplifizierten Sequenz dann bereits stark genug war um via Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen werden zu können.

1 hot start	94 °C	
2 Denaturierung	94 °C	20 sek
3 Hybridisierung	55 °C	20 sek
4 Elongation	72 °C	60 sek pro 1000bp
5 20 Wiederholungen der Schritte 2-4		
6 Elongation	72 °C	5-10 Minuten
7 Stop	8 °C	

7.6.6 Plasmidpräparation

7.6.6.1 Mini-Präparation (Nach Birnboin-Dooley)

Eine Impföse *E. coli* wurde in 300µl P1 durch vortexen suspendiert. Nach Zugabe von 300µl P2 wurde die Suspension durch Invertieren durchmischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurden 300µl P3 hinzupipettiert, der Ansatz wieder durch Invertieren homogenisiert und weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nachfolgend wurde der Ansatz bei 4°C für 30 Minuten bei 13000 U/Minuten zentrifugiert und 800µl des Überstandes in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um die DNA zu fällen wurden 560µl Isopropanol (0,7%Vol) zugegeben, der Ansatz durch Vortexen gut gemischt und zwei bis drei (maximal fünf) Minuten auf Eis inkubiert. Die gefällte DNA wurde nun durch 30 minütiges Zentrifugieren bei 13000 U/Minuten pelletiert, mit 300µl 70% Ethanol gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von fünf Minuten bei 13000 U/Minuten für zehn Minuten bei 37°C getrocknet (oder länger, je nach Erfordernis). Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 40µl sterilem destilliertem Wasser oder TE-Puffer aufgenommen. Nach längerer Trockenzeit sollte das Pellet jedoch vor dem Lösen durch leichtes Vortexen oder Pipettieren 5-10 Minuten im Lösungsmittel stehend inkubiert werden.

7.6.6.2 Midi-Präparation (NucleoBond, Clonetech / Becton Dickinson)

Der das gewünschte Plasmid tragende *E. coli* Stamm wurde auf LB-Agar mit geeignetem Antibiotikum dünn ausgestrichen und Über-Nacht bei 37°C inkubiert. Eine isoliert liegende Einzelkolonie wurde in 1ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum gebracht und 6 Std bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschliessend wurden 200µl dieser Vorkultur in 200ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum pipettiert und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert.

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (4500-6000g für 15 Minuten) bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 4ml Puffer S1+RNaseA resuspendiert. Es wurden 4ml Puffer S2 zugegeben, der Ansatz durch Invertieren gemischt und maximal fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4ml Puffer S3 wurde die Suspension wiederum mehrmals invertiert und nach fünfminütiger Inkubation auf Eis mindestens 25 Minuten bei 4°C und mindestens 10000g zentrifugiert.

Die NucleoBond-Säule wurde unterdessen mit 2,5ml Puffer N2 äquilibriert. Der Überstand wurde nun auf die Säule gegeben und der Durchfluß verworfen. Anschliessend wurde mit 10ml Puffer N3 gewaschen und der Durchfluß wieder verworfen. Nun wurde die DNA mit 5ml Puffer N5 aus der Säule eluiert (in ein 50ml PP-Röhrchen) und mit 3,5ml Isopropanol versetzt um die DNA zu fällen. Es folgte eine 60-minütige Zentrifugation bei 4000 U/Minuten bei 4°C in der Heraeus-Zentrifuge um die DNA zu pelletieren. Das Pellet wurde mit 2ml 70% Ethanol gewaschen und durch erneute 10 minütige Zentrifugation im Röhrchen fixiert, sodass der Alkohol gefahrlos mit der Pipette abgenommen werden konnte. Das Pellet wurde getrocknet und in 200-400µl TE-Puffer gelöst. Anschliessend wurde die DNA-Konzentration und -Reinheit photometrisch bestimmt.

7.6.7 Restriktionsanalyse

Um Klonierungsprodukte zu überprüfen wurden die betreffenden Plasmide mit Restriktionsenzymen geschnitten, die entstehenden Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das resultierende Muster analysiert.

Die Kontrollen wurden im 10µl Maßstab durchgeführt:

H ₂ O	auf 10 µl
Enzym	4U (Konzentration der Enzymlösung beachten)
Puffer	1µl (auf Enzym abgestimmt)
DNA	1µl (0,5-1µg)

Nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz mit GEBS-Puffer versehen und auf ein Agarosegel aufgetragen.

8 Zusammenfassung

Eine Infektion durch das ausschließlich human-spezifische Pathogen *Neisseria gonorrhoeae* manifestiert sich bei einer symptomatischen Kolonisierung in der sog. Gonorrhö, einer venerischen Erkrankung, die durch akute Inflammation des befallenen Gewebes und durch die massive Infiltration von Granulozyten charakterisiert ist. Die Gonokokken können im Verlauf einer symptomatischen Infektion über ihre Opa_{CEA}-Adhäsine mit CEACAM Proteinen unterschiedlicher Wirtszellen interagieren.

In der vorliegenden Doktorarbeit sollten anhand verschiedener zellbiologischer, biochemischer und genetischer Methoden die molekularen Vorgänge während der Opa_{CEA}-Gonokokken-Phagozyten-Interaktion untersucht werden. Der Kontakt von Opa_{CEA}-Gonokokken mit primären Granulozyten induziert die Formation von Lamellipodien-ähnlichen Membranausstülpungen und führt zur CEACAM-abhängigen Phagozytose der Opa_{CEA} Gonokokken. Schon in früheren *in vitro* Versuchen konnte die Reorganisation des Zytoskeletts und die Oponin-unabhängige, CEACAM-vermittelte Aufnahme Opa_{CEA}-exprimierender Gonokokken in differenzierte promyelomonzytären Zellen und Granulozyten mit der Stimulation von Kinasen der Src-Familie und der GTPase Rac in Verbindung gebracht werden. Erste *in vitro* Infektionsversuche mit CEACAM-exprimierenden 293 Zellen, in denen pharmakologische oder genetische Inhibitoren gegen Kinasen der Src-Familie eingesetzt wurden, deuteten darauf hin, dass ausschließlich die CEACAM3-vermittelte Internalisierung der Gonokokken die katalytische Aktivität von Kinasen der Src-Familie benötigt. Dies konnte auch in CEACAM3-exprimierenden, Src-Kinase defizienten Maus-Fibroblasten bestätigt werden, da nur c-Src rekonstituierte Zellen Opa_{CEA} Gonokokken internalisieren. Die Adhäsion der Opa_{CEA} Gonokokken an CEACAM3 induziert eine Src-abhängige Tyrosinphosphorylierung der zytoplasmatischen CEACAM3-Domäne und die Kinase selbst kann über ihre SH2-Domäne direkt an das phosphorylierte CEACAM3 binden.

Auch die Stimulation der GTPase Rac verläuft über das CEACAM3 Protein, da die Expression einer dominant negativen Version der Rho GTPase ausschließlich mit der CEACAM3-, aber nicht mit der CEACAM6-abhängigen Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken interferiert. Zudem induziert nur die CEACAM3-vermittelte

Aufnahme die Rekrutierung und GTP-Beladung des endogenen Rac. Eine zentrale Rolle dabei spielt die Integrität der ITAM-ähnlichen Sequenz von CEACAM3. Die Mutation beider Tyrosinreste innerhalb der ITAM-ähnlichen Sequenz oder die komplette Deletion der zytoplasmatischen Domäne inhibieren die CEACAM3-vermittelte Rac-Stimulation und blockieren die Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken. Aber nicht nur Opa_{CEA} Gonokokken interagieren mit CEACAM3, sondern auch die CEACAM-bindenden Adhäsine von *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae* führen zur Rac-Stimulation und damit zur Internalisierung der Pathogene.

Im letzten Teil der Arbeit konnte das molekulare Bindeglied zwischen der CEACAM3-induzierten Signalkaskade und der Stimulation der kleinen GTPase Rac identifiziert werden. Das Vav Protein fungiert dabei als GEF für die kleine GTPase Rac. Eine dominant negative Version von Vav oder eine spezifische Vav-siRNA inhibieren die CEACAM3-vermittelte Aufnahme von Opa_{CEA}-Gonokokken bzw. die GTP-Beladung von Rac. Interessanterweise bindet das Vav Protein über seine SH2 Domäne direkt an CEACAM3 und zwar nach Phosphorylierung durch aktive Src Kinasen an den Tyrosinrest 230 der ITAM-ähnlichen Sequenz.

Die distinkte CEACAM3-induzierte Signalkaskade erlaubt es, die Bedeutung von CEACAM3 für die Phagozytose CEACAM-bindender Pathogene auch in primären Granulozyten zu untersuchen. Interessanterweise inhibiert PP2 die Aufnahme der Gonokokken dosisabhängig, wohingegen die Blockade der CEACAM1- bzw. CEACAM6-vermittelten Internalisierung der Gonokokken durch Nystatin keine Auswirkungen zeigt. Auch die Proteintransduktion der dominant-negativen Version von Vav (TAT-Vav-dn) bzw. Rac (TAT-Rac-dn) in primäre Granulozyten interferierte effektiv mit der Phagozytose der Opa_{CEA} Gonokokken. Dementsprechend verhindert ausschließlich die Blockade der CEACAM3-vermittelten Phagozytose, aber nicht der CEACAM1- bzw. CEACAM6-vermittelten Aufnahme durch monoklonale Antikörper die Internalisierung bzw. die Elimination von CEACAM-bindenden Pathogenen. Diese Arbeiten beschreiben das exklusiv auf Granulozyten exprimierte CEACAM3 Protein als einen neuen gegen CEACAM-bindende Erreger gerichteten phagozytischen Rezeptor der angeborenen Immunantwort.

9 Summary

The exclusively human specific pathogen *Neisseria gonorrhoeae* is the causative agent of gonorrhoea a venereal disease characterized by an acute inflammation of infected area and a massive infiltration of granulocytes. During an acute, symptomatic gonorrhoeae the pathogen is able to interact with CEACAM proteins of different cells by the means of their so called Opa_{CEA}-adhesins.

In this doctoral thesis the pathogen-phagocyte-interaction was to be investigated by cell biology, biochemical and genetical methods. The contact of Opa_{CEA}-expressing gonococci with primary granulocytes induces ruffling of the membrane and lamellipodia-like protrusion finally leading to the CEACAM-dependent phagocytosis of the pathogenic bacteria. Earlier infection-studies with pro-myelomonocytic cells were able to show that the phenotypic cytoskeleton rearrangement and the internalisation of gonococci was dependent on the stimulation of Src-family kinases and the small GTPase Rac.

Initial *in vitro* infection studies with transiently transfected human epithelial 293 cells showed that exclusively CEACAM3-mediated internalisation of Opa_{CEA}-expressing gonococci depends on the catalytic activity of Src-family kinases. This was further corroborated by infecting CEACAM3-expressing, genetic manipulated S⁻/Y⁻/F⁻-deficient mouse fibroblasts with gonococci, as only cells reconstituted with c-Src were able to internalise Opa_{CEA}-expressing gonococci. Bacterial ligation of CEACAM3 leads to Src-family kinase dependent tyrosin phosphorylation within the cytoplasmic-tail of CEACAM3 and on the molecular level the kinase itself is able to directly interact with phosphorylated CEACAM3 via its SH2-domain.

Accordingly, stimulation of the small GTPase Rac is connected to bacterial CEACAM3 ligation, as expression of a dominant negative Rac constructs only interferes with CEACAM3, but not with CEACAM6 mediated internalisation of gonococci. In addition recruitment of Rac to adhering bacteria and Rac stimulation is dependent on CEACAM3 mediated uptake and expression of the Opa_{CEA}-adhesins. A critical part of CEACAM3 mediated signal transduction turned out to be its ITAM like sequence. Either mutation of both tyrosine residues or deletion of the whole cytoplasmic tail inhibited CEACAM3-mediated Rac stimulation and accordingly internalisation of Opa_{CEA}-expressing gonococci. However CEACAM3-mediated internalisation is not restricted to gonococci as CEACAM-binding *Moraxella*

catarrhalis and *Haemophilus influenzae* also stimulate Rac-GTP-loading while taken up via CEACAM3.

In the last part of the doctoral thesis I was able to identify the molecular link between Rac stimulation and bacterial CEACAM3 engagement. Vav serves as a specific GEF towards the stimulation of the small GTPase Rac, as a dominant negative version of Vav or a specific Vav-siRNA blocks CEACAM3-mediated uptake of Opa_{CEA}-expressing gonococci and GTP-loading of Rac respectively. Vav directly binds to CEACAM3 via its SH2 domain leading to a CEACAM3-Vav protein complex after phosphorylation of tyrosine residue 230 of CEACAM3 by stimulated Src-family kinases.

The uniqueness of CEACAM3-initiated signal transduction provided a method to identify its relevance during phagocytosis of CEACAM binding bacteria in primary human granulocytes. Especially the pharmacological inhibitor PP2 interferes in a concentration dependent manner with the uptake of gonococci in granulocytes while Nystatin which inhibits CEACAM1 and CEACAM6 dependent internalisation *in vitro* has no effect on bacterial uptake in human granulocytes. Accordingly, interference of CEACAM3 mediated stimulation of Vav (TAT-Vav-dn) or Rac (Tat-Rac-dn) inhibited uptake of Opa_{CEA}-gonococci into primary cells. In addition a CEACAM3-specific but not a CEACAM1 or CEACAM6 specific monoclonal antibody inhibited internalisation and elimination of CEACAM-binding bacteria.

Therefore, the results presented in this doctoral thesis describe CEACAM3 which is exclusively expressed on human granulocytes as a novel single-chain phagocytic receptor of the innate immune system

10 Literaturverzeichnis

- Abrami, L. and F. G. van Der Goot (1999). "Plasma membrane microdomains act as concentration platforms to facilitate intoxication by aerolysin." J Cell Biol **147**(1): 175-84.
- Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu Rev Immunol **17**: 593-623.
- Aebi, C., I. Maciver, et al. (1997). "A protective epitope of *Moraxella catarrhalis* is encoded by two different genes." Infect Immun **65**(11): 4367-77.
- Agerer, F., S. Waeckerle, et al. (2004). "Microscopic quantification of bacterial invasion by a novel antibody-independent staining method." Journal of Microbiological Methods **59**(1): 23-32.
- Aghazadeh, B., W. E. Lowry, et al. (2000). "Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation." Cell **102**: 625-633.
- Albert, M. L., J. I. Kim, et al. (2000). "alpha5beta1 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells." Nat Cell Biol **2**(12): 899-905.
- Apicella, M. A., M. Ketterer, et al. (1996). "The pathogenesis of gonococcal urethritis in men: confocal and immunoelectron microscopic analysis of urethral exsudates from men infected with *Neisseria gonorrhoeae*." Journal of Infectious Diseases **173**: 636-646.
- Arudchandran, R., M. J. Brown, et al. (2000). "The Src homology 2 domain of Vav is required for its compartmentation to the plasma membrane and activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase 1." J Exp Med **191**(1): 47-60.
- Attia, A. S., E. R. Lafontaine, et al. (2005). "The UspA2 protein of *Moraxella catarrhalis* is directly involved in the expression of serum resistance." Infect Immun **73**(4): 2400-10.
- Balligand, G., Y. Laroche, et al. (1985). "Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination." Infect Immun **48**(3): 782-6.
- Beachey, E. H. (1981). "Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface." J Infect Dis **143**(3): 325-45.

- Beauchemin, N., T. Kunath, et al. (1997). "Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells." Oncogene **14**: 783-790.
- Belland, R. J., T. Chen, et al. (1992). "Human neutrophil response to recombinant neisserial Opa proteins." Molecular Microbiology **6 (13)**: 1729-1737.
- Benard, V., B. P. Bohl, et al. (1999). "Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant- stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases." Journal of Biological Chemistry **274(19)**: 13198-204.
- Benchimol, S., A. Fuks, et al. (1989). "Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule." Cell **57**: 327-334.
- Bhat, K. S., C. P. Gibbs, et al. (1991). "The opacity proteins of *Neisseria gonorrhoeae* strain MS11 are encoded by a family of 11 complete genes [published erratum appears in Molecular Microbiology 1992 Apr;6(8):1073-6]." Molecular Microbiology **5**: 1889-1901.
- Bibbins, K. B., H. Boeuf, et al. (1993). "Binding of the Src SH2 domain to phosphopeptides is determined by residues in both the SH2 domain and the phosphopeptides." Mol Cell Biol **13(12)**: 7278-87.
- Billadeau, D. D., S. M. Mackie, et al. (2000). "The Rho family guanine nucleotide exchange factor Vav-2 regulates the development of cell-mediated cytotoxicity." J Exp Med **192(3)**: 381-92.
- Billker, O., A. Popp, et al. (2002). "Distinct mechanisms of internalization of *Neisseria gonorrhoeae* by members of the CEACAM receptor family involving Rac1- and Cdc42- dependent and -independent pathways." The EMBO Journal **21(4)**: 560-71.
- Billker, O., A. Popp, et al. (2000). "The structural basis of CEACAM-receptor targeting by neisserial Opa proteins." Trends Microbiol **8(6)**: 258-60.
- Black, D. S. and J. B. Bliska (1997). "Identification of p130Cas as a substrate of Yersinia YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions." The EMBO Journal **16**: 2730-2744.
- Blake, M. S. and L. M. Wetzler (1995). "Vaccines for gonorrhoeae: where are we on the curve?" Trends in Microbiology **3 (12)**: 469-474.
- Boackle, R. (1993). "The complement system." Immunol Ser **58**: 135-59.

- Booth, J. W., D. Telio, et al. (2003). "Phosphatidylinositol 3-kinases in carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule-mediated internalization of *Neisseria gonorrhoeae*." J Biol Chem **278**(16): 14037-45.
- Borggreffe, T., L. Masat, et al. (1999). "Cellular, intracellular, and developmental expression patterns of murine SWAP-70." Eur J Immunol **29**(6): 1812-22.
- Borggreffe, T., M. Wabl, et al. (1998). "A B-cell-specific DNA recombination complex." J Biol Chem **273**(27): 17025-35.
- Boros, P., J. A. Odin, et al. (1991). "IgM anti-Fc gamma R autoantibodies trigger neutrophil degranulation." J Exp Med **173**(6): 1473-82.
- Bos, M. P., F. Grunert, et al. (1997). "Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Opa variants of *Neisseria gonorrhoeae*." Infection & Immunity **65**: 2353-2361.
- Bos, M. P., M. Kuroki, et al. (1998). "CD66 receptor specificity exhibited by neisserial Opa variants is controlled by protein determinants in CD66 N-domains." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(16): 9584-9.
- Boslego, J. W., E. C. Tramont, et al. (1991). "Efficacy trial of a parenteral gonococcal pilus vaccine in men." Vaccine **9**(3): 154-62.
- Boulton, I. C. and S. D. Gray-Owen (2002). "Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes." Nature Immunology **3**(3): 229-36.
- Brandtzaeg, P. (1997). "Mucosal immunity in the female genital tract." J Reprod Immunol **36**(1-2): 23-50.
- Brown, D. A. and E. London (1998). "Functions of lipid rafts in biological membranes." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 111-36.
- Brugnera, E., L. Haney, et al. (2002). "Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180 ELMO complex." Nature Cell Biology **4**(8): 574-82.
- Brummer, J., M. Neumaier, et al. (1995). "Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas." Oncogene **11**: 1649-1655.
- Buchwald, G., A. Friebel, et al. (2002). "Structural basis for the reversible activation of a Rho protein by the bacterial toxin SopE." Embo J **21**(13): 3286-95.
- Bustelo, X. R. (2000). "Regulatory and signaling properties of the Vav family." Molecular and Cellular Biology **20**(5): 1461-77.

- Bustelo, X. R. (2001). "Vav proteins, adaptors and cell signaling." Oncogene **20**(44): 6372-81.
- Cambier, J. C. (1995). "Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)." J Immunol **155**(7): 3281-5.
- Carey, D. J. (1997). "Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors." Biochem J **327** (Pt 1): 1-16.
- Caron, E. and A. Hall (1998). "Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases." Science **282**(5394): 1717-21.
- Casey, P. J. (1995). "Protein lipidation in cell signaling." Science **268**(5208): 221-5.
- Casey, S. G., D. R. Veale, et al. (1979). "Demonstration of intracellular growth of gonococci in human phagocytes using spectinomycin to kill extracellular organisms." Journal of General Microbiology **113**: 395-398.
- Catlin, B. W. (1990). "Branhamella catarrhalis: an organism gaining respect as a pathogen." Clin Microbiol Rev **3**(4): 293-320.
- Chen, R., O. Kim, et al. (2001). "Regulation of the PH-domain-containing tyrosine kinase Etk by focal adhesion kinase through the FERM domain." Nature Cell Biology **3**(5): 439-44.
- Chen, T., R. J. Belland, et al. (1995). "Adherence of pilus- Opa+ gonococci to epithelial cells in vitro involves heparan sulfate." Journal of Experimental Medicine **182**: 511-517.
- Chen, T., S. Bolland, et al. (2001). "The CGM1a (CEACAM3/CD66d)-mediated phagocytic pathway of *Neisseria gonorrhoeae* expressing opacity proteins is also the pathway to cell death." Journal of Biological Chemistry **276**(20): 17413-9.
- Chen, T. and E. C. Gotschlich (1996). "CGM1a antigen of neutrophils, a receptor of gonococcal opacity proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**: 14851-14856.
- Chen, T., W. Zimmermann, et al. (2001). "Biliary glycoprotein (BGP_a, CD66_a, CEACAM1) mediates inhibitory signals." Journal of Leukocyte Biology **70**(2): 335-40.
- Cherfils, J. and P. Chardin (1999). "GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins." Trends Biochem Sci **24**(8): 306-11.

- Chimini, G. and P. Chavrier (2000). "Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment." Nat Cell Biol **2**(10): E191-6.
- Cohen, M. S. and J. G. Cannon (1999). "Human experimentation with *Neisseria gonorrhoeae*: progress and goals." J Infect Dis **179 Suppl 2**: S375-9.
- Cooper, J. A. and C. S. King (1986). "Dephosphorylation or antibody binding to the carboxy terminus stimulates pp60c-src." Mol Cell Biol **6**(12): 4467-77.
- Cooper, M. D. and S. A. Floyd (1982). "In vitro kinetics of phagocytosis and intracellular killing of gonococci by peritoneal macrophages from mice deficient in complement component 5." Infection & Immunity **36**: 363-370.
- Cooper, M. D., Z. A. McGee, et al. (1984). "Attachment to and invasion of human fallopian tube mucosa by an IgA1 protease-deficient mutant of *Neisseria gonorrhoeae* and its wild-type parent." Journal of Infectious Diseases **150**: 737-744.
- Costello, P. S., A. E. Walters, et al. (1999). "The Rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF-kappaB pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 3035-40.
- Cox, D., P. Chang, et al. (1997). "Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes." J Exp Med **186**(9): 1487-94.
- Crespo, P., X. R. Bustelo, et al. (1996). "Rac-1 dependent stimulation of the JNK/SAPK signaling pathway by Vav." Oncogene **13**(3): 455-60.
- Crespo, P., K. E. Schuebel, et al. (1997). "Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the *vav* proto-oncogene product." Nature **385**: 169-172.
- Daeron, M. (1997). "Structural bases of Fc gamma R functions." Int Rev Immunol **16**(1-2): 1-27.
- Daoud, A., F. Abuekteish, et al. (1996). "Neonatal meningitis due to *Moraxella catarrhalis* and review of the literature." Ann Trop Paediatr **16**(3): 199-201.
- Darby, C., R. L. Geahlen, et al. (1994). "Stimulation of macrophage Fc gamma RIIIA activates the receptor-associated protein tyrosine kinase Syk and induces phosphorylation of multiple proteins including p95Vav and p62/GAP-associated protein." J Immunol **152**(11): 5429-37.

- Das, B., X. Shu, et al. (2000). "Control of intramolecular interactions between the pleckstrin homology and Dbl homology domains of Vav and Sos1 regulates Rac binding." J Biol Chem **275**(20): 15074-81.
- Daub, H., K. Gevaert, et al. (2001). "Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16." J Biol Chem **276**(3): 1677-80.
- Davis, W., P. T. Harrison, et al. (1995). "Two distinct regions of FcγRI initiate separate signalling pathways involved in endocytosis and phagocytosis." The EMBO Journal **14**: 432-441.
- de Vries, F. P., R. Cole, et al. (1998). "*Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors." Molecular Microbiology **27**(6): 1203-12.
- Deckert, M., S. Tartare-Deckert, et al. (1996). "Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product." Immunity **5**(6): 591-604.
- Dehio, C., S. D. Gray-Owen, et al. (1998). "The role of neisserial Opa proteins in interactions with host cells." Trends Microbiol **6**(12): 489-95.
- Dehio, M., O. G. Gomez-Duarte, et al. (1998). "Vitronectin-dependent invasion of epithelial cells by *Neisseria gonorrhoeae* involves alpha(v) integrin receptors." FEBS Letters **424**(1-2): 84-8.
- Denny, F. W. (1974). "Effect of a toxin produced by *Haemophilus influenzae* on ciliated respiratory epithelium." J Infect Dis **129**(2): 93-100.
- Densen, P. and G. L. Mandell (1978). "Gonococcal interactions with polymorphonuclear neutrophils - importance of the phagosome for bactericidal activity." Journal of Clinical Investigation **62**: 1161-1171.
- Dharmasathaphorn, K. and J. L. Madara (1990). "Established intestinal cell lines as model systems for electrolyte transport studies." Methods Enzymol **192**: 354-89.
- Dinauer, M. C. (2003). "Regulation of neutrophil function by Rac GTPases." Curr Opin Hematol **10**(1): 8-15.
- Doody, G. M., D. D. Billadeau, et al. (2000). "Vav-2 controls NFAT-dependent transcription in B- but not T-lymphocytes." Embo J **19**(22): 6173-84.

- Downey, G. P., R. J. Botelho, et al. (1999). "Phagosomal maturation, acidification, and inhibition of bacterial growth in nonphagocytic cells transfected with FcγRIIA receptors." Journal of Biological Chemistry **274**(40): 28436-44.
- Drutz, D. J. (1978). Intracellular fate of *Neisseria gonorrhoeae*. Immunobiology of *Neisseria gonorrhoeae*. G. F. Brooks, E. C. Gotschlich, K. K. Holmes, W. D. Sawyer and F. E. Young. Washington, DC, American Society for Microbiology: 232-235.
- Duguid, J. P. (1959). "Fimbriae and adhesive properties in Klebsiella strains." J Gen Microbiol **21**: 271-86.
- Duxbury, M. S., H. Ito, et al. (2004). "CEACAM6 gene silencing impairs anoikis resistance and in vivo metastatic ability of pancreatic adenocarcinoma cells." Oncogene **23**(2): 465-73.
- Eden, C. S., L. A. Hanson, et al. (1976). "Variable adherence to normal human urinary-tract epithelial cells of Escherichia coli strains associated with various forms of urinary-tract infection." Lancet **1**(7984): 490-2.
- Elkins, C. and R. F. Rest (1990). "Monoclonal antibodies to outer membrane protein PII block interactions of *Neisseria gonorrhoeae* with human neutrophils." Infection & Immunity **58** (4): 1078-1084.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-35.
- Evans, B. A. (1977). "Ultrastructural study of cervical gonorrhoea." J Infect Dis **136**(2): 248-55.
- Falkow, S. (1991). "Bacterial entry into eukaryotic cells." Cell **65**(7): 1099-102.
- Fallman, M., K. Andersson, et al. (1995). "*Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells." Infection & Immunity **63**: 3117-3124.
- Farrell, C. F. and R. F. Rest (1990). "Up-regulation of human neutrophil receptors for *Neisseria gonorrhoeae* expressing PII outer membrane proteins." Infection & Immunity **58** (9): 2777-2784.
- Feuk-Lagerstedt, E., E. T. Jordan, et al. (1999). "Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils." J Immunol **163**(10): 5592-8.
- Finlay, B. B. and P. Cossart (1997). "Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens." Science **276**: 718-725.

- Finlay, B. B. and S. Falkow (1997). "Common themes in microbial pathogenicity revisited." Microbiology and Molecular Biology Reviews **61**: 136-169.
- Fischer, K. D., Y. Y. Kong, et al. (1998). "Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor." Curr Biol **8**(10): 554-62.
- Fischer, K. D., A. Zmuldzinas, et al. (1995). "Defective T-cell receptor signalling and positive selection of Vav-deficient CD4+ CD8+ thymocytes." Nature **374**(6521): 474-7.
- Fischer, S. H. and R. F. Rest (1988). "Gonococci possessing only certain P.II outer membrane proteins interact with human neutrophils." Infection & Immunity **56** (6): 1574-1579.
- Fleming, I. N., A. Gray, et al. (2000). "Regulation of the Rac1-specific exchange factor Tiam1 involves both phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent components." Biochem J **351**(Pt 1): 173-82.
- Foxwell, A. R., J. M. Kyd, et al. (1998). "Nontypeable Haemophilus influenzae: pathogenesis and prevention." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 294-308.
- Frangipane, J. V. and R. F. Rest (1992). "Anaerobic growth of gonococci does not alter their Opa-mediated interactions with human neutrophils." Infect Immun **60**(5): 1793-9.
- Frankel, A. D. and C. O. Pabo (1988). "Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus." Cell **55**(6): 1189-93.
- Freissler, E., A. Meyer auf der Heyde, et al. (2000). "Syndecan-1 and syndecan-4 can mediate the invasion of OpaHSPG- expressing *Neisseria gonorrhoeae* into epithelial cells." Cell Microbiol **2**(1): 69-82.
- Fu, Y. and J. E. Galan (1999). "A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion." Nature **401**(6750): 293-7.
- Futterer, K., J. Wong, et al. (1998). "Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide." J Mol Biol **281**(3): 523-37.
- Gaillard, J. L., P. Berche, et al. (1991). "Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci." Cell **65**(7): 1127-41.

- Gatfield, J. and J. Pieters (2000). "Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages." Science **288**(5471): 1647-50.
- Gibbs, C. P., B.-Y. Reimann, et al. (1989). "Reassortment of pilin genes in *Neisseria gonorrhoeae* occurs by two distinct mechanisms." Nature **338**: 651-652.
- Gomez-Duarte, O. G., M. Dehio, et al. (1997). "Binding of vitronectin to Opa-expressing *Neisseria gonorrhoeae* mediates invasion of HeLa cells." Infection & Immunity **65**: 3857-3866.
- Graham, R. A., S. Wang, et al. (1998). "Postsurgical surveillance of colon cancer: preliminary cost analysis of physician examination, carcinoembryonic antigen testing, chest x-ray, and colonoscopy." Ann Surg **228**(1): 59-63.
- Grassmé, H., E. Gulbins, et al. (1997). "Acidic sphingomyelinase mediates entry of *Neisseria gonorrhoeae* into non-phagocytic cells." Cell **91**: 605-15.
- Grassme, H. U. C., R. M. Ireland, et al. (1996). "Gonococcal opacity protein promotes bacterial entry-associated rearrangements of the epithelial cell actin cytoskeleton." Infection & Immunity **64**: 1621-1630.
- Gray-Owen, S. D., C. Dehio, et al. (1997). "*Neisseria gonorrhoeae* opa-dependent interactions with CD66 carcinoembryonic antigen receptors influences tissue response and triggers the stimulation of a src-family tyrosine kinase and Rac1-dependent signalling pathway." Presented at Microbial Pathogenesis and Host Response Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Gray-Owen, S. D., C. Dehio, et al. (1997). "CD66 carcinoembryonic antigens mediate interactions between Opa-expressing *Neisseria gonorrhoeae* and human polymorphonuclear phagocytes." The EMBO Journal **16**: 3435-3445.
- Gray-Owen, S. D., D. R. Lorenzen, et al. (1997). "Differential Opa specificities for CD66 receptors influence tissue interactions and cellular response to *Neisseria gonorrhoeae*." Molecular Microbiology **26**: 971-980.
- Green, M. and P. M. Loewenstein (1988). "Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein." Cell **55**(6): 1179-88.
- Greenberg, S., P. Chang, et al. (1996). "Clustered syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**: 1103-1107.
- Greicius, G., E. Severinson, et al. (2003). "CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation." J Leukoc Biol **74**(1): 126-34.

- Gruenheid, S. and B. B. Finlay (2003). "Microbial pathogenesis and cytoskeletal function." Nature **422**(6933): 775-81.
- Haas, R. and T. F. Meyer (1986). "The repertoire of silent pilus genes in *Neisseria gonorrhoeae*: evidence for gene conversion." Cell **44**: 107-115.
- Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." Science **279**: 509-514.
- Hamid, N., A. Gustavsson, et al. (1999). "YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages." Microb Pathog **27**(4): 231-42.
- Hammarstrom, S. and V. Baranov (2001). "Is there a role for CEA in innate immunity in the colon?" Trends Microbiol **9**(3): 119-25.
- Han, J., B. Das, et al. (1997). "Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases." Mol Cell Biol **17**(3): 1346-53.
- Handsfield, H. H. (1990). *Neisseria gonorrhoeae*. Principles and practice of infectious diseases. G. L. Mandell, R. G. Douglas and J. E. Bennett. New York, Churchill Livingstone: 1613-1631.
- Harada, T., T. Morooka, et al. (2001). "ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1." Nat Cell Biol **3**(5): 453-9.
- Hart, M. J., A. Eva, et al. (1991). "Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the db1 oncogene product." Nature **354**(6351): 311-4.
- Harvey, H. A., M. R. Ketterer, et al. (1997). "Ultrastructural analysis of primary human urethral epithelial cell cultures infected with *Neisseria gonorrhoeae*." Infect Immun **65**(6): 2420-7.
- Hasegawa, H., E. Kiyokawa, et al. (1996). "DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane." Mol Cell Biol **16**(4): 1770-6.
- Hauck, C. R., H. Grassme, et al. (2000). "Acid sphingomyelinase is involved in CEACAM receptor-mediated phagocytosis of *N. gonorrhoeae*." FEBS Letters **478**: 260-266.
- Hauck, C. R., E. Gulbins, et al. (1999). "The tyrosine phosphatase SHP-1 is involved in the opsonin-independent phagocytosis of Opa52-expressing *Neisseria gonorrhoeae*." Infection & Immunity **67**: 5490-5494.
- Hauck, C. R., D. Lorenzen, et al. (1997). "An *in vitro*-differentiated human cell line as a model system to study the interaction of *Neisseria gonorrhoeae* with phagocytic cells." Infection & Immunity **65**: 1863-1869.

- Hauck, C. R. and T. F. Meyer (1997). "The lysosomal/phagosomal membrane protein h-lamp-1 is a target of the IgA1 protease of *Neisseria gonorrhoeae*." FEBS Letters **405**: 86-90.
- Hauck, C. R. and T. F. Meyer (2003). "'Small' talk: Opa proteins as mediators of *Neisseria*-host-cell communication." Curr Opin Microbiol **6**(1): 43-9.
- Hauck, C. R. and T. F. Meyer (2003). "'Small'talk: Opa proteins as mediators of *Neisseria*-host cell communication." Current Opinion in Microbiology **6**: 43-49.
- Hauck, C. R., T. F. Meyer, et al. (1998). "CD66-mediated phagocytosis of Opa₅₂ *Neisseria gonorrhoeae* requires a Src-like tyrosine kinase- and Rac1-dependent signalling pathway." The EMBO Journal **17**: 443-454.
- Heckels, J. E. (1981). "Structural comparison of *Neisseria gonorrhoeae* outer membrane proteins." J Bacteriol **145**(2): 736-42.
- Hedges, S. R., M. S. Mayo, et al. (1999). "Limited local and systemic antibody responses to *Neisseria gonorrhoeae* during uncomplicated genital infections." Infect Immun **67**(8): 3937-46.
- Hedges, S. R., D. A. Sibley, et al. (1998). "Cytokine and antibody responses in women infected with *Neisseria gonorrhoeae*: effects of concomitant infections." J Infect Dis **178**(3): 742-51.
- Hefta, L. J., H. Schrewe, et al. (1990). "Expression of complementary DNA and genomic clones for carcinoembryonic antigen and nonspecific cross-reacting antigen in Chinese hamster ovary and mouse fibroblast cells and characterization of the membrane-expressed products." Cancer Res **50**(8): 2397-403.
- Henderson, I. R., P. Owen, et al. (1999). "Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation." Mol Microbiol **33**(5): 919-32.
- Henkart, P. A. (1994). "Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules." Immunity **1**(5): 343-6.
- Hill, D. J., M. A. Toleman, et al. (2001). "The variable P5 proteins of typeable and non-typeable *Haemophilus influenzae* target human CEACAM1." Molecular Microbiology **39**(4): 850-62.
- Hill, D. J. and M. Virji (2003). "A novel cell-binding mechanism of *Moraxella catarrhalis* ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1." Mol Microbiol **48**(1): 117-29.

- Hoiczky, E., A. Roggenkamp, et al. (2000). "Structure and sequence analysis of Yersinia YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins." Embo J **19**(22): 5989-99.
- Hopper, S., B. Vasquez, et al. (2000). "Effects of the Immunoglobulin A1 Protease on Neisseria gonorrhoeae Trafficking across Polarized T84 Epithelial Monolayers." Infect. Immun. **68**(2): 906-911.
- Hornef, M. W., M. J. Wick, et al. (2002). "Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses." Nat Immunol **3**(11): 1033-40.
- Hornstein, I., A. Alcover, et al. (2004). "Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization." Cell Signal **16**(1): 1-11.
- Huber, M., L. Izzi, et al. (1999). "The carboxyl-terminal region of biliary glycoprotein controls its tyrosine phosphorylation and association with protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 in epithelial cells [In Process Citation]." Journal of Biological Chemistry **274**(1): 335-44.
- Indik, Z. K., J. G. Park, et al. (1995). "Induction of phagocytosis by a protein tyrosine kinase." Blood **85**(5): 1175-80.
- Ireton, K. and P. Cossart (1997). "Host-pathogen interactions during entry and actin-based movement of Listeria monocytogenes." Annu Rev Genet **31**: 113-38.
- Isakov, N. (1997). "Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades." J Leukoc Biol **61**(1): 6-16.
- Isberg, R. R., D. L. Voorhis, et al. (1987). "Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells." Cell **50**: 769-778.
- James, J. F. and J. Swanson (1978). "Studies on gonococcus infection. XIII. Occurrence of color/opacity colonial variants in clinical cultures." Infect Immun **19**(1): 332-40.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). "The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self." Immunol Today **13**(1): 11-6.
- Jerse, A. E. (1999). "Experimental gonococcal genital tract infection and opacity protein expression in estradiol-treated mice." Infect Immun **67**(11): 5699-708.
- Jerse, A. E., M. S. Cohen, et al. (1994). "Multiple gonococcal opacity proteins are expressed during experimental urethral infection in the male." Journal of Experimental Medicine **179**: 911-920.

- Johannsen, D. B., D. M. Johnston, et al. (1999). "A Neisseria gonorrhoeae immunoglobulin A1 protease mutant is infectious in the human challenge model of urethral infection." Infect Immun **67**(6): 3009-13.
- Johnson, A. P. and T. J. Inzana (1986). "Loss of ciliary activity in organ cultures of rat trachea treated with lipo-oligosaccharide from Haemophilus influenzae." J Med Microbiol **22**(3): 265-8.
- Johnson, S. C., R. C. Chung, et al. (1991). "Human immunization with Pgh 3-2 gonococcal pilus results in cross-reactive antibody to the cyanogen bromide fragment-2 of pilin." J Infect Dis **163**(1): 128-34.
- Jonsson, A. B., G. Nyberg, et al. (1991). "Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in pilC, a novel gene for pilus assembly." Embo J **10**(2): 477-88.
- Julius, M., C. R. Maroun, et al. (1993). "Distinct roles for CD4 and CD8 as co-receptors in antigen receptor signalling." Immunol Today **14**(4): 177-83.
- Kaibuchi, K., S. Kuroda, et al. (1999). "Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells." Annu Rev Biochem **68**: 459-86.
- Kallstrom, H., M. K. Liszewski, et al. (1997). "Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic Neisseria." Molecular Microbiology **25**(4): 639-47.
- Karalus, R. and A. Campagnari (2000). "Moraxella catarrhalis: a review of an important human mucosal pathogen." Microbes Infect **2**(5): 547-59.
- Kilian, M., J. Reinholdt, et al. (1996). "Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence." APMIS **104**: 321-338.
- King, G., J. F. James, et al. (1978). "Studies on gonococcus infection. XI. Comparison of in vivo and vitro association of Neisseria gonorrhoeae with human neutrophils." J Infect Dis **137**(1): 38-43.
- King, G. J. and J. Swanson (1978). "Studies on gonococcus infection. XV. Identification of surface proteins of Neisseria gonorrhoeae correlated with leukocyte association." Infect Immun **21**(2): 575-84.
- Klebanoff, S. J. (1992). Microbicidal mechanisms, oxygen-dependent. Encyclopedia of Immunology, Vol. III. I. M. Roitt and P. J. Delves. London, Academic Press: 1064-1068.

- Klinghoffer, R. A., C. Sachsenmaier, et al. (1999). "Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction." The EMBO Journal **18**(9): 2459-2471.
- Klingman, K. L. and T. F. Murphy (1994). "Purification and characterization of a high-molecular-weight outer membrane protein of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*." Infect Immun **62**(4): 1150-5.
- Kmieciak, T. E. and D. Shalloway (1987). "Activation and suppression of pp60c-src transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation." Cell **49**(1): 65-73.
- Knepper, B., I. Heuer, et al. (1997). "Differential response of human monocytes to *Neisseria gonorrhoeae* variants expressing pilus and opacity protein." Infection & Immunity **65**: 4122-4129.
- Koomey, M., E. C. Gotschlich, et al. (1987). "Effects of *recA* mutations on pilus antigenic variation and phase transitions in *Neisseria gonorrhoeae*." Genetics **117**(3): 391-8.
- Koretzky, G. A. and P. S. Myung (2001). "Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins." Nat Rev Immunol **1**(2): 95-107.
- Kuijpers, T. W., M. Hoogerwerf, et al. (1992). "CD66 nonspecific cross-reacting antigens are involved in neutrophil adherence to cytokine-activated endothelial cells." Journal of Cell Biology **118**(2): 457-66.
- Kupsch, E.-M., B. Knepper, et al. (1993). "Variable opacity (Opa) outer membrane proteins account for the cell tropisms displayed by *Neisseria gonorrhoeae* for human leukocytes and epithelial cells." The EMBO Journal **12**(2): 641-650.
- Kupsch, E. M., B. Knepper, et al. (1993). "Variable opacity (Opa) outer membrane proteins account for the cell tropisms displayed by *Neisseria gonorrhoeae* for human leukocytes and epithelial cells." The EMBO Journal **12**: 641-650.
- Lafont, F., L. Abrami, et al. (2004). "Bacterial subversion of lipid rafts." Curr Opin Microbiol **7**(1): 4-10.
- Lafontaine, E. R., L. D. Cope, et al. (2000). "The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells in vitro." J Bacteriol **182**(5): 1364-73.
- Lambden, P. R., J. E. Heckels, et al. (1979). "Variations in surface protein composition associated with virulence properties in opacity types of *Neisseria gonorrhoeae*." Journal of General Microbiology **114**: 305-312.

- Lanzavecchia, A. (1987). "Antigen uptake and accumulation in antigen-specific B cells." Immunol Rev **99**: 39-51.
- Lauer, S., J. VanWye, et al. (2000). "Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection." Embo J **19**(14): 3556-64.
- Lehrer, R. I. (1992). Microbicidal mechanisms, oxygen-independent. Encyclopedia of Immunology, Vol. III. I. M. Roitt and P. J. Delves. London, Academic Press: 1068-1072.
- Lemmon, M. A., K. M. Ferguson, et al. (2002). "Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton." FEBS Lett **513**(1): 71-6.
- Lin, L., P. Ayala, et al. (1997). "The Neisseria type 2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells." Molecular Microbiology **24**: 1083-1094.
- Loos, M., H. Martin, et al. (1989). "The biosynthesis of C1q, the collagen-like and Fc-recognizing molecule of the complement system." Behring Inst Mitt(84): 32-41.
- Lopez-Lago, M., H. Lee, et al. (2000). "Tyrosine phosphorylation mediates both activation and downmodulation of the biological activity of Vav." Mol Cell Biol **20**(5): 1678-91.
- Luo, L. (2000). "Rho GTPases in neuronal morphogenesis." Nat Rev Neurosci **1**(3): 173-80.
- Makela, P. H. (1988). "Unencapsulated Haemophilus influenzae--what kind of pathogen?" Eur J Clin Microbiol Infect Dis **7**(5): 606-9.
- Makino, S., J. P. M. van Putten, et al. (1991). "Phase variation of the opacity outer membrane protein controls invasion by *Neisseria gonorrhoeae* into human epithelial cells." The EMBO Journal **10**(6): 1307-1315.
- Malorny, B., G. Morelli, et al. (1998). "Sequence diversity, predicted two-dimensional protein structure, and epitope mapping of neisserial Opa proteins." J Bacteriol **180**(5): 1323-30.
- Mandel, M. A. (1976). "Immune "save" of lethally irradiated mice with use of allogeneic spleen cells." Surg Forum **27**(62): 574-6.
- Manes, S., G. del Real, et al. (2003). "Pathogens: raft hijackers." Nat Rev Immunol **3**(7): 557-68.
- Masat, L., J. Caldwell, et al. (2000). "Association of SWAP-70 with the B cell antigen receptor complex." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(5): 2180-4.

- Massol, P., P. Montcourrier, et al. (1998). "Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1." Embo J **17**(21): 6219-29.
- McCaw, S. E., E. H. Liao, et al. (2004). "Engulfment of *Neisseria gonorrhoeae*: revealing distinct processes of bacterial entry by individual carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule family receptors." Infect Immun **72**(5): 2742-52.
- McCaw, S. E., J. Schneider, et al. (2003). "Immunoreceptor tyrosine-based activation motif phosphorylation during engulfment of *Neisseria gonorrhoeae* by the neutrophil-restricted CEACAM3 (CD66d) receptor." Mol Microbiol **49**(3): 623-37.
- McGee, Z. A., R. L. Jensen, et al. (1999). "Gonococcal infection of human fallopian tube mucosa in organ culture: relationship of mucosal tissue TNF-alpha concentration to sloughing of ciliated cells." Sex Transm Dis **26**(3): 160-5.
- McGee, Z. A., D. S. Stephens, et al. (1983). "Mechanisms of mucosal invasion by pathogenic *Neisseria*." Rev Infect Dis **5 Suppl 4**: S708-14.
- McMichael, J. C., M. J. Fiske, et al. (1998). "Isolation and characterization of two proteins from *Moraxella catarrhalis* that bear a common epitope." Infect Immun **66**(9): 4374-81.
- McNeish, A. S., P. Turner, et al. (1975). "Mucosal adherence of human enteropathogenic *Escherichia coli*." Lancet **2**(7942): 946-8.
- Meller, N., M. Irani-Tehrani, et al. (2002). "Zizimin1, a novel Cdc42 activator, reveals a new GEF domain for Rho proteins." Nat Cell Biol **4**(9): 639-47.
- Mengaud, J., H. Ohayon, et al. (1996). "E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells." Cell **84**: 923-932.
- Merz, A. J. and M. So (1997). "Attachment of piliated, Opa- and Opc- gonococci and meningococci to epithelial cells elicits cortical actin rearrangements and clustering of tyrosine-phosphorylated proteins." Infect Immun **65**: 4341-4349.
- Merz, A. J., M. So, et al. (2000). "Pilus retraction powers bacterial twitching motility." Nature **407**(6800): 98-102.
- Meyer, T. F. (1990). "Pathogenic neisseriae--a model of bacterial virulence and genetic flexibility." Int J Med Microbiol **274**: 135-154.

- Meyer, T. F., E. Billyard, et al. (1984). "Pilus genes of *Neisseria gonorrhoeae*: chromosomal organization and DNA sequence." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **81**: 6110-6114.
- Meyer, T. F., J. Pohlner, et al. (1994). "Biology of the pathogenic Neisseriae. [Review]." Current Topics in Microbiology & Immunology **192**: 283-317.
- Mezzatesta, J. R. and R. F. Rest (1983). "Phagocytic killing of *Neisseria gonorrhoeae* by human monocytes." Infection & Immunity **42 (1)**: 99-105.
- Morales, V. M., A. Christ, et al. (1999). "Regulation of human intestinal intraepithelial lymphocyte cytolytic function by biliary glycoprotein (CD66a)." J Immunol **163(3)**: 1363-70.
- Mosleh, I. M., H. J. Boxberger, et al. (1997). "Experimental infection of native human ureteral tissue with *Neisseria gonorrhoeae*: adhesion, invasion, intracellular fate, exocytosis, and passage through a stratified epithelium." Infect Immun **65(8)**: 3391-8.
- Movilla, N. and X. R. Bustelo (1999). "Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins." Mol Cell Biol **19(11)**: 7870-85.
- Muenzner, P., C. Dehio, et al. (2000). "Carcinoembryonic antigen family receptor specificity of *Neisseria meningitidis* Opa variants influences adherence to and invasion of proinflammatory cytokine-activated endothelial cells." Infect Immun **68(6)**: 3601-7.
- Muenzner, P., M. Naumann, et al. (2001). "Pathogenic Neisseria Trigger Expression of Their Carcinoembryonic Antigen-related Cellular Adhesion Molecule 1 (CEACAM1; Previously CD66a) Receptor on Primary Endothelial Cells by Activating the Immediate Early Response Transcription Factor, Nuclear Factor-kappa B." Journal of Biological Chemistry **276(26)**: 24331-24340.
- Murphy, G. L., T. D. Connell, et al. (1989). "Phase variation of gonococcal protein II: regulation of gene expression by slipped-strand mispairing of a repetitive DNA sequence." Cell **56(4)**: 539-47.
- Murphy, T. F. and M. A. Apicella (1987). "Nontypable Haemophilus influenzae: a review of clinical aspects, surface antigens, and the human immune response to infection." Rev Infect Dis **9(1)**: 1-15.
- Muzio, M. and A. Mantovani (2000). "Toll-like receptors." Microbes Infect **2(3)**: 251-5.

- Nagel, G., F. Grunert, et al. (1993). "Genomic organization, splice variants and expression of CGM1, a CD66-related member of the carcinoembryonic antigen gene family." European Journal of Biochemistry **214**: 27-35.
- Namekata, K., Y. Enokido, et al. (2004). "MOCA induces membrane spreading by activating Rac1." J Biol Chem **279**(14): 14331-7.
- Naumann, M., S. Wessler, et al. (1997). "Neisseria gonorrhoeae epithelial cell interaction leads to the activation of the transcription factors nuclear factor kappaB and activator protein 1 and the induction of inflammatory cytokines." Journal of Experimental Medicine **186**(2): 247-58.
- Niebuhr, K. and P. J. Sansonetti (2000). "Invasion of epithelial cells by bacterial pathogens the paradigm of Shigella." Subcell Biochem **33**: 251-87.
- Nishihara, H., S. Kobayashi, et al. (1999). "Non-adherent cell-specific expression of DOCK2, a member of the human CDM-family proteins." Biochim Biophys Acta **1452**(2): 179-87.
- Nishihara, H., M. Maeda, et al. (2002). "DOCK2 associates with CrkL and regulates Rac1 in human leukemia cell lines." Blood **100**(12): 3968-74.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." Cell **81**: 53-62.
- O'Rourke, L. M., R. Tooze, et al. (1998). "CD19 as a membrane-anchored adaptor protein of B lymphocytes: costimulation of lipid and protein kinases by recruitment of Vav." Immunity **8**(5): 635-45.
- Ogihara, S. and H. Kato (2000). "Endocrine cell distribution and expression of tissue-associated antigens in human female paraurethral duct: possible clue to the origin of urethral diverticular cancer." Int J Urol **7**(1): 10-5.
- Ohannesian, D. W., D. Lotan, et al. (1995). "Carcinoembryonic antigen and other glycoconjugates act as ligands for galectin-3 in human colon carcinoma cells." Cancer Res **55**(10): 2191-9.
- Oikawa, S., S. Imajo, et al. (1987). "The carcinoembryonic antigen (CEA) contains multiple immunoglobulin-like domains." Biochem Biophys Res Commun **144**(2): 634-42.
- Oikawa, S., C. Inuzuka, et al. (1991). "A specific heterotypic cell adhesion activity between members of carcinoembryonic antigen family, W272 and NCA, is mediated by N-domains." Journal of Biological Chemistry **266**(13): 7995-8001.

- Ordonez, C., R. A. Screaton, et al. (2000). "Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis." Cancer Res **60**(13): 3419-24.
- Pantaloni, D., C. Le Clainche, et al. (2001). "Mechanism of actin-based motility." Science **292**(5521): 1502-6.
- Pantelic, M., Y. J. Kim, et al. (2005). "Neisseria gonorrhoeae kills carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 (CD66a)-expressing human B cells and inhibits antibody production." Infect Immun **73**(7): 4171-9.
- Park, J. G., R. K. Murray, et al. (1993). "Conserved cytoplasmic tyrosine residues of the gamma subunit are required for a phagocytic signal mediated by Fc gamma RIIIA." J Clin Invest **92**(4): 2073-9.
- Parker, D. C. (1993). "The functions of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation." Semin Immunol **5**(6): 413-20.
- Parsons, N. J., A. A. Kwaasi, et al. (1986). "A determinant of resistance of Neisseria gonorrhoeae to killing by human phagocytes: an outer membrane lipoprotein of about 20 kDa with a high content of glutamic acid." Journal of General Microbiology **132**: 3277-3287.
- Patel, J. C., A. Hall, et al. (2002). "Vav regulates activation of Rac but not Cdc42 during FcgammaR-mediated phagocytosis." Mol Biol Cell **13**(4): 1215-26.
- Paulnock, D. M. (1992). "Macrophage activation by T cells." Curr Opin Immunol **4**(3): 344-9.
- Paxton, R. J., G. Mooser, et al. (1987). "Sequence analysis of carcinoembryonic antigen: identification of glycosylation sites and homology with the immunoglobulin supergene family." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(4): 920-4.
- Persson, C., N. Carballeira, et al. (1997). "The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130^{Cas} and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions." The EMBO Journal **16**: 2307-2318.
- Pils, S., T. Schmitter, et al. (2005). "Quantification of bacterial invasion into adherent cells by flow cytometry." Journal of Microbiological Methods **in press**.
- Pilz, D., T. Vocke, et al. (1992). "Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3." Infect Immun **60**(1): 189-95.
- Plaut, A. G. (1983). "The IgA1 proteases of pathogenic bacteria." Annual Reviews in Microbiology **37**: 603-622.

- Plaut, A. G., J. Gilbert, et al. (1975). "*Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: Extracellular enzyme cleaves human immunoglobulin A." Science **190**: 1103-1105.
- Popp, A., C. Dehio, et al. (1999). "Molecular analysis of neisserial Opa protein interactions with the CEA family of receptors: identification of determinants contributing to the differential specificities of binding." Cell Microbiol **1**(2): 169-81.
- Prall, F., P. Nollau, et al. (1996). "CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues." J Histochem Cytochem **44**(1): 35-41.
- Punsalang, A. P., Jr. and W. D. Sawyer (1973). "Role of pili in the virulence of *Neisseria gonorrhoeae*." Infect Immun **8**(2): 255-63.
- Raupach, B., J. Mecsas, et al. (1999). "Bacterial epithelial cell cross talk." Curr Top Microbiol Immunol **236**: 137-61.
- Ravetch, J. V. (1997). "Fc receptors." Curr Opin Immunol **9**(1): 121-5.
- Ravetch, J. V. and J. P. Kinet (1991). "Fc receptors." Annu Rev Immunol **9**: 457-92.
- Ravetch, J. V. and L. L. Lanier (2000). "Immune inhibitory receptors." Science **290**(5489): 84-9.
- Razi-Wolf, Z., G. J. Freeman, et al. (1992). "Expression and function of the murine B7 antigen, the major costimulatory molecule expressed by peritoneal exudate cells." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(9): 4210-4.
- Read, R. C., R. Wilson, et al. (1991). "Interaction of nontypable *Haemophilus influenzae* with human respiratory mucosa in vitro." J Infect Dis **163**(3): 549-58.
- Rest, R. F. (1979). "Killing of *Neisseria gonorrhoeae* by human polymorphonuclear neutrophil granule extracts." Infect Immun **25**(2): 574-9.
- Rest, R. F., S. H. Fischer, et al. (1982). "Interactions of *Neisseria gonorrhoeae* with human neutrophils: effects of serum and gonococcal opacity on phagocyte killing and chemiluminescence." Infect Immun **36**(2): 737-44.
- Rest, R. F. and W. M. Shafer (1989). "Interactions of *Neisseria gonorrhoeae* with human neutrophils." Clinical Microbiology Reviews **2** (Suppl.): S83-S91.
- Reth, M. (1989). "Antigen receptor tail clue." Nature **338**(6214): 383-4.

- Ridley, A. J. (2001). "Rho family proteins: coordinating cell responses." Trends in Cell Biology **11**(12): 471-7.
- Ridley, A. J. and A. Hall (1992). "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." Cell **70**(3): 389-99.
- Ridley, A. J., H. F. Paterson, et al. (1992). "The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling." Cell **70**(3): 401-10.
- Roggenkamp, A., N. Ackermann, et al. (2003). "Molecular analysis of transport and oligomerization of the Yersinia enterocolitica adhesin YadA." J Bacteriol **185**(13): 3735-44.
- Romagnani, S. (1991). "Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease." Int J Clin Lab Res **21**(2): 152-8.
- Rosenberger, C. M., J. H. Brumell, et al. (2000). "Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals." Curr Biol **10**(22): R823-5.
- Rossman, K. L., C. J. Der, et al. (2005). "GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(2): 167-80.
- Roussel, R. R., S. R. Brodeur, et al. (1991). "Selective binding of activated pp60c-src by an immobilized synthetic phosphopeptide modeled on the carboxyl terminus of pp60c-src." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10696-700.
- Rudel, T., D. Facius, et al. (1995). "Role of pili and the phase-variable PilC protein in natural competence for transformation of *Neisseria gonorrhoeae*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**: 7986-7990.
- Rudel, T., J. P. M. van Putten, et al. (1992). Interaction of two variable proteins (PilE and PilC) required for pilus-mediated adherence of *Neisseria gonorrhoeae* to human epithelial cells.
- Ryan, K. J. (1990). *Neisseria* including *Branhamella*. Medical Microbiology - An introduction to infectious diseases. J. C. Sheris. New York Amsterdam London, Elsevier: 343-356.
- Schmidt, A. and A. Hall (2002). "Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch." Genes Dev **16**(13): 1587-609.
- Schmidt, K. A., H. Schneider, et al. (2001). "Experimental gonococcal urethritis and reinfection with homologous gonococci in male volunteers." Sex Transm Dis **28**(10): 555-64.

- Schmitter, T., F. Agerer, et al. (2004). "Granulocyte CEACAM3 is a phagocytic receptor of the innate immune system that mediates recognition and elimination of human-specific pathogens." Journal of Experimental Medicine **199**: 35-46.
- Schuebel, K. E., N. Movilla, et al. (1998). "Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2." Embo J **17**(22): 6608-21.
- Schwarze, S. R., K. A. Hruska, et al. (2000). "Protein transduction: unrestricted delivery into all cells?" Trends Cell Biol **10**(7): 290-5.
- Screaton, R. A., L. DeMarte, et al. (2000). "The specificity for the differentiation blocking activity of carcinoembryonic antigen resides in its glycoposphatidylinositol anchor." J Cell Biol **150**(3): 613-26.
- Seveau, S., H. Bierne, et al. (2004). "Role of lipid rafts in E-cadherin-- and HGF-R/Met--mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells." J Cell Biol **166**(5): 743-53.
- Shafer, W. M. and R. F. Rest (1989). "Interactions of gonococci with phagocytic cells." Annual Reviews in Microbiology **43**: 121-145.
- Shaw, J. H. and S. Falkow (1988). "Model for invasion of human tissue culture cells by *Neisseria gonorrhoeae*." Infection & Immunity **56** (6): 1625-1632.
- Shin, J. S. and S. N. Abraham (2001). "Glycosylphosphatidylinositol-anchored receptor-mediated bacterial endocytosis." FEMS Microbiol Lett **197**(2): 131-8.
- Shinohara, M., Y. Terada, et al. (2002). "SWAP-70 is a guanine-nucleotide-exchange factor that mediates signalling of membrane ruffling." Nature **416**(6882): 759-63.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes. [Review] [67 refs]." Nature **387**: 569-572.
- Simons, M. P., W. M. Nauseef, et al. (2005). "Interactions of *Neisseria gonorrhoeae* with adherent polymorphonuclear leukocytes." Infect Immun **73**(4): 1971-7.
- Skubitz, K. M., K. D. Campbell, et al. (1995). "CD66 family members are associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils." Journal of Immunology **155**: 5382-5390.
- Songyang, Z., S. E. Shoelson, et al. (1994). "Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav." Mol Cell Biol **14**(4): 2777-85.

- Sprent, J. (1997). "Immunological memory." Curr Opin Immunol **9**(3): 371-9.
- Squier, M. K. and J. J. Cohen (1994). "Cell-mediated cytotoxic mechanisms." Curr Opin Immunol **6**(3): 447-52.
- St Geme, J. W., 3rd, M. L. de la Morena, et al. (1994). "A Haemophilus influenzae IgA protease-like protein promotes intimate interaction with human epithelial cells." Molecular Microbiology **14**(2): 217-33.
- Steinman, R. M. (1991). "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." Annu Rev Immunol **9**: 271-96.
- Stern, A., M. Brown, et al. (1986). "Opacity genes in *Neisseria gonorrhoeae*: Control of phase and antigenic variation." Cell **47**: 61-71.
- Stocks, S. C. and M. A. Kerr (1993). "Neutrophil NCA-160 (CD66) is the major protein carrier of selectin binding carbohydrate groups LewisX and sialyl lewisX." Biochem Biophys Res Commun **195**(1): 478-83.
- Stout, R. D. and K. Bottomly (1989). "Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages." J Immunol **142**(3): 760-5.
- Stradal, T. E., K. Rottner, et al. (2004). "Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins." Trends Cell Biol **14**(6): 303-11.
- Streichert, T., A. Ebrahimnejad, et al. (2001). "The microbial receptor CEACAM3 is linked to the calprotectin complex in granulocytes." Biochemical & Biophysical Research Communications **289**(1): 191-7.
- Swanson, J. (1978). "Studies on gonococcus infection. XII. Colony color and opacity variants of gonococci." Infect Immun **19**(1): 320-31.
- Swanson, J., O. Barrera, et al. (1988). "Expression of outer membrane protein II by gonococci in experimental gonorrhoea." Journal of Experimental Medicine **168**: 2121-2129.
- Swanson, J., G. King, et al. (1975). "Studies on gonococcus infection VII. In vitro killing of gonococci by human leukocytes." Infection & Immunity **11**: 65-68.
- Swanson, J., K. Robbins, et al. (1987). "Gonococcal pilin variants in experimental gonorrhoea." Journal of Experimental Medicine **165**: 1344-1357.
- Swanson, M. S. and R. R. Isberg (1996). "Identification of Legionella pneumophila mutants that have aberrant intracellular fates." Infection & Immunity **64**: 2585-2594.

- Takenawa, T. and H. Miki (2001). "WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement." J Cell Sci **114**(Pt 10): 1801-9.
- Tapsall, J. (2002). "Current concepts in the management of gonorrhoea." Expert Opin Pharmacother **3**(2): 147-57.
- Taylor, V., M. Wong, et al. (2000). "5' phospholipid phosphatase SHIP-2 causes protein kinase B inactivation and cell cycle arrest in glioblastoma cells [In Process Citation]." Molecular and Cellular Biology **20**(18): 6860-71.
- Thomas, S. M. and J. Brugge (1997). "Cellular functions regulated by src family kinases." Annual Reviews in Cell and Developmental Biology **13**: 513-609.
- Thompson, J. A., F. Grunert, et al. (1991). "Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives." Journal of Clinical Laboratory Analysis **5**: 344-366.
- Turner, M. and D. D. Billadeau (2002). "VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors." Nat Rev Immunol **2**(7): 476-86.
- Turner, M., P. J. Mee, et al. (1997). "A requirement for the Rho-family GTP exchange factor Vav in positive and negative selection of thymocytes." Immunity **7**(4): 451-60.
- Unkmeir, A., K. Latsch, et al. (2002). "Fibronectin mediates Opc dependent internalisation of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells." Molecular Microbiology **42**: 933-946.
- Van Aelst, L. and C. D'Souza-Schorey (1997). "Rho GTPases and signaling networks." Genes Dev **11**(18): 2295-322.
- van Alphen, L., D. A. Caugant, et al. (1997). "Differences in genetic diversity of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* from various diseases." Microbiology **143** (Pt 4): 1423-31.
- van Alphen, L., H. M. Jansen, et al. (1995). "Virulence factors in the colonization and persistence of bacteria in the airways." Am J Respir Crit Care Med **151**(6): 2094-9; discussion 2099-100.
- van Putten, J. P., T. D. Duensing, et al. (1998). "Entry of OpaA+ gonococci into HEp-2 cells requires concerted action of glycosaminoglycans, fibronectin and integrin receptors." Molecular Microbiology **29**(1): 369-79.

- van Putten, J. P. and S. M. Paul (1995). "Binding of syndecan-like cell surface proteoglycan receptors is required for *Neisseria gonorrhoeae* entry into human mucosal cells." The EMBO Journal **14**: 2144-2154.
- van Schilfgaarde, M., L. van Alphen, et al. (1995). "Paracytosis of *Haemophilus influenzae* through cell layers of NCI-H292 lung epithelial cells." Infect Immun **63**(12): 4729-37.
- Veale, D. R., H. Finch, et al. (1976). "Penetration of penicillin into human phagocytes containing *Neisseria gonorrhoeae*: Intracellular survival and growth at optimum concentrations of antibiotic." Journal of General Microbiology **95**: 353-363.
- Venter, J. C., M. D. Adams, et al. (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-51.
- Virji, M., D. Evans, et al. (2000). "Carcinoembryonic antigens are targeted by diverse strains of typable and non-typable *Haemophilus influenzae*." Molecular Microbiology **36**(4): 784-95.
- Virji, M., D. Evans, et al. (1999). "Critical determinants of host receptor targeting by *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: identification of Opa adhesiotopes on the N-domain of CD66 molecules." Molecular Microbiology **34**(3): 538-51.
- Virji, M. and J. E. Heckels (1986). "The effect of protein II and pili on the interaction of *Neisseria gonorrhoeae* with human polymorphonuclear leucocytes." Journal of General Microbiology **132**: 503-512.
- Virji, M., H. Kayhty, et al. (1992). "Interactions of *Haemophilus influenzae* with human endothelial cells in vitro." J Infect Dis **165 Suppl 1**: S115-6.
- Virji, M., K. Makepeace, et al. (1996). "Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic *Neisseriae*." Molecular Microbiology **22**: 941-950.
- Virji, M., K. Makepeace, et al. (1994). "Distinct mechanisms of interactions of Opc-expressing meningococci at apical and basolateral surfaces of human endothelial cells; the role of integrins in apical interactions." Molecular Microbiology **14**(1): 173-184.
- Virji, M., J. R. Saunders, et al. (1993). "Pilus-facilitated adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells: modulation of adherence phenotype occurs concurrently with changes in primary amino acid

- sequence and the glycosylation status of pilin." Molecular Microbiology **10 (5)**: 1013-1028.
- Virji, M., S. M. Watt, et al. (1996). "The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*." Molecular Microbiology **22**: 929-939.
- Visser, L. G., P. S. Hiemstra, et al. (1996). "Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes." Infect Immun **64(5)**: 1653-8.
- Wadia, J. S. and S. F. Dowdy (2003). "Modulation of cellular function by TAT mediated transduction of full length proteins." Curr Protein Pept Sci **4(2)**: 97-104.
- Wadia, J. S. and S. F. Dowdy (2005). "Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer." Adv Drug Deliv Rev **57(4)**: 579-96.
- Wang, J., S. D. Gray-Owen, et al. (1998). "Opa binding to cellular CD66 receptors mediates the transcellular traversal of *Neisseria gonorrhoeae* across polarized T84 epithelial cell monolayers." Molecular Microbiology **30(3)**: 657-71.
- Ward, M. E., A. A. Glynn, et al. (1972). "Fate of *Neisseria gonorrhoeae* in polymorphonuclear leukocytes: an electronmicroscopic study of the natural disease." British Journal of Experimental Pathology **53**: 289-294.
- Ward, M. E., P. J. Watt, et al. (1974). "The human fallopian tube: a laboratory model for gonococcal infection." J Infect Dis **129(6)**: 650-9.
- Weng, W. K., L. Jarvis, et al. (1994). "Signaling through CD19 activates Vav/mitogen-activated protein kinase pathway and induces formation of a CD19/Vav/phosphatidylinositol 3-kinase complex in human B cell precursors." J Biol Chem **269(51)**: 32514-21.
- Westerlund, B. and T. K. Korhonen (1993). "Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix." Mol Microbiol **9(4)**: 687-94.
- Witt, K., D. R. Veale, et al. (1976). "Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to ingestion and digestion by phagocytes of human buffy coat." Journal of Medical Microbiology **9 (1)**: 1-12.
- Wu, J., S. Katzav, et al. (1995). "A functional T-cell receptor signaling pathway is required for p95vav activity." Mol Cell Biol **15(8)**: 4337-46.

- Wu, J., D. G. Motto, et al. (1996). "Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation." Immunity **4**(6): 593-602.
- Zhou, D. and J. Galan (2001). "Salmonella entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins." Microbes Infect **3**(14-15): 1293-8.
- Zhou, G. Q., Y. Zhang, et al. (2001). "The carcinoembryonic antigen (CEA) gene family in non-human primates." Gene **264**(1): 105-12.

11 Anhang

11.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Adhärenz und Invasion Opa_{HSPG} -exprimierender Gonokokken über Heperansulfatproteoglykan _____	6
Abbildung 1.2	Struktur der CEACAM Proteine _____	9
Abbildung 1.3	CEACAM-vermittelte Invasion von Epithelzellen _____	11
Abbildung 1.4	Interaktion Opa_{CEA} -exprimierender Bakterien mit Granulozyten und T-Zellen CEACAM-vermittelte Invasion von Epithelzellen _____	24
Abbildung 2.1	Die Opsonin-unabhängige Phagozytose von Gonokokken in humane Granulozyten beruht auf der Expression des bakteriellen Opa_{CEA} -Adhäsins _____	36
Abbildung 2.2	Opa_{CEA} -exprimierende Gonokokken werden am effizientesten über die CEACAM3-vermittelte Phagozytose internalisiert _____	37
Abbildung 2.3	Effiziente Transfektion der CEACAMs in 239 Zellen _____	38
Abbildung 2.4	Die Inhibition von Kinasen der Src-Familie blockiert die CEACAM3-vermittelte Aufnahme von Opa_{CEA} Gonokokken _____	40
Abbildung 2.5	Hyperphosphorylierung der CEACAM3 ITAM-ähnlichen Sequenz durch die virale Src-Kinase _____	42
Abbildung 2.6	Die Src-SH2 Domäne bindet spezifisch an das phosphorylierte CEACAM3-ITAM ____	43
Abbildung 2.7	Tyrosinkinasen der Src-Familie sind für die CEACAM3-vermittelte Internalisierung der Opa_{CEA} Gonokokken essentiell _____	45
Abbildung 2.8	CEACAM3-transfizierte, SYF ^{-/-} -defiziente Zellen internalisieren keine Gonokokken ____	46
Abbildung 2.9	Die Zerstörung von cholesterinreichen Mikrodomänen inhibiert die CEACAM6- aber nicht die CEACAM3-vermittelte Aufnahme der Gonokokken _____	48
Abbildung 2.10	Epitheliale CEACAMs internalisieren Gonokokken über cholesterinreiche Mikrodomänen _____	50
Abbildung 2.11	Die Aufnahme von Gonokokken in primäre Granulozyten verläuft über die CEACAM3-vermittelte Phagozytose _____	52
Abbildung 3.1	Aktivitätszyklus der Rho GTPasen _____	64
Abbildung 3.2	Opa_{CEA} -exprimierende Gonokokken werden effizient von humanen Granulozyten erkannt und eliminiert _____	68
Abbildung 3.3	Der Kontakt von Opa_{CEA} Gonokokken mit humanen Granulozyten induziert Lamellipodien-ähnliche Membranfortsätze auf den professionellen Fresszellen ____	69
Abbildung 3.4	293 Zellen exprimieren endogen keine CEACAM Protein und lassen sich effizient transient transfizieren _____	70
Abbildung 3.5	CEACAM-transfizierte 293 Zellen interagieren mit Opa_{CEA} Gonokokken _____	71

Anhang

Abbildung 3.6	CEACAM-exprimierende Zellen internalisieren spezifisch Opa _{CEA} -exprimierende Gonokokken _____	71
Abbildung 3.7	Die CEACAM3- aber nicht die CEACAM6-vermittelte Internalisierung von Opa _{CEA} Gonokokken benötigt die kleine GTPase Rac _____	72
Abbildung 3.8	Die kleine GTPase Rac wird nur in CEACAM3-exprimierende Zellen zu adhätierenden Opa _{CEA} -Gonokokken rekrutiert _____	73
Abbildung 3.9	Die CEACAM3-vermittelte Internalisierung von Opa _{CEA} Gonokokken stimuliert die kleine GTPase Rac _____	74
Abbildung 3.10	Die Rac Stimulation über CEACAM3 benötigt das bakterielle Opa _{CEA} -Adhäsins _____	74
Abbildung 3.11	Die ITAM-ähnliche Sequenz der zytoplasmatischen Domäne des CEACAM3 Proteins _____	75
Abbildung 3.12	Die zytoplasmatische Domäne von CEACAM3 mit der ITAM-ähnlichen Sequenz ist essentiell für die Aufnahme von Opa _{CEA} Gonokokken _____	76
Abbildung 3.13	Die Stimulation der kleinen GTPase Rac ist an die ITAM-ähnliche Sequenz von CEACAM3 gekoppelt _____	77
Abbildung 3.14	Kinasen der Src-Familie verbinden die CEACAM3-Ligation mit der Rac Stimulation _____	78
Abbildung 3.15	Die effektive Phagozytose von Gonokokken in humane Granulozyten hängt von der Expression des bakteriellen Opa _{CEA} -Adhäsins ab _____	79
Abbildung 3.16	Die Funktionalität des CEACAM3 Proteins ist essentiell für die Internalisierung Opa _{CEA} -exprimierender Gonokokken durch primäre, humane Granulozyten _____	80
Abbildung 3.17	Die Absättigung der N-terminalen Bindungsstellen des CEACAM3 Proteins verhindert die Phagozytose der Opa _{CEA} Gonokokken _____	81
Abbildung 3.18	Expression der pTAT-Fusionsproteine _____	82
Abbildung 3.19	Die CEACAM3-abhängige Rac Stimulation ist für die Internalisierung von Opa _{CEA} Gonokokken in humane Granulozyten essentiell _____	83
Abbildung 3.20	Die Elimination der Opa _{CEA} Gonokokken verläuft hauptsächlich über die CEACAM3-vermittelte Aufnahme _____	84
Abbildung 3.21	<i>Haemophilus influenzae</i> wird durch CEACAM3-exprimierende 293 Zellen erkannt und internalisiert _____	85
Abbildung 3.22	<i>Moraxella catarrhalis</i> wird durch CEACAM3-exprimierende 293 Zellen erkannt und internalisiert _____	86
Abbildung 3.23	Humane Granulozyten phagozytieren CEACAM-bindende Bakterien über CEACAM3 _____	86
Abbildung 4.1	Regulation der Rho GTPase-Aktivität _____	98
Abbildung 4.2	Struktur des Vav Proteins _____	99
Abbildung 4.3	Die CEACAM3-vermittelte Aufnahme von Opa _{CEA} Gonokokken braucht den Guanin-Nukleotid- Austauschfaktor-Vav _____	103
Abbildung 4.4	Die Aufnahme von Opa _{CEA} exprimierender Gonokokken in CEACAM3-transfizierte Zellen wird durch das dominant negative Vav konzentrationsabhängig inhibiert _____	104
Abbildung 4.5	Ausschließlich die CEACAM3-vermittelte Aufnahme der Opa _{CEA} Gonokokken benötigt die Aktivität des Vav Proteins _____	106

Abbildung 4.6	Die Transfektion von Vav2-siRNA unterdrückt spezifisch die endogene Expression von Vav2 _____	108
Abbildung 4.7	Die Transfektion von Vav2-siRNA in stabil transfizierte CEACAM3 HeLa-Zellen beeinträchtigt die Aufnahme von Opa _{CEA} Gonokokken _____	109
Abbildung 4.8	Die Inhibition der Vav2-Expression interferiert mit der CEACAM3-vermittelten Stimulation der kleinen GTPase Rac _____	110
Abbildung 4.9	Die Interaktion von Opa _{CEA} Gonokokken mit CEACAM3 führt zur Rekrutierung des Vav2 Proteins _____	111
Abbildung 4.10	Das Vav2 Protein interagiert mit dem CEACAM3 Protein _____	112
Abbildung 4.11	Der Tyrosinrest Y230 der ITAM-ähnlichen Sequenz von CEACAM3 interagiert spezifisch mit der SH3-SH2-SH3 Domäne von Vav _____	113
Abbildung 4.12	Die Phagozytose von Opa _{CEA} Gonokokken in humane Granulozyten lässt sich durch die Proteintransduktion von TAT-Vav-dn beeinträchtigen _____	115
Abbildung 4.13	Die Transduktion des TAT-Vav-dn Fusionsproteins in primäre Granulozyten interferiert mit der CEACAM-vermittelte Aufnahme Opa _{CEA} Gonokokken _____	117
Abbildung 4.14	Phosphotyrosin-abhängige Regulation der Vav GEF-Aktivität _____	127

11.2 Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CFU	<i>colony forming unit</i>
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CS	Kälberserum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Erm	Erythromycin
et al.	<i>Et altera</i> ; und andere
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GST	Glutation-S-Transferase
h	Stunde
HBS	Hepes gepufferte Salzlösung
HMW	High Molecular Weight Marker
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif</i>
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria- Bertani

LMW	Low Molecular Weight Marker
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
OD	optische Dichte
Opa	<i>opacity associated</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PL	Polylysin
pmol	Picomol
PTK	Proteintyrosinkinase
PVDF	Polyvenylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	<i>Src-homology 2 domain</i>
SH3	<i>Src-homology 3 domain</i>
sog.	sogenannte
TAE	Tris- Acetat- EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
WASP	<i>Wiskott Aldrich Syndrome Protein</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
z.B.	zum Beispiel

11.3 *Publikationen*

Guder, A., T. Schmitter, I. Wiedemann, H.G. Sahl and Bierbaum G. (2002). "Role of the single regulator MrsR1 and the two-component system MrsR2/K2 in the regulation of mersacidin production and immunity." *Applied and Environmental Microbiology* **68**(1): 106-13.

Schmitter, T., F. Agerer, L. Peterson, P. Münzner and Hauck C.R. (2004). "Granulocyte CEACAM3 is a phagocytic receptor of the innate immune system that mediates recognition and elimination of human-specific pathogens." *Journal of Experimental Medicine* **199**: 35-46.

Pils, S., T. Schmitter, F. Neske and Hauck C. R. (2005). "Quantification of bacterial invasion into adherent cells by flow cytometry." (Im Druck, *Journal of Microbiological Methods*)

Hauck, C. R., F. Agerer, P. Münzner and Schmitter T. (2005). "Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection" (Im Druck, *European Journal of Cell Biology*)

T Schmitter, S. Pils, V. Sakk, K. Fischer and Hauck C. R. "The guanine nucleotide exchange factor Vav directly couples CEACAM3 with Rac stimulation during phagocytosis of human pathogens" (In Vorbereitung)

Schmitter, T., F. Agerer, L. Peterson, S. Waeckerle, P. Münzner and Hauck C. R. "Phagocytosis of *Neisseria gonorrhoeae* by granulocytic CEACAM 3 receptor depends on Src family kinases" (In Vorbereitung)

11.4 Tagungsbeiträge

11.4.1 Poster

T. Schmitter, F. Agerer, J. Blaß und C. Hauck (2001). *Neisseria gonorrhoeae* induces CEACAM-dependent signalling. First Joint French-German Congress on Cell Biology, Strassbourg, Frankreich

T. Schmitter, F. Agerer, J. Blaß und C. Hauck (2001). *Neisseria gonorrhoeae* induces CEACAM-dependent signalling. Mini-Symposium, Wittenberg

T. Schmitter, F. Agerer, J. Blaß, P. Münzner-Voigt und C. Hauck (2002). CEACAM3, but not CEACAM6, activates the small GTPase Rac upon contact of Opa-expressing *Neisseria gonorrhoeae* with human cells. Internationales Leopoldina Symposium in Würzburg: Parasitism, Commensalism, Symbiosis – Common Themes, Different Outcome

08/2003 T. Schmitter, F. Agerer, J. Blaß, P. Münzner-Voigt und C. Hauck (2003). Human granulocyte CEACAM-3 is a phagocytic receptor that activates Rac and mediates elimination of human specific pathogens. 24th Annual International CEA Symposium, Frauenwörth

Rumpel, A. Reipert, T. Schmitter, C. Wolz, G. Bierbaum (2004). Contribution of the cell envelope to Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. VAAM-Jahrestagung, Braunschweig

T. Schmitter, F. Agerer, J. Blaß, P. Münzner-Voigt und C. Hauck (2004). Human granulocyte CEACAM-3 is a phagocytic receptor that activates Rac and mediates elimination of human specific pathogens. Internationales Leopoldina Symposium in Würzburg: Microbes of high pathogenic potential – Strategies for detection, control and eradication

11.4.2 Vorträge

T. Schmitter, F. Agerer, J. Blaß und C. Hauck (2001). *Neisseria gonorrhoeae* induces CEACAM-dependent signalling. Mini-Symposium, Wittenberg

T. Schmitter, F. Agerer, J. Blaß und C. Hauck (2002). CEACAM3, but not CEACAM6, activates the small GTPase Rac upon contact of Opa-expressing *Neisseria gonorrhoeae* with human cells. Mini-Symposium, Kloster Banz

03/2004 T. Schmitter, F. Agerer, L. Peterson, S. Wäckerle, P. Münzner-Voigt und C. Hauck (2004). Human-specific pathogens are recognised and eliminated via CEACAM3 a phagocytic receptor of the innate immune system. VAAM-Jahrestagung, Braunschweig

11.5 *Lebenslauf*

NAME Tim Ronald Schmitter
GEBURTSDATUM 26. August 1973
GEBURTSORT Trier
STAATSANGEHÖRIGKEIT Deutsch

SCHULBILDUNG

1980 – 1984 Grundschole in Meckenheim
1990 – 1991 Schüleraustausch, Palisades High-School Pennsylvania / USA
1984 – 1993 Konrad-Adenauer-Gymnasium in Meckenheim/NRW
1993 Allgemeine Hochschulreife

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

1993 Studium der Biologie, Universität Bonn
2000 Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie und Zoologie
1999 – 2000 Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Bonn unter Betreuung von Herrn Prof. H.-G. Sahl

Diplomarbeit: Radioaktive [C¹⁴] – Markierung des Lantibiotikums Mersacidin und Quantifizierung des Zellwandvorläufers Lipid II bei *Staphylococcus aureus* Stämmen

3 / 2001 – 6 / 2005 Promotion am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg unter der Betreuung von Herrn Priv. Doz. Dr. C.R. Hauck

Thema: CEACAM3: ein neuartiger phagozytischer Rezeptor der angeborenen Immunantwort zur Erkennung human-spezifischer Pathogene

12/ 2005 Promotionsprüfung