

# **Interaktion pathogener Neisserien mit zellulären Rezeptoren:**

**Molekulare Untersuchungen zu neisseriellen Adhäsinen  
und ihrer Wechselwirkung mit humanen CEACAMs**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Katharina Küspert**

aus Marktleuthen

Würzburg 2007

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. C.R. Hauck

Gutachter: Prof. Dr. R. Gross

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit vom 01.9.2003 bis zum 31.03.2007 am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg und am Lehrstuhl für Zellbiologie der Universität Konstanz unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Christof Hauck durchgeführt.

Besonders danke ich

Herrn Prof. Dr. Christof Hauck für die hervorragende Betreuung, die zahlreichen Anregungen und die ständige Hilfsbereitschaft während meiner gesamten Doktorarbeit sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. Roy Gross für die Bereitschaft als Zweitgutachter dieser Arbeit zu fungieren.

Herrn Prof. Dr. Matthias Frosch und Herrn Prof. Dr. Ulrich Vogel für die Bereitstellung der Mikroarrays sowie Anja Schramm-Glück für die Unterstützung bei den Mikroarray-Experimenten.

Meinen Mitarbeitern im Labor, ohne die die Arbeit nur halb soviel Spaß gemacht hätte: Franziska Agerer, Jonas Angstenberger, Verena Bachmann, Anne Berking, Alexander Buntru, Guilene Citieuh, Doris Deininger, Susanne Feindler-Boeckh, Immo Hansen, Joachim Hentschel, Christine Hoffmann, Ruth Hohenberger-Bregger, Markus Hupp, Anne Keller, Roland Kissmehl, Jennifer Knoch, Markus Knust, Kathrin Kopp, Sigrid Lux, Jürgen Meier, Petra Münzner-Voigt, Florian Neske, Lisa Peterson, Stefan Pils, Tim Schmitter, Clara Sprissler, Jeeva Varadarajulu und Stefanie Weibel.

Danke für Eure ständige Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit im und außerhalb vom Labor!

Meinen Eltern für ihre Unterstützung, Motivation und ihr Vertrauen.

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Gattung <i>Neisseria</i>.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Pathogene Neisserien - Epidemiologie und klinischer Verlauf der Neisserien-Infektionen .....</b>	<b>1</b>
<b>1.3</b>	<b>Virulenzfaktoren pathogener Neisserien zur Etablierung einer Infektion .....</b>	<b>3</b>
1.3.1	Pili .....	5
1.3.2	Opa-Proteine .....	6
1.3.2.1	<i>Opa<sub>HSPG</sub></i> vermittelte Interaktion mit Epithelzellen .....	7
1.3.2.2	<i>Opa<sub>CEA</sub></i> -vermittelte Interaktion mit CEACAMs .....	8
1.3.2.3	<i>Opa<sub>CEA</sub></i> -vermittelte Interaktion mit CEACAM1 und CEACAM3 .....	12
1.3.3	Opc-Protein.....	15
1.3.4	Andere neisserielle Adhäsine .....	16
1.3.5	IgA-Protease .....	16
1.3.6	Porine .....	17
1.3.7	Lipooligosaccharide.....	17
1.3.8	Polysaccharidkapsel.....	18
<b>1.4</b>	<b>Ziele der Arbeit .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR ERFASSUNG VON NEISSERIEN-CEACAM INTERAKTIONEN .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>22</b>
2.2.1	Lösliche CEACAM1-GFP Konstrukte erkennen neisserielle Opa <sub>CEA</sub> Proteine.....	22
2.2.2	Die aminoternale Domäne von CEACAM8 assoziiert nicht mit Opa <sub>CEA</sub> - exprimierenden Gonokokken .....	24
2.2.3	Erstellung eines Bindungsprofils neisserieller Opa <sub>CEA</sub> -Adhäsine durch lösliche aminoternale Domänen von humanen CEACAMs.....	25
2.2.4	GFP-markierte aminoternale Domänen sind hervorragende molekulare Werkzeuge zur Analyse der CEACAM-Assoziation in einer heterogenen Bakterienpopulation.....	26
<b>2.3</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>OPA<sub>CEA</sub>-INDUZIERTER TRANSKRIPTIONSVERÄNDERUNGEN IN NEISSERIA MENINGITIDIS MC58 .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.2.1	Vorbereitung der Proben für die Transkriptomanalyse.....	35
3.2.2	Hochregulierte Gene in <i>Neisseria meningitidis</i> MC58 durch Opa-CEACAM1- Interaktion.....	36

---

3.2.3	Herunterregulierte Gene in <i>Neisseria meningitidis</i> MC58 durch Opa-CEACAM1-Interaktion.....	37
<b>3.3</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DER INTERAKTION OPA-NEGATIVER MENINGOKOKKEN MIT CEACAM1.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
4.2.1	Opa-negative Meningokokken werden von CEACAM1-exprimierenden Zellen aufgenommen.....	44
4.2.2	Opa-negative Meningokokken exprimieren keine Opa-Proteine während der CEACAM1-vermittelten Aufnahme.....	47
4.2.2.1	<i>Alle Opa-Proteine aus Neisseria meningitidis MC58 werden vom anti-Opa Antikörper erkannt.....</i>	<i>47</i>
4.2.2.2	<i>Der Opa-negative Phänotyp der Meningokokken bleibt bestehen während der Infektion CEACAM1-exprimierender Zellen.....</i>	<i>49</i>
4.2.3	Die CEACAM-abhängige Invasion Opa-negativer Meningokokken erfolgt ausschließlich über CEACAM1.....	51
4.2.4	Opa-negative Meningokokken kolokalisieren mit CEACAM1.....	52
4.2.5	CEACAM1 vermittelt die Invasion Opa-negativer Meningokokken in verschiedenen Zelllinien.....	53
4.2.6	Das Aktinzytoskelett spielt keine Rolle bei der CEACAM1-vermittelten Invasion Opa-negativer Meningokokken.....	54
4.2.7	Die Kinetik der CEACAM1-vermittelten Aufnahme Opa-negativer Meningokokken ist vergleichbar mit der Opa-positiver Meningokokken.....	56
4.2.8	Die CEACAM1-vermittelte Aufnahme Opa-negativer Meningokokken erfordert mehrere Domänen des Rezeptors.....	57
4.2.9	Die CEACAM1-vermittelte Aufnahme Opa-negativer Meningokokken ist unabhängig von Kohlenhydrat-Strukturen des Rezeptors.....	61
4.2.10	Multimerisiertes CEACAM1 - aber nicht monomeres CEACAM1 - bindet an Opa-negative Meningokokken.....	64
4.2.11	Bekannte neisserielle Invasine spielen keine Rolle bei der CEACAM1-vermittelten Aufnahme Opa-negativer Meningokokken.....	69
4.2.12	Identifizierung des CEACAM1-interagierenden Adhäsins Opa-negativer Meningokokken durch eine lambda-Phagen-Genbank.....	70
4.2.12.1	<i>Herstellung einer lambdaZAP Express Genbank von Opa-negativen Meningokokken.....</i>	<i>71</i>
4.2.12.2	<i>λPhagen Screen zu Identifizierung potentieller CEACAM1-interagierender Adhäsine.....</i>	<i>71</i>
4.2.13	Untersuchung eines Hämagglutinin-/Hämolysin-verwandten Proteins als potentielles CEACAM1-interagierendes Adhäsin.....	74
4.2.13.1	<i>Inaktivierung des Hämagglutinin-/Hämolysin-verwandten Proteins aus Nm MC5874.....</i>	<i>74</i>

4.2.13.2	<i>Untersuchung der Mutanten auf Invasionsfähigkeit</i> .....	76
4.2.13.3	<i>Untersuchung der Mutanten auf CEACAM1-Bindefähigkeit</i> .....	77
<b>4.3</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>78</b>
<b>5</b>	<b>BETEILIGUNG DER C-JUN N-TERMINALEN KINASE AN CEACAM3-VERMITTELTEN SIGNALWEGEN</b> .....	<b>85</b>
<b>5.1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>85</b>
<b>5.2</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>87</b>
5.2.1	CEACAM3 vermittelt die Aktivierung c-Jun N-terminaler Kinasen .....	87
5.2.2	Aktivierte c-Jun N-terminale Kinasen kolokalisieren mit CEACAM3 .....	90
5.2.3	Die ITAM-ähnliche Sequenz von CEACAM3 ist nicht essentiell zur Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinasen .....	91
5.2.4	c-Jun N-terminale Kinasen sind an CEACAM3-vermittelten bakteriellen Aufnahmeprozessen beteiligt .....	93
<b>5.3</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>100</b>
6.1	Bakterien .....	100
6.1.1	<i>Neisseria</i> -Stämme .....	100
6.1.1.1	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	100
6.1.1.2	<i>kommensale Neisserien</i> .....	100
6.1.2	<i>Escherichia coli</i> -Stämme .....	100
<b>6.2</b>	<b>Zelllinien</b> .....	<b>101</b>
<b>6.3</b>	<b>Phagen</b> .....	<b>101</b>
<b>6.4</b>	<b>Nährmedien für Bakterien und Zellkultur</b> .....	<b>101</b>
6.4.1	Medien und Platten für Bakterien.....	101
6.4.2	Medien für Zellkultur.....	102
<b>6.5</b>	<b>Antikörper, Enzyme und Proteine</b> .....	<b>102</b>
6.5.1	Antikörper.....	102
6.5.1.1	<i>Primärantikörper</i> .....	102
6.5.1.2	<i>Sekundärantikörper</i> .....	103
6.5.1.3	<i>Antikörperunabhängige Färbereagenzien</i> .....	103
6.5.2	Enzyme und Proteine .....	103
<b>6.6</b>	<b>Plasmide und Primer</b> .....	<b>103</b>
6.6.1	Plasmide .....	103
6.6.2	Primer.....	107
<b>6.7</b>	<b>Lösungen und Puffer</b> .....	<b>108</b>
6.7.1	Lösungen und Puffer für eukaryontische Zellen .....	108
6.7.2	Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie .....	109

---

6.7.3	Lösungen und Puffer für SDS-PAGE, Proteingelfärbung und Western Blot .....	109
6.7.4	Chemikalien und Kits.....	110
<b>6.8</b>	<b>Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>111</b>
<b>6.9</b>	<b>Software.....</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>112</b>
<b>7.1</b>	<b>Arbeiten mit Bakterien .....</b>	<b>112</b>
7.1.1	Kultur von Bakterien.....	112
7.1.1.1	<i>Kultur von Neisserien.....</i>	112
7.1.1.2	<i>Kultur von Escherichia coli.....</i>	112
7.1.2	Einfrieren von Bakterien .....	112
7.1.3	Bestimmung der Bakterienzahl.....	112
7.1.4	Transformation von Bakterien durch Temperaturschock.....	113
<b>7.2</b>	<b>Arbeiten mit Zellen .....</b>	<b>113</b>
7.2.1	Kultur von verschiedenen Zelllinien.....	113
7.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	114
7.2.3	Bestimmung der Zellzahl .....	114
7.2.4	Transfektion von eukaryontischen Zellen durch die Calcium-Phosphat Kopräzipitationsmethode.....	114
<b>7.3</b>	<b>Arbeiten mit Phagen .....</b>	<b>115</b>
7.3.1	Konstruktion einer $\lambda$ ZAP-Express Genbank.....	115
7.3.1.1	<i>Partielle Restriktion von genomischer DNA aus Neisseria meningitidis MC58 und Dichtegradientenzentrifugation .....</i>	115
7.3.1.2	<i>Ligation mit dem <math>\lambda</math>ZAP-Express Vektor.....</i>	116
7.3.1.3	<i>Verpackung der Ligationsansätze in Phagenpartikel .....</i>	116
7.3.2	Phageninfektion und Titerbestimmung .....	116
7.3.3	Screenen einer $\lambda$ ZAP-Express Genbank .....	117
7.3.4	In vivo excision .....	117
<b>7.4</b>	<b>Arbeiten mit DNA .....</b>	<b>118</b>
7.4.1	Isolierung chromosomaler DNA aus Neisserien .....	118
7.4.2	Plasmidpräparation .....	119
7.4.2.1	<i>Plasmidpräparation (nach Birnboim-Doly).....</i>	119
7.4.2.2	<i>Plasmidpräparation mittels Kit .....</i>	119
7.4.3	Fällung der DNA .....	119
7.4.3.1	<i>Ethanolpräzipitation .....</i>	119
7.4.3.2	<i>Isopropanolpräzipitation.....</i>	120
7.4.4	DNA-Konzentrationsbestimmung .....	120

---

7.4.5	Enzymatische Modifikationen der DNA.....	120
7.4.5.1	<i>DNA-Hydrolyse durch Restriktionsenzyme</i> .....	120
7.4.5.2	<i>Dephosphorylierung plasmidaler DNA</i> .....	121
7.4.5.3	<i>Ligation</i> .....	121
7.4.5.4	<i>In-Fusion Reaktion</i> .....	121
7.4.5.5	<i>Cre-lox site-spezifische Rekombination</i> .....	122
7.4.6	Polymerase-Ketten-Reaktion und <i>Gene-SOEing</i> .....	122
7.4.7	Agarosegelelektrophorese .....	124
7.4.8	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	124
<b>7.5</b>	<b>Arbeiten mit RNA und Mikroarrays</b> .....	<b>124</b>
7.5.1	RNA-Isolierung .....	124
7.5.1.1	<i>Mechanischer Aufschluß von Bakterien zur RNA-Isolierung</i> .....	125
7.5.1.2	<i>RNA-Isolierung aus Bakterien und Analyse</i> .....	125
7.5.2	RNA-Konzentrationsbestimmung .....	126
7.5.3	Mikroarrays .....	126
7.5.3.1	<i>Reverse Transkription mit Einbau der Farbstoffe Cy3 und Cy5</i> .....	126
7.5.3.2	<i>Hybridisierung der Slides</i> .....	127
7.5.3.3	<i>Scannen und Auswertung</i> .....	128
<b>7.6</b>	<b>Arbeiten mit Proteinen</b> .....	<b>128</b>
7.6.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	128
7.6.2	Coomassie-Färbung und Silberfärbung von Proteingelen .....	129
7.6.3	Western Blot.....	130
7.6.3.1	<i>Nass-Transfer und Semidry-Verfahren</i> .....	130
7.6.3.2	<i>Immundetektion von Proteinen</i> .....	131
7.6.3.3	<i>Strippen</i> .....	131
7.6.4	Protein-Überexpression in <i>Escherichia coli</i> .....	131
7.6.5	Herstellung von pro- und eukaryontischen Zelllysaten und Nachweis der zellulären Proteinmenge .....	132
7.6.6	Herstellung von löslichen Rezeptordomänen und Multimerisierung der Domänen	132
7.6.7	Bakterien-Rezeptor-Interaktionsstudien.....	132
7.6.7.1	<i>Bakterien-Pulldown mit löslichen, fluoreszenzmarkierten Rezeptordomänen</i> .....	132
7.6.7.2	<i>Bakterien-Pulldown mit Rezeptor-enthaltenden Zelllysaten</i> .....	133
7.6.7.3	<i>Rezeptor-Overlay-Assay mit Bakterien im Dot Blot Format</i> .....	133
7.6.8	Durchflußzytometrie .....	134
7.6.8.1	<i>Bestimmung der Interaktion zwischen GFP-markierten Rezeptordomänen und Bakterien mittels Durchflußzytometrie</i> .....	134

---

7.6.8.2	<i>Bestimmung der Transfektionseffizienz in Zellen mittels Durchflußzytometrie</i> .....	134
<b>7.7</b>	<b>Infektionsexperimente</b> .....	<b>135</b>
7.7.1	Antibiotika-Protektions-Assay .....	135
7.7.2	Infektion von Zellen für die Analyse durch konfokale Laser-Scanning Mikroskopie . .....	136
<b>7.8</b>	<b>Immunfluoreszenzfärbung und Konfokalmikroskopie</b> .....	<b>136</b>
7.8.1	Doppelimmunfluoreszenzfärbung zur Färbung von extra- und intrazellulären Bakterien und einem eukaryontischen Markerprotein .....	136
7.8.2	Konfokale Mikroskopie.....	137
<b>8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>138</b>
<b>9</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>140</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>142</b>
<b>11</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>156</b>
<b>11.1</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	<b>156</b>
<b>11.2</b>	<b>Plasmide</b> .....	<b>158</b>
<b>11.3</b>	<b>Publikationen</b> .....	<b>162</b>
<b>11.4</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>163</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Gattung *Neisseria*

Die Vertreter der Gattung *Neisseria* sind gram-negative, unbewegliche und sporenlose Diplokokken von 0,6-1,5µm Größe, die auf die Besiedlung von Schleimhäuten spezialisiert sind. Neben einigen harmlosen Kommensalen der Schleimhautflora, wie *Neisseria cinerea*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria lactamica* oder *Neisseria sicca*, gehören der Gattung auch die humanspezifischen Pathogene *Neisseria gonorrhoeae* (Gonokokken) und *Neisseria meningitidis* (Meningokokken) an. Während das 1879 von Albert Neisser zum ersten Mal beschriebene Bakterium *Neisseria gonorrhoeae* eine der bekanntesten Erkrankungen aus der Gruppe der sexuell übertragbaren Krankheiten, die Gonorrhoe, verursacht, stellt das von Anton Weichselbaum 1887 entdeckte Bakterium *Neisseria meningitidis* einen Erreger der eitrigen Hirnhautentzündung dar.

## 1.2 Pathogene Neisserien - Epidemiologie und klinischer Verlauf der Neisserien-Infektionen

*Neisseria meningitidis* ist einer der häufigsten Erreger der bakteriellen Meningitis und verursacht jährlich etwa 500000 Erkrankungen weltweit (Wilder-Smith und Memish, 2003). Besonders häufig treten Meningokokken-Infektionen in China, Brasilien und dem „Meningokokkengürtel“ auf, der sich von Westafrika bis nach Äthiopien erstreckt (Achtman et al., 1997). In den industrialisierten Ländern treten Meningokokkenerkrankungen meist sporadisch auf, die sich besonders im späten Winter und im Frühjahr häufen. In Deutschland liegt die Zahl der jährlich infizierten Personen bei 750, von denen etwa 10% an der Erkrankung sterben (Nationales Referenzzentrum für Meningokokken; [www.meningococcus.de](http://www.meningococcus.de)). Unbehandelt beträgt die Letalität der Meningokokken-Meningitis 85%. Kinder und Erwachsene unter 30 Jahren erkranken am häufigsten, wobei Kleinkinder im Alter von 6 Monaten bis 2 Jahren besonders gefährdet sind, da sie keine natürliche Immunität besitzen (Gold et al., 1978).

Meningokokken werden aufgrund der Zusammensetzung ihrer Polysaccharidkapsel in 13 Serogruppen eingeteilt (A, B, C, 29E, H, I, K, L, M, W-135, X, Y und Z), von denen fünf ernstzunehmende Krankheiten verursachen können, nämlich die Serogruppen A, B, C, W-135 und Y. Die überwiegende Mehrzahl der Infektionen in Deutschland sind auf Serogruppe B und C zurückzuführen. Laut dem Nationalen Referenzzentrum für Meningokokken erkrankten

zwischen 1993 und 2001 73% der Patienten an Serogruppe B und 21% an Serogruppe C. Eine Impfprophylaxe, basierend auf gereinigten Kapselpolysacchariden, existiert bislang nur für Stämme der Serogruppen A, C, W-135 und Y. Für Meningokokken der Serogruppe B existiert noch kein Vakzin, da die Kapselpolysaccharide dieser Serogruppe lediglich eine schwach immunogene Wirkung besitzen und eine antigene Kreuzreaktion mit humanem embryonalem Hirngewebe besteht (Finne, 1983).

Meningokokken werden durch Tröpfcheninfektion übertragen und besiedeln hauptsächlich die Schleimhaut des oberen Respirationstraktes. Dort können die Erreger auf der Schleimhaut verweilen, ohne Krankheitserscheinungen auszulösen. In der Tat tragen, je nach Altersgruppe, etwa 20 – 30% der gesunden Bevölkerung Meningokokken auf der Schleimhaut. In seltenen Fällen durchqueren diese Bakterien das Schleimhautepithel und gelangen in die Blutbahn, wo sie eine Sepsis verursachen. Im Verlauf der Sepsis werden Endothelzellen zerstört, Gefäßwände entzündet und Thrombosen und Nekrosen können sich entwickeln. Eine besonders fulminant verlaufende Form der Sepsis stellt das Waterhouse-Friderichsen-Syndrom dar. Diese Form kommt bei etwa 15% der Sepsis-Patienten vor und endet unbehandelt immer tödlich. Bei etwa 40% der Patienten mit einer Meningokokken-Sepsis überwinden die Erreger die Blut-Hirn-Schranke, dringen in das Zentrale Nervensystem ein und verursachen dort die meist letale Meningokokken-Meningitis.

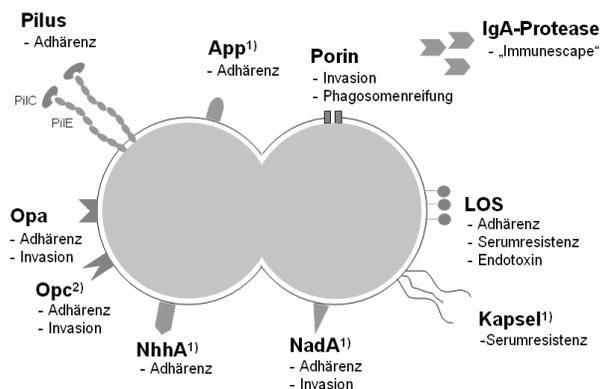
*Neisseria gonorrhoeae* ist der Erreger der Gonorrhoe, einer Geschlechtskrankheit, die durch direkten Schleimhautkontakt übertragen wird. Die Gonorrhoe wurde bereits im alten Testament beschrieben und stellt nach wie vor eine der häufigsten venerischen Erkrankungen des Menschen dar. So werden jährlich etwa 70 Millionen Menschen neu infiziert (World Health Report, 1995). In den Vereinigten Staaten beläuft sich die Neuinfektionsrate auf 50000 Fälle pro Jahr, wohingegen die Zahl der in Deutschland gemeldeten Inzidenzen bei 1000-2000 Fällen pro Jahr liegt. Allerdings ist die Dunkelziffer der Neuinfektionen in Deutschland wahrscheinlich um einen Faktor zehn höher, da im Jahr 2000 die Meldepflicht für die Gonorrhoe abgeschafft wurde (Epidemiologisches Bulletin – RKI; September 2001/Nr. 38).

Aufgrund der besonderen Übertragungsweise werden bei einer Gonokokkeninfektion hauptsächlich die Schleimhäute des Harnleiters und des Gebärmutterhalses besiedelt. Allerdings können auch die Schleimhäute des oberen Respirationstraktes, des Rektums, sowie die Bindehaut vor allem bei Neugeborenen befallen werden (Handsfield, 1990). Letzteres stellt vor allem in Entwicklungsländern ein großes Problem dar, da diese Augeninfektion dort nach wie vor eine häufige Ursache für frühkindliche Blindheit ist (Laga et al., 1989).

Die klinischen Symptome der Gonorrhoe unterscheiden sich drastisch zwischen Männern und Frauen. Bei männlichen Infizierten kommt es innerhalb von 2-5 Tagen nach Übertragung des Erregers zu einer schmerzhaften eitrigen Entzündung der Harnröhre, die durch eine massive Infiltration des betroffenen Gewebes durch polymorphkernige Granulozyten charakterisiert ist. Im Gegensatz dazu verläuft die Erkrankung bei Frauen meist in einer milden Vaginitis, die von vaginalen Infektionen, verursacht durch andere Organismen, schwer zu unterscheiden ist. Da die Krankheit bei Frauen oft mild oder gar asymptomatisch verläuft, kommt den Patientinnen eine große Rolle als potentielle Infektionsquelle zu. Unbehandelte Gonorrhoe kann zu schweren Komplikationen führen. So können Gonokokken bei weiblichen Patienten eine Salpingitis (Eileiterentzündung) verursachen und über eine aufsteigende Infektion alle oberen Geschlechtsorgane und den gesamten Beckenbereich infizieren (PID; *pelvic inflammatory disease*). Dies kann zur Sterilität der Patientinnen führen. Des Weiteren treten bei 1-5% der Gonorrhoe-Patienten serumresistente Erreger in die Blutbahn über und verursachen eine disseminierte Gonokokkeninfektion (DGI; *disseminated gonococcal disease*), die sich in Hautinfektionen, Arthritis, Perikarditis und Sepsis äußern kann.

### 1.3 Virulenzfaktoren pathogener Neisserien zur Etablierung einer Infektion

Pathogene Neisserien haben zahlreiche Faktoren und Mechanismen entwickelt, um den menschlichen Körper erfolgreich zu besiedeln und der Immunabwehr zu entgehen (Abb. 1.1).

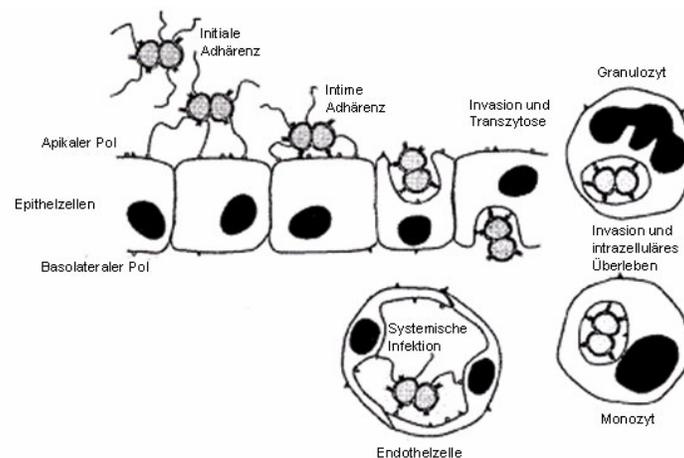


**Abb. 1.1:** Wichtige Virulenzfaktoren von *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* (modifiziert nach Dehio et al., 2000).

<sup>1)</sup> Diese Virulenzfaktoren kommen ausschließlich in Meningokokken vor

<sup>2)</sup> In Meningokokken spielt Opc eine Rolle bei der Adhärenz und Invasion. Die Funktion des Opc Homologs in Gonokokken ist noch nicht geklärt

Der erste Schritt bei der Etablierung einer Infektion mit pathogenen Neisserien ist die Adhärenz an die apikale Seite des Schleimhautepithels. Das Anhaften an das Gewebe ist eine wichtige Voraussetzung für die Kolonisierung, da so einer Entfernung durch mechanische Kräfte entgegengewirkt werden kann. Die initiale Adhärenz der Bakterien an das Epithel erfolgt mittels TypIV Pili (Abb. 1.2). Nach Retraktion der Pili kommt es zu einem sehr engen Kontakt der Bakterien mit der Wirtszelle, an dem Adhäsine, wie z.B. Opa-Proteine oder Opc beteiligt sein können (intime Adhärenz). Diese Interaktion kann zur Aufnahme der Bakterien in die Zellen und zur Transzytose in tiefergelegene, subepitheliale Gewebe führen (Wang et al., 1998). Interaktionen zwischen Neisserien und professionellen Phagozyten (Granulozyten und Monozyten) resultieren in einer Opsonin-unabhängigen Aufnahme der Bakterien (Hauck et al., 1998). Interaktionen der Neisserien mit endotheliale Gewebe können zum Eindringen in den Blutstrom und zur Disseminierung der Infektion führen. Dabei verleiht die Polysaccharidkapsel der Meningokokken bzw. die Sialylierung des Lipooligosaccharides von Meningokokken und Gonokokken den Bakterien Resistenz gegenüber dem Serum. Auch die Sekretion einer „Antikörper-zerstörenden“ Protease sowie die Fähigkeit der Bakterien verschiedene Oberflächenstrukturen durch Variation zu verändern, verhilft pathogenen Neisserien, der Abwehr des Immunsystems zu entkommen.



**Abb 1.2: Schematische Darstellung verschiedener Stadien der Infektion mit pathogenen Neisserien auf zellulärer Ebene** (modifiziert nach Dehio et al., 2000).

In den folgenden Kapiteln sollen die wichtigsten Virulenzfaktoren pathogener Neisserien beschrieben werden.

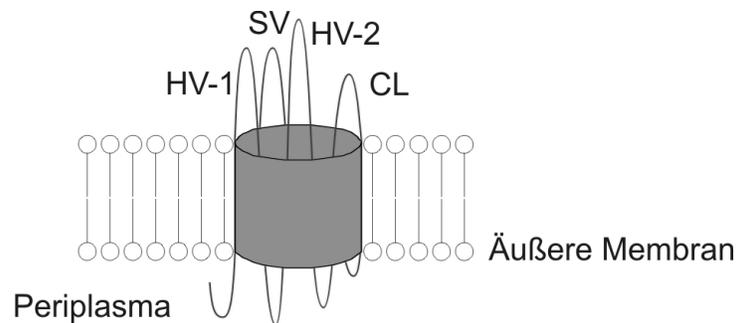
### 1.3.1 Pili

Die Pili pathogener Neisserien gehören zur Gruppe der TypIV Pili und haben unterschiedliche Funktionen. Neben ihrer Beteiligung bei der bakteriellen Interaktion mit dem Wirt, vermitteln diese filamentösen Strukturen pathogener Neisserien die Autoagglutination der Bakterien, eine gleitende Motilität sowie die Aufnahme exogener, Gattungsspezifischer DNA (Ryll et al., 1997; Fussenegger et al., 1997; Merz et al., 2000). Für die Aufnahme der neisseriellen DNA ist eine bestimmte Sequenz, die so genannte neisserielle Aufnahmesequenz (GCCGTCTGAA) notwendig (Elkins et al., 1991). TypIV-Pili pathogener Neisserien setzen sich aus verschiedenen Pilus-assoziierten Proteinen sowie der Haupt-Untereinheit PilE bzw. Pilin zusammen (Meyer et al. 1984). Die Pilinuntereinheiten bilden eine helikale, flexible Struktur, an deren Spitze das eigentliche Adhäsın PilC gelagert ist (Rudel et al., 1995b). PilC stellt ein 110 kDa großes Protein dar, das neben seiner Funktion als Adhäsın auch bei der Pilus-Biosynthese (Jonsson et al., 1991) benötigt wird und bei der natürlichen Transformationskompetenz der pathogenen Neisserien eine wichtige Rolle spielt (Rudel et al., 1995a, Hamilton et al, 2006). Der zelluläre Pilus-Rezeptor scheint das Protein CD46 (*membrane cofactor protein*) zu sein (Kallstrom et al., 1997) - allerdings konnte bis heute noch keine direkte Interaktion zwischen CD46 und PilC nachgewiesen werden. CD46 wird von allen humanen Zellen mit Nukleus exprimiert und dient als Regulator des Komplementsystems. Aus neueren Untersuchungen geht jedoch hervor, dass TypIV Pili pathogener Neisserien auch unabhängig von CD46 mit Epithelzellen interagieren können (Kirchner et al., 2005).

Die Pili stellen aufgrund ihrer exponierten Lage auf der Zelloberfläche besonders immunogene Strukturen von Bakterien dar (Jones et al., 1980; Nicolson et al., 1987). Um der gegen die Pili gerichteten Immunantwort zu entgehen, haben pathogene Neisserien daher einen sehr effektiven Adaptionsmechanismus entwickelt: die antigene Variation. Unter dem Begriff antigene Variation versteht man die substanzielle Strukturveränderung von Oberflächenproteinen, die zu einer veränderten immunologischen Erkennung führen kann (Henderson et al., 1999). Die antigene Variation der neisseriellen Pili basiert auf RecA-abhängigen Rekombinationsereignissen zwischen mehreren über das Genom verteilten, nicht transkribierten (stillen) Genloci (*pilS*) und zwei transkriptionell aktiven Genen für PilE (*pilE1* und *pilE2*) (Gibbs et al., 1989; Meyer 1990). Durch eine RecA-abhängige Rekombination von so genannten Minikassetten zwischen den aktiven *pilE* Genen und den stillen *pilS* Genen entstehen Variationen in der Aminosäuresequenz im immundominanten Teil des Pilins. (Haas und Meyer, 1986; Koomey et al., 1987; Gibbs et al., 1989).

### 1.3.2 Opa-Proteine

Eine weitere wichtige Gruppe virulenz-assoziiierter Proteine pathogener Neisserien sind die *opacity associated* (Opa) Proteine. Diese Proteine fungieren als Adhäsine und haben eine tragende Funktion bei der Kolonisierung und Invasion von Wirtszellen (Wolff et al., 1995). Opa-Proteine gehören zur Klasse 5 der äußeren Membranproteine und geben den Kolonien ein opaques Erscheinungsbild (Stern et al., 1986). Strukturvorhersagen zufolge sind alle Opa-Proteine aus einem  $\beta$ -barrel mit acht Transmembrandomänen und vier extrazellulären Schleifen (*loops*) aufgebaut (Abb. 1.3). Während einer dieser *loops* in allen Opa-Proteinen hoch konserviert ist, enthalten drei dieser *loops* variable Sequenzen, die als hypervariable (HV-1, HV-2) und semivariable Domänen (SV) bezeichnet werden (Malorny et al., 1998). Diese variablen Bereiche der Opa-Proteine sind wahrscheinlich für verschiedene biologische Charakteristika der individuellen Opa-Varianten verantwortlich.



**Abb. 1.3: Schematische Struktur der Opa-Proteine.** Die Opa-Proteine sind integrale Bestandteile der äußeren Membran und sind strukturell mit den klassischen Porinen von gramnegativen Bakterien verwandt. Sie bilden ein  $\beta$ -barrel mit acht transmembranen Domänen und vier extrazellulären *loops*. In den extrazellulären *loops* befinden sich die semivariablen (SV) und hypervariablen (HV-1 und HV-2) Regionen sowie eine konservierte Region (CL) (modifiziert nach Grant et al., 1999).

Opa-Proteine werden von *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* exprimiert. Auch einige kommensale *Neisseria* Spezies zeichnen sich durch den Besitz von Opa-ähnlichen Proteinen aus (Hauck und Meyer, 2003; Toleman et al., 2001). Der am Besten untersuchte Gonokokkenstamm *Neisseria gonorrhoeae* MS11 besitzt in seinem Genom elf unterschiedliche Genkopien für Opa-Proteine (Bhat et al., 1992). Im Gegensatz dazu kodieren Meningokokken lediglich für bis zu vier verschiedene Opa-Proteine (Stern et al., 1987). Da jeder Neisserienstamm ein differentielles Repertoire an *opa* Genen besitzt, konnten bereits viele verschiedene *opa* Allele identifiziert werden (Malorny et al., 1998). Die Expression der Opa-Proteine unterliegt der Phasenvariation und kann somit unabhängig voneinander „an-“

und „abgeschaltet“ werden. Die Phasenvariation der Opa-Proteine basiert im Gegensatz zum Pilin auf einem RecA-unabhängigen Mechanismus, der als „*slipped-strand mispairing*“ bezeichnet wird (Stern et al., 1986; Murphy et al., 1989; Henderson et al., 1999). Entscheidend für diese Form der Phasenvariation sind repetitive Pentanukleotidsequenzen (CTCTT) in der codierenden Region der aminoterminalen Signalsequenz der *opa* Gene. Bei der Replikation des Bakterienchromosoms kann es aufgrund dieser repetitiven Sequenzen zu einer Fehlpaarung der beiden DNA-Stränge (*slipped strand mispairing*) kommen. Diese Fehlpaarung führt zu einer Veränderung der Anzahl der repetitiven Einheiten und damit zu einer Verschiebung des Leserasters. Abhängig vom Leseraster wird die transkribierte RNA daher in funktionelle oder in unvollständige, nicht-funktionelle Opa-Proteine translatiert. Als Folge der phasenvariablen Opa-Expression entstehen heterogene Populationen mit Neisserien, die entweder keines, eines oder mehrere Opa-Proteine exprimieren. Ein Vorteil der differentiellen Expression der Opa-Proteine ist vermutlich der Wirtszelltropismus, der durch die unterschiedliche Rezeptorerkennung der Opa-Varianten vermittelt wird.

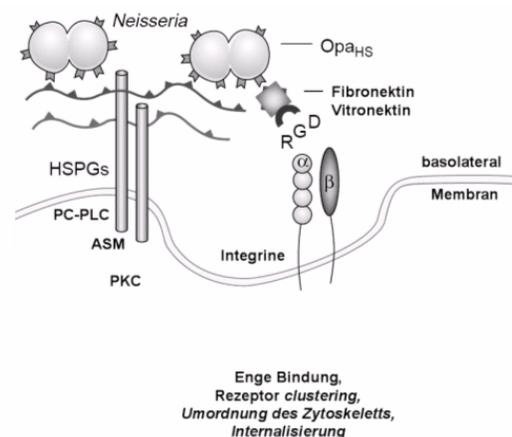
Bislang wurden zwei Klassen von Opa-Proteinen identifiziert, die sich in ihrer Bindungsspezifität an humane Zellrezeptoren unterscheiden (Hauck und Meyer, 2003). Die eine Klasse bindet an Heparansulfatproteoglykane (HSPG) und wird als Opa<sub>HSPG</sub> bezeichnet (Kapitel 1.3.2.1). Dieser Klasse gehören nur wenige Opa-Varianten an, wie z.B. Opa<sub>30</sub> (bzw. als plasmidkodierte Variante als Opa<sub>50</sub> bezeichnet) von *Neisseria gonorrhoeae* MS11 oder Opa<sub>27,5</sub> von *Neisseria gonorrhoeae* VP1. Die Mehrzahl der Opa-Proteine bindet an Mitglieder der CEACAM (*carcinoembryonic antigen related cellular adhesion molecule*)-Familie (z.B. Opa<sub>52-60</sub> von *Neisseria gonorrhoeae* MS11). Mit CEACAMs interagierende Opa-Varianten werden unter Opa<sub>CEA</sub>-Proteine klassifiziert (Kapitel 1.3.2.2).

### 1.3.2.1 Opa<sub>HSPG</sub> vermittelte Interaktion mit Epithelzellen

Heparansulfatproteoglykane (HSPG) sind häufige Membranproteine auf der Oberfläche tierischer Zellen, die in GPI-verankerte Glypikane oder transmembrane Syndekane eingeteilt werden können. Neben der Funktion als akzessorische Moleküle bei der Zellverankerung, Zellwachstum, Signaltransduktionsprozessen und der Zytoskelettorganisation stellen Heparansulfatproteoglykane auch Rezeptoren für Opa<sub>HSPG</sub>-Proteine von Neisserien dar (Hauck and Meyer, 2003). Die Wechselwirkung zwischen Neisserien und den Proteoglykanen beruht auf der Interaktion zwischen positiv geladene Aminosäuren der Opa-Proteine in der hypervariablen Region 1 (HV-1) mit den negativ geladenen Heparansulfatseitenketten der

Rezeptoren (Virji et al., 1995; Virji et al., 1999b; Grant et al., 1999). Die Invasion  $Opa_{HSPG}$  exprimierender Neisserien wird über Syndekan-1 und Syndekan-4 vermittelt. Dieser Invasionsmechanismus ist bis auf die molekulare Ebene relativ gut charakterisiert. So führt die Adhärenz der Bakterien an diese Rezeptoren in bestimmten Epithelzellen (Chang, ME-180) zu einer Umordnung des Zytoskeletts, was letztendlich zur Aufnahme der Bakterien in die Zellen führt. Für diesen Invasionsmechanismus ist die Aktivierung der Phosphatidylcholin-abhängigen Phospholipase C (PC-PLC) und der sauren Sphingomyelinase (ASM) essentiell, welche die Generierung der sekundären Botenstoffe Diacylglycerin und Ceramid bewirken (Grassme et al., 1996; Grassme et al., 1997). Diese sekundären Botenstoffe induzieren vermutlich über die Proteinkinase C die Reorganisation des Aktinzytoskeletts und somit die Invasion der Neisserien (Spiegel et al., 1996; Keenan und Kelleher, 1998).

Interessanterweise erfordert die effiziente Internalisierung der Neisserien in einigen Epithelzellen (HeLa, CHO, HEP-2) eine zusätzliche Interaktion mit Vitronektin oder Fibronektin. Durch diese als Brückenmoleküle fungierenden Serum- und extrazelluläre Matrixkomponenten binden  $Opa_{HSPG}$ -Proteine indirekt an  $\alpha_v\beta_3$ - und  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine, was letztendlich zu einer effizienten Internalisierung der Neisserien führt (Abb. 1.4).

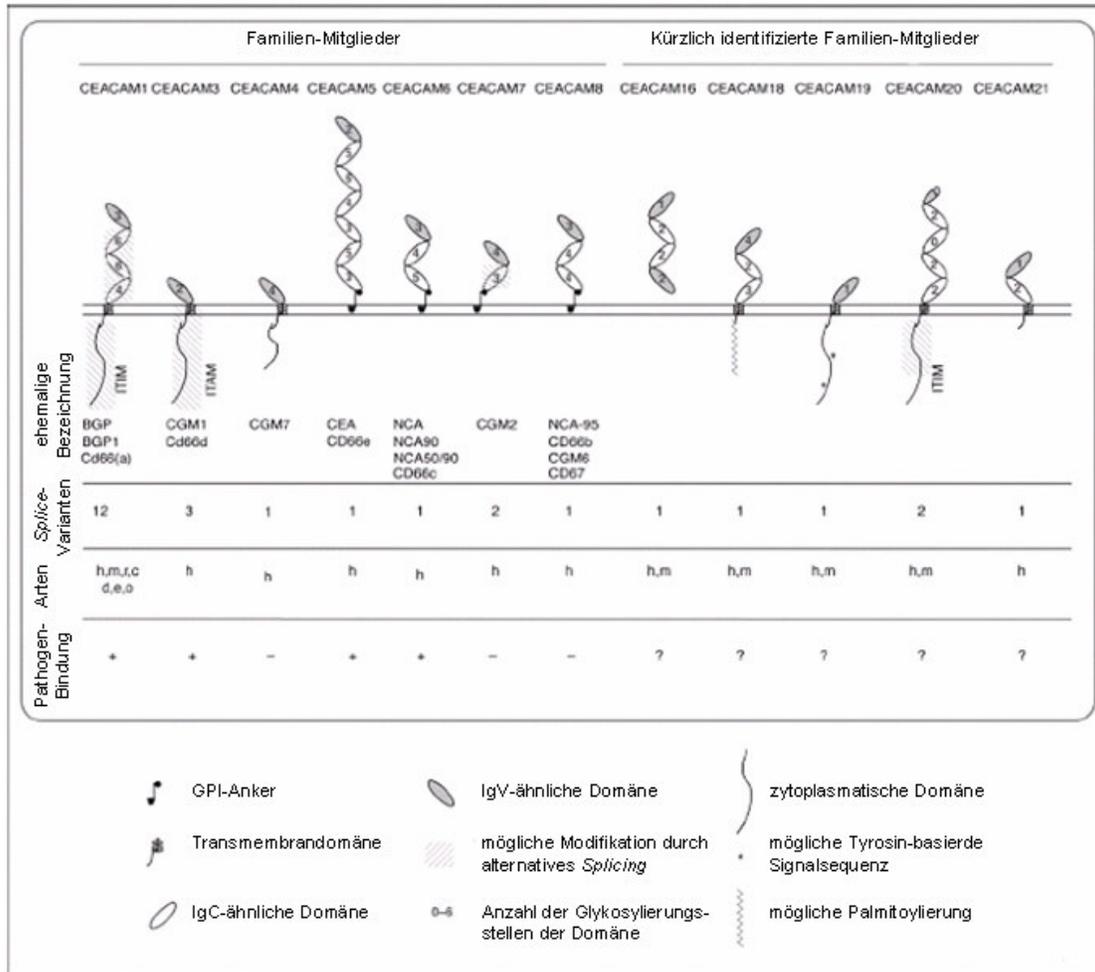


**Abb. 1.4: Adhärenz und Invasion  $Opa_{HSPG}$ -exprimierender Neisserien über Heparansulfatproteoglykan** (Hauck and Meyer, 2003)

### 1.3.2.2 $Opa_{CEA}$ -vermittelte Interaktion mit CEACAMs

Neben den Heparansulfatproteoglykanen, die spezifisch von  $Opa_{HSPG}$ -exprimierenden Neisserien erkannt werden, bindet eine weitere Klasse von Opa-Proteinen, die  $Opa_{CEA}$ -Proteine, an verschiedene Mitglieder der *carcinoembryonic antigen related cell adhesion*

*molecule* (CEACAM)-Familie. CEACAMs gehören zusammen mit den *pregnancy specific glycoproteins* (PSG) zur CEA Genfamilie, die der Immunglobulin-Überfamilie zuzuordnen ist (Hammarström, 1999). Bis heute wurden 12 verschiedene Mitglieder der CEACAM-Familie beim Menschen identifiziert, die von verschiedensten Zelltypen, wie Epithelzellen, Endothelzellen, lymphoiden und hämatopoetischen Zellen exprimiert werden (Abb. 1.5).

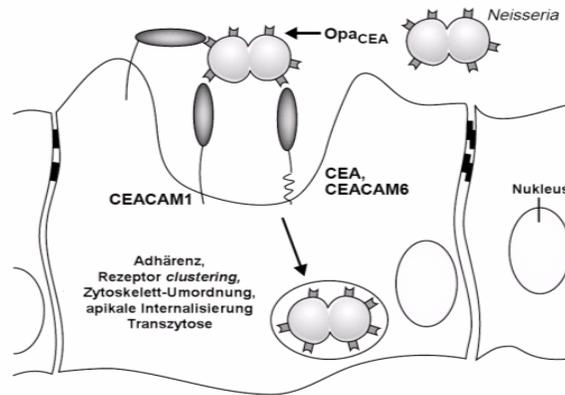


**Abb. 1.5: Mitglieder der CEACAM-Familie** (modifiziert nach Kuespert et al., 2006).

CEACAM Moleküle sind hochglykosylierte Membranproteine die sich aus zwei Arten von Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen zusammensetzen: der stark konservierten aminoterminalen Domäne, die homolog zu der Ig-variablen Domäne ist (IgV-ähnliche Domäne), gefolgt von bis zu sechs Domänen, die ähnlich der IgC2-konstanten Domäne sind (IgC-ähnliche Domäne) (Thompson et al., 1991). Diese extrazellulären, globulinähnlichen

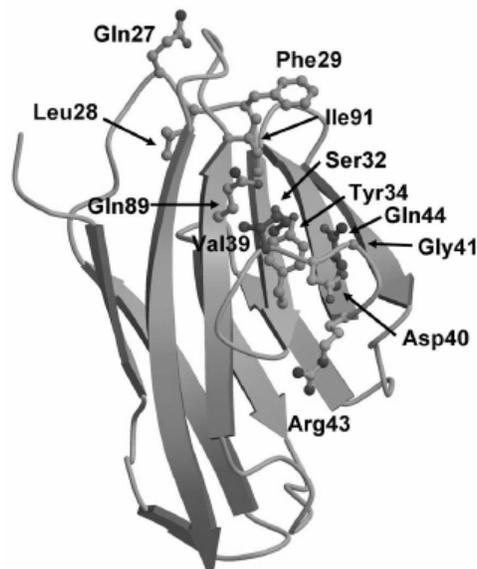
Domänen sind entweder über eine Transmembrandomäne, die in einer zytoplasmatischen Domäne endet, mit der Membran verbunden oder über einen Glykosylphosphatidylinositolrest in der Zellmembran verankert (Oikawa et al., 1987; Paxton et al., 1987). Lediglich CEACAM16, ein erst kürzlich entdecktes Mitglied der Familie, kommt ausschließlich als sekretiertes Protein vor und besitzt im Gegensatz zu den anderen humanen CEACAMs zwei anstatt eine IgV-ähnliche Domäne (Zebhauser et al., 2005).

Die physiologischen Funktionen der CEACAM Moleküle sind bis heute noch unzureichend geklärt, dennoch scheinen diese Proteine multifunktionelle Eigenschaften zu besitzen. Beispielsweise scheint eine Dysregulation der CEACAM-Expression in verschiedenen Geweben mit der malignen Entartung der Zellen zu korrelieren (Hsieh et al., 1999; Kunath et al., 1995). Darüber hinaus spielen verschiedene Mitglieder der CEACAM-Familie eine Rolle bei der Zell-Zelladhäsion durch homo- und heterophile Interaktion mit CEACAM Molekülen auf benachbarten Zellen und durch Interaktion mit anderen Liganden, wie E-Selektin (Oikawa et al., 1991; Oikawa et al., 2000; Watt et al., 2001; Kuijpers et al., 1992; Stocks und Kerr, 1993). Heterophile Interaktionen wurden auch mit verschiedenen Pathogenen beschrieben. Beispielsweise interagieren *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* mit ihren Adhäsinen Protein P5 bzw. UspA1 mit CEACAM1 (Virji et al., 2000; Hill und Virji, 2003; Hill et al., 2001). Auch *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* binden mit Op<sub>CEA</sub>-Proteinen an verschiedene Mitglieder der CEACAM-Familie. Bis heute wurden vier Mitglieder der humanen CEACAM-Familie, nämlich CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 und CEACAM6, identifiziert, die mit einem oder mehreren Op<sub>CEA</sub>-Proteinen pathogener Neisserien interagieren können. Die Interaktion der Bakterien mit diesen Rezeptoren löst Signalkaskaden aus, die zur Aufnahme der Bakterien führen und auch andere Effekte hervorrufen (Abb. 1.6) Diese Prozesse werden für CEACAM1 und CEACAM3 in Kapitel 1.3.2.3 und Kapitel 5 näher beschrieben. Im Gegensatz zu diesen Molekülen konnte noch keine Assoziation zwischen den neisseriellen Op<sub>CEA</sub>-Adhäsinen und CEACAM4, CEACAM7 und CEACAM8 festgestellt werden (Virji et al., 1996b; Gray-Owen et al., 1997b; Bos et al., 1997; Chen et al., 1997; Muenzner et al., 2000). Bei den erst vor kurzem identifizierten CEACAMs (CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19, CEACAM20, CEACAM21) (Zebhauser et al., 2005) liegen noch keine Untersuchungen zur Op<sub>CEA</sub>-CEACAM Interaktion vor.



**Abb. 1.6:** CEACAM-vermittelte Invasion von Epithelzellen (modifiziert nach Hauck und Meyer, 2003)

Interessanterweise erfolgt die Assoziation der  $\text{Opa}_{\text{CEA}}$ -Proteine mit den hochglykosylierten CEACAM Molekülen in nicht-glykosylierten Bereichen der aminoterminalen Domäne des Rezeptors und stellt eine reine Protein-Protein Interaktion dar. Dabei sind spezifische Aminosäurereste auf separaten  $\beta$ -Faltblättern im C''C'FCFG-Bereich der aminoterminalen Domänen an der Interaktion mit  $\text{Opa}_{\text{CEA}}$ -Proteinen beteiligt (Abb. 1.7) (Bos et al., 1998; Popp et al., 1999; Virji et al., 1999a).



**Abb. 1.7:** Struktur der aminoterminalen Domäne von CEACAM1. Die Struktur der aminoterminalen Domäne von CEACAM1 ist als Ribbon-Diagramm dargestellt. Aminosäurereste, die an Interaktionen mit  $\text{Opa}$ -Proteinen bzw. an homo- und heterophilen Interaktionen mit CEACAMs beteiligt sind, sind gesondert dargestellt. Tyr34 und Ile91 stellen wichtige Aminosäuren für die Interaktion mit allen  $\text{Opa}_{\text{CEA}}$ -Proteinen dar (aus Fedarovich et al., 2006).

Die Bindung der neisseriellen Adhäsine an diese Bereiche der aminoterminalen Domäne, deren Struktur 2006 von Fedarovich et al. aufgeklärt wurde (aminoterminaler Domäne von CEACAM1), erfolgt durch die hypervariablen Domänen in den extrazellulären *loops* der Opa<sub>CEA</sub>-Proteine. Dabei scheint die hypervariable Domäne HV-1 an der selektiven CEACAM-Erkennung beteiligt zu sein (Rest et al., 1989; Virji et al., 1999a; Bos et al., 2002). Die semivariable Domäne der Opa-Proteine spielt keine Rolle bei der Interaktion mit CEACAMs (Bos et al., 2002).

### 1.3.2.3 Opa<sub>CEA</sub>-vermittelte Interaktion mit CEACAM1 und CEACAM3

Das Hauptaugenmerk der CEACAM-Interaktionen mit pathogenen Opa<sub>CEA</sub>-exprimierenden Neisserien richtet sich auf CEACAM1 und CEACAM3. Diese Moleküle und die durch Opa<sub>CEA</sub>-Bindung ausgelösten Signalkaskaden werden daher im Folgenden näher beschrieben.

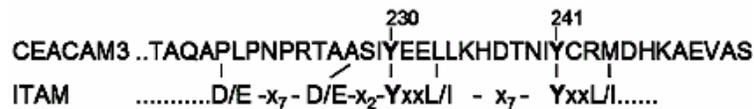
CEACAM1 ist das am weitesten verbreitete Molekül der CEACAM-Familie beim Menschen und kommt in zahlreichen Geweben vor (Epithelzellen, Endothelzellen, Lymphozyten, myeloiden Zellen). Interessanterweise existieren auch in anderen Säugetieren, darunter Nager, Hund, Elephant und Kuh, Homologe zu CEACAM1 (Obrink, 1997; Kammerer et al., 2004; Kuespert et al., 2006). Obgleich die humane Form nur eine 60-prozentige Identität und eine Konserviertheit von 83% mit den Nagerformen aufweist, sind viele Sequenzmotive in den zytoplasmatischen Domänen ähnlich oder sogar identisch. Daher können viele Ergebnisse zu molekularen Interaktionen der murinen Form von CEACAM1 auf die humane Form übertragen werden. So zeigten Untersuchungen an Mäusen, dass CEACAM1 an verschiedenen physiologischen Prozessen, wie der Angiogenese, dem Insulin-Stoffwechsel, der T-Zellregulation und der Tumorbildung beteiligt ist (Poy et al., 2002; Horst et al., 2006; Leung et al., 2006, Ergun et al., 2000). Neben der Involvierung in diesen Prozessen stellt humanes CEACAM1, nicht aber murines CEACAM1, einen Rezeptor für viele humanpathogene Bakterien dar.

Das Glykoprotein CEACAM1 tritt in 12 verschiedenen *Splice*-Varianten auf. Die individuellen Isoformen des Moleküls unterscheiden sich dabei in der Anzahl der extrazellulären IgC-ähnlichen Domänen, der Art der Membranverankerung und der Länge der zytoplasmatischen Domäne (Gray-Owen und Blumberg, 2006). Die Hauptisoform dieses Moleküls besteht aus der konservierten IgV-ähnlichen aminoterminalen Domäne, gefolgt von drei IgC-ähnlichen Domänen. Diese extrazellulären Domänen sind über eine Transmembrandomäne, an die sich eine lange zytoplasmatische Domäne anschließt, mit der

Membran verbunden (Abb. 1.5). Die lange zytoplasmatische Domäne von CEACAM1 besitzt zwei *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs* (ITIMs). Solche Motive können generell eine inhibierende Funktion bei verschiedenen zellulären Prozessen ausüben, wie beispielsweise der Aktivierung von B- und T-Zellen. Eine Stimulierung von ITIM-Rezeptoren führt auf molekularer Ebene zu einer Phosphorylierung der Tyrosin-Reste in den ITIMs durch Src-Kinasen. Dies resultiert in einer Rekrutierung und Aktivierung von Phosphatasen wie SHP-1 und SHIP. Die aktivierten Phosphatasen können dann durch Dephosphorylierung verschiedener Substrate ein Signal in den Zellen dämpfen oder gar unterdrücken (Ravetch und Lanier, 2000). Auch im Zusammenhang mit der Infektion pathogener Neisserien könnte dieses Motiv in CEACAM1 eine Rolle spielen. So konnten Boulton et al. (2002) zeigen, dass CEACAM1 in T-Lymphozyten nach Interaktion mit  $Op_{CEA}$ -exprimierenden Neisserien mit den Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 assoziiert. Die Interaktion hat eine Arretierung der Aktivierung und der Proliferation dieser Zellen zur Folge. Die Beobachtung, dass Gonorrhoe-Patienten eine reduzierte Anzahl an T-Lymphozyten im Blut haben, könnte mit diesem Vorgang in Verbindung stehen. Im Gegensatz zur möglichen Funktion des ITIM-Motivs bei diesem Vorgang, konnte eindeutig bewiesen werden, dass dieses Motiv bei CEACAM1-vermittelten Signaltransduktionsprozessen zur Internalisierung  $Op_{CEA}$ -exprimierender Bakterien keine Rolle spielt. So konnten Muenzner et al. (2007) zeigen, dass die Aufnahme  $Op_{CEA}$ -exprimierender Neisserien über CEACAM1 mit einer Deletion der zytoplasmatischen Domäne vergleichbar zu der mit wildtypischem CEACAM1 war und unabhängig vom Aktinzytoskelett erfolgte. Genaueres über diese von CEACAM1 durch  $Op_{CEA}$ -Interaktion ausgelöste Signalkaskade ist allerdings noch nicht bekannt und ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Zusätzlich gibt es noch einen weiteren sehr interessanten Effekt, der aus der Interaktion  $Op_{CEA}$ -exprimierender Neisserien mit CEACAM1 hervorgeht. So resultiert eine Interaktion  $Op_{CEA}$ -exprimierender Neisserien mit CEACAM1 zusätzlich in einer verstärkten Adhäsion der Epithelzellen an die extrazelluläre Matrix (Muenzner et al., 2005). Dieser Mechanismus scheint daher der Exfoliation der Zellen entgegen zu wirken und erleichtert somit die neisserielle Kolonisierung auf der menschlichen Schleimhaut. Eine effizientere Kolonisierung der Epithelzellen könnte auch durch die Tatsache gewährleistet werden, dass die Expression von CEACAM1 durch Neisserien-induzierte proinflammatorische Zytokine verstärkt wird (Muenzner et al., 2002).

Auch CEACAM3 erfährt große Aufmerksamkeit bezüglich der Interaktion mit  $Op_{CEA}$ -exprimierenden Neisserien. CEACAM3 ist ein besonderes Mitglied der CEACAM-Familie, da dieses Molekül ausschließlich auf humanen Granulozyten exprimiert wird und einen

neuartigen phagozytischen Rezeptor der angeborenen Immunantwort darstellt. So konnte Schmitter et al. (2004) zeigen, dass die Interaktion Op<sub>CEA</sub>-exprimierender Neisserien mit diesem Rezeptor zu einer effizienten Phagozytose und Eliminierung der Bakterien führt. CEACAM3 besteht aus einer stark konservierten extrazellulären IgV-ähnlichen aminoterminalen Domäne, die mit einer Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne verbunden ist (Abb. 1.5). In der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM3 findet sich eine *immunreceptor tyrosin-based activation motif* (ITAM)-ähnliche Sequenz (Reth 1989; Cambier 1995; Chen et al., 2001) (Abb. 1.8). Solche Sequenzen besitzen eine Schlüsselrolle für die Weitergabe aktivierender Signale in die Zelle und kommen beispielsweise auch bei verschiedenen Immunrezeptoren, wie z.B. Untereinheiten des T- und B-Zell Rezeptors sowie Mitgliedern der Fc-Rezeptor-Familie, vor (Cambier, 1995).



**Abb. 1.8:** Die ITAM-ähnliche Sequenz der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM3. Hervorgehoben sind die essentiellen Tyrosinreste (Y230 und Y241) im Vergleich zur Konsensussequenz des ITAM.

Interessanterweise spielen beide Tyrosinreste Y230 und Y241 des ITAM-ähnlichen Motivs bei der CEACAM3-vermittelten Signaltransduktionskaskade eine wichtige Rolle zur effektiven Aufnahme Op<sub>CEA</sub>-exprimierender Gonokokken (Schmitter et al., 2004). Bezüglich Y230 konnten Schmitter et al. (2007a) zeigen, dass der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav direkt an diesen durch Src-Kinasen phosphorylierten Tyrosinrest bindet und die kleine GTPase Rac stimuliert, die einen wichtigen Regulator des Aktinzytoskeletts darstellt. Die durch Rac ausgelösten Umordnungen des Aktinzytoskeletts führen dann zur Aufnahme der Gonokokken. Zusätzlich zu Y230 ist der Tyrosinrest Y241 an der CEACAM3 vermittelten Signalkaskaden zur Phagozytose der Bakterien beteiligt. So resultierten Invasionsassays mit Punktmutationen an diesem Aminosäurerest in einer reduzierten Aufnahme der Op<sub>CEA</sub>-exprimierenden Gonokokken (McCaw et al., 2003; Schmitter et al., 2004). Genauer zur Involvierung des Y241-Restes an der bakteriellen Aufnahme ist jedoch noch nicht bekannt. Möglicherweise spielt in diesem Zusammenhang eine Phosphatidyinositol-3-Kinase (PI-3 Kinase) eine Rolle. Booth et al. (2003) konnten zeigen, dass die Aktivität dieser Kinase notwendig für die CEACAM3-vermittelte Aufnahme der Op<sub>CEA</sub>-exprimierenden Gonokokken ist. Da ITAM-Motive Andockstellen für PI-3 Kinasen darstellen können

(Piccione et al., 1993), könnte dieser Tyrosinrest eventuell mit PI-3 Kinase in Verbindung stehen. Neben der ITAM-abhängigen, effektiven Internalisierung *Opa*<sub>CEA</sub>-exprimierender Gonokokken, kann die CEACAM3-vermittelte Aufnahme der Bakterien auch unabhängig vom ITAM-Motiv erfolgen (McCaw et al., 2003). Genauer über diesen relativ ineffizienten Aufnahmeweg ist allerdings noch nicht bekannt.

### 1.3.3 Opc-Protein

Ein weiteres virulenz-assoziiertes Protein pathogener Neisserien stellt Opc dar, das ebenso wie die Opa-Proteine zur Klasse 5 der Außenmembranproteine gehört. Opc ist ein bakterielles Adhäsion, das sich aus 10 Transmembransträngen und 5 oberflächenexponierten *loops* zusammensetzt. (Merker et al., 1997). Dieses Protein wird von den meisten *Neisseria meningitidis* Stämmen exprimiert (Seiler et al., 1996). Auch in Gonokokken konnte ein homologes Gen zu *opc* identifiziert werden, dessen Funktion jedoch noch nicht geklärt ist (Zhu et al., 1999). Die bisher bekannten Eigenschaften über Opc basieren daher auf Untersuchungen mit dem Opc-Protein aus Meningokokken. Ebenso wie die Opa-Proteine unterliegt *opc* der Phasenvariation, die jedoch auf transkriptioneller Ebene kontrolliert wird. Die Variation eines hochpolymeren Polycytidinstranges innerhalb der Promotorregion des *opc*-Gens kann zu einer starken, geringen oder fehlenden Expression des *opc*-Gens führen (Sarkari et al., 1994). Aus mehreren Untersuchungen geht hervor, dass Opc die Adhäsion und Invasion von Meningokokken an Epithel- und Endothelzellen vermitteln kann (Virji et al., 1992; Virji et al., 1993; De Vries et al., 1996; De Vries et al., 1998). Als Rezeptoren wurden Heparansulfatproteoglykane (HSPG) (De Vries et al., 1998). und verschiedene Integrine identifiziert. Wohingegen die Interaktion zwischen Opc und HSPG direkt ist, bindet Opc indirekt über die Brückenmoleküle Vitronektin und Fibronektin an  $\alpha_v\beta_3$ - bzw.  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine. Die Interaktion kann die Induktion von Signalkaskaden zur Folge haben, die zur Aufnahme der Bakterien führt. Die Aufnahme von Meningokokken scheint sowohl in Epithelzellen als auch in peripheren Endothelzellen (Huvec) in einem Kapsel-negativen Hintergrund stattzufinden. Interessanterweise konnte Unkmeir et al. (2002) jedoch zeigen, dass zerebralmikrovaskuläre Endothelzellen (HBMEC) auch eine Opc-abhängige Aufnahme von bekapselten Meningokokken vermitteln können. Insgesamt erscheint das Opc der Meningokokken als ein funktionelles Homolog der bei Gonokokken eingehend charakterisierten *Opa*<sub>HSPG</sub> Proteine.

### 1.3.4 Andere neisserielle Adhäsine

Neben den gut charakterisierten neisseriellen Adhäsinen wie TypIV Pili, Opa-Proteine und Opc konnten in den letzten Jahren in *Neisseria meningitidis* zusätzliche Proteine identifiziert werden, die als Adhäsine (App, MspA, NhhA) oder zusätzlich als Invasin (NadA) fungieren können (Serruto et al., 2003; Capecchi et al., 2005; Scarselli et al., 2006; Turner et al., 2006). Diese Proteine, zu denen es noch wenige Informationen gibt, gehören alle zur Familie der Autotransporter und werden in Kapitel 4.1 näher beschrieben.

### 1.3.5 IgA-Protease

Die IgA-Protease stellt einen weiteren Virulenzfaktor pathogener Neisserien dar, der zur „Entschärfung“ der IgA-Antikörper des Wirtes dient. Immunglobulin A ist der vorherrschende Antikörpertyp auf der Schleimhautoberfläche und in Sekreten des Menschen. Diese Antikörper erkennen spezifisch membrangebundene und sekretierte Antigene von Bakterien und Viren sowie Toxine der Bakterien (Plaut et al., 1975; Brandtzaeg et al., 1997). Um der Erkennung durch IgA zu entkommen, sezernieren pathogene Neisserien eine Serin-Protease, die spezifisch humanes IgA1, aber nicht IgA2 spaltet (Plaut et al., 1975). Die Spaltung des humanen IgA1 durch die IgA-Protease erfolgt in der so genannten *hing*-Region des IgA1 Moleküls. Diese sequenzspezifische Spaltung führt daher zur Entkopplung des F(ab)<sub>2</sub>-Teils, der die Antigenerkennung und -bindung vermittelt, vom Fc-Teil des Antikörpers, der für die Effektorfunktionen des Immunglobulins, wie beispielsweise Opsonierung für die Phagozytose bzw. Komplementfixierung verantwortlich ist (Plaut et al., 1975). Die Spaltung von Immunglobulin A1 scheint allerdings für die neisserielle Kolonisation des Menschen nicht unbedingt notwendig zu sein, da Gonokokkenmutanten, die keine IgA-Protease exprimieren, trotzdem männliche Gewebe invadieren können (Cooper et al., 1984; Johannsen et al., 1999). Neben der Funktion der Spaltung von IgA1, ist diese Protease in der Lage das humane, lysosomale Membranprotein hLAMP1 zu spalten (Hauck und Meyer, 1997; Lin et al., 1997). h-LAMP1 stellt einen Marker für späte Endosomen und Phagolysosomen dar und dient vermutlich dem Schutz der Vesikelmembran vor aggressiven Enzymen innerhalb des Lysosoms. Die Spaltung dieses Markers durch die IgA-Protease pathogener Neisserien führt zu einem vermehrten intrazellulären Überleben der Bakterien (Lin et al., 1997) und einer effizienteren Transzytose durch polarisierte Epithelzellen (Hopper et al., 2000). Die IgA-Protease scheint daher in diesem Kontext eine wichtige Rolle während der Gonokokkeninfektion zu spielen.

### 1.3.6 Porine

Porine sind die Hauptbestandteile der äußeren Membran gram-negativer Bakterien. Diese Proteine liegen im funktionellen Zustand als Homotrimere vor und bilden Poren, die als Transportkanäle für Ionen und Nährstoffe dienen (Benz, 1988). Auch pathogene Neisserien bilden solche Poren, die essentiell für das Überleben der Bakterien sind (Barlow et al., 1989; Gotschlich et al., 1987; Suker et al., 1994; van der Ley et al., 1991). *Neisseria meningitidis* exprimiert zwei Porine, das phasenvariable PorA und das PorB, das aufgrund von unterschiedlichen antigenen Eigenschaften in zwei Serotypen (PorB2, PorB3) unterteilt werden kann. *Neisseria gonorrhoeae* besitzt dagegen nur ein funktionelles Porin (PorB), von dem ebenfalls zwei Serotypen (P.IA, P.IB) existieren. Interessanterweise besitzt PorB eine zusätzliche Eigenschaft als Modulator zellulärer Apoptose, die es zu einem Virulenzfaktor macht. So kann PorB in die Zytoplasma- und Phagosomenmembran von Wirtszellen integrieren, wo es als Spannungs-abhängiger Ionenkanal von der Zelle durch Bindung von ATP/GTP an das Porin reguliert werden kann (Rudel et al., 1996). Auf noch ungeklärte Weise kann transloziertes Porin zu Mitochondrien der Wirtszelle gelangen, wo es apoptotische Vorgänge modifizieren kann. Im Gegensatz zu PorB aus Gonokokken, das in Epithelzellen und phagozytischen Zellen Apoptose induzieren kann, scheint PorB aus Meningokokken die Zellen vor Apoptose zu schützen (Muller et al., 1999; Muller et al., 2000; Massari et al., 2000).

### 1.3.7 Lipooligosaccharide

Das Lipooligosaccharid stellt die nach außen gewandte Lipidschicht der äußeren Membran von Neisserien dar. Dieser auch als Endotoxin fungierende Lipooligosaccharid-Komplex besteht aus einem membranständigen Teil, dem Lipid A, das mit einem Oligosaccharid verknüpft ist. Im Gegensatz zum Lipopolysaccharid (LPS) anderer gram-negativer Bakterien, besitzt das neisserielle Endotoxin keine O-spezifischen Seitenketten, so dass es meist als Lipooligosaccharid (LOS) bezeichnet wird (Kahler und Stephens, 1998; Preston et al., 1996). Der LipidA-Anteil dieses Komplexes ist für die toxische Wirkung des Endotoxins verantwortlich. Eingebunden in den LOS-Komplex oder als freie Substanz stimuliert LipidA zahlreiche proinflammatorische Zytokine wie z.B. Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), IL-8 oder IL-1a in Endothelzellen und Zellen des Immunsystems (Jerse und Rest, 1997; Hersh et al., 1998). Ebenso wie die zuvor beschriebenen Virulenzfaktoren unterliegt auch neisserielles LOS den Mechanismen der Phasen- und antigenen Variation. Die Variation erfolgt durch das

An- und Abschalten der Expression von Glykosyltransferasen, die an der Biosynthese des Lipooligosaccharides beteiligt sind (Burch et al., 1997; Yang und Gotschlich, 1996). Darüber hinaus kann LOS durch Sialylierung eines terminalen Galaktoserestes verändert werden. Die Sialylierung der LOS-Struktur kann zu einer erhöhten Serumresistenz der Bakterien und einem Schutz vor der Phagozytose durch PMNs und dem Abtöten durch das Komplementsystem führen. Des Weiteren kann sialyliertes LOS die Bindung der Neisserien an Epithel- und Endothelzellen unterdrücken (van Putten, 1993). Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass Meningokokken mit sialyliertem LOS mit bestimmten Lektinen myeloider Zellen interagieren (*sialic acid immunoglobulin like lectins* (Siglecs)) können, was eine verstärkte Phagozytose der Bakterien zur Folge hat (Jones et al., 2003). Diese Ergebnisse sind daher gegensätzlich zu den vorher beobachteten Effekten des sialylierten LOS pathogener Neisserien.

### 1.3.8 Polysaccharidkapsel

Im Gegensatz zu den Gonokokken besitzen die Meningokokken einen weiteren Virulenzfaktor, die Polysaccharidkapsel. Die Polysaccharidkapsel kann die Meningokokken während der systemischen Ausbreitung in Blut und Liquor vor den bakteriziden Eigenschaften des Serums und auch der Komplement-vermittelten Opsonisierung und Phagozytose schützen (Hammerschmidt et al., 1994). Meningokokkenstämme exprimieren verschiedene Kapseltypen, die sich in ihrer chemischen Struktur und den antigenen Eigenschaften unterscheiden. Basierend auf diesen Unterschieden können Meningokokken in 13 Serogruppen eingeteilt werden, von denen lediglich Serogruppe A, B, C, W135 und Y mit Meningokokken-Infektionen assoziiert sind. Das Hauptmolekül der Kapsel der Serogruppe A stellt N-Acetylmannosamin-1-Phosphat dar. Im Gegensatz dazu besteht das Kapselpolysaccharid der Serogruppen B, C, W135 und Y zum Teil oder ausschließlich aus N-Acetyl-Neuraminsäure (Sialinsäure). Während die Sialinsäuren der Serotypen W135 und Y mit Glukose und Galaktose in einer  $\alpha$ -2,6-Bindung verknüpft sind (Bhattacharjee et al., 1976), unterscheiden sich die Kapseln der Serogruppe B und C in der Art der Verknüpfung der langkettigen Sialinsäurepolymere (Serogruppe B:  $\alpha$ -2,8-Verknüpfung Serogruppe C  $\alpha$ -2,9-Verknüpfung) (Jennings et al., 1977). Interessanterweise existiert im neuronalen Gewebe ein Zelladhäsionsmolekül mit der Bezeichnung N-CAM, das eine nahezu identische Struktur zum Kapselpolysaccharid der Serogruppe B aufweist. Als Folge dieses antigenen Mimikry werden keine Antikörper gegen diese Kapselstruktur gebildet.

Die Kapsel stellt eine Oberflächenstruktur dar, die behindernd bei der Adhäsion an die Wirtszellen sein kann. Während TypIV Pili, App und NhhA in Anwesenheit der Kapsel an Epithelzellen binden können, wird die Interaktion zwischen Opa-Proteinen und dem Opc Protein mit den Epithelzellen stark behindert (Scarselli et al., 2006). Meningokokken sind daher in der Lage, ihre Kapsel phasenvariabel zu exprimieren. Die Phasenvariation der Kapsel beruht wie die der Opa-Proteine auf dem Mechanismus des *slipped strand mispairings* (Hammerschmidt et al., 1996). Ein Kapsel-negativer Phänotyp begünstigt dabei die Adhäsion und bakterielle Aufnahme durch die Wirtszelle, wohingegen ein Kapsel-positiver Phänotyp essentiell für das Überleben der Bakterien in Blut und Liquor ist.

## 1.4 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Interaktion pathogener Neisserien mit humanen CEACAMs und die daraus resultierenden molekularen Ereignisse auf zellulärer bzw. bakterieller Ebene genauer zu charakterisieren.

- Pathogene Neisserien können durch ihre Opa<sub>CEA</sub>-Proteine mit verschiedenen Molekülen der CEACAM-Familie interagieren. Die Untersuchung solcher Adhäsion-Rezeptor Interaktionen ist meist sehr zeitintensiv und liefert häufig nur semi-quantitative Daten. Aus diesem Grund sollte eine neue Methode entwickelt werden, die eine schnelle und quantitative Erfassung von Adhäsion-Rezeptor-Interaktionen ermöglicht (Kapitel 2).
- Über die durch Opa<sub>CEA</sub>-CEACAM Interaktion ausgelösten molekularen Vorgänge in pathogenen Neisserien gibt es bis heute noch keine Informationen. Aus diesem Grund sollte mit Hilfe der Mikroarray-Technologie ein Transkriptionsprofil von opa<sub>CEA</sub> von *Neisseria meningitidis* MC58 nach Interaktion mit CEACAM1 erstellt werden. Die Erstellung eines solchen Profils sollte die Identifikation von Opa<sub>CEA</sub>-stimulierten Virulenz-Genen ermöglichen (Kapitel 3).
- Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde entdeckt, dass *Neisseria meningitidis* MC58 unabhängig von Opa-Proteinen mit CEACAM1 interagieren kann. Da Opa-Proteine die bis heute einzig bekannten meningokokkale Liganden zu CEACAM1 darstellen,

- 
- wurde die Existenz eines weiteren Adhäsins in *Neisseria meningitidis* MC58 postuliert, das an dieser Interaktion beteiligt ist. Aus diesem Grund sollte die Interaktion der nicht-opaquer Meningokokken mit CEACAM1 näher analysiert werden und das mit CEACAM1 interagierende Adhäsins identifiziert werden (Kapitel 4).
- Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die Interaktion Opa<sub>CEA</sub>-exprimierender Neisserien mit phagozytischen Zellen, die verschiedene Mitglieder der CEACAM-Familie exprimieren, zur Stimulation der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) führt. Es sollte daher untersucht werden, welches Mitglied der CEACAM-Familie an dieser Aktivierung beteiligt ist und welche Rolle das aktivierte JNK in CEACAM-vermittelten Signaltransduktionsprozessen spielt (Kapitel 5).

## 2 Entwicklung einer Methode zur Erfassung von Neisserien-CEACAM Interaktionen

### 2.1 Einleitung

In der Regel beginnen infektiöse Prozesse durch pathogene Mikroorganismen mit der Besiedlung von Wirtsgeweben. Die Erreger binden dabei mit bestimmten Anheftungsfaktoren, so genannten Adhäsinen, an zelluläre Oberflächenstrukturen.

Interessanterweise nutzen fast alle bisher charakterisierten pathogenen Bakterien unterschiedliche Adhäsine, um an verschiedene eukaryontische Zelloberflächenstrukturen zu binden, wie z.B. einfache oder komplexe Kohlenhydrate in Form von Glykoproteinen oder Glykolipiden, sowie integrale Membranproteine wie Cadherine, Integrine oder Immunoglobulin-verwandte Zelladhäsionsmoleküle (IgCAMs). Die von *E. coli* exprimierten Adhäsine FimH oder SfaS assoziieren beispielsweise mit  $\alpha$ -Mannose-Resten bzw.  $\alpha$ -sialyl-2-3- $\beta$ -Galaktosidase-Resten (Abraham et al., 1988; Stins et al., 1994), wohingegen InlA aus *Listeria monocytogenes* an E-cadherin (Pizzaro-Cerda et al., 2004), Inv aus *Yersinia pseudotuberculosis* an  $\beta$ 1-Integrine (Grassl et al., 2003) oder Opa<sub>CEA</sub> Proteine aus *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* an CEACAMs (Hauck et al., 2003) binden.

Um Interaktionen zwischen Adhäsinen und Rezeptoren zu ermitteln, wurden bereits einige Methoden entwickelt. Adhäsin-Rezeptor-Interaktionen können beispielsweise durch Adhäsions- und Invasionsassays mit Rezeptor-transfizierten Zelllinien bzw. mit wildtypischen und Adhäsin-defizienten Bakterien nachgewiesen werden. Auch Rezeptor-Overlay-Assays oder Affinitätschromatographie mit gereinigten bakteriellen Adhäsinen stellen gängige Vorgehensweisen dar, um die Interaktionen zu analysieren. Ein beträchtlicher Nachteil dieser Praktiken besteht jedoch darin, dass sie entweder sehr zeitintensiv sind und/oder häufig nur semiquantitative Daten liefern. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine einfache Rezeptor-Bindungs-Methode entwickelt, die eine schnelle und quantitative Analyse von Rezeptor-Adhäsin-Interaktionen in einer Bakterienpopulation zulässt. Die Methode beruht auf der Inkubation einer Bakterienpopulation mit fluoreszenzmarkierten, löslichen Rezeptordomänen. Befinden sich Bakterien in der Population, die ein Rezeptor-interagierendes Adhäsin exprimieren, so kann dies aufgrund der Assoziation mit den fluoreszierenden Rezeptordomänen semiquantitativ mittels Western Blot oder durch Durchflußzytometrie bestimmt werden. Die Bestimmung der Assoziation im Durchflußzytometer erlaubt dabei eine sehr schnelle und auch quantitative Analyse und stellt

somit eine hervorragende Methode zur schnellen und exakten Untersuchung von Rezeptor-Adhäsion Interaktionen auch in heterogenen Bakterienpopulationen dar.

Zur Erarbeitung dieser Methode wurde die gut charakterisierte Interaktion zwischen humanen CEACAMs und neisseriellen Opa<sub>CEA</sub>-Proteinen ausgenutzt, die in Kapitel 1.3.2.2 ausführlich beschrieben wurde.

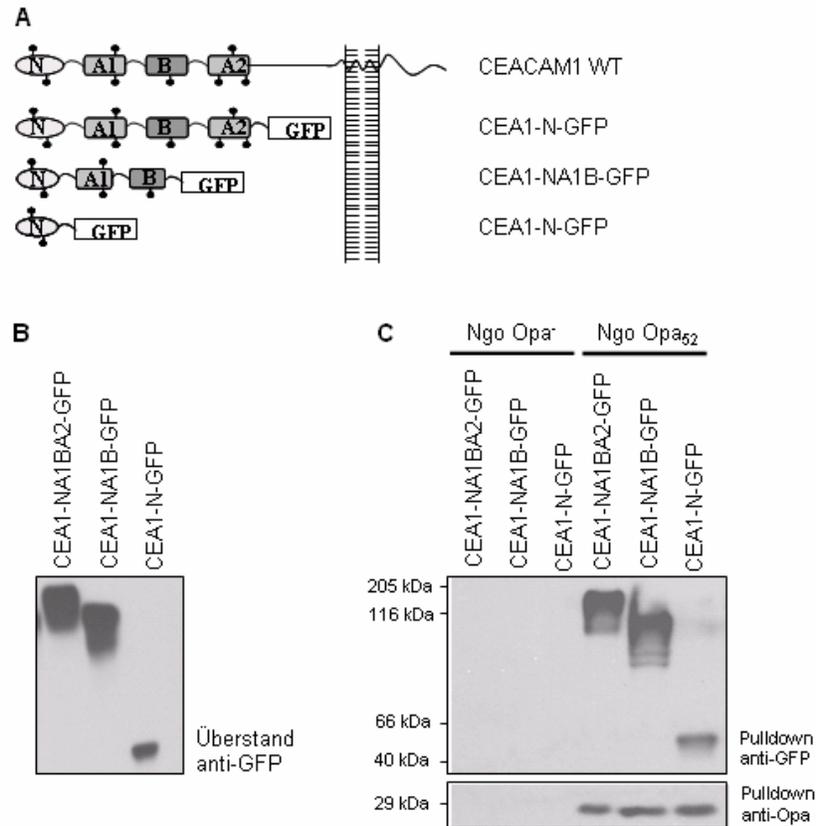
## 2.2 Ergebnisse

### 2.2.1 Lösliche CEACAM1-GFP Konstrukte erkennen neisserielle Opa<sub>CEA</sub> Proteine

Aus funktionellen Studien mit transfizierten Zelllinien und Rezeptor-Bindungs-Assays ist bekannt, dass die aminoterminalen Domänen von CEACAMs ausreichend für die Assoziation mit neisseriellen Opa<sub>CEA</sub>-Proteinen sind (Virji et al., 1999a; Virji et al., 1996a). Um diese Daten zu bestätigen, wurden verschiedene Bereiche der extrazellulären Domänen von humanem CEACAM1 ohne die Transmembrandomäne und ohne die zytoplasmatische Domäne in den Vektor pLPS 3'EGFP kloniert. Diese Bereiche befanden sich im Leseraster mit der kodierenden Sequenz für das *green-fluorescent protein* (GFP). Nach Transfektion von 293T-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten wurden die resultierenden Proteine exprimiert und in den Zellkulturüberstand sekretiert. Die erhaltenen rekombinanten GFP-fusionierten Proteine setzen sich zusammen aus der IgV-ähnlichen aminoterminalen Domäne von CEACAM1 (N), gefolgt von keiner (CEA1-N-GFP), zwei (CEA1-NA1B-GFP) oder drei (CEA1-NA1BA2-GFP) IgC2-ähnlichen extrazellulären Domänen von CEACAM1 (Abb. 2.1 A und B).

Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften dieser sekretierten Proteine wurden die Zellkulturüberstände, welche die entsprechenden löslichen GFP-Konstrukte (CEA1-NA1BA2-GFP, CEA1-NA1B-GFP oder CEA1-N-GFP) enthielten, für *Pulldown*-Experimente mit Bakterien eingesetzt. Hierzu wurden Opa<sub>CEA</sub>-exprimierende Gonokokken oder nicht-opaque Gonokokken mit den Zellkulturüberständen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurden die Bakterien durch Western Blot Analyse auf CEACAM-Bindung mittels anti-GFP Antikörper untersucht. Die Ergebnisse (Abb. 2.1 C) zeigten, dass alle verwendeten löslichen CEACAM1-Konstrukte (CEA1-NA1BA2-GFP, CEA1-NA1B-GFP und CEA1-N-GFP) an Opa<sub>CEA</sub>-exprimierende Gonokokken binden, wohingegen Opa-negative Gonokokken keine Assoziation zu einem der verwendeten rekombinanten Proteine aufwiesen. Die Resultate zeigen, dass die Bindung der

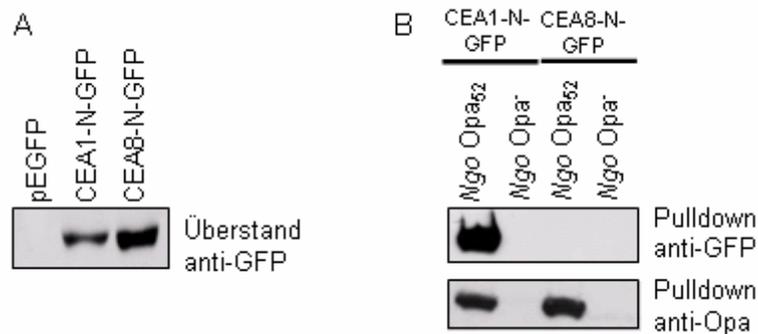
löslichen CEACAM1 Varianten an Gonokokken in Abhängigkeit von Opa-Proteinen erfolgt und dass die aminoternale Domäne von CEACAM1 ausreichend für eine effiziente Interaktion mit diesen Bakterien ist.



**Abb. 2.1: Assoziation neisserieller Opa<sub>CEA</sub>-Proteine mit löslichen CEACAM1-GFP Konstrukten.** (A) Schematische Darstellung der verwendeten löslichen CEACAM1-GFP Konstrukte und des CEACAM1 Wildtyps. Die löslichen CEACAM1-Konstrukte setzen sich zusammen aus der aminoternalen IgV-ähnlichen Domäne (N) und einer unterschiedlichen Anzahl von IgC2-ähnlichen extrazellulären Domänen (A1, B, A2) von CEACAM1. Alle löslichen CEACAM1-Konstrukte sind am carboxyterminalen Ende mit GFP fusioniert. Weitere lösliche CEACAM-Konstrukte, die in späteren Experimenten eingesetzt wurden (CEA3-N-GFP, CEA4-N-GFP, CEA5-N-GFP, CEA6-N-GFP und CEA8-N-GFP) sind analog zu CEA1-N-GFP hergestellt worden, jedoch mit der entsprechenden aminoternalen Domäne des jeweiligen CEACAM Moleküls. (B) Expression der löslichen CEACAM1-GFP Konstrukte. 293T-Zellen wurden mit cDNA der dargestellten löslichen CEACAM1-GFP Konstrukte transfiziert. Die Zellkulturüberstände wurden nach drei Tagen abgeerntet und auf Expression löslicher CEACAM-GFP Konstrukte mittels anti-GFP Antikörper im Western Blot überprüft. (C) Bakterien-Pulldown-Assay mit löslichen CEACAM1-GFP Konstrukten. Opa<sub>52</sub>-exprimierende (Ngo Opa<sub>52</sub>) bzw. nicht-opaque Gonokokken (Ngo Opa<sup>-</sup>) wurden mit Zellkulturüberständen der verschiedenen CEACAM1-GFP Konstrukte inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurden die Bakterien im Western Blot auf CEACAM-Bindung und Opa-Expression mittels anti-GFP bzw. anti-Opa Antikörper analysiert.

### 2.2.2 Die aminoterminalen Domäne von CEACAM8 assoziiert nicht mit Opa<sub>CEA</sub>-exprimierenden Gonokokken

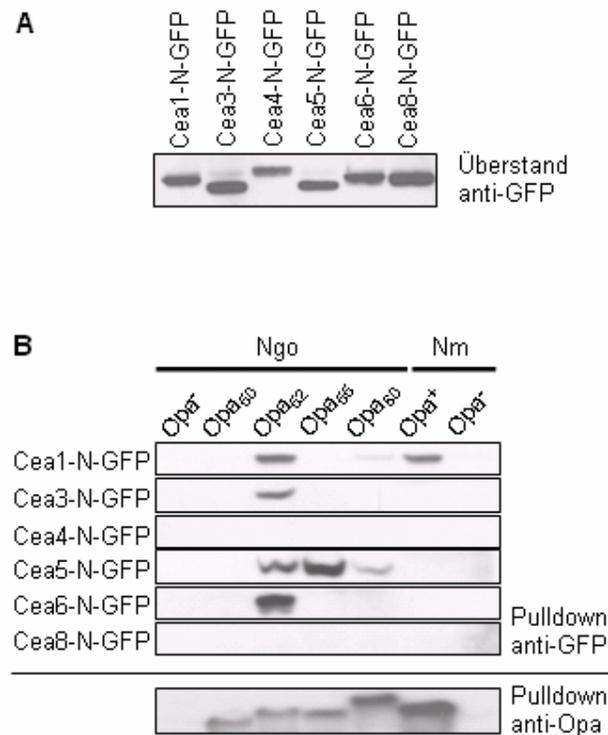
In verschiedenen Opa-CEACAM Interaktionsstudien (Gray-Owen et al., 1997b) konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu CEACAM1 das nahe verwandte CEACAM8 Molekül mit keinem der bisher charakterisierten Opa-Proteine eine Wechselwirkung eingeht. Um die Spezifität der mit den löslichen CEACAM1-GFP Konstrukten beobachteten Opa-CEACAM Interaktion zu überprüfen, wurde daher eine lösliche GFP-fusionierte Form der aminoterminalen Domäne von CEACAM8 (CEA8-N-GFP) analog zum CEA1-N-GFP-Konstrukt hergestellt und in 293T-Zellen produziert (Abb. 2.2 A). *Pulldown*-Experimente mit CEA1-N-GFP und CEA8-N-GFP zeigten, dass Opa<sub>52</sub>-exprimierende Gonokokken mit CEA1-N-GFP, jedoch nicht mit CEA8-N-GFP interagierten. Nicht-opaque Gonokokken interagierten weder mit CEA1-N-GFP noch mit CEA8-N-GFP (Abb. 2.2 B). Die Ergebnisse zeigen somit, dass die lösliche, mit GFP fusionierte aminoterminalen Domäne von CEACAM1 die gleiche Bindungsspezifität aufweist wie der intakte Rezeptor.



**Abb. 2.2: Analyse der Bindungsspezifität löslicher aminoterminaler CEACAM-Domänen an Opa<sub>CEA</sub>-exprimierende Gonokokken.** (A) Expression des löslichen CEA1-N-GFP bzw. CEA8-N-GFP im Kulturüberstand. 293T-Zellen wurden mit cDNA von CEA1-N-GFP, CEA8-N-GFP bzw. mit dem leeren Kontrollvektor (pcDNA) transfiziert. Die Zellkulturüberstände wurden nach drei Tagen abgeerntet und auf Expression der löslichen CEACAM-GFP Konstrukte mittels anti-GFP Antikörper im Western Blot überprüft. (B) Bakterien-*Pulldown*-Assay mit CEA1-N-GFP und CEA8-N-GFP. Opa<sub>52</sub>-exprimierende (Ngo Opa<sub>52</sub>) bzw. nicht-opaque Gonokokken (Ngo Opa<sup>-</sup>) wurden mit CEA1-N-GFP bzw. CEA8-N-GFP enthaltenden Zellkulturüberständen inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurden die Bakterien im Western Blot auf CEACAM-Bindung und Opa-Expression mittels anti-GFP bzw. anti-Opa Antikörper analysiert.

### 2.2.3 Erstellung eines Bindungsprofils neisserieller Opa<sub>CEA</sub>-Adhäsiene durch lösliche aminoternale Domänen von humanen CEACAMs

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass individuelle Opa<sub>CEA</sub>-Proteine mit verschiedenartigen CEACAM-Molekülen assoziieren können. Für Opa<sub>52</sub> wurde beispielsweise eine Interaktion mit CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 und CEACAM6 nachgewiesen, wohingegen andere Opa-Proteine wie zum Beispiel Opa<sub>60</sub> und Opa<sub>55</sub> lediglich an CEACAM1 und CEACAM5, bzw. nur an CEACAM5 binden (Gray-Owen et al., 1997b). Um zu überprüfen, ob auch lösliche CEACAM Rezeptoren verschiedene Opa-Proteine erkennen, wurden GFP-fusionierte Formen der aminoternale Domänen sämtlicher humaner CEACAMs, einschließlich CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6 und CEACAM8, in 293T-Zellen produziert und in einem Bakterien-*Pulldown*-Assay eingesetzt (Abb. 2.3 A). Für diese Interaktionsstudien wurden definierte Gonokokken-Stämme verwendet, die diverse Opa<sub>CEA</sub>-Proteine (Opa<sub>52</sub>, Opa<sub>55</sub>, Opa<sub>60</sub>), Opa<sub>HSPG</sub> (Opa<sub>50</sub>) oder keine Opa-Proteine (Opa<sup>-</sup>) exprimieren. Neben den verschiedenen Gonokokken-Stämmen wurden zusätzlich Opa-positive und Opa-negative unbekapselte Meningokokken des Stammes *Neisseria meningitidis* MC58 auf CEACAM-Bindung analysiert. Mit Hilfe des *Pulldown*-Assays wurde gezeigt, dass bis auf CEA4-N-GFP und CEA8-N-GFP alle verwendeten rekombinanten löslichen aminoternale Domänen wenigstens mit einem Opa-Protein-exprimierenden neisseriellen Stamm interagierten (Abb. 2.3 B). Das Bindungsmuster der aminoternale Domänen war dabei vergleichbar mit dem aus der Literatur bekannten zellbasierten Opa-CEACAM Interaktionsmuster (Gray-Owen et al., 1997b). Opa<sub>52</sub>-exprimierende Gonokokken interagierten dabei mit vier der eingesetzten aminoternale Domänen, nämlich CEA1-N-GFP, CEA3-N-GFP, CEA5-N-GFP und CEA6-N-GFP, wohingegen Opa<sub>60</sub>-exprimierende Gonokokken lediglich mit den aminoternale Domänen von CEACAM1 und CEACAM5, und Opa<sub>55</sub>-exprimierende Gonokokken mit CEA5-N-GFP assoziierten. Bakterien, die das Heparansulfatproteoglykan (HSPG)-bindende Opa-Protein (Opa<sub>50</sub>) exprimierten, interagierten mit keiner der getesteten CEACAM-aminoternale Domänen. Aus den Bindungsstudien mit *Neisseria meningitidis* ging hervor, dass Opa-exprimierende Meningokokken lediglich mit CEACAM1, aber nicht mit anderen Mitgliedern der CEACAM-Familie assoziierten. Insgesamt zeigten die Analysen, dass lösliche GFP-fusionierte aminoternale IgV-ähnliche Domänen verschiedener CEACAMs selektiv an unterschiedliche Opa-Proteine binden konnten. Darüber hinaus konnte mit Hilfe des angewandten *Pulldown*-Assays ein CEACAM-Bindungsprofil von Opa<sub>CEA</sub>-exprimierenden Gonokokken und Meningokokken erstellt werden.

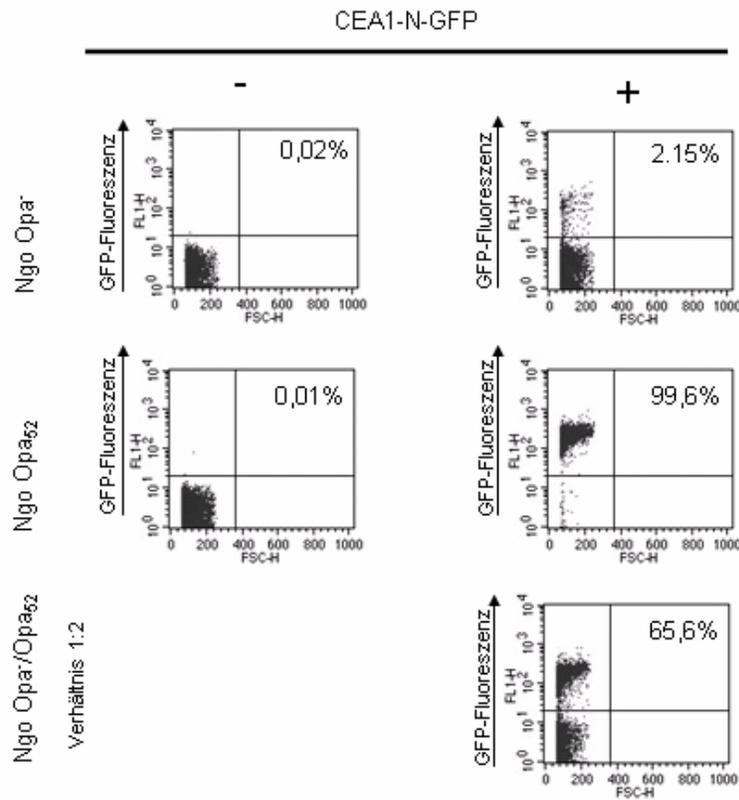


**Abb. 2.3: Bindungsprofil GFP-markierter aminoterminaler CEACAM Domänen an verschiedene neisserielle Opa<sub>CEA</sub> Proteine.** (A) 293T Zellen wurden mit cDNA der dargestellten löslichen CEACAM-Domänen transfiziert. Die Zellkulturüberstände wurden nach drei Tagen geerntet und auf Expression löslicher CEACAM-GFP Konstrukte mittels anti-GFP Antikörper im Western Blot überprüft. (B) Bakterien-*Pulldown*-Assay mit löslichen CEACAM-GFP Konstrukten. Sowohl verschiedene Gonokokkenstämme, die Opa<sub>CEA</sub> (Opa<sub>52</sub>, Opa<sub>55</sub> oder Opa<sub>60</sub>), OpaHSPG (Opa<sub>50</sub>) oder keine Opa-Proteine (Opa<sup>-</sup>) exprimieren, als auch Opa-positive (Nm Opa<sup>+</sup>) und Opa-negative Meningokokken (Nm Opa<sup>-</sup>) wurden mit Zellkulturüberständen der dargestellten löslichen CEACAM-Varianten inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurden die Bakterien im Western Blot auf CEACAM-Bindung mittels anti-GFP Antikörper analysiert. Die Expression der Opa-Proteine wurde mittels anti-Opa Antikörper in den Bakterien-Lysaten überprüft. Nicht-opaque Neisserien dienten dabei als Negativkontrolle.

#### 2.2.4 GFP-markierte aminoterminalen Domänen sind hervorragende molekulare Werkzeuge zur Analyse der CEACAM-Assoziation in einer heterogenen Bakterienpopulation

Die löslichen aminoterminalen Domänen der verschiedenen CEACAM-Moleküle stellen ein gutes Hilfsmittel dar, um Opa-CEACAM Interaktionen durch *Pulldown*-Assays mittels Western Blot zu untersuchen. Bakterien, die mit den löslichen Rezeptordomänen interagieren, sollten aufgrund der GFP-Markierung des Rezeptors Fluoreszenz zeigen. Aufgrund dieser Fluoreszenzmarkierung sollte es daher möglich sein, Bakterien-CEACAM-Interaktionen im

Durchflußzytometer schnell und quantitativ zu bestimmen. Um dies zu untersuchen, wurden Opa<sub>52</sub>-exprimierende (Ngo Opa<sub>52</sub>) und Opa-negative (Ngo Opa<sup>-</sup>) Gonokokken mit CEA1-N-GFP enthaltenden Zellkulturüberständen bzw. mit Überständen von kontrolltransfizierten Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurden die Bakterien in FACS-Puffer resuspendiert und direkt im Durchflußzytometer auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Die im Dot Plot dargestellten Ergebnisse zeigen, dass in Abwesenheit von CEA1-N-GFP sowohl opaque als auch nicht-opaque Gonokokken lediglich eine geringe Hintergrundfluoreszenz aufwiesen (Abb. 2.4). Im Gegensatz dazu besaßen in Anwesenheit der GFP-markierten aminoterminalen CEACAM1-Domäne etwa 99% der opaquen Bakterien eine etwa 100-fach höhere Fluoreszenzintensität aufgrund ihrer Assoziation mit dem fluoreszierenden Protein. Nicht-opaque Bakterien interagierten lediglich zu etwa 2% mit CEA1-N-GFP. Fluoreszenzmessungen einer im Verhältnis von 1:2 gemischten, mit CEA1-N-GFP inkubierten Population aus nicht-opaquen und opaquen Gonokokken spiegelten die Zusammensetzung der heterogenen Population wider: über 65% der Bakterien assoziierten mit CEA1-N-GFP. Die Fluoreszenzintensität der CEA1-N-GFP assoziierten Bakterien war dabei erneut etwa 100-fach höher als bei den restlichen Bakterien, die nicht mit den fluoreszierenden Domänen interagierten. Insgesamt zeigen die Daten, dass mit Hilfe von GFP-markierten aminoterminalen Domänen Interaktionen zwischen Bakterien und CEACAMs im Durchflußzytometer detektiert und quantifiziert werden können.

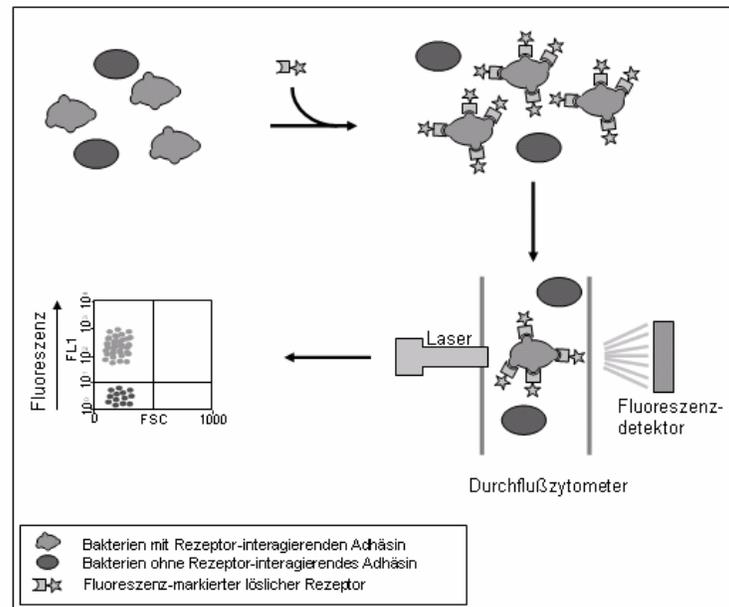


**Abb. 2.4: Detektion und Quantifizierung CEACAM-bindender Bakterien mittels Durchflußzytometrie.** Nicht-opqae Gonokokken (Ngo Opa<sup>+</sup>), Opa<sub>52</sub>-exprimierende Gonokokken (Ngo Opa<sub>52</sub>) oder eine heterogene Gonokokken-Population (hergestellt durch Mischen Opa-negativer und Opa-positiver Bakterien im Verhältnis von 1:2) wurden mit CEA1-N-GFP enthaltenden Zellkulturüberständen bzw. mit Zellkulturüberständen von kontrolltransfizierten Zellen inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurden die Bakterien auf CEACAM-Bindung mittels Durchflußzytometrie durch Messung der mit den Bakterien assoziierten GFP-Fluoreszenz analysiert. Von jeder Probe wurden jeweils 20000 Ereignisse gemessen. Dargestellt sind die originalen Dot Plots eines repräsentativen Experiments. Die Zahlen stehen für den Prozentsatz an Gonokokken, die mit CEA1-N-GFP assoziiert sind.

## 2.3 Diskussion

Die Erstellung eines Rezeptor-Bindungs-Profiles für bakterielle Adhäsine stellt eine wichtige Voraussetzung dar, um Wirtszell-Kontakte zu bestimmen, die möglicherweise von bestimmten pathogenen Bakterien ausgenutzt werden. Häufig angewandte Methoden zur Bestimmung der Adhäsion-Rezeptor Interaktionen wie Adhäsions- und Invasions-Assays oder Rezeptor-Overlay-Assays haben den großen Nachteil, dass sie sehr arbeitsintensiv sind und teilweise nur semiquantitative Daten liefern. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode entwickelt, die eine schnelle und einfache Quantifizierung einer

Bakterien-Rezeptor-Assoziation ermöglicht. Bei dieser Methode werden lösliche, fluoreszenzmarkierte Rezeptordomänen als molekulare Werkzeuge zur Markierung von Rezeptor-bindenden Bakterien eingesetzt. Interaktionen zwischen Bakterien und Rezeptordomäne, die nach Inkubation der beiden Liganden entstehen, können mittels Western Blot oder direkt im Durchflußzytometer bestimmt werden (Abb. 2.5).



**Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Bindungs-Assays zur schnellen und quantitativen Analyse der Rezeptorererkennung pathogener Bakterien.** Bakterien, die ein Rezeptor-erkennendes Adhäsın exprimieren oder nicht exprimieren werden mit fluoreszenzmarkierten löslichen Rezeptor-Konstrukten inkubiert. Nur Bakterien, die das Rezeptor-erkennende Adhäsın exprimieren interagieren mit dem fluoreszenzmarkierten Rezeptor. Die mit dem Rezeptor markierten Bakterien können mit Hilfe der Durchflußzytometrie quantitativ bestimmt werden. (Modifiziert nach Kuespert und Hauck, 2007b)

Um die Anwendbarkeit dieser Methode zu demonstrieren, wurde die gut charakterisierte Rezeptor-Adhäsın-Interaktion zwischen humanen CEACAMs und neisseriellen Opa<sub>CEA</sub>-Proteinen ausgenutzt. Aus unterschiedlichen Studien (Gray-Owen et al., 1997b, Bos et al., 1998) ist bekannt, dass die IgV-ähnliche aminoterminalen Domäne von CEACAMs, die mit Opa<sub>CEA</sub>-Proteinen interagieren können (CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 und CEACAM6), ausreichend für eine Assoziation mit den genannten Adhäsinen ist. Unter Verwendung von verschiedenen löslichen CEACAM1-Varianten, die sich aus der IgV-ähnlichen aminoterminalen Domäne von CEACAM1 und einer jeweils unterschiedlichen Anzahl an extrazellulären IgC2-ähnlichen Domänen des Moleküls zusammensetzten, konnte auch mit der vorgestellten Methode die Notwendigkeit der aminoterminalen Domäne zur

Interaktion mit den Opa<sub>CEA</sub>-Proteinen festgestellt werden. Die durch die löslichen, fluoreszenzmarkierten Rezeptordomänen ermittelte Interaktion war dabei spezifisch, da die GFP-markierte aminoternale Domäne von CEACAM8 nicht mit Opa<sub>CEA</sub>-exprimierenden Bakterien assoziierte. Nachdem gezeigt wurde, dass die Methode zur Analyse von Opa-CEACAM-Interaktionen geeignet ist, wurden lösliche aminoternale Domänen verschiedener CEACAMs zum Erstellen eines Bindungsprofils mit diversen neisseriellen Opa<sub>CEA</sub>-Proteinen eingesetzt. Auch bei Verwendung der verschiedenen aminoternalen Domänen konnte das von anderen Arbeitsgruppen in Adhäsions-Assays ermittelte CEACAM-Erkennungsmuster erneut reproduziert werden. Das in dieser Arbeit vorgestellte Rezeptor-Bindungsprotokoll ist daher funktionell und kann für Untersuchungen der CEACAM-Erkennung verwendet werden. Mit Hilfe dieser Methode könnte man beispielsweise sehr schnell ein CEACAM-Bindungsprofil verschiedener pathogener und kommensaler Neisserienstämme erstellen, die Opa-Proteine oder Opa-ähnliche Proteine (Toleman et al., 2001) exprimieren. Darüber hinaus könnten die löslichen Rezeptoren ein wertvolles Hilfsmittel darstellen, um schnell und einfach weitere Bakterienarten zu identifizieren, die an CEACAMs binden. Interessante Kandidaten hierfür wären beispielsweise Bakterienarten, die gleiche ökologische Nischen und einen gleichen Lebensstil wie pathogene Neisserien besitzen. In der Tat sind bereits mehrere gram-negative pathogene Bakterien bekannt, wie z.B. *Moraxella catarrhalis* oder *Haemophilus influenzae*, die ebenso wie pathogene Neisserien die menschliche Schleimhaut besiedeln und mittels unterschiedlicher Adhäsine, nämlich UspA1 und Protein P5, mit humanen CEACAMs interagieren (Hill et al., 2001; Hill und Virji, 2003; Virji et al., 2000). Viele pathogene Bakterienarten nutzen Adhäsine, um einen nahen Kontakt mit der Wirtszelle herzustellen. Der beschriebene Rezeptor-Bindungs-Assay könnte daher ein sehr hilfreiches Mittel zur Analyse weiterer Adhäsine-Rezeptor-Interaktionspaare sein. Dabei muss berücksichtigt werden, dass das beschriebene Protokoll lediglich für Adhäsine ausgelegt ist, die monomere Formen des Rezeptors erkennen. Ist dies der Fall, so können die Adhäsine-bindenden Domänen des entsprechenden Wirtsrezeptors in einer löslichen, fluoreszenzmarkierter Form produziert werden und als hilfreiches Werkzeug zur Analyse der Adhäsinebindung eingesetzt werden. Bei Adhäsinen, die nur oligomere Formen des Rezeptors erkennen, ist es notwendig, die löslichen Domänen vor der Verwendung für den Rezeptor-Bindungs-Assay zu multimerisieren (vgl. Kapitel 4.2.10). Dies kann beispielsweise durch Quervernetzung der Domänen mit einem geeigneten Antikörper erfolgen.

Neben den Opa-CEACAM-Interaktionen könnten mit der vorgestellten Methode weitere Adhäsion-Rezeptor Interaktionen, wie beispielsweise die Interaktion zwischen InternalinA von *Listeria monocytogenes* und menschlichen E-cadherin, überprüft werden. InternalinA ist ein Oberflächen-exponiertes Adhäsion des fakultativ intrazellulären pathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes*, das mit hoher Affinität an die extrazelluläre aminoternale Domäne des epithelialen Zellrezeptors E-cadherin bindet (Lecuit et al., 1999; Schubert et al., 2002). Lösliche, fluoreszenzmarkierte aminoternale Domänen von E-cadherin könnten daher auch hilfreiche molekulare Werkzeuge zur schnellen Analyse der E-cadherin Bindungseigenschaften diverser Listerien-Arten darstellen.

Ein herausragendes Merkmal der neuen Methode besteht nicht nur in der schnellen Erfassung von Pathogen-Rezeptor Interaktionen, sondern auch darin, dass einzelne Bakterienzellen, die mit den entsprechenden Rezeptor interagieren, detektiert und quantifiziert werden können. Eine solche Quantifizierung lässt sich mit Hilfe eines Durchflußzytometers ermöglichen, mit dem die mit den Mikroorganismen assoziierte Fluoreszenz gemessen werden kann. Bakterien, die aufgrund der Interaktion mit dem GFP-markierten Rezeptor eine höhere Fluoreszenz besitzen, können dabei von Bakterien unterschieden werden, die nicht mit dem Rezeptor interagieren. Die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen Rezeptor-interagierenden und nicht-interagierenden Bakterien wurde an einer definierten Gonokokkenpopulation demonstriert, welche sich aus einem bestimmten Prozentsatz von Opa<sub>CEA</sub>-exprimierenden bzw. nicht-opaen Bakterien zusammensetzte. Mit Hilfe der Durchflußzytometer-Analyse konnten die zwei verschiedenen Phänotypen in dieser Mischpopulation anhand der Interaktion mit der fluoreszenzmarkierten aminoternalen Domäne von CEACAM1 prozentual korrekt unterschieden und quantifiziert werden. Interessanterweise zeigten Messungen mit dem Durchflußzytometer, dass etwa 2% einer nicht-opaen Gonokokkenpopulation mit CEACAM1 interagierten. Da nicht-opaen Bakterien keine Interaktion mit den Domänen aufweisen sollten, ist anzunehmen, dass sich ein geringer Prozentsatz an Opa-positiven Bakterien in der nicht-opaen Population befand. Das Vorkommen von opaen Gonokokken in der nicht-opaen Population lässt sich dadurch erklären, dass die Expression einiger Opa-Proteine des vorher auf Opa-Negativität gescreenten Gonokokkenstammes *Neisseria gonorrhoeae* MS11 wegen der Fähigkeit zur Phasenvariation in den „An“-Zustand geschaltet worden sein könnte. Der für die Experimente verwendete Stamm *Neisseria gonorrhoeae* MS11 zeichnet sich dadurch aus, dass lediglich eines der 11 Opa-Proteine, nämlich Opa<sub>30</sub>, durch Insertion einer Chloramphenicol-Resistenz-Kassette am entsprechenden Genort zerstört wurde, und somit nicht mehr exprimiert werden kann. Die restlichen 10 Opa-

Proteine unterliegen jedoch immer noch der Phasenvariabilität, was letztendlich dazu führen kann, dass nicht-opaque Bakterien wieder Opa-Proteine exprimieren. Ein solches Reversionsereignis findet laut Literatur in einer Häufigkeit von  $10^{-3}$  statt (Kupsch 1993, Stern 1986). Der Nachweis des geringen Prozentsatzes an CEACAM-bindenden Bakterien in der visuell selektierten nicht-opaque Population mittels Durchfluszytometrie demonstriert die enorme Sensitivität dieser neuen Methode. Geringste Mengen an Rezeptor-bindenden Phänotypen in einer heterogenen Population können daher aufgrund ihrer Assoziation mit dem fluoreszenzmarkierten Rezeptor detektiert und quantifiziert werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten beziehen sich stets auf die Interaktion einer Bakterienpopulation mit einer einzigen Variante eines löslichen fluoreszenzmarkierten Rezeptors. Zum Nachweis mehrerer Adhäsion-Rezeptor-Interaktionen in einer einzigen Bakterienpopulation wäre es vorstellbar, die Bakterienpopulation gleichzeitig mit diversen löslichen Rezeptoren, die mit unterschiedlichen Fluorophoren, wie z. B. dem Cyan-fluoreszierenden Protein, dem Gelb-fluoreszierenden Protein oder dem Rot-fluoreszierenden Protein (Verkhusha et al., 2004) ausgestattet sind, zu inkubieren und mittels Durchfluszytometrie auf Rezeptor-Assoziation zu analysieren. Aufgrund der optischen Auftrennung der verschiedenartigen Rezeptor-Fluoreszenzsignale nach Durchfluszytometer-Messung könnte somit die Interaktion zwischen Bakterien und verschiedenartigen Rezeptoren in einer einzigen Probe schnell und quantitativ erfasst werden. Zusammengefasst wurde hier eine neuartige Methode zur Erfassung von Pathogen-Rezeptor-Interaktionen vorgestellt. Neben der leichten und schnellen Durchführbarkeit, zeichnet sich diese Methode durch ihre enorme Sensitivität aus, die es sogar ermöglicht, die Rezeptorerkennung einzelner Bakterien in einer Population quantitativ nachzuweisen.

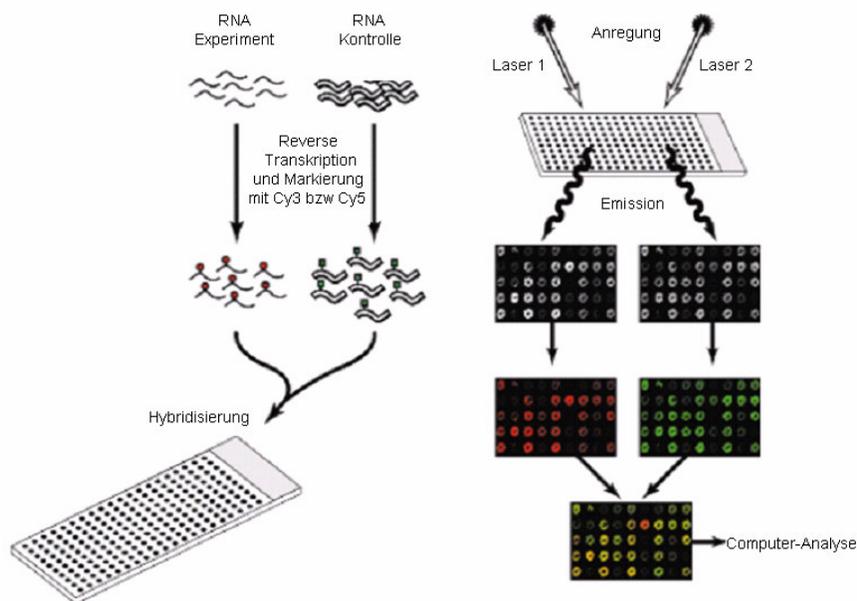
## 3 Opa<sub>CEA</sub>-induzierte Transkriptionsveränderungen in *Neisseria meningitidis* MC58

### 3.1 Einleitung

Die Adhäsion von Meningokokken an Epithelzellen stellt einen wichtigen Prozess bei der Infektion dar. Meningokokken binden in einem initialen Adhäsionsschritt mittels TypIV Pili an die Zelloberfläche. Anschließend assoziieren die Bakterien eng mit der Plasmamembran der Wirtszelle. Bei dieser intimen Adhäsion sind unter anderem Opa-Proteine beteiligt, die mit Heparansulfatproteoglykanen oder mit verschiedenen Mitgliedern der CEACAM-Familie interagieren können (vgl. Kapitel 1.3.2).

Interessanterweise scheint der Wechsel zwischen initialer Adhäsion und intimer Adhäsion eine Änderung der Genexpression in Meningokokken zur Folge zu haben. So konnte Deghmane et al. (2002) zeigen, dass der Transkriptionsregulator CrgA nach Kontakt der Bakterien mit Epithelzellen die Expression der für die Biosynthese der Pili und Kapsel notwendigen Gene *pilE* und *sia* reprimiert. Bakterielle Oberflächenstrukturen, die bei der intimen Adhäsion hindernd wirken könnten, werden somit herunterreguliert.

Trotz solcher Entdeckungen wie die des Transkriptionsregulators CrgA ist das Verständnis der molekularen Vorgänge in *Neisseria meningitidis* während der Infektion, speziell der Adhärenz und Invasion immer noch sehr lückenhaft. Neue Technologien, wie beispielsweise Mikroarrays stellen daher geeignete Mittel dar, um molekulare Vorgänge in den Bakterien während der Infektion auf Transkriptionsebene zu analysieren (Abb. 3.1). Diese Technik hat den großen Vorteil, dass in einem Experiment gleichzeitig mehrere tausend Gene analysiert werden können. So werden auf einen Glasobjektträger einzelne DNA-Fragmente (Spots) im „high density“-Format aufgebracht, so dass ein komplettes bakterielles Genom repräsentiert sein kann. Zur Analyse der Genexpression in den Bakterien auf einen bestimmten Reiz hin (z.B. Wirtszellkontakt) wird RNA aus Experiment- und Kontrollzellen gewonnen, in cDNA umgeschrieben und mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Nach Hybridisierung der cDNAs mit den Spots wird die Signalintensität der unterschiedlich markierten Farbstoffe an jedem Spot gemessen und ausgewertet. Durch Bestimmung des Verhältnisses der Signalintensitäten können Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandenen RNA-Mengenverhältnisse des transkribierten Gens gemacht werden. Dadurch kann man bestimmen, welches Gen auf einen bestimmten Reiz hin hochreguliert oder herunterreguliert wird.



**Abb. 3.1: Prinzip der Mikroarrayanalyse** (Beschreibung im Text; modifiziert nach Duggan et al., 1999)

Im Jahre 2000 (Tettelin et al., 2000) wurde die gesamte Genom-Sequenz des Stammes *Neisseria meningitidis* MC58 veröffentlicht. Sie besteht aus 2272351 Basenpaaren und insgesamt 2158 offenen Leserastern (ORFs) mit einer durchschnittlichen Größe von 874 Basenpaaren. Anhand dieser Informationen konnten auch für diesen Stamm Mikroarrays etabliert werden, auf dem jedes ORF des gesamten Genoms von *Neisseria meningitidis* MC58 repräsentiert ist (Guckenberger et al., 2002). Diese Mikroarrays können für Untersuchungen des Transkriptionsprofils von *Neisseria meningitidis* auf bestimmte Reize hin, wie z. B. die Adhäsion der Bakterien an Wirtszellen verwendet werden.

Verschiedene Arbeitsgruppen versuchten daher mit der Mikroarraytechnologie, neue Kenntnisse über die molekularen Vorgänge in den Bakterien während der Adhäsion auf Transkriptionsebene zu gewinnen. Grifantini et al. (2002) konnten beispielsweise zeigen, dass der Kontakt mit humanen bronchialen Epithelzellen (16HBE14) zu einer veränderten Expression von 347 Genen aus *Neisseria meningitidis* führt (Grifantini et al., 2002). Im Gegensatz dazu werden beim Kontakt mit HEp-2 Epithel-Zellen 72 Gene verändert exprimiert und beim Kontakt mit endothelialen HBMEC Zellen 48 Gene (Dietrich et al., 2003). Diese Daten beruhen auf der Untersuchung eines Transkriptionsprofils der Bakterien nach Kontakt mit humanen Zellen. Die Untersuchung der veränderten Genexpression der Meningokokken

nach Kontakt mit humanen Zellen lässt jedoch keine Schlüsse zu, welcher Reiz genau die Expression induziert.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Veränderungen der Genexpression in *Neisseria meningitidis* MC58, die durch Opa-CEACAM1 Interaktion ausgelöst werden, mittels Mikroarray-Technologie analysiert werden. Ziel war es, potentielle virulenz-assoziierte Gene, die nach Interaktion mit CEACAM1 in *Neisseria meningitidis* MC58 verstärkt exprimiert werden, zu identifizieren. Für diese Untersuchungen wurden lösliche aminoterminal Domänen von CEACAM1 verwendet, die - wie in Kapitel 2 ausführlich beschrieben - spezifisch mit Opa-Proteinen interagieren. Der Einsatz dieser Domäne hat den großen Vorteil, dass die Änderung der Genexpression - im Gegensatz zur Untersuchung des Transkriptionsprofils nach Kontakt mit Zellen - auf einen einzelnen, spezifischen Reiz hin, nämlich der CEACAM1 Bindung an Opa-Proteine untersucht werden kann.

## 3.2 Ergebnisse

### 3.2.1 Vorbereitung der Proben für die Transkriptomanalyse

Die lösliche aminoterminal Domäne von CEACAM1 ist ausreichend für eine effiziente Interaktion mit Opa-Proteinen (vgl. Kapitel 2, Kuespert et al., 2007a). So interagierten Opa-positive Meningokokken mit CEA1-N-GFP, wohingegen Opa-negative Meningokokken keine Interaktion mit dieser Domäne aufwiesen (Abb. 2.3). CEA1-N-GFP wurde daher im Folgenden als molekulares Werkzeug verwendet, um ein CEACAM1-abhängiges Expressionsprofil Opa-positiver Meningokokken mittels der Mikroarraytechnologie zu erstellen. Hierzu ist es notwendig, zwei Ansätze miteinander zu vergleichen – das Experiment mit der Kontrolle. Als Experiment dienten Ansätze mit Opa-positiven Meningokokken, die mit CEA1-N-GFP enthaltenden Zellkulturüberständen inkubiert wurden. Ansätze mit Opa-positiven Meningokokken, die mit CEA8-N-GFP (assoziiert nicht mit Opa-Proteinen) inkubiert wurden (Kontrolle1 für Versuch A) oder Opa-negative Meningokokken, die mit CEA1-N-GFP inkubiert wurden (Kontrolle2 für Versuch B) dienten als entsprechende Kontrollen. Im Gegensatz zum Experiment, sind bei den Kontrollansätzen keine Opa-CEACAM Interaktionen zu vermuten. Eine Analyse der Opa-vermittelten Genexpression nach Interaktion mit CEA1-N-GFP ist daher möglich. Bis auf die beschriebenen Veränderungen wurden die Kontrollansätze ebenso wie der Experimentansatz behandelt. Hierzu wurde die gleiche Anzahl an Opa-positiven bzw. Opa-negativen Meningokokken mit den entsprechenden Zellkulturüberständen für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach

anschließendem Waschen der Bakterien erfolgte die Isolation der RNA der jeweiligen Ansätze. Gleiche Mengen an RNA (je 20 µg) der zu vergleichenden Ansätze wurde in cDNA umgeschrieben und dabei mit verschiedenen Farbstoffen gleichmäßig markiert (Experiment Cy3; Kontrolle Cy5). Anschließend erfolgte die Hybridisierung der cDNA mit einem Oligonukleotid-Mikroarray, auf dem alle 2158 ORFs des Genoms von *Neisseria meningitidis* MC58 in dreifacher Ausführung repräsentiert waren. Für Versuch A wurde Cy3-markierte cDNA des Experimentes und Cy5-markierte cDNA der Kontrolle1 verwendet, wohingegen für Versuch B die Hybridisierung mit Cy3-markierter cDNA des Experimentes und Cy5-markierten cDNA der Kontrolle2 erfolgte. Die Intensitäten der gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe an jeweils den gleichen Sondenlokus wurden mit Hilfe eines Laserscanners ermittelt und das Verhältnis der Signalintensitäten durch Computer-Analysen bestimmt. Von einer Hochregulation wurde gesprochen, wenn der Quotient des jeweiligen Sondenlokus aus Experiment und Kontrolle  $\geq 1,8$  war, von einer Herunterregulation, wenn der Quotient  $\leq 0,6$  betrug. ORFs wurden als differentiell reguliert betrachtet, deren Sondenloki sowohl bei Versuch A als auch bei Versuch B als hoch- bzw. herunterreguliert eingestuft wurden (Tab. 3.1; Tab. 3.2).

### **3.2.2 Hochregulierte Gene in *Neisseria meningitidis* MC58 durch Opa-CEACAM1-Interaktion**

Untersuchungen bezüglich der hochregulierten Gene in Opa-positiven Meningokokken nach Kontakt mit CEA1-N-GFP zeigten, dass 7 der 2158 ORF von *Neisseria meningitidis* MC58 sowohl bei Versuch A als auch bei Versuch B hochreguliert wurden. Der Grad der Regulation erstreckte sich in einem Bereich zwischen 1,80 und 2,45. Die hochregulierten ORFs wurden verschiedenen funktionellen Kategorien zugeordnet, wie beispielsweise Metabolismus und Proteinsynthese. 3 der 7 Gene (ORF NMB0809, ORF NMB1906, ORF NMB2004) besitzen eine noch unbekannt Funktion und gehören daher der Kategorie der hypothetischen Proteine an.

**Tab. 3.1: Hochregulierte Gene von Opa-positiven *Neisseria meningitidis* MC58 nach Kontakt mit CEA1-N-GFP**

<b>funktionale Kategorie</b>	<b>Genfunktion</b>	<b>ORF-Nummer</b>	<b>Regulation Versuch A</b>	<b>SD</b>	<b>Regulation Versuch B</b>	<b>SD</b>
Metabolismus	Citrat-Synthase	NMB0954	2,26	0,23	1,86	0,15
	Fumarat-Hydratase, Klasse I, anaerob	NMB1613	2,45	1,35	2,60	1,26
Proteinsynthese	30S Ribosomales Protein S10 konserviertes hypothetisches Protein	NMB0140	1,99	0,12	2,63	0,27
Hypothetisch	konserviertes hypothetisches Protein	NMB0809	1,80	1,02	2,23	1,50
	konserviertes hypothetisches Protein	NMB1906	2,24	0,93	1,82	0,74
	konserviertes hypothetisches Protein	NMB2004	1,89	0,39	1,92	0,50
Unkategorisiert	NifU Protein	NMB1380	1,97	0,08	2,23	0,31

Durch BLAST-Analysen ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi)) sollte den hypothetischen Proteinen ihre potentielle Funktion zugeordnet werden. NMB0809 ist ein Protein mit 266 Aminosäuren. Proteine mit ähnlicher Aminosäuresequenz konnten auch in verschiedenen Bakterien identifiziert werden. Bei vielen dieser Bakterien ist dieses Protein in den Zuckermetabolismus verwickelt und stellt eine NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase dar. Im Gegensatz dazu ist NMB1906 ein hypothetisches Protein mit 74 Aminosäuren. Eine ähnliche Aminosäuresequenz kommt beispielsweise auch in *Fusobacterium nucleatum* vor, wo sie mit einem  $\alpha$ -Hämolyysin in Verbindung gebracht wird. NMB2004 ist ein hypothetisches Protein mit 230 Aminosäuren. Proteine mit ähnlicher Aminosäuresequenz konnten auch in verschiedenen Bakterien identifiziert werden. Bei vielen dieser Bakterien stellt dieses Protein einen putativen Effektor der Murein-Hydrolase dar. Alle drei hochregulierten hypothetischen Proteine kommen sowohl in Meningokokken als auch in Gonokokken vor.

### 3.2.3 Herunterregulierte Gene in *Neisseria meningitidis* MC58 durch Opa-CEACAM1-Interaktion

Untersuchungen bezüglich der herunterregulierten Gene in Opa-positiven Meningokokken nach Kontakt mit CEA1-N-GFP zeigten, dass 56 der 2158 ORF von *Neisseria meningitidis* MC58 sowohl bei Versuch A als auch bei Versuch B herunterreguliert wurden. Der Quotient zwischen Experiment und Kontrolle erstreckte sich in einem Bereich von 0,60 und 0,11. Unter den 56 regulierten Genen waren 33 Gene, die für hypothetische Proteine kodieren. Die

restlichen 23 regulierten Gene wurden insgesamt 7 verschiedene Kategorien zugeordnet (Tab. 3.2).

**Tab. 3.2: Herunterregulierte Gene von Opa-positiven *Neisseria meningitidis* nach Kontakt mit CEA1-N-GFP**

<b>funktionale Kategorie</b>	<b>Genfunktion</b>	<b>ORF-Nummer</b>	<b>Regulation Versuch A</b>	<b>SD</b>	<b>Regulation Versuch B</b>	<b>SD</b>
Zelluläre Prozesse	Zellteilungs-Protein FtsQ	NMB0425	0,37	0,05	0,42	0,01
	Cadmium-Resistenz-Protein	NMB1955	0,55	0,15	0,33	0,09
	Protein der Kälteschock-Domänen-Familie	NMB0838	0,55	0,02	0,53	0,02
	FrpC Operon-Protein	NMB0584	0,50	0,02	0,47	0,03
	Eisen-reguliertes Protein FrpA, putativ	NMB0585	0,56	0,14	0,50	0,05
	FrpC Operon-Protein	NMB1414	0,60	0,04	0,50	0,02
Metabolismus	Oxidoreduktase, putativ	NMB0614	0,48	0,06	0,56	0,09
	Azyl-Träger-Protein	NMB0220	0,45	0,04	0,44	0,04
DNA-Metabolismus	C-5 Cytosin-spezifische DNA-Methylase	NMB0826	0,49	0,05	0,39	0,02
	Typ II Restriktionsenzym HgaI	NMB0726	0,47	0,08	0,27	0,00
	Typ II Restriktionsenzym, putativ	NMB1289	0,34	0,04	0,36	0,08
	C-5 Cytosin-spezifische DNA-Methylase	NMB1290	0,36	0,08	0,24	0,03
	Transposase, IS30 Familie	NMB0805	0,57	0,12	0,55	0,07
	Transposase, IS30 Familie	NMB0834	0,57	0,03	0,50	0,04
	Transposase, IS30 Familie	NMB0911	0,58	0,07	0,49	0,05
	IS1106 Transposase, authentische Leserasterverschiebung	NMB1984	0,54	0,02	0,49	0,01
	IS1106 Transposase, putativ, degeneriert	NMB2043	0,53	0,03	0,50	0,01
	Transposase, IS30 Familie	NMB2148	0,57	0,04	0,49	0,06
	Proteinexport-Membran Protein					
<i>Protein fate</i>	SecG	NMB1888	0,56	0,02	0,42	0,01
	IgA-spezifische Serin-Endopeptidase	NMB0700	0,49	0,03	0,40	0,04
Hypothetisch	hypothetisches Protein	NMB0449	0,26	0,04	0,27	0,05
	hypothetisches Protein	NMB0450	0,42	0,19	0,27	0,02
	hypothetisches Protein	NMB2123	0,36	0,01	0,22	0,01
	hypothetisches Protein	NMB2085	0,59	0,03	0,47	0,01
	hypothetisches Protein	NMB0094	0,58	0,26	0,23	0,04
	hypothetisches Protein	NMB0298	0,48	0,07	0,37	0,03
	hypothetisches Protein	NMB0644	0,56	0,05	0,29	0,02
	hypothetisches Protein	NMB0654	0,55	0,07	0,36	0,02
	hypothetisches Protein	NMB0857	0,37	0,04	0,32	0,09
	hypothetisches Protein	NMB0898	0,56	0,09	0,59	0,07
	hypothetisches Protein	NMB0915	0,57	0,12	0,45	0,07
	hypothetisches Protein	NMB2115	0,44	0,35	0,57	0,04
	hypothetisches Protein	NMB0046	0,59	0,11	0,37	0,05
	hypothetisches Protein	NMB0429	0,53	0,12	0,50	0,26
	hypothetisches Protein	NMB0491	0,38	0,10	0,21	0,05
	hypothetisches Protein	NMB1116	0,55	0,02	0,51	0,01

	hypothetisches Protein	NMB1205	0,29	0,02	0,11	0,01
	hypothetisches Protein	NMB1211	0,56	0,03	0,50	0,03
	hypothetisches Protein	NMB1350	0,55	0,03	0,36	0,04
	hypothetisches Protein	NMB1469	0,35	0,02	0,31	0,03
	hypothetisches Protein	NMB1597	0,55	0,14	0,56	0,05
	hypothetisches Protein	NMB1837	0,54	0,03	0,50	0,03
	hypothetisches Protein	NMB1844	0,55	0,03	0,51	0,01
	hypothetisches Protein	NMB1853	0,31	0,02	0,40	0,03
	hypothetisches Protein	NMB2013	0,51	0,09	0,32	0,02
	hypothetisches Protein	NMB2113	0,46	0,06	0,32	0,07
	hypothetisches Protein	NMB0057	0,60	0,07	0,50	0,03
	hypothetisches Protein	NMB0483	0,52	0,02	0,57	0,04
	hypothetisches Protein	NMB0518	0,56	0,06	0,37	0,07
	konserviertes hypothetisches Protein	NMB0874	0,44	0,03	0,24	0,00
	konserviertes hypothetisches Protein	NMB0739	0,47	0,06	0,58	0,03
	konserviertes hypothetisches Protein	NMB1979	0,50	0,09	0,33	0,02
	hypothetisches Protein	NMB2106	0,39	0,01	0,23	0,02
verschiedene Funktionen	Typ-IV-Pilus-Aufbau-Protein PilV, putativ	NMB0887	0,55	0,04	0,47	0,02
Unkategorisiert	MafB-verwandtes Protein	NMB2122	0,34	0,02	0,27	0,01
	Galactosyltransferase-verwandtes Protein	NMB0624	0,54	0,09	0,51	0,11

### 3.3 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten potentielle, virulenz-assoziierte Gene, die durch Opa<sub>CEACAM1</sub> Interaktion in *Neisseria meningitidis* MC58 hochreguliert werden, identifiziert werden. Die Identifizierung solcher Gene sollte mittels Oligonukleotid-Mikroarrays geschehen, auf denen alle 2158 ORFs dieses Bakteriums in dreifacher Ausführung repräsentiert waren (Guckenberger et al., 2002). Die Ergebnisse zeigten, dass die Opa<sub>CEACAM1</sub> Interaktion in einer Herunterregulation von 56 Genen resultierte. Die meisten dieser Gene kodieren für unbekannte Proteine und wurden daher der Kategorie „hypothetische Proteine“ zugeordnet. Lediglich 7 Gene wurden nach Interaktion der Bakterien mit dem löslichen Rezeptor hochreguliert. Vier dieser Gene kodierten für Proteine mit bekannter Funktion, nämlich die Citrat-Synthase, die Fumarat-Hydratase, NifU-Protein und ein ribosomales Protein. Während dem ribosomalen Protein eine Rolle bei der Proteinbiosynthese zukommt, sind die Citrat-Synthase und die Fumarat-Hydratase am Tricarbonsäurezyklus beteiligt (Hebeler et al., 1976; Goh et al., 2005). NifU stellt generell ein Protein dar, das an der Nitrogenase-spezifischen [Fe-S] Cluster Bildung beteiligt ist. Diese [Fe-S] Cluster sind essentiell für die Reduktion des Stickstoffes zu Ammonium durch die Nitrogenase (Dos

Santos et al., 2004). Das Proteinprodukt von ORF 1380 wurde aufgrund seiner Homologie zu NifU Proteinen anderer Spezies als NifU determiniert. Seine Rolle in Meningokokken ist allerdings unbekannt, da noch kein Nitrogenase-ähnliches Protein in diesen Bakterien identifiziert wurde. Durch BLAST-Analysen der hochregulierten Gene, die für „hypothetische Proteine“ kodieren, kann angenommen werden, dass es sich bei ORF NMB0809 um eine mögliche NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase handelt und bei ORF NMB2004 um einen putativen Effektor der Murein-Hydrolase. Die beschriebenen hochregulierten Gene in *Neisseria meningitidis* MC58 scheinen alle an verschiedenen Prozessen beteiligt zu sein, die nicht direkt mit Virulenz in Verbindung gebracht werden können. Im Gegensatz dazu wurde ein weiteres Gen, nämlich ORF NMB1906 im Mikroarray hochreguliert, dessen Genprodukt durch eine mögliche hämolytische Aktivität virulenz-assoziiert sein könnte. Diese Vermutung resultiert aus BLAST-Vergleichen mit einem  $\alpha$ -Hämolsin aus *Fusobacterium nucleatum*, das eine ähnliche Aminosäuresequenz wie das Genprodukt von ORF NMB1906 besitzt (Okamoto et al., 2000).  $\alpha$ -Hämolsine sind porenbildende bakterielle Toxine, die durch hämolytische Aktivität Erythrozyten zerstören können (Nagy et al., 2006). ORF NMB1906 stellt somit ein interessantes, potentiell virulenz-assoziiertes Gen dar, das durch Opa-CEACAM1 Interaktion in den Bakterien hochreguliert wird und in zukünftigen Experimenten genauer analysiert werden könnte. Bezüglich der Opa-induzierten Expression müsste die Hochregulation des ORFs NMB1906 durch RT (Reverse Transkriptions)-PCR oder *Real-Time* PCR zunächst bestätigt werden. Anschließend könnte die potentielle hämolytische Funktion dieses hypothetischen Proteins durch Mutagenesestrategien oder Überexpression in *E. coli* untersucht werden.

Datenvergleiche mit Genexpressionsprofilen von *Neisseria meningitidis* MC58 nach Kontakt mit verschiedenen Zelltypen (HEp-2, HBMEC, 16HBE14) zeigen keinerlei Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit nach Opa-CEACAM1 Interaktion als hochreguliert eingestuften Genen (Grifantini et al., 2002; Dietrich et al., 2003). Theoretisch hätte man zumindest bei HBMEC-Zellen teilweise Übereinstimmungen erwarten können, da diese Zellen CEACAM1 exprimieren können (persönliche Auskunft Dr. P. Muenzner-Voigt) und daher eine Interaktion mit Opa<sub>CEA</sub>-Proteinen möglich ist. Da bei den anderen Zelltypen (16HBE14, HEp-2) keine Veröffentlichungen über eine etwaige CEACAM Expression vorliegen, ist es möglich, dass diese Zellen keine CEACAMs exprimieren. Dies könnte das differentielle Transkriptionsprofil zwischen den zellbasierten Experimenten und den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten (Opa-CEACAM1 Interaktion) erklären.

Die durch Opa-CEACAM1 Interaktion induzierten Veränderungen der Genexpression waren im Vergleich zu anderen Mikroarray-basierten Experimenten anderer Arbeitsgruppen eher von geringer Intensität. So erstreckte sich der Grad der Herunterregulation in einem Bereich von 0,6 – 0,11. Im Gegensatz dazu lag der Bereich der Hochregulation lediglich zwischen 1,80 und 2,45. Dies entspricht in etwa einer Verdopplung der Expression. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen wurden die Bakterien für 15 Minuten dem Reiz ausgesetzt (Inkubation mit löslichen CEA1-N-GFP). Die Inkubationszeit wurde so kurz gewählt, um möglichst frühe Transkriptionsereignisse nach Opa-CEACAM Interaktion zu detektieren. Möglicherweise hätte der Grad der Regulation durch eine längere Inkubationszeit der Neisserien mit dem löslichen Rezeptor verstärkt werden können. Außerdem hätte eine verlängerte Inkubationszeit vermutlich zur Detektion weiterer durch Opa-CEACAM Interaktion ausgelöste Transkriptionsereignisse führen können. Aus Infektionsstudien mit CEACAM-exprimierenden Zellen ist bekannt, dass im Zuge der intimen Adhäsion CEACAM-Moleküle durch Interaktion mit Opa<sub>CEA</sub>-Proteinen am Ort der Bakterien angehäuft werden (Hauck und Meyer, 2003). Um diese zellulären Ereignisse *in vitro* nachzustellen, wäre es eventuell sinnvoll gewesen, eine Expressionsanalyse nach Inkubation der Neisserien mit multimerisierten, löslichen CEA1-N-GFP durchzuführen. Dies hätte möglicherweise einen verstärkten Grad der Regulation und die Detektion weiterer, durch Opa-CEACAM1 Interaktion ausgelöster Transkriptionsereignisse zur Folge gehabt.

Bis heute sind die molekularen Vorgänge in pathogenen Neisserien nach Interaktion mit bestimmten Rezeptoren noch völlig ungeklärt. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Veränderungen der Genexpression in *Neisseria meningitidis* MC58 nach Interaktion mit einem Rezeptor, nämlich CEACAM1, untersucht. Die aus Mikroarray-Experimenten erhaltenen Daten zu dieser veränderten Genexpression geben erste Hinweise darauf, dass neben der veränderten Expression von Genen, die nicht mit Virulenz assoziiert werden, auch potentielle virulenz-assoziiierter Gene hochreguliert werden. Diese Daten müssten allerdings durch weitere Experimente bestätigt werden und bieten daher eine gute Grundlage für Untersuchungen der molekularen Vorgänge in pathogenen Neisserien nach Interaktion mit CEACAM1.

## 4 Charakterisierung der Interaktion Opa-negativer Meningokokken mit CEACAM1

### 4.1 Einleitung

Die Adhäsion und Invasion von Wirtsgeweben stellt eine wichtige Voraussetzung für die Pathogenese bei vielen Bakterienspezies dar. Die meisten pathogenen Bakterien besitzen spezifische Anheftungsfaktoren, so genannte Adhäsine. Bakterielle Adhäsine ermöglichen eine Bindung an zelluläre Oberflächenstrukturen, wie Kohlenhydratanteile von Glykoproteinen oder Glykolipiden sowie an Rezeptoren und andere membranständige Proteine der eukaryontischen Wirtszellen. Durch die spezifische Adhäsion an die Gewebeoberfläche wirken pathogene Bakterien, gerade bei der Kolonisierung von Schleimhautoberflächen, einer Entfernung durch mechanische Kräfte entgegen. In einigen Fällen wird durch die Interaktion der bakteriellen Adhäsine mit dem zellulären Rezeptor eine Rezeptor-vermittelte Signalkaskade ausgelöst, die eine Aufnahme der Bakterien in die Zelle zur Folge hat. Die Bakterien können sich auf diesem Weg der humoralen Immunantwort entziehen und in einer geschützten intrazellulären Nische überleben.

Bakterielle Adhäsine werden grob in Fimbrien-Adhäsine und Nicht-Fimbrien-Adhäsine eingeteilt (Finlay et al., 1997; Hauck, 2006). Fimbrien-Adhäsine stellen Adhäsionsmoleküle dar, die auf Fimbrien oder Pili lokalisiert sind. Dort können sie beispielsweise die Hauptuntereinheit bilden (z.B. K88-Pili von schweinepathogenen *E. coli*, Blomberg et al., 1993 „k88“) oder sie sitzen an der Pilusspitze (z.B. PilC von *Neisseria spp.* (Kallstrom et al., 1997). Alle Adhäsine, die nicht mit Fimbrien assoziiert sind, werden der Gruppe der Nicht-Fimbrien-Adhäsine zugeordnet. Nicht-Fimbrien-Adhäsine vermitteln häufig die Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix, wie Collagen, Laminin oder Elastin oder an adhäsive Glykoproteine, wie Vitronectin, Fibrinogen oder Fibronectin (Pizarro-Cerda et al., 2006). Auch integrale Membranproteine wie Integrine, Selektine, Cadherine und Mitglieder der CEACAM-Familie stellen mögliche Rezeptoren dar (Hauck et al., 2002), die in einigen Fällen sogar die Invasion der Bakterien in die Zelle vermitteln.

Wie in Kapitel 1.3.2.2. bereits ausführlich beschrieben wurde, sind CEACAMs hochglykosylierte Proteine, die der Überfamilie der Immunglobuline angehören. CEACAM1 ist das beim Menschen am weitesten verbreitete Mitglied der CEACAM-Familie. Dieses Molekül tritt beim Menschen in zwölf verschiedenen Isoformen auf und wird sowohl auf Epithelzellen als auch auf Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen exprimiert

(Hammarstrom et al., 1999; Thompson et al., 1995). Die Hauptisoform des Moleküls umfasst vier extrazelluläre Domänen und besitzt eine lange zytoplasmatische Domäne (CEA1-NA1BA2 bzw. CEACAM1-Wildtyp). CEACAM1 stellt ein interzelluläres Adhäsionsmolekül dar, dessen aminoterminal Domäne an homophilen und heterophilen Zell-Zell Interaktionen beteiligt ist. Interessanterweise wird die aminoterminal Domäne auch von verschiedenen human-spezifischen Pathogenen erkannt.

So zeigten Forschungen der letzten Jahre, dass *Moraxella catarrhalis* mittels UspA1 an CEACAM1 bindet, wohingegen *Haemophilus influenzae* Protein P5 und pathogene Neisserien Opa<sub>CEA</sub>-Proteine zur Interaktion mit diesem Molekül nutzen (Virji et al., 1996b; Gray-Owen et al., 1997a; Bos et al., 1997; Chen et al., 1997; Muenzner et al., 2000; Virji et al., 2000; Hill und Virji, 2003; Hill et al., 2001). Obwohl diese Adhäsine untereinander kaum Sequenzhomologien besitzen (Hill et al., 2001), scheinen zumindest beim strukturellen Vergleich von Protein P5 und Opa<sub>CEA</sub>-Proteinen gewisse Ähnlichkeiten zu bestehen. So durchspannt Protein P5 ebenso wie Opa-Proteine die Membran achtmal und bildet dabei drei extrazelluläre Schleifen (*loops*) mit variablen Bereichen und ein extrazelluläres C-terminal befindliches invariantes *loop* (Duim et al., 1997; Malorny et al., 1998; Webb et al., 1998). Weder für Opa-Proteine noch für Protein P5 besteht eine strukturelle Verwandtschaft zu UspA1. UspA1 wird der Familie der Oca (*oligomeric coiled-coil adhesin*)-Proteine zugeordnet (Hoiczky et al., 2000; Roggenkamp et al., 2003). Proteine dieser Familie besitzen eine extrazelluläre, kugelförmige N-terminale Domäne, die über einen  $\alpha$ -helikalen Stiel mit der Membran-verankerten C-terminalen Domäne verbunden ist. Bemerkenswerterweise erfolgt die Interaktion trotz struktureller Unterschiede zwischen UspA1, Protein P5 und Opa<sub>CEA</sub>-Proteinen über eine direkte Protein-Protein-Interaktion im nicht-glykosylierten Bereich der N-terminalen Domäne von CEACAM1 (Bos et al., 1998; Virji et al., 2000; Hill et al., 2001; Hill et al., 2003). Die Erreger nutzen dabei eng benachbarte oder überlappende Adhäsiotope des zellulären Oberflächenrezeptors (Virji et al., 1999a).

Intensive Forschungen in den letzten Jahren zeigten, dass das human-spezifische Pathogen *Neisseria meningitidis* neben den Opa-Proteinen diverse Oberflächenstrukturen exprimieren kann, die eine Kolonisierung und Invasion eukaryontischer Zellen ermöglichen. Bekannte Faktoren, die eine Rolle bei der Adhäsion spielen, sind TypIV Pili, App (*Adhesion and penetration protein*), MspA (*meningococcal serin protease A*) und NhhA (*Neisserial hia/hsf homologue*). Während die Rolle der TypIV Pili für die initiale Adhärenz des Erregers bereits geklärt ist (vgl. Kapitel 1.3.1), steht die Rolle der anderen erwähnten Adhäsine im Infektionsverlauf noch nicht genau fest. Turner et al. (2006) konnten zeigen, dass MspA

sowohl an Epithel- als auch an Endothelzellen binden kann, wohingegen die adhäsiven Eigenschaften von App und NhhA lediglich in Epithelzellen untersucht wurden (Serruto et al., 2003; Scarselli et al., 2006). Ob diese Proteine auch am Invasionsprozess der Bakterien beteiligt sind ist nicht bekannt, da es bis heute noch keine Veröffentlichungen gibt, die für oder gegen eine mögliche Rolle dieser Proteine als Invasin sprechen. Im Gegensatz zu den beschriebenen Adhäsinen exprimieren Meningokokken diverse Proteine, wie Opa-Proteine, Opc und NadA, die als Invasin beschrieben wurden. NadA kommt in hypervirulenten Neisserien-Stämmen vor und besitzt die Fähigkeit, an Epithelzellen zu binden und einen Mechanismus auszulösen, der die Internalisierung der Bakterien zur Folge hat (Capecchi et al., 2005). Der zelluläre Rezeptor dieses Proteins ist bis heute noch nicht bekannt, jedoch gibt es erste Hinweise, dass es sich um einen Protein-Rezeptor handelt (Capecchi et al., 2005). Im Gegensatz dazu sind die Identitäten der Rezeptoren für Opc und Opa-Proteine bereits ermittelt worden. Während Opc sowohl an Heparansulfatproteoglykane (HSPG) (de Vries et al., 1998) als auch indirekt durch Interaktion mit Vitronektin und Fibronektin an Integrine binden kann (Virji et al., 1992; Virji et al., 1994; Unkmeir et al., 2002), interagieren Opa-Proteine mit Heparansulfatproteoglykanen ( $\text{Opa}_{\text{HSPG}}$ ) und Mitgliedern der CEACAM-Familie ( $\text{Opa}_{\text{CEA}}$ ) (Virji et al., 1993; de Vries et al., 1998; Virji et al., 1996b). Die Interaktion führt zur Induktion einer Signaltransduktionskaskade, die zur Aufnahme der Neisserien führt.

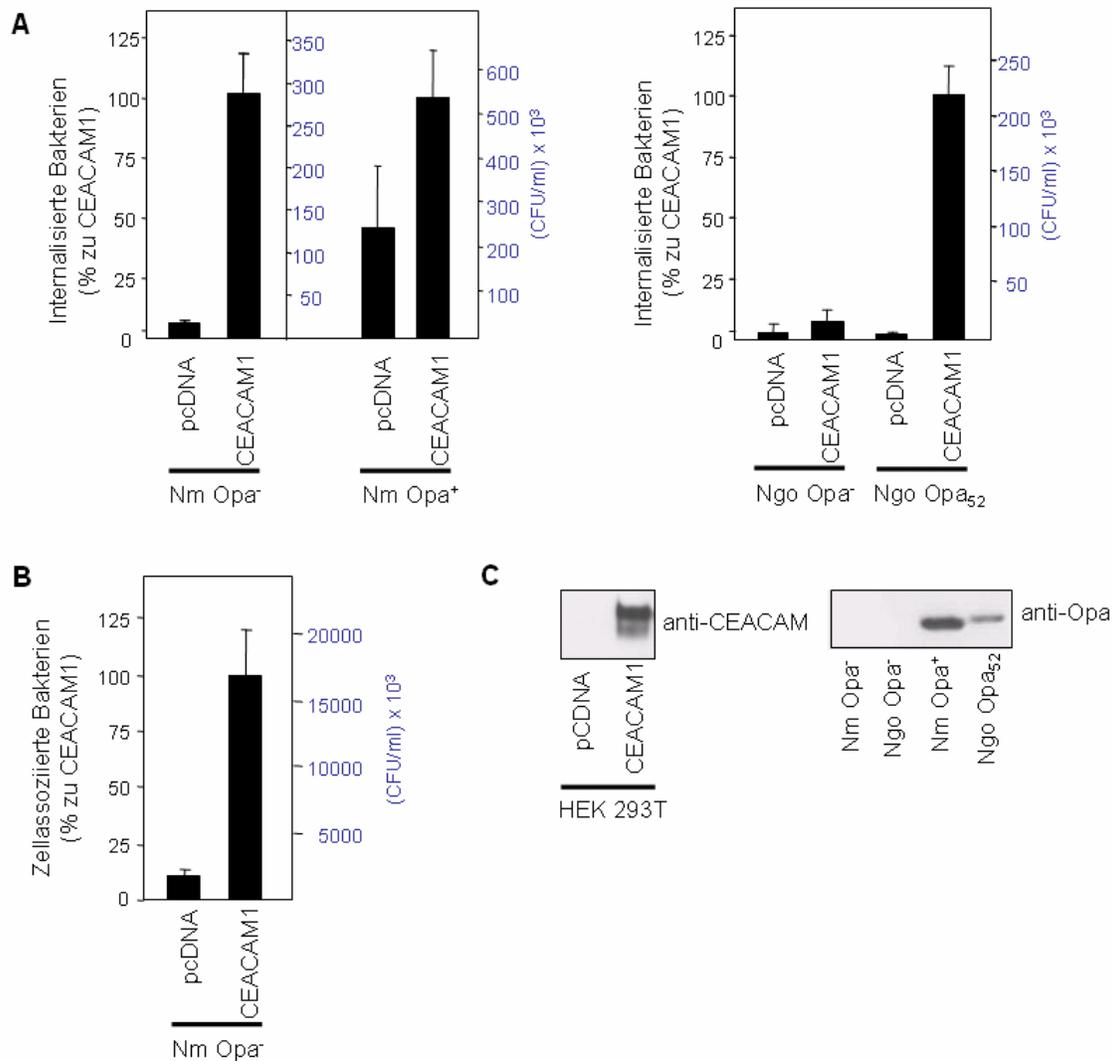
In der vorliegenden Arbeit wurde durch visuelles Screening ein Opa-negativer Stamm aus *Neisseria meningitidis* MC58 isoliert. Interessanterweise wurde bei der Durchführung eines Kontrollexperimentes durch Zufall entdeckt, dass dieser isolierte Meningokokken-Stamm Zellen in Abhängigkeit der CEACAM1-Expression invadieren kann. Da der verwendete Stamm keine  $\text{Opa}_{\text{CEA}}$  Proteine exprimierte wurde, die Existenz eines weiteren, unbekanntes Adhäsins in *Neisseria meningitidis* MC58 angenommen, das mit CEACAM1 interagiert. Ziel der Arbeit war es daher, die Interaktion zwischen Opa-negativen Meningokokken und den Mitgliedern der CEACAM-Familie zu charakterisieren und das unbekanntes bakterielle Adhäsins zu identifizieren.

## 4.2 Ergebnisse

### 4.2.1 Opa-negative Meningokokken werden von CEACAM1-exprimierenden Zellen aufgenommen

Aus diversen Studien ist bekannt, dass Neisserien durch ihre Opa-Proteine mit verschiedenen CEACAM-Molekülen interagieren können und letztendlich aufgrund der Stimulation

zellulärer Signaltransduktionsprozesse in die Zelle eindringen können (Gray-Owen, 2003). Neben den neisseriellen Opa-Proteinen konnte bis heute noch kein weiteres CEACAM-assoziiertes Adhäsion in der Familie der Neisserien identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde durch visuelles Screening ein Stamm aus dem Kapsel-defizienten Stamm *Neisseria meningitidis* MC58 ( $\Delta siaD$ ,  $\Delta lgtA$ ) (Kurzai et al., 2005) isoliert, der keine Opa-Proteine exprimiert. Dieser Opa-negative Meningokokken-Stamm (Nm Opa<sup>-</sup>) wurde neben Opa-negativen Gonokokken (Ngo Opa<sup>-</sup>) und Opa-exprimierenden Gono- (Ngo Opa<sub>52</sub>) und Meningokokken (Nm Opa<sup>+</sup>) in einem Antibiotika-Protektions-Assay eingesetzt. Hierzu wurden CEACAM1-transfizierte Zellen und kontrolltransfizierte (pcDNA) Zellen mit den Bakterienstämmen für zwei Stunden mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 40 infiziert. Nach Abtötung der extrazellulären Bakterien mit Gentamicin wurde die absolute Anzahl der lebenden, von den Zellen internalisierten Bakterien und der prozentuale Anteil der Bakterien im Vergleich zur CEACAM1-Internalisation bestimmt. Erstaunlicherweise zeigten die Ergebnisse (Abb. 4.1 A), dass Opa-negative Meningokokken ebenso wie Opa-exprimierende Neisserien von CEACAM1-exprimierenden Zellen aufgenommen wurden. Opa-negative Gonokokken wurden im Gegensatz dazu nicht von CEACAM1-exprimierenden Zellen internalisiert. Die Aufnahmerate Opa-negativer Meningokokken war mit ca.  $280 \times 10^3$  cfu/ml vergleichbar mit der Aufnahme Opa-positiver Gonokokken. Im Gegensatz dazu wurden etwa doppelt so viele Opa-positive Meningokokken von CEACAM1-transfizierten Zellen aufgenommen. Die Hintergrundinvasion über kontrolltransfizierte Zellen war bei diesen Bakterien im Vergleich zu den anderen deutlich höher. Bei der Untersuchung der Zellassoziation Opa-negativer Meningokokken an CEACAM1-transfizierte und kontrolltransfizierte Zellen konnte ebenfalls eine erhöhte Adhäsion der Bakterien an CEACAM1-exprimierende Zellen ermittelt werden (Abb. 4.1 B). Der in dieser Arbeit aus *Neisseria meningitidis* MC58 isolierte Opa-negative Meningokokkenstamm scheint daher verstärkt an CEACAM1-exprimierende Zellen zu binden. Darüber hinaus scheinen die Opa-negativen Bakterien von CEACAM1-transfizierten Zellen verstärkt aufgenommen zu werden.



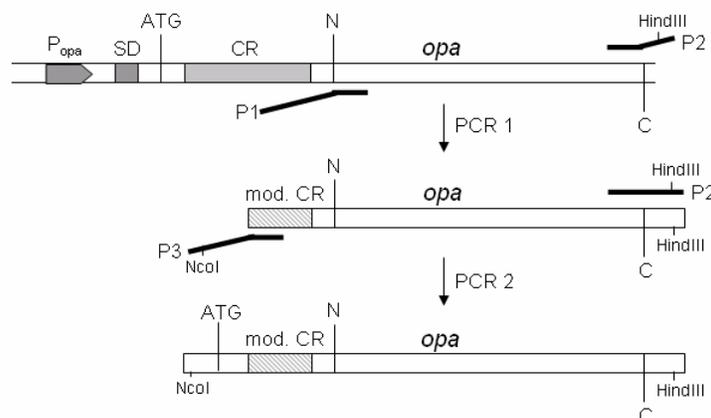
**Abb. 4.1: Opa-negative Meningokokken assoziieren mit CEACAM1-exprimierenden Zellen und werden von diesen internalisiert.** (A, B) Antibiotika-Protektions-Assay und Adhärenz-Assay. 293T-Zellen wurden mit cDNA für CEACAM1-HA oder dem leeren Expressionsvektor (pcDNA) transient transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für zwei Stunden mit nicht-opaqen (Ngo Opa<sup>-</sup>; Nm Opa<sup>-</sup>) bzw. opaqen Gonokokken (Ngo Opa<sup>a52</sup>) oder Meningokokken (Nm Opa<sup>+</sup>) mit einer MOI von 40 infiziert. Die Anzahl der lebenden, internalisierten Bakterien wurde durch einen Antibiotika-Protektions-Assay ermittelt (A). Die Anzahl der zellassoziierten Bakterien wurden durch einen Adhärenz-Assay ermittelt (B). Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei, in Triplets durchgeführten, unabhängigen Experimenten. (C) Die Expression von CEACAM1-HA und Opa-Proteinen wurde im Western-Blot mit anti-HA bzw. anti-Opa Antikörpern nachgewiesen.

## 4.2.2 Opa-negative Meningokokken exprimieren keine Opa-Proteine während der CEACAM1-vermittelten Aufnahme

### 4.2.2.1 Alle Opa-Proteine aus *Neisseria meningitidis* MC58 werden vom anti-Opa Antikörper erkannt

Das Eindringen nicht-opaquer Meningokokken in CEACAM1-transfizierte Zellen stellt einen völlig unerwarteten und neuen Befund dar. Dieser Effekt war bisher von anderen Arbeitsgruppen, die ähnliche Experimente mit eigens selektierten Opa-negativen Meningokokken des Stammes MC58 durchgeführt hatten, nicht beobachtet worden (Virji et al., 1996a). Deshalb bestand die Möglichkeit, dass der zur Detektion der Opa-Proteine verwendete Antikörper nicht alle Opa-Proteine des Stammes *Neisseria meningitidis* MC58 (Opa<sup>-</sup>) erkennt. So könnte es durchaus sein, dass durch Rekombinationsereignisse in dem verwendeten Stamm veränderte Opa-Varianten entstehen würden, die andere antigene Eigenschaften aufweisen und daher von dem verwendeten monoklonalen anti-Opa-Protein-Antikörper nicht erkannt werden. Um dies zu überprüfen, wurden alle vier *opa*-Gene des verwendeten Meningokokkenstammes, die von den offenen Leserastern (ORFs) ORF NMB0442 (*opa1*), ORF NMB0926 (*opa2*), ORF NMB1465 (*opa3*) und ORF NMB1636 (*opa4*) kodiert werden, in den prokaryontischen Expressionsvektor pET28a kloniert. Nach Überexpression der Opa-Proteine in *E. coli* sollten diese mit Hilfe des anti-Opa Antikörpers detektiert werden.

Da Opa-Proteine aufgrund der variablen Anzahl der repetitiven Pentanukleotidsequenzen (CTCTT) in der Signalsequenz einer Phasenvariation unterliegen (vgl. Kapitel 1.3.2) musste bei der Klonierung der einzelnen *opa*-Gene darauf geachtet werden, dass sich die *opa*-Gene im entsprechenden Leseraster befanden, um für das funktionelle Protein kodieren zu können. Um dies zu erreichen, wurde die von Kupsch et al. (1993) beschriebene Methode angewandt, die in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt ist. Zur Amplifikation der einzelnen *opa*-Gene wurden die in Tabelle 4.1 dargestellten Primer verwendet. Die PCR-Produkte der *opa*-Gene wurden mittels Restriktion (*NcoI* und *XhoI*) in den prokaryontischen Expressionsvektor pET28a unter die Kontrolle des *lac*-Promotors kloniert und anschließend mittels Sequenzierung verifiziert.



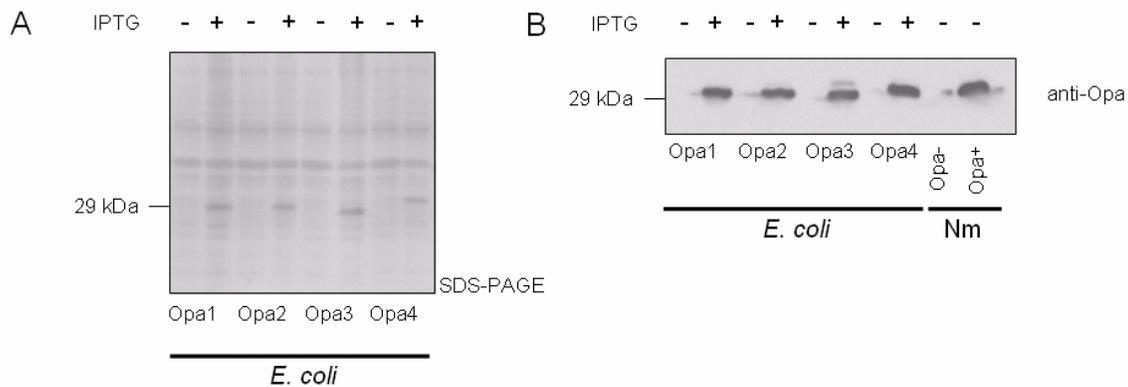
**Abb. 4.2: PCR-Strategie zur Klonierung und unveränderten Expression von *opa*-Genen.** Jedes *opa*-Gen unterliegt der Phasenvariation aufgrund einer variablen Anzahl an Pentanukleotidsequenzen (CR) in der Signalsequenz. Je nach Anzahl der Pentanukleotidsequenzen kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters, was eine vollständige Translation des Proteins ermöglicht oder einen vorzeitigen Abbruch der Translation verursacht (Stern et al, 1986). Das dargestellte Protokoll wird zur Erzeugung von *opa*-Genen verwendet, die aufgrund einer veränderten CR für ein funktionelles Opa-Protein kodieren. Durch zwei aufeinander folgende PCRs mit verschiedenen Primerkombinationen (P1/P2 oder P3/P2) können *opa*-Gene mit einer modifizierten CR hergestellt werden. Die Primer 1 und 3 werden dabei so konstruiert, dass der repetitive Charakter der Pentanukleotidsequenzen durch neutrale Nukleotidsubstitutionen unterbrochen wird und sich das Gen aufgrund der modifizierten CR im Leseraster für ein funktionelles Opa-Protein befindet. (N) und (C) beziehen sich auf amino- und carboxyterminale Enden des Proteins.

**Tab. 4.1: Primer und Matrizen zur Amplifikation der *opa*-Gene aus *N. meningitidis* MC58**

Produkt	Primer	Matrize
<i>opa1</i>	Opa-MC58( <i>E.coli</i> )-mitte-sense (P1) Opa1/2MC58-HindIII-anti (P2) OpaMC58(pET28)-NcoI-sense (P3)	chromosomale DNA <i>N. meningitidis</i> MC58 (Opa) (ORF NMB0442)
<i>opa2</i>	Opa-MC58( <i>E.coli</i> )-mitte-sense (P1) Opa1/2MC58-HindIII-anti (P2) OpaMC58(pET28)-NcoI-sense (P3)	chromosomale DNA <i>N. meningitidis</i> MC58 (Opa) (ORF NMB0926)
<i>opa3</i>	Opa-MC58( <i>E.coli</i> )-mitte-sense (P1) Opa3/4MC58-HindIII-anti (P2) OpaMC58(pET28)-NcoI-sense (P3)	chromosomale DNA <i>N. meningitidis</i> MC58 (Opa) (ORF NMB1465)
<i>opa4</i>	Opa-MC58( <i>E.coli</i> )-mitte-sense (P1) Opa3/4MC58-HindIII-anti (P2) OpaMC58(pET28)-NcoI-sense (P3)	chromosomale DNA <i>N. meningitidis</i> MC58 (Opa) (ORF NMB1636)

Für die Synthese der rekombinanten Opa-Proteine wurde der Protease-defiziente *E. coli*-Expressionsstamm BL21 DE3 verwendet. Die Expressionseffizienz der Proteine ohne bzw. nach IPTG-Induktion wurde mittels SDS-PAGE in den bakteriellen Lysaten analysiert (Abb. 4.3). Nach Induktion der jeweiligen Opa-Proteine (Opa1, Opa2, Opa3 und Opa4) konnte jeweils eine verstärkte Proteinbande bei ca. 30 kDa ermittelt werden, die bei den jeweiligen

nicht-induzierten Kontrollen fehlten. Das ermittelte Molekulargewicht der Banden lässt vermuten, dass es sich um Opa-Proteine handelt. Zusätzlich wurden die bakteriellen Lysate im Western Blot mittels anti-Opa-Antikörper auf Opa-Expression überprüft. Alle vier in *E. coli* exprimierten Opa-Proteine des Stammes *N. meningitidis* MC58 konnten mit dem anti-Opa Antikörper detektiert werden. Als Positivkontrolle diente ein Zelllysate Opa-positiver Meningokokken, als Negativkontrolle nicht-induzierte *E. coli* Stämme sowie ein Lysat des nicht-opaque Meningokokkenstammes. Die Ergebnisse zeigen, dass der verwendete anti-Opa Antikörper alle vier in *E. coli* exprimierten Opa-Proteine des Stammes *Neisseria meningitidis* MC58 (Opa<sup>-</sup>) erkennt.

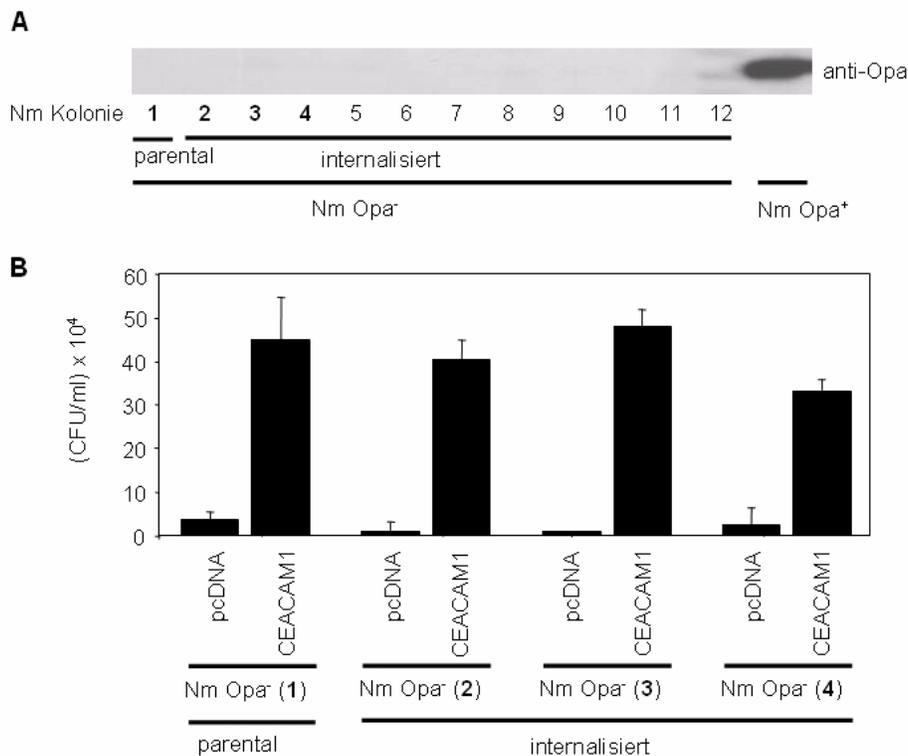


**Abb. 4.3: Expression meningokokkaler Opa-Proteine in *E. coli* und Untersuchung der Antikörperspezifität.** (A) SDS-PAGE zur Analyse der Expression rekombinanter Opa-Proteine des Stammes *N. meningitidis* MC58 in *E. coli* BL21 DE3. Alle *opa*-Gene aus *Neisseria meningitidis* MC58 (Opa<sup>-</sup>) wurden in einen Expressionsvektor kloniert und in *E. coli* als rekombinante Proteine (Opa1, Opa2, Opa3, Opa4) exprimiert. Zu diesem Zweck wurden die Opa-exprimierenden *E. coli*-Stämme in Flüssigkultur angezogen und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 mit IPTG induziert. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein unbehandelter Ansatz weiterkultiviert. Die Synthese der Opa-Proteine (~ 30 kDa) erfolgte ausschließlich nach Induktion der Expression. (B) Die Expression der rekombinanten Opa-Proteine (vgl. (A)) wurde im Western Blot mittels anti-Opa Antikörper überprüft. Als Positivkontrolle dienten opaque Meningokokken, als Negativkontrolle nicht-opaque Meningokokken.

#### 4.2.2.2 Der Opa-negative Phänotyp der Meningokokken bleibt bestehen während der Infektion CEACAM1-exprimierender Zellen

Es ist vorstellbar, dass die CEACAM1-vermittelte Aufnahme Opa-negativer Meningokokken auf eine Reexpression der phasenvariablen Opa-Proteine vor oder während des Infektionsverlaufes zurückzuführen ist. Es wurde daher mittels Western Blot überprüft, ob durch CEACAM1-internalisierte Opa-negative Meningokokken den parentalen Phänotyp

beibehielten oder zu einem Opa-Protein-positiven Phänotyp revertiert sind. Hierzu wurden CEACAM1-transfizierte 293T-Zellen mit Opa-negativen Meningokokken (parentale Nm Opa<sup>-</sup>) infiziert. Anschließend wurden die von den Zellen internalisierten Bakterien auf entsprechenden Agarplatten ausplattiert und elf der gewachsenen Kolonien auf Opa-Expression analysiert. Es zeigte sich, dass ebenso wie der parentale Meningokokken-Stamm keiner der untersuchten, nach CEACAM1-Internalisation reisolierten Meningokokkenstämme (internalisierte Nm Opa<sup>-</sup>) (Nm-Kolonie 2-12; Abb. 4.4 A) Opa-Proteine exprimierten. Als Positivkontrolle für die Funktionalität des Antikörpers wurde ein Zellysate Opa-positiver Meningokokken eingesetzt.

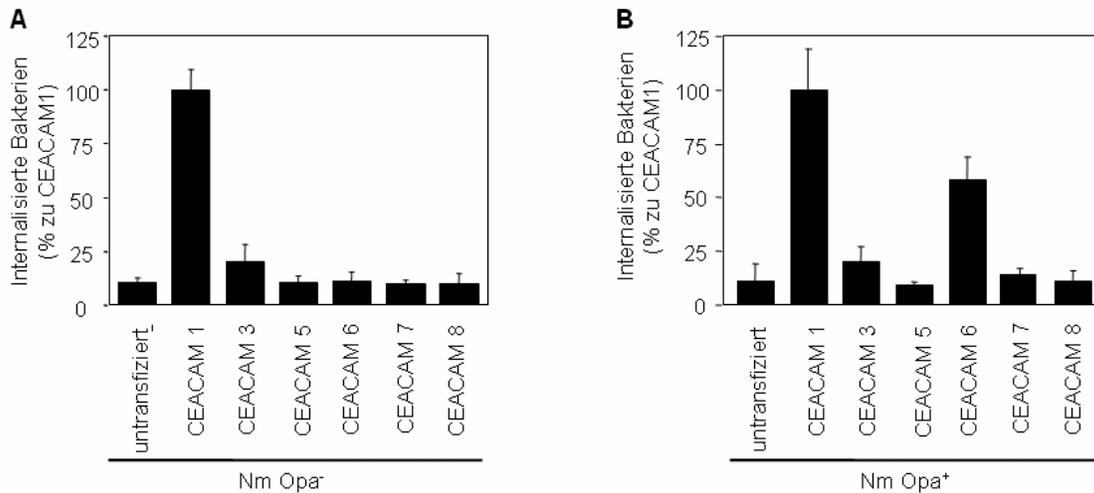


**Abb. 4.4: Opa-negative Meningokokken exprimieren keine Opa-Proteine während der CEACAM1-vermittelten Invasion.** (A) Überprüfung der Opa-Expression von bereits in CEACAM1-Zellen internalisierten Bakterien. Opa-negative Meningokokken wurden nach Infektion CEACAM1-exprimierender Zellen isoliert und im Western Blot mittels anti-Opa Antikörper auf Opa-Expression überprüft. Als Positivkontrolle dienten Opa-positiver Meningokokken (Nm Opa<sup>+</sup>). (B) Antibiotika-Protektions-Assay mit „internalisierten“ Nm Opa<sup>-</sup>. 293T-Zellen wurden mit cDNA für CEACAM1-HA oder den leeren Expressionsvektor (pcDNA) transient transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für zwei Stunden mit nicht-opaquen parentalen und bereits durch CEACAM1 internalisierten und reisolierten Meningokokken (Nm Opa<sup>-</sup>) mit einer MOI von 40 infiziert. Die Anzahl der lebenden, internalisierten Bakterien wurde durch einen Antibiotika-Protektions-Assay ermittelt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei, in Triplets durchgeführten, unabhängigen Experimenten.

Bei Infektion CEACAM1-transfizierter und kontrolltransfizierter Zellen mit den reisolierten, Opa-negativen Meningokokken-Stämmen (hier am Beispiel von Nm-Kolonie 2-4 gezeigt) konnte das gleiche Invasionsmuster über CEACAM1 wie beim parentalen Opa-negativen Meningokokken-Stamm ermittelt werden (Abb. 4.4 B). Die in dieser Arbeit eingesetzten Meningokokken scheinen daher keine Opa-Proteine während des Infektionsverlaufes zu exprimieren. Deshalb liegt die Schlussfolgerung nahe, dass diese Varianten CEACAM1-transfizierte Zellen unabhängig von Opa-Proteinen invadieren können.

#### **4.2.3 Die CEACAM-abhängige Invasion Opa-negativer Meningokokken erfolgt ausschließlich über CEACAM1**

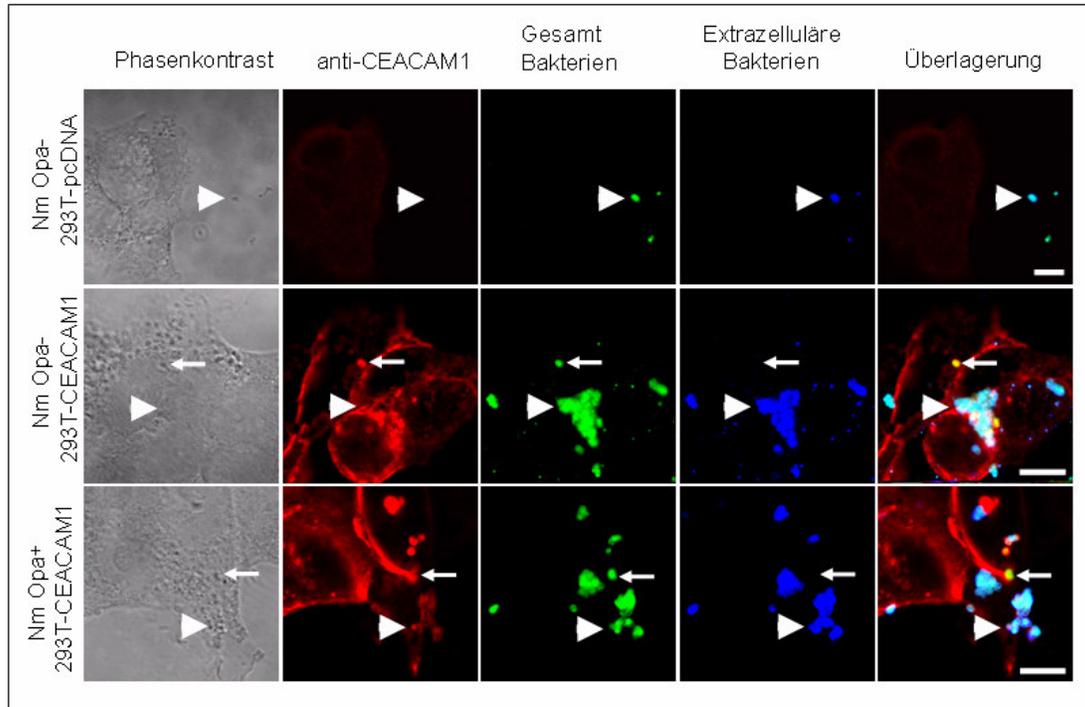
Aus diversen Studien ist bekannt, dass vier Mitglieder der CEACAM-Familie, nämlich CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 und CEACAM6 mit pathogenen Bakterien interagieren können. Für *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae* konnte eine Interaktion mit CEACAM1 und CEACAM3 nachgewiesen werden (Virji et al., 2000; Hill und Virji, 2003; Hill et al., 2001; Schmitter, 2005), wohingegen *E. coli*-DAEC (*diffusely adhering E. coli*)-Stämme mit CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6 assoziieren (Berger et al., 2004). Einzelne Opa<sub>CEA</sub>-Proteine der Gono- und Meningokokken hingegen können mit mindestens einem, teilweise sogar mit mehreren Mitgliedern der CEACAM-Familie interagieren (Hauck und Meyer, 2003). Um zu untersuchen, ob nur CEACAM1 oder aber auch andere Mitglieder der CEACAM-Familie die Internalisation Opa-negativer Meningokokken vermitteln können, wurden 293T-Zellen mit cDNAs verschiedener CEACAM-Moleküle transfiziert und mit Opa-negativen bzw. Opa-positiven Meningokokken für zwei Stunden mit 40 Bakterien pro Zelle infiziert. Die Zahl der lebenden, internalisierten Bakterien wurde in einem Antibiotika-Protektions-Assay relativ zu CEACAM1 ermittelt (Abb. 4.5). Die Ergebnisse des Antibiotika-Protektions-Assays zeigten, dass von den untersuchten CEACAM-Varianten lediglich CEACAM1 die Invasion Opa-negativer Meningokokken in 293T-Zellen vermitteln konnte. Zellen, die andere Mitglieder der CEACAM Familie (CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7 und CEACAM8) exprimierten, wurden nicht von Opa-negativen Meningokokken invadiert. Im Vergleich zu den Opa-negativen Meningokokken konnte für Opa-positive Meningokokken eine Internalisierung über CEACAM1 und CEACAM6 gezeigt werden. Die Internalisierung über CEACAM1 war dabei effizienter als über CEACAM6. Aus den Befunden lässt sich schließen, dass von den analysierten CEACAM-Molekülen lediglich CEACAM1 die Internalisierung Opa-negativer Meningokokken vermitteln kann.



**Abb. 4.5: Opa-negative Meningokokken werden von CEACAM1, aber nicht von anderen Mitgliedern der CEACAM-Familie internalisiert.** 293T-Zellen wurden mit cDNA für CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7 und CEACAM8 transient transfiziert; als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für zwei Stunden mit nicht-opaen (Nm Opa<sup>-</sup>) bzw. opaen (Nm Opa<sup>+</sup>) Meningokokken mit einer MOI von 40 infiziert. Die bakterielle Invasion wurde durch einen Antibiotika-Protektions-Assays ermittelt. Die Grafik zeigt die prozentualen Mittelwerte mit Standardabweichung von drei, in Triplets durchgeführten, unabhängigen Experimenten.

#### 4.2.4 Opa-negative Meningokokken kolokalisieren mit CEACAM1

Um den Effekt der CEACAM1-vermittelten Aufnahme Opa-negativer Meningokokken zu visualisieren, erfolgte eine mikroskopische Analyse. Hierzu wurden 293T-Zellen mit CEACAM1 oder pcDNA transfiziert und mit Opa-negativen und Opa-positiven (Kontrolle) Meningokokken für zwei Stunden infiziert. Die Proben wurden anschließend durch differentielle Fluoreszenzfärbungen von CEACAM1 und extra- und intrazellulären Bakterien für die Konfokalmikroskopie präpariert und analysiert. Sowohl Opa-negative Meningokokken als auch Opa-positive Meningokokken adhärten verstärkt an CEACAM1-transfizierte Zellen und konnten in diese Zellen eindringen. Die Bakterien kolokalisieren dabei mit CEACAM1 (Abb. 4.6). Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden (Negativkontrolle), zeigten keine Assoziation mit den Pathogenen. Mit Hilfe der mikroskopischen Aufnahmen konnte daher die Adhäsion und Internalisierung Opa-negativer Meningokokken über CEACAM1-exprimierende Zellen visuell bestätigt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Bakterien mit dem humanen Oberflächenrezeptor kolokalisieren.

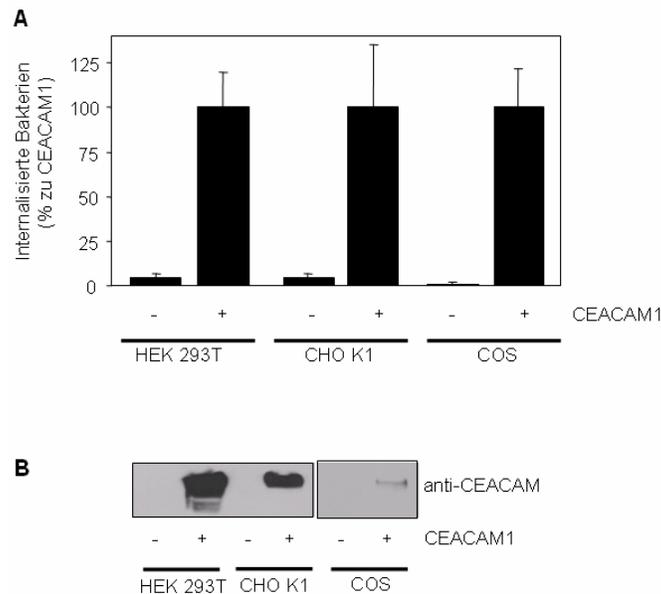


**Abb. 4.6: Kolokalisation von nicht-opaquen und opaquen Meningokokken mit CEACAM1.** CEACAM1- bzw. kontrolltransfizierte (pcDNA) 293T-Zellen wurden mit Opa-negativen (Nm Opa<sup>-</sup>) und Opa-positiven (Nm Opa<sup>+</sup>) Meningokokken für 2 h mit einer MOI von 40 infiziert. Nach anschließender Fixierung der Proben wurden extra- und intrazelluläre Neisserien sowie CEACAM1 mit entsprechenden Antikörpern in einer Immunfluoreszenzfärbung (Kapitel 7.8.1) angefärbt. CEACAM1 (rot); intrazelluläre Bakterien (grün; Pfeil); extrazelluläre (blau + grün; Pfeilkopf). Die mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop erhaltenen Bilder zeigen eine Kolokalisation von Opa-positiven und Opa-negativen Meningokokken mit CEACAM1. Die Balken repräsentieren 10 µm.

#### 4.2.5 CEACAM1 vermittelt die Invasion Opa-negativer Meningokokken in verschiedenen Zelllinien

Die bisherigen Ergebnisse zur CEACAM1-vermittelten Invasion Opa-negativer Meningokokken wurden stets in humanen 293T-Zellen durchgeführt. Es war daher von Interesse, ob das Eindringen Opa-negativer Meningokokken über CEACAM1 auch mit anderen Zelllinien reproduziert werden kann. In den folgenden Untersuchungen wurden daher die nicht-humane, epitheliale Zelllinie COS7 aus Meerkatzen und die Hamster-Zelllinie CHO für einen Antibiotika-Protektions-Assay verwendet. Da diese Zelllinien ebenso wie 293T-Zellen keine endogenen CEACAMs exprimieren, wurden sie mit CEACAM1 stabil transfiziert und anschließend mit Opa-negativen Meningokokken für zwei Stunden infiziert. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte Zellen der jeweiligen Zelllinien und als Positivkontrolle CEACAM1-transfizierte 293T-Zellen. Die Zahl der lebenden, internalisierten Bakterien wurde in Prozent zu den jeweiligen CEACAM1-exprimierenden Zellen dargestellt.

Die Ergebnisse der Antibiotika-Protektions-Assays zeigten, dass sowohl CEACAM1-transfizierte COS7-Zellen als auch CEACAM1-transfizierte CHO-Zellen Opa-negative Meningokokken zu einem höheren Prozentsatz internalisierten, als die untransfizierten Zellen (Abb. 4.7). Die prozentual ermittelte Invasionsrate war vergleichbar zu der ermittelten Invasionsrate von 293T-Zellen. Das CEACAM1-vermittelte Eindringen Opa-negativer Meningokokken scheint daher nicht spezifisch für 293T-Zellen zu sein, sondern kann auch von verschiedenen anderen Zelllinien aus unterschiedlichen Organismen vermittelt werden.

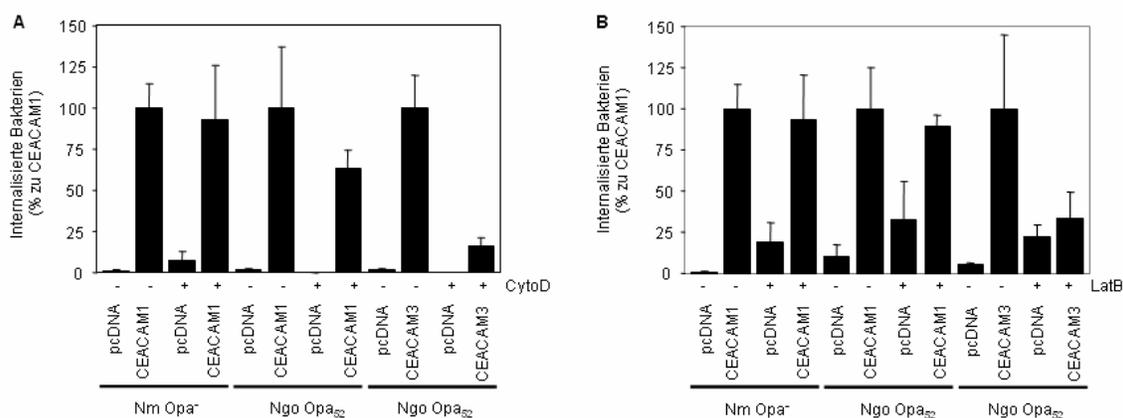


**Abb. 4.7: Opa-negative Meningokokken werden von verschiedenen Zelllinien mittels CEACAM1 internalisiert.** (A) Mit CEACAM1-transfizierte sowie untransfizierte 293T-Zellen, CHO K1-Zellen und COS7-Zellen wurden für zwei Stunden mit nicht-opaquen Meningokokken (Nm Opa<sup>-</sup>) mit einer MOI von 40 infiziert und die Zahl der internalisierten Bakterien in einem Antibiotika-Protektions-Assay in Prozent zu den jeweiligen CEACAM1-exprimierenden Zellen ermittelt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei, in Triplets durchgeführten, unabhängigen Experimenten. (B) Die Expression von CEACAM1 im Zelllysat der verschiedenen Zelllinien erfolgte mit einem spezifischen monoklonalen Maus anti-CEACAM Antikörper (D14HD11).

#### 4.2.6 Das Aktinzytoskelett spielt keine Rolle bei der CEACAM1-vermittelten Invasion Opa-negativer Meningokokken

Bei der Aufnahme pathogener Bakterien spielt das Aktinzytoskelett aufgrund von diversen Oberflächenrezeptoren ausgehenden Signaltransduktionskaskaden häufig eine wichtige Rolle. Beispielsweise werden durch Interaktion von Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken mit humanem CEACAM3 Signaltransduktionskaskaden ausgelöst, die zur Umgestaltung der

zellulären Aktinstrukturen führen und letztendlich eine Phagozytose der Bakterien zur Folge haben (Schmitter et al., 2004; McCaw et al., 2003; Billker et al., 2002). Interessanterweise spielt das Aktinzytoskelett bei der Aufnahme Opa<sub>52</sub>-exprimierender Gonokokken über CEACAM1 nahezu keine Rolle (Muenzner et al., 2007). Da andere Arbeitsgruppen jedoch Verbindungen zwischen dem Aktinzytoskelett und CEACAM1 nachweisen konnten (Schumann 2001, Da Silva-Azevedo und Reutter 1999), sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Opa-Protein-unabhängige, CEACAM1-vermittelte Aufnahme der Meningokokken abhängig vom Aktinzytoskelett ist. Daher wurden CEACAM1-transfizierte Zellen bzw. kontrolltransfizierte (pcDNA) Zellen in Anwesenheit oder Abwesenheit eines Inhibitors der Aktinzytoskelett-Dynamik mit Opa-negativen Meningokokken infiziert und die Invasionsrate der pathogenen Bakterien im Antibiotika-Protektions-Assay ermittelt. Als Positivkontrolle dienten CEACAM3-transfizierte Zellen, die mit Opa-positiven Gonokokken infiziert wurden (Abb. 4.8).



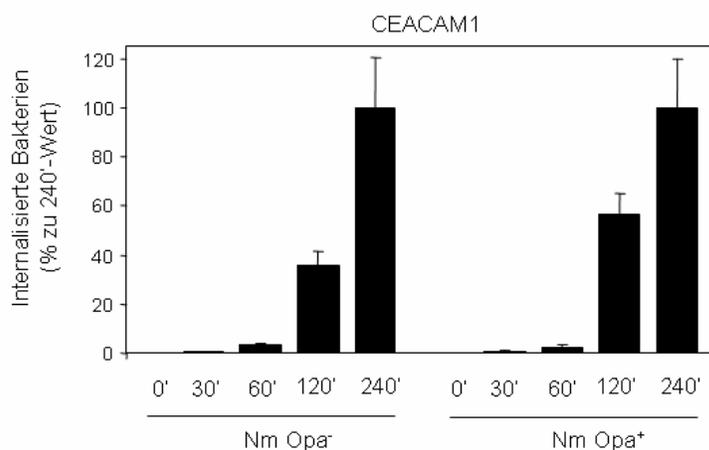
**Abb. 4.8: Einfluß von Inhibitoren der Aktin-Dynamik auf die Aufnahme opaquer Gonokokken.** 293T-Zellen wurden mit cDNA für CEACAM1-HA, CEACAM3-HA oder dem leeren Expressionsvektor (pcDNA) transient transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen nach 30 minütiger Vorinkubation mit Cytochalasin D (1µg/µl) für zwei Stunden mit nicht-opaen Meningokokken bzw. mit Opa<sub>CEA</sub>-Gonokokken mit einer MOI von 40 infiziert. Die Anzahl der lebenden, internalisierten Bakterien wurde durch einen Antibiotika-Protektions-Assay ermittelt. Die Grafik zeigt die prozentualen Mittelwerte mit Standardabweichung von drei, in Triplets durchgeführten, unabhängigen Experimenten.

Bei Verwendung von Cytochalasin D, einem Inhibitor der Aktin-Filament-Elongation (Urbanik und Ware, 1989), konnte keine signifikante Reduktion der CEACAM1-vermittelten Aufnahme Opa-negativer Meningokokken im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt werden (Abb. 4.8 A). Das Invasionsmuster war dabei vergleichbar mit dem von Opa-positiven Gonokokken. Im Gegensatz zur CEACAM1-vermittelten Aufnahme wurde in Anwesenheit

von Cytochalasin D die CEACAM3-vermittelte Aufnahme Opa-positiver Gonokokken um ca. 80% reduziert. Der verwendete Inhibitor war somit funktionell. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei Verwendung von Latrunculin B, einem Inhibitor der Aktinpolymerisation (Wakatsuki et al., 2001) erzielt (Abb. 4.8 B). Die CEACAM1-vermittelte Aufnahme Opa-negativer Meningokokken scheint daher unabhängig von Umordnungen des Aktinzytoskeletts der Zellen zu sein.

#### 4.2.7 Die Kinetik der CEACAM1-vermittelten Aufnahme Opa-negativer Meningokokken ist vergleichbar mit der Opa-positiver Meningokokken

Beim Vergleich der Kinetik der CEACAM1-vermittelten Aufnahme Opa-negativer Meningokokken mit der von Opa-positiven Meningokokken über einen Zeitraum von vier Stunden konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (Abb. 4.9).



**Abb. 4.9: Die Kinetik der CEACAM1-vermittelten Aufnahme Opa-negativer und Opa-positiver Meningokokken unterscheidet sich nicht.** 293T-Zellen wurden mit cDNA für CEACAM1-HA oder dem leeren Expressionsvektor (pcDNA) transient transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiten (0 min – 240 min) mit Opa-negativen Meningokokken bzw. Opa-positiven Meningokokken mit einer MOI von 40 infiziert. Die Anzahl der lebenden, internalisierten Bakterien wurde durch einen Antibiotika-Protektions-Assay ermittelt. Bei der Darstellung wurde die zu den jeweiligen Zeitpunkten erhaltene Hintergrundinvasion (pcDNA-transfizierte Zellen) von den entsprechenden CEACAM1-Invasionswerten subtrahiert. Die Grafik zeigt die prozentualen Mittelwerte mit Standardabweichung von drei, in Triplets durchgeführten, unabhängigen Experimenten.

Die prozentuale Aufnahme beider Bakterienstämme war zu den untersuchten Zeitpunkten (0 min, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min) ähnlich. Wohingegen bei 30 Minuten und 60 Minuten kaum Invasion zu verzeichnen war, erfolgte eine effiziente Internalisierung beider

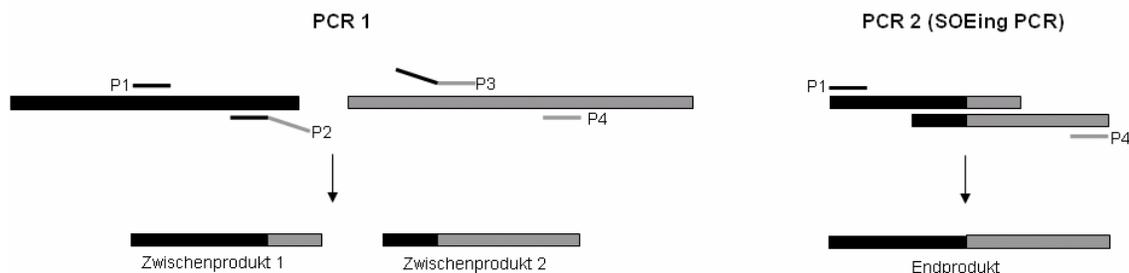
Stämme nach 120 Minuten Infektionszeit, die nach 240 minütiger Infektion noch gesteigert wurde. Die Aufnahmeprozesse Opa-negativer Meningokokken über CEACAM1 scheinen daher im zeitlichen Verlauf vergleichbar mit der Aufnahme Opa-positiver Meningokokken zu sein.

#### **4.2.8 Die CEACAM1-vermittelte Aufnahme Opa-negativer Meningokokken erfordert mehrere Domänen des Rezeptors**

Humanes CEACAM1 stellt einen Rezeptor verschiedener Adhäsine pathogener Bakterien dar (Gray-Owen und Blumberg, 2006). Bakterielle Adhäsine, wie UspA1 (*Moraxella catarrhalis*), Protein P5 (*Haemophilus influenzae*) und Opa<sub>CEA</sub> (pathogene Neisserien) erkennen die IgV-ähnliche aminoternale Domäne von CEACAM1. Die Assoziation der Bakterien mit dieser Domäne des zellulären Rezeptors hat die Induktion einer Signaltransduktionskaskade zur Folge, die in der Aufnahme der Bakterien resultiert. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Stamm aus *Neisseria meningitidis* MC58 isoliert, der auch unabhängig von der Expression der Opa-Proteine von CEACAM1-exprimierenden Zellen aufgenommen werden kann. Da die CEACAM1-vermittelte Aufnahme dieser Bakterien durch ein noch unbekanntes Adhäsins stattzufinden scheint, sollte im Folgenden ermittelt werden, welche Domänen von CEACAM1 notwendig für die Internalisierung Opa-negativer Meningokokken sind. Für diese Untersuchungen wurden CEACAM1-Konstrukte mit unterschiedlichen Domänen hergestellt. Diese setzten sich zusammen aus der IgV-ähnlichen, aminoterminalen Domäne von CEACAM1, gefolgt von keiner (CEA1-N-variant), einer (CEA1-NA1-variant) oder zwei (CEA1-NA1B-variant) IgC-ähnlichen extrazellulären Domänen des Rezeptors, die mit der Zytoplasmatischen- und Transmembrandomäne von CEACAM1 fusioniert wurden. Das chimäre Protein CEA8/1-chimera setzt sich zusammen aus wildtypischem CEACAM1, dessen aminoternale Domäne mit der von CEACAM8 ausgetauscht wurde (Abb. 4.11 A).

Die Konstruktion der CEACAM-Varianten bzw. CEACAM-Chimären erfolgte mittels *SOEing*-PCR, deren Prinzip in Abbildung 4.10 schematisch dargestellt ist. In Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3 sind die Primer und Matrizen aufgelistet, die zur Amplifikation der entsprechenden Zwischenprodukte verwendet wurden (PCR1). Diese wurden aufgrund ihrer homologen Bereiche zu einem Molekül fusioniert (PCR2). Die dafür verwendeten *sense*- und *antisense* Primer waren jeweils mit einer *In-Fusion*-Sequenz ausgestattet, darüber hinaus besaß der verwendete *antisense*-Primer ein Stop-Codon gefolgt von der endständigen Sequenz

des HA-Tags. Die Fusionsprodukte wurden mittels *In-Fusion*-Reaktion in den prälinearisierten eukaryontischen Expressionsvektor pDNR-CMV kloniert (vgl. Plasmidkarten Kapitel 11.2) und durch Sequenzierung und Restriktionsanalyse verifiziert.



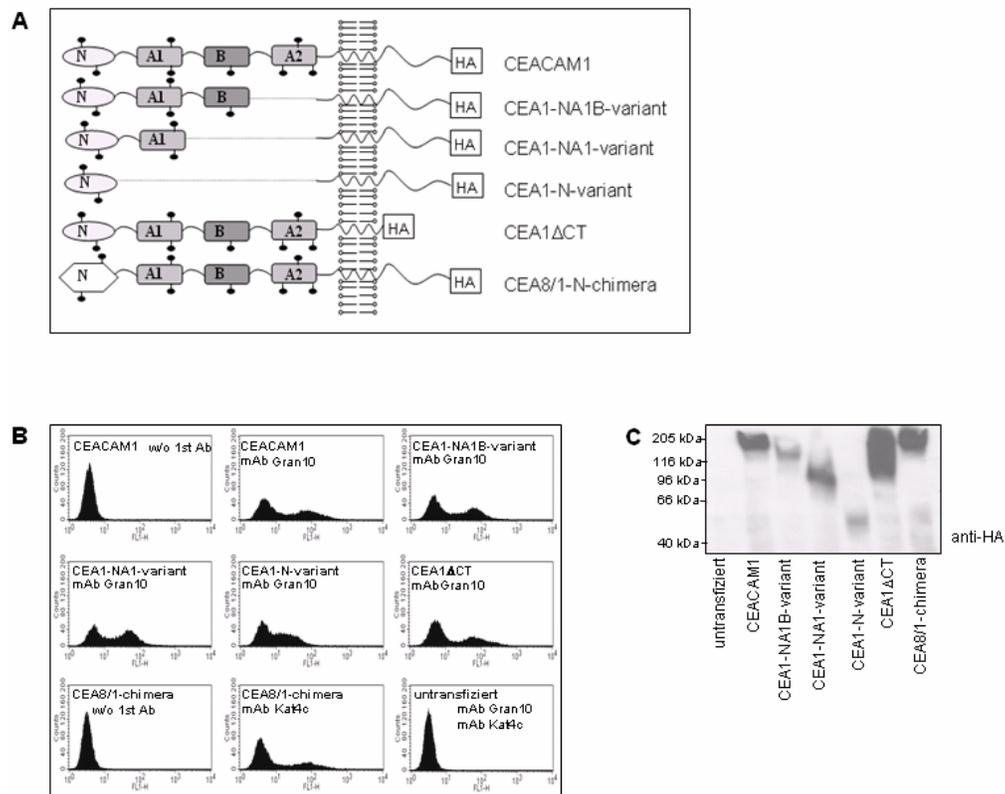
**Abb. 4.10: Schematische Darstellung des Prinzips des *Gene-SOEing*.** In einer ersten PCR wurden die zu fusionierenden Teile der verschiedenen DNA-Moleküle amplifiziert. Primer 2 und 3 (P2, P3) waren dabei so konstruiert, dass die Zwischenprodukte jeweils überlappende, homologe Bereiche mit dem zu fusionierenden DNA Molekül trugen. In einer zweiten PCR (*SOEing* PCR) dienten die Zwischenprodukte als Ausgangsmoleküle und konnten aufgrund der homologen Bereiche zu einem Molekül fusioniert werden. Das fusionierte Endprodukt wurde mit den Primern P1 und P4 amplifiziert.

**Tab. 4.2: Primer und Matrizen zur Amplifikation der Zwischenprodukte für die Herstellung der CEACAM1-Varianten über *SOEing*-PCR.**

Zwischenprodukt	Primer	Matrize
CEA1-N	Ceacam1-IF-sense (P1) C1-Chim-N-TM-anti (P2)	cDNA humaner CEACAM1-HA
CEA1-TM-zyto-1	C1-Chim-N-TM-sense (P3) Cea1-HA-stop-IF-anti (P4)	cDNA humaner CEACAM1-HA
CEA1-NA1	Ceacam1-IF-sense (P1) C1-Chim-NA1-TM-anti (P2)	cDNA humaner CEACAM1-HA
CEA1-TM-zyto-2	C1-Chim-NA1-TM-sense (P3) Cea1-HA-stop-IF-anti (P4)	cDNA humaner CEACAM1-HA
CEA1-NA1B	Ceacam1-IF-sense (P1) C1-Chim-NA1B-TM-anti (P2)	cDNA humaner CEACAM1-HA
CEA1-TM-zyto-3	C1-Chim-NA1B-TM-sense (P3) Cea1-HA-stop-IF-anti (P4)	cDNA humaner CEACAM1-HA
CEA8-N	Cea8-IF-sense (P1) Cea8/1-Chimera-anti (P2)	cDNA humaner CEACAM8
CEA1-TM-zyto-4	Cea8/1-Chimera-sense (P3) Cea1-HA-stop-IF-anti (P4)	cDNA humaner CEACAM1-HA

Tab. 4.3: Primer und Matrizen für die Herstellung der CEACAM1-Varianten mittels *SOEing-PCR*.

Endprodukt	Zwischenprodukte	Primer	Größe [kb]
CEA1N-variant	CEA1-N CEA1-TM-zyto-1	Ceacam1-IF-sense (P1) Cea1-HA-stop-IF-anti (P4)	0,9
CEA1-NA1-variant	CEA1-NA1 CEA1-TM-zyto-2	Ceacam1-IF-sense (P1) Cea1-HA-stop-IF-anti (P4)	1,2
CEA1-NA1B-variant	CEA1-NA1B CEA1-TM-zyto-3	Ceacam1-IF-sense (P1) Cea1-HA-stop-IF-anti (P4)	1,4
CEA8/1-chimera	CEA8-N CEA1-TM-zyto-4	Cea8-IF-sense (P1) Cea1-HA-stop-IF-anti (P4)	1,7

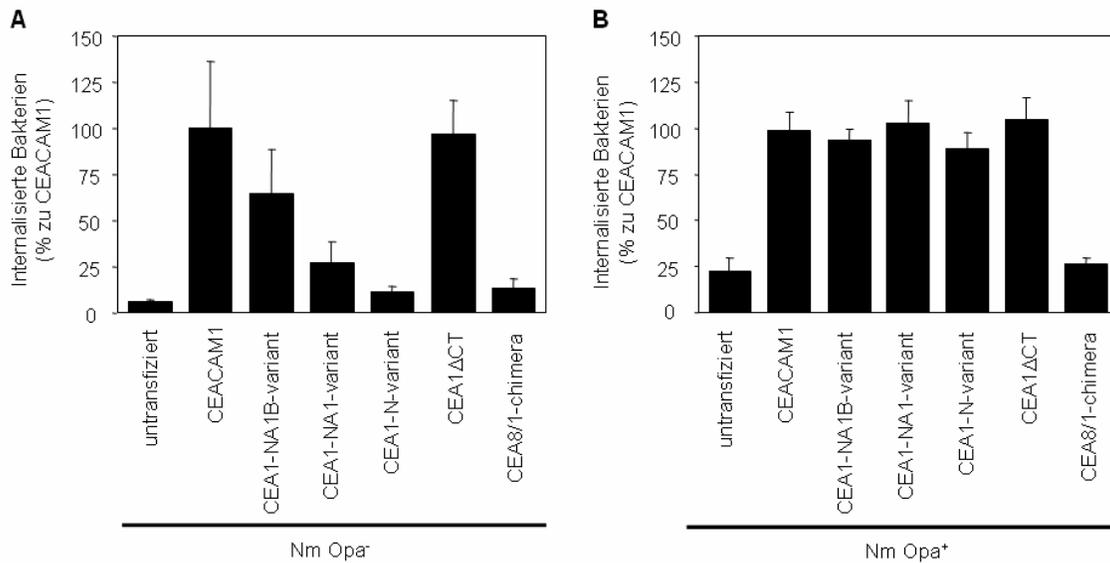


**Abb. 4.11: Expression der verwendeten CEACAM1-Varianten und Chimären.** (A) Schematische Darstellung der verwendeten CEACAM1-Varianten, Chimären und des CEACAM1 Wildtyps. Die CEACAM1-Varianten setzen sich zusammen aus der aminoterminalen IgV-ähnlichen Domäne (N) und einer unterschiedlichen Anzahl von IgC2-ähnlichen extrazellulären Domänen (A1, B, A2) von CEACAM1, die mit der Transmembran- und der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1 fusioniert wurden. Beim chimären Protein CEA8/1-chimera wurde die aminoterminal Domäne von CEACAM1 mit der von CEACAM8 ausgetauscht. Alle Konstrukte besitzen an ihrem carboxyterminalen Ende einen HA-tag. (B) Kontrolle der Oberflächenexpression der CEACAM1-Konstrukte mittels Durchflußzytometrie. 293T-Zellen wurden mit cDNA der verschiedenen CEACAM1-Konstrukte transfiziert oder blieben untransfiziert. Die Analyse der Zellen erfolgte im Durchflußzytometer mit den dargestellten Antikörpern, die spezifisch extrazelluläre Bereiche der Konstrukte erkennen. (C) Expressionskontrolle der CEACAM1-Konstrukte im Western-Blot. 293T-Zellen wurden mit cDNA der dargestellten CEACAM1-Konstrukte transfiziert oder blieben untransfiziert. Die Detektion der Konstrukte im Zelllysate erfolgte mit dem anti-HA Antikörper.

Die hergestellten Konstrukte (CEA1-N-variant, CEA1-NA1-variant, CEA1-NA1B-variant und CEA8/1-chimera), sowie CEACAM1-HA und CEACAM1 $\Delta$ CT (ein Konstrukt mit einer Deletion der zytoplasmatischen Domäne) wurden in 293T-Zellen transfiziert und im Western Blot mittels anti-HA Antikörper auf Expression und Größe hin überprüft. In den Zelllysaten der transfizierten Zellen konnten die rekombinanten Proteine mit dem jeweiligen erwarteten Molekulargewicht detektiert werden (Abb. 4.11 C). CEA1-N-variant hatte ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa, CEA1-NA1-variant von ca. 100 kDa, CEA1-NA1B-variant ca. 150 kDa und das chimäre Protein CEA8/1-chimera 180 kDa. Durchflußzytometrische Analysen der mit den Konstrukten transfizierten Zellen zeigen, dass die rekombinanten Proteine auf der Zelloberfläche lokalisiert und somit für pathogene Bakterien zugänglich sind (Abb. 4.11 B).

Um zu überprüfen, welche Domänen von CEACAM1 für die Internalisierung Opa-negativer Meningokokken notwendig sind, wurden diese Konstrukte in einem Antibiotika-Protektions-Assay eingesetzt. Hierzu wurden 293T-Zellen mit cDNA der verschiedenen CEACAM1-Konstrukte transfiziert und mit Opa-negativen Meningokokken für zwei Stunden mit 40 Bakterien pro Zelle infiziert. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte Zellen. Zur Überprüfung der Aufnahmefähigkeit der mit den CEACAM1-Konstrukten transfizierten Zellen erfolgte eine Infektion mit Opa-exprimierenden Meningokokken. Die Menge der lebenden, internalisierten Bakterien wurde in Prozent zu wildtypischem CEACAM1 ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass Opa-exprimierende Meningokokken sämtliche CEACAM1-Varianten, die mit der aminoterminalen Domäne von CEACAM1 ausgestattet waren zum Eindringen in die Zellen nutzen konnten, wohingegen Zellen die das chimäre Protein CEA8/1-chimera exprimierten bzw. untransfizierte Zellen keine Invasion der Bakterien vermittelten (Abb. 4.12 B). Im Gegensatz zur Aufnahme Opa-exprimierender Meningokokken konnte bei Opa-negativen Meningokokken ein unterschiedliches Invasionsmuster beobachtet werden (Abb. 4.12 A). Opa-negative Meningokokken wurden sehr effizient über CEACAM1- und CEACAM1 $\Delta$ CT-exprimierende Zellen aufgenommen. Sobald die Zellen CEACAM-Konstrukte mit einer reduzierten Anzahl der IgC-ähnlichen extrazellulären Domänen von CEACAM1 exprimierten (CEA1-NA1B-variant, CEA1-NA1-variant, CEA1-N-variant), wurden auch weniger Opa-negative Meningokokken von den Zellen internalisiert. Die Invasion Opa-negativer Meningokokken in Zellen, die CEA1-N-variant bzw. CEA8/1-chimera exprimierten, war vergleichbar mit Zellen, die kein CEACAM exprimierten (Negativkontrolle). Die Aufnahme Opa-negativer Meningokokken scheint daher von der Anzahl der extrazellulären Domänen von CEACAM1 abhängig zu sein. Dabei ist die

aminoternale Domäne von CEACAM1 notwendig (keine Invasion über CEA8/1-chimera) aber nicht ausreichend (keine Invasion über CEA1-N-variant) für eine effektive Aufnahme Opa-negativer Meningokokken.

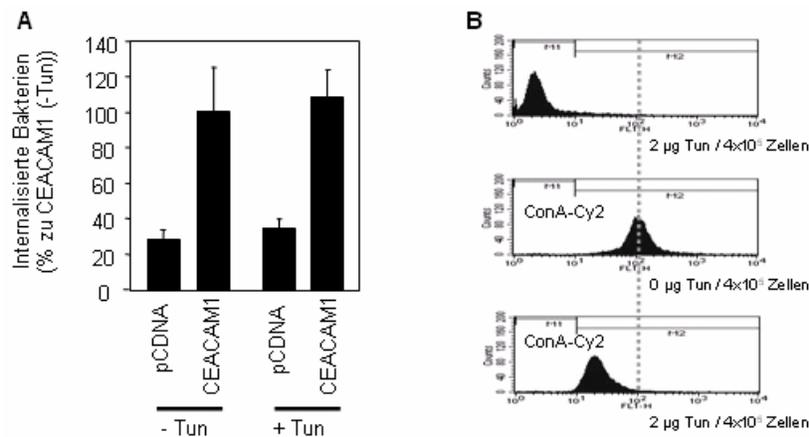


**Abb. 4.12: Nicht-opaque Meningokokken interagieren anders mit CEACAM1 als opaque Meningokokken.** 293T-Zellen wurden mit cDNA von CEACAM1, CEA1-NA1B-variant, CEA1-NA1-variant, CEA1-N-variant, CEA1ΔCT und CEA8/1-chimera transfiziert. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für zwei Stunden mit nicht-opaquen (Nm Opa<sup>-</sup>) (A) bzw. opaquen (Nm Opa<sup>+</sup>) Meningokokken (B) mit einer MOI von 40 infiziert. Die bakterielle Invasion wurde durch einen Antibiotika-Protektions-Assay ermittelt. Die Grafik zeigt die prozentualen Mittelwerte mit Standardabweichung von drei, in Triplets durchgeführten, unabhängigen Experimenten.

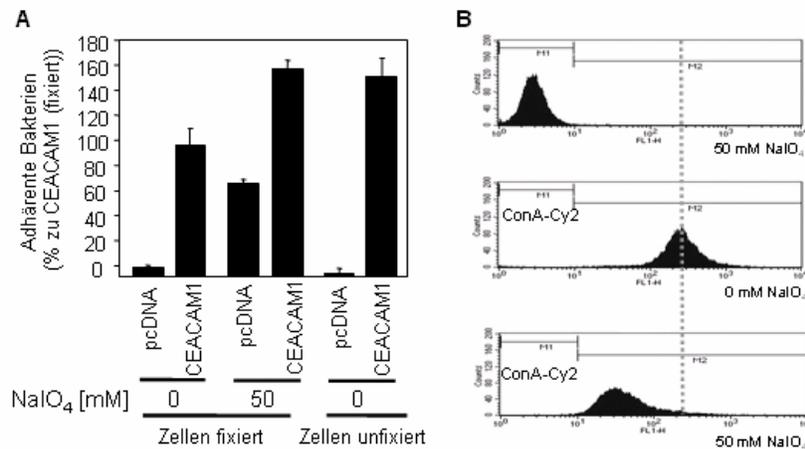
#### 4.2.9 Die CEACAM1-vermittelte Aufnahme Opa-negativer Meningokokken ist unabhängig von Kohlenhydrat-Strukturen des Rezeptors

CEACAM1 stellt einen hochglykosylierten Rezeptor dar. Pathogene wie Opa<sub>CEA</sub>-exprimierende Neisserien, *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae* binden in einer reinen Protein-Protein Interaktion an das Molekül (Bos et al., 1998; Virji et al., 2000; Hill et al., 2001; Hill et al., 2003). Enterobakterien wie *E. coli* und Salmonellen-Stämme können im Gegensatz dazu mit den Kohlenhydrat-Anteilen des Moleküls assoziieren (Leusch et al., 1991). Da die Assoziation Opa-negativen Meningokokken mit CEACAM1 auf einem noch unbekanntem Adhäsion beruht, wurde im Folgenden untersucht, ob Glykosylierungen des Rezeptors essentiell für die Interaktion mit den Bakterien sind. CEACAM1-transfizierte bzw. kontrolltransfizierte Zellen wurden daher mit verschiedenen Chemikalien behandelt, die den

Glykosylierungsgrad der Zellen reduzieren, oder blieben unbehandelt und wurden mit Opa-negativen Meningokokken infiziert. Die Reduktion des Glykosylierungsgrades nach Behandlung der Zellen mit den entsprechenden Chemikalien konnte mit dem Kohlenhydrat-bindenden fluoreszenzmarkierten Lektin ConcanavalinA (ConA-Cy2) im Durchflußzytometer determiniert werden. Sowohl eine Präinkubation der Zellen mit  $2\mu\text{g}$  Tunicamicin pro  $4 \times 10^5$  Zellen, einem Inhibitor der N-Glykosylierung, als auch eine Behandlung der Zellen mit 50 mM des Oxidationsmittels Natriumperodat ( $\text{NaIO}_4$ ), welches cis-diol Gruppen der Kohlenhydrate zu Aldehyden oxidiert, resultierte in einer starken Reduktion des Glykosylierungsgrades (Abb. 4.13 B, Abb. 4.14 B). Eine Infektion von mit Tunicamicin behandelten Zellen mit Opa-negativen Meningokokken ergab keine wesentlichen Unterschiede bei der CEACAM1-vermittelten Aufnahme der Bakterien im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 4.13 A). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Verwendung des Oxidationsmittels Natriumperodat erzielt. Unabhängig von der Behandlung fixierter Zellen mit dem Oxidationsmittel adhärten Opa-negative Meningokokken stärker an CEACAM1-transfizierte Zellen, als an untransfizierte Zellen (Abb. 4.14 B). Die Zellen wurden fixiert, um ein Ablösen bei Inkubation mit dem Oxidationsmittel zu verhindern. Es konnte daher nur die Adhärenz der Bakterien an die Zellen bestimmt werden.



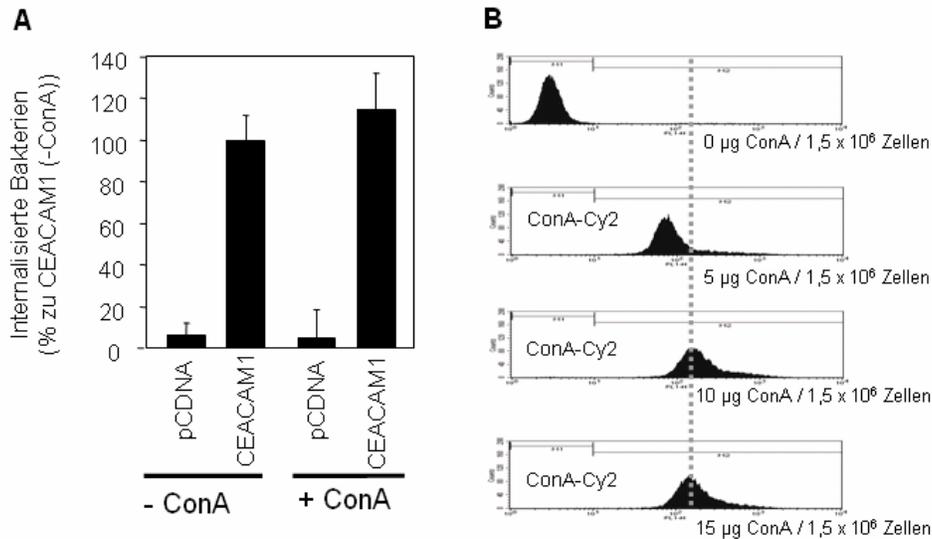
**Abb. 4.13: Die reduzierte Glykosylierung von Zellen nach Behandlung mit Tunicamicin hat keinen Effekt auf die CEACAM1-vermittelte Invasion Opa-negativer Meningokokken** (A) Gentamycin-Assay mit Tunicamicin behandelten Zellen. 293T-Zellen wurden mit cDNA für CEACAM1-HA oder dem leeren Expressionsvektor transient transfiziert und in einem Antibiotika-Protektions-Assay eingesetzt. Die Zellen wurden 24 h vor Infektion mit nicht-opaenen Meningokokken (MOI 40, 2h) mit oder ohne Tunicamicin ( $2\mu\text{g} / 4 \times 10^5$  Zellen) präinkubiert. Die Grafik zeigt die Zahl der lebensfähigen Bakterien in Prozent von drei, in Triplets durchgeführten, unabhängigen Experimenten. (B) Kontrolle der Deglykosylierung durch Tunicamicin. CEACAM1-transfizierte 293T-Zellen wurden 24 h vor Analyse mit oder ohne Tunicamicin ( $2\mu\text{g} / 4 \times 10^5$  Zellen) präinkubiert. Mit Hilfe des Cy2-gekoppelten Lektins ConcanavalinA (ConA-Cy2) konnte der Glykosylierungsgrad der Zellen mittels Durchflußzytometrie untersucht werden.



**Abb. 4.14: Die Oxidation von Kohlenhydratstrukturen der Zellen mit NaIO<sub>4</sub> hat keinen Effekt auf die CEACAM1-vermittelte Adhärenz Opa-negativer Meningokokken.** (A) Adhärenz-Assay mit NaIO<sub>4</sub> behandelten Zellen. 293T-Zellen wurden mit der cDNA für CEACAM1-HA oder dem leeren Expressionsvektor transient transfiziert und in einem Adhärenz-Assay eingesetzt. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit oder ohne NaIO<sub>4</sub> (50 mM) für 5 min bei 37°C im Dunkeln präinkubiert. Nach Waschen der Zellen erfolgte die Infektion mit nicht-opaen Meningokokken (MOI 40, 2h). Als Kontrolle für eine effektive Adhärenz der Bakterien an fixierte Zellen dienten mit NaIO<sub>4</sub> unbehandelte, nicht fixierte Zellen. Die Grafik zeigt die Zahl der adhärenen Bakterien in Prozent von drei, in Triplets durchgeführten, unabhängigen Experimenten. (B) Kontrolle der Oxidation der Zucker mittels NaIO<sub>4</sub>. CEACAM1-transfizierte 293T-Zellen mit oder ohne NaIO<sub>4</sub> (50 mM) für 5 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach Waschen der Zellen konnte mit Hilfe des Cy2-gekoppelten Lektins ConcanavalinA (ConA-Cy2) der Glykosylierungsgrad der Zellen mittels Durchflußzytometrie untersucht werden.

Auch bei Blockierung verschiedener Kohlenhydratstrukturen, wie  $\alpha$ -mannopyranosyl- oder  $\alpha$ -glucopyranosyl-Reste, durch Präinkubation der Zellen mit dem Lektin ConcanavalinA (ConA-Cy2) konnte keine Reduktion der Aufnahme der Opa-negativen Meningokokken über CEACAM1 festgestellt werden (Abb. 4.15 A). Die zur Blockierung verwendete Lektinkonzentration (15  $\mu$ g/  $1,5 \times 10^6$  Zellen) wurde dabei so gewählt, dass sämtliche ConA-interagierende Kohlenhydratstrukturen auf den Zellen abgesättigt waren (Abb. 4.15 B).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass Kohlenhydratstrukturen auf der Oberfläche der Zellen keine Rolle bei der CEACAM1-vermittelten Aufnahme Opa-negativer Meningokokken zu spielen scheinen.

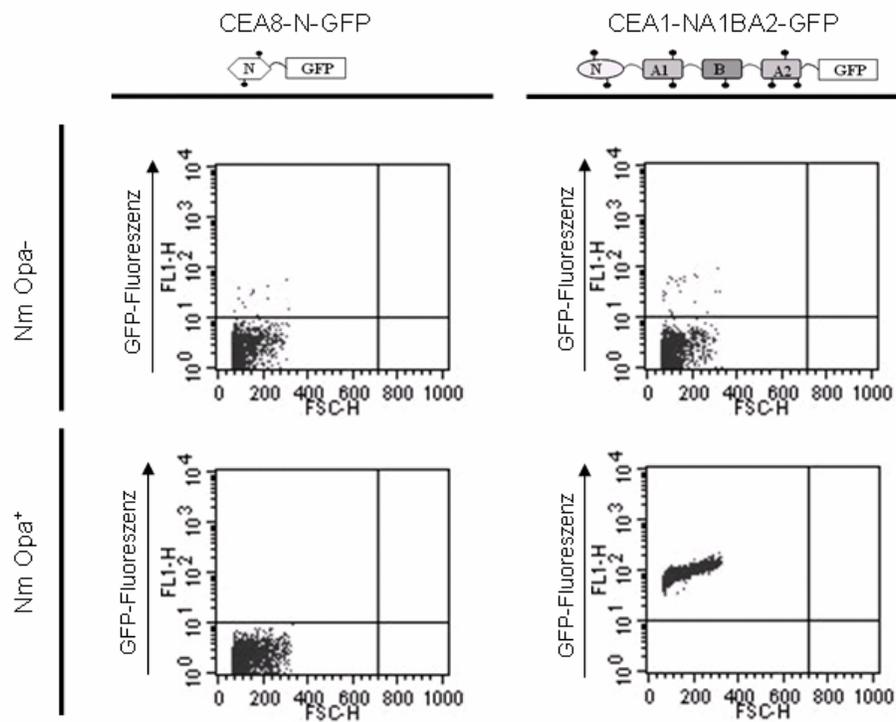


**Abb. 4.15: Eine Blockierung der  $\alpha$ -mannopyranosyl- und  $\alpha$ -glucopyranosyl-Reste der Zellen mit ConcanavalinA hat keinen Effekt auf die CEACAM1-vermittelte Invasion Opa-negativer Meningokokken.** (A) Antibiotika-Protektions-Assay mit ConcanavalinA behandelten Zellen. 293T-Zellen wurden mit der cDNA für CEACAM1-HA oder dem leeren Expressionsvektor transient transfiziert und in einem Antibiotika-Protektions-Assay eingesetzt. Die Zellen wurden mit oder ohne ConA-Cy2 (15 µg / 1,5 x 10<sup>6</sup> Zellen) für 30 min. präinkubiert. Nach Waschen der Zellen erfolgte die Infektion mit nicht-opaen Meningokokken (MOI 40, 2h). Die Grafik zeigt die Zahl der lebensfähigen Bakterien in Prozent von drei, in Triplets durchgeführten, unabhängigen Experimenten. (B) Kontrolle der Absättigung mittels ConcanavalinA (ConA-Cy2). CEACAM1-transfizierte 293T-Zellen wurden 30 min vor Analyse mit unterschiedlichen Mengen ConA-Cy2 präinkubiert. Nach anschließendem Waschen konnte die Absättigung  $\alpha$ -mannopyranosyl- und  $\alpha$ -glucopyranosyl-Reste mittels Durchflußzytometrie untersucht werden.

#### 4.2.10 Multimerisiertes CEACAM1 - aber nicht monomeres CEACAM1 - bindet an Opa-negative Meningokokken

Vorangegangene Experimente zeigten, dass Opa-negative Meningokokken bei der Invasion CEACAM1-transfizierter Zellen mit CEACAM1 kolokalisieren (Abb. 4.6) und in Abhängigkeit von CEACAM1 in die Zellen eindringen. Es kann daher vermutet werden, dass die Internalisierung auf eine direkte Interaktion der Bakterien mit CEACAM1 zurückzuführen ist. Es könnte jedoch auch sein, dass die nicht-opaen Bakterien mit einem anderen Membranprotein interagieren, dass dann z.B. über eine laterale Assoziation mit CEACAM1 die Internalisierung der Erreger einleitet. Um eine direkte Assoziation zwischen den Opa-negativen Meningokokken und CEACAM1 zu überprüfen, wurde daher die in Kapitel 2 vorgestellte Rezeptor-Bindungsmethode angewandt. Hierzu wurden Opa-negative Meningokokken mit fluoreszierenden, löslichen CEA1-NA1BA2-GFP-enthaltenden bzw. als Kontrolle mit CEA8-N-GFP-enthaltenden Zellkulturüberständen inkubiert und nach anschließendem Waschen der Bakterien direkt im Durchflußzytometer auf GFP-Fluoreszenz

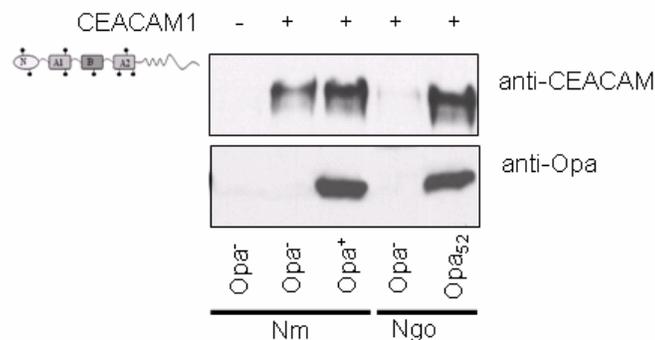
analysiert. Als Positivkontrolle für eine mögliche CEACAM1-Interaktion wurden Opa-positive Meningokokken eingesetzt. Aus den Untersuchungen ging hervor, dass Opa-negative Meningokokken im Gegensatz zu Opa-positiven Meningokokken keine erhöhte Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit den löslichen CEACAM1-Konstrukten aufwiesen (Abb. 4.16). Die gemessene Intensität war vergleichbar mit den nach Inkubation mit CEA8-N-GFP (Negativkontrolle) ermittelten Werten. Dieser Befund war nach den vorausgegangenen funktionellen Untersuchungen überraschend und könnte bedeuten, dass Opa-negative Meningokokken nicht mit dem fluoreszierenden, löslichen CEACAM1 Konstrukt CEA1-NA1BA2-GFP interagieren.



**Abb. 4.16: Lösliches CEA1-NA1BA2-GFP bindet nicht an Opa-negative Meningokokken.** Opa-negative (Nm Opa<sup>-</sup>) bzw. Opa-positive (Nm Opa<sup>+</sup>) Meningokokken wurden mit CEA1-NA1BA2-GFP- oder CEA8-N-GFP (Negativkontrolle) enthaltenden Zellkulturüberständen inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurden die Bakterien in FACS-Puffer resuspendiert und auf CEACAM-Bindung mittels Durchflußzytometrie durch Messung der mit den Bakterien assoziierten GFP-Fluoreszenz analysiert. Von jeder Probe wurden jeweils 10000 Ereignisse gemessen. Dargestellt sind die originalen Dot Plots eines repräsentativen Experiments.

Da dem löslichen CEA1-NA1BA2-GFP Konstrukt die Transmembran- und zytoplasmatische Domäne von CEACAM1-Wildtyp fehlen, sollte mit dem folgenden Experiment untersucht werden, ob Opa-negative Meningokokken mit CEACAM1-Wildtyp oder einem CEACAM1-enthaltenden Komplex assoziieren. Hierzu wurden Opa-negative Meningokokken mit

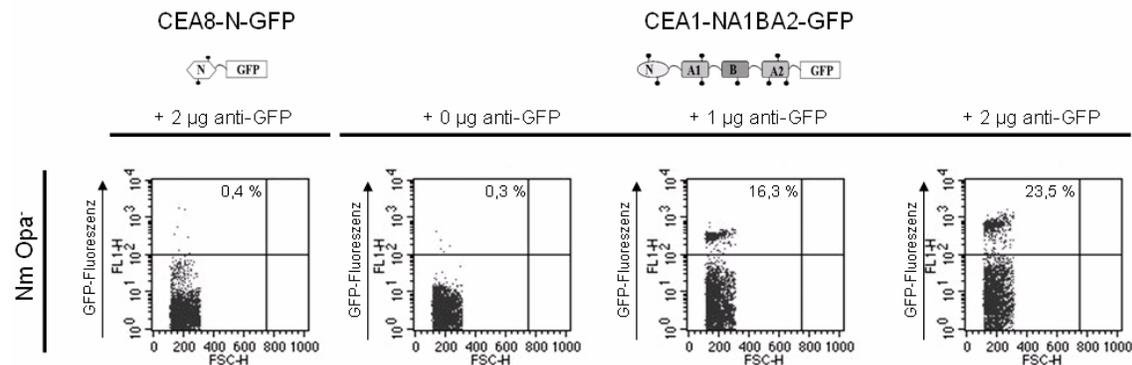
verdünnten Zelllysaten von CEACAM1-transfizierten bzw. kontrolltransfizierten Zellen inkubiert. Nach Waschen wurden die Bakterien durch Western Blot Analyse auf CEACAM-Bindung mittels anti-CEACAM Antikörper untersucht. Als Kontrolle wurde das Experiment gleichzeitig mit Opa-positiven Meningo- und Gonokokken bzw. mit Opa-negativen Gonokokken durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten, dass sowohl Opa-positive Neisserien-Stämme, als auch Opa-negative Meningokokken mit CEACAM1 assoziierten (Abb. 4.17). Die CEACAM1-Assoziation Opa-negativer Meningokokken war dabei etwas geringer ausgeprägt als bei Opa-positiven Bakterien, wie sich an der schwächeren CEACAM1-Bande im Blot erkennen lässt. Opa-negative Gonokokken assoziierten nicht mit CEACAM1. Die in diesem Experiment erworbenen Erkenntnisse weisen darauf hin, dass Opa-negative Meningokokken direkt mit CEACAM1 oder einem CEACAM1-enthaltenden Komplex interagieren können.



**Abb. 4.17: CEACAM1-Wildtyp assoziiert mit Opa-negativen Meningokokken.** 293T-Zellen wurden mit cDNA für CEACAM1 oder dem leeren Expressionsvektor (pcDNA) transient transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit 1%-Triton-Puffer lysiert. Opa-negative (Opa<sup>-</sup>) bzw. Opa-positive (Opa<sup>+</sup>) Meningo- (Nm) und Gonokokken (Ngo) wurden mit den Zelllysaten für 3h bei 4°C inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurden die Bakterien im Western Blot auf CEACAM-Bindung und Opa-Expression mittels anti-CEACAM bzw. anti-Opa Antikörper analysiert.

Untersuchungen mit verschiedenen CEACAM1-interagierenden Pathogenen zeigten (Berger et al., 2004, Hauck und Meyer, 2003), dass CEACAM1 zum Ort der Invasion der Bakterien rekrutiert wird und der Rezeptor an diesen Stellen als Cluster vorliegt. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte durch mikroskopische Untersuchungen (Abb. 4.6) eine Anhäufung von CEACAM1 am Ort der Invasion Opa-negativer Meningokokken beobachtet werden. Da Opa-negative Meningokokken nicht mit löslichem CEA1-NA1BA2-GFP, jedoch mit wildtypischem CEACAM1 zu interagieren scheinen, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Multimerisierung und Aggregation von löslichem CEACAM1 eine direkte

Interaktion mit den Bakterien und dem Rezeptor ermöglicht. Um lösliche, GFP-markierte CEACAM1 Moleküle zu multimerisieren, wurden CEA1-NA1BA2-GFP-enthaltende Zellkulturüberstände bzw. CEA8-N-GFP-enthaltende Zellkulturüberstände (Negativkontrolle) mit unterschiedlichen Mengen (0  $\mu$ l – 2  $\mu$ l) an polyklonalem anti-GFP Antikörper präinkubiert. Die bivalenten, polyklonalen Antikörper sollten für eine Multimerisierung der GFP-markierten CEACAM-Derivate sorgen. Diese vorbehandelten Überstände wurden anschließend für Bindungsstudien mit Opa-negativen Meningokokken eingesetzt. Hierfür wurden die Bakterien mit den vorbehandelten Zellkulturüberständen inkubiert, nach anschließendem Waschen in FACS-Puffer resuspendiert und direkt im Durchflußzytometer auf GFP-Fluoreszenz analysiert (Abb. 4.18).

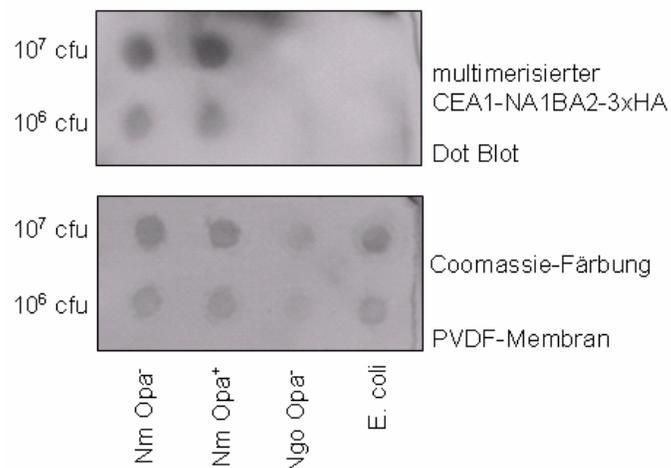


**Abb. 4.18: Multimerisiertes, lösliches CEA1-NA1BA2-GFP bindet an Opa-negative Meningokokken.** Multimerisierung löslicher CEACAM Konstrukte. CEA1-NA1BA2-enthaltende Zellkulturüberstände wurden mit 1  $\mu$ g oder 2  $\mu$ g polyklonalem anti-GFP Antikörper für 2h bei Raumtemperatur inkubiert oder blieben unbehandelt. CEA8-N-GFP-enthaltende Zellkulturüberstände wurden mit 2  $\mu$ l polyklonalem anti-GFP Antikörper inkubiert. Bakterien-Pulldown mit multimerisierten CEACAM-Konstrukten. Opa-negative Meningokokken wurden mit anti-GFP-behandelten CEA1-NA1BA2-GFP- oder CEA8-N-GFP-enthaltenden Zellkulturüberständen inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurden die Bakterien auf CEACAM-Bindung mittels Durchflußzytometrie durch Messung der mit den Bakterien assoziierten GFP-Fluoreszenz analysiert. Von jeder Probe wurden jeweils 10000 Ereignisse gemessen. Dargestellt sind die originalen Dot Plots eines repräsentativen Experiments. Die Zahlen stehen für den Prozentsatz an Opa-negativen Meningokokken, die mit CEA1-NA1BA2-assoziieren.

Gemessen an der Hintergrundfluoreszenz des Kontrollansatzes (CEA8-N-GFP), wiesen Opa-negative Meningokokken eine erhöhte Fluoreszenz auf, sobald sie mit anti-GFP Antikörper vorbehandelten CEA1-NA1BA2-GFP-Zellkulturüberständen inkubiert wurden. Dabei erhöhte sich der Anteil der fluoreszierenden Bakterien in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge des zur Vernetzung der löslichen CEACAM1 Moleküle verwendeten Antikörpers. Bei Präinkubation mit 1  $\mu$ g anti-GFP wiesen etwa 16% der Bakterien eine erhöhte Fluoreszenz auf, wohingegen nach Zugabe von 2  $\mu$ g anti-GFP 23,5% der Bakterien eine erhöhte

Fluoreszenz besaßen. Bakterien, die mit unbehandelten CEA1-NA1BA2-GFP Überständen inkubiert wurden, hatten eine zur Negativkontrolle (CEA8-N-GFP) vergleichbare Hintergrundfluoreszenz. Aus den Ergebnissen ging hervor, dass Opa-negative Meningokokken direkt an multimerisierte, lösliche CEA1-NA1BA2-GFP Konstrukte binden können.

Vergleichbare Ergebnisse konnten auch mit einem multimerisierten, löslichen CEACAM1-Konstrukt, das einen dreifachen HA-tag an seinem carboxyterminalen Ende besaß (CEA1-NA1BA2-3xHA), erzielt werden. Dieses Konstrukt wurde mittels monoklonalem anti-HA Antikörper multimerisiert und in Dot Blot Analysen eingesetzt. Bei der Dot Blot Analyse wurden lebende Opa-negative Meningokokken und verschiedene Kontrollstämme (Nm Opa<sup>+</sup>, Ngo Opa<sup>-</sup>, *E. coli*) auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Zellkulturüberständen, die multimerisierten CEA1-NA1BA2-3xHA enthielten, für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließendem Waschen der PVDF-Membran erfolgte die Detektion von multimerisierten CEA1NA1BA2-3xHA mit einem Antikörper gegen anti-HA. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl Opa-negative als auch Opa-positive Meningokokken mit multimerisiertem CEA1-NA1BA2-3xHA interagierten. Opa-negative Gonokokken und *E. coli*-Bakterien wiesen keine Assoziation zu dem löslichen CEACAM1-Konstrukt auf (Abb. 4.19).

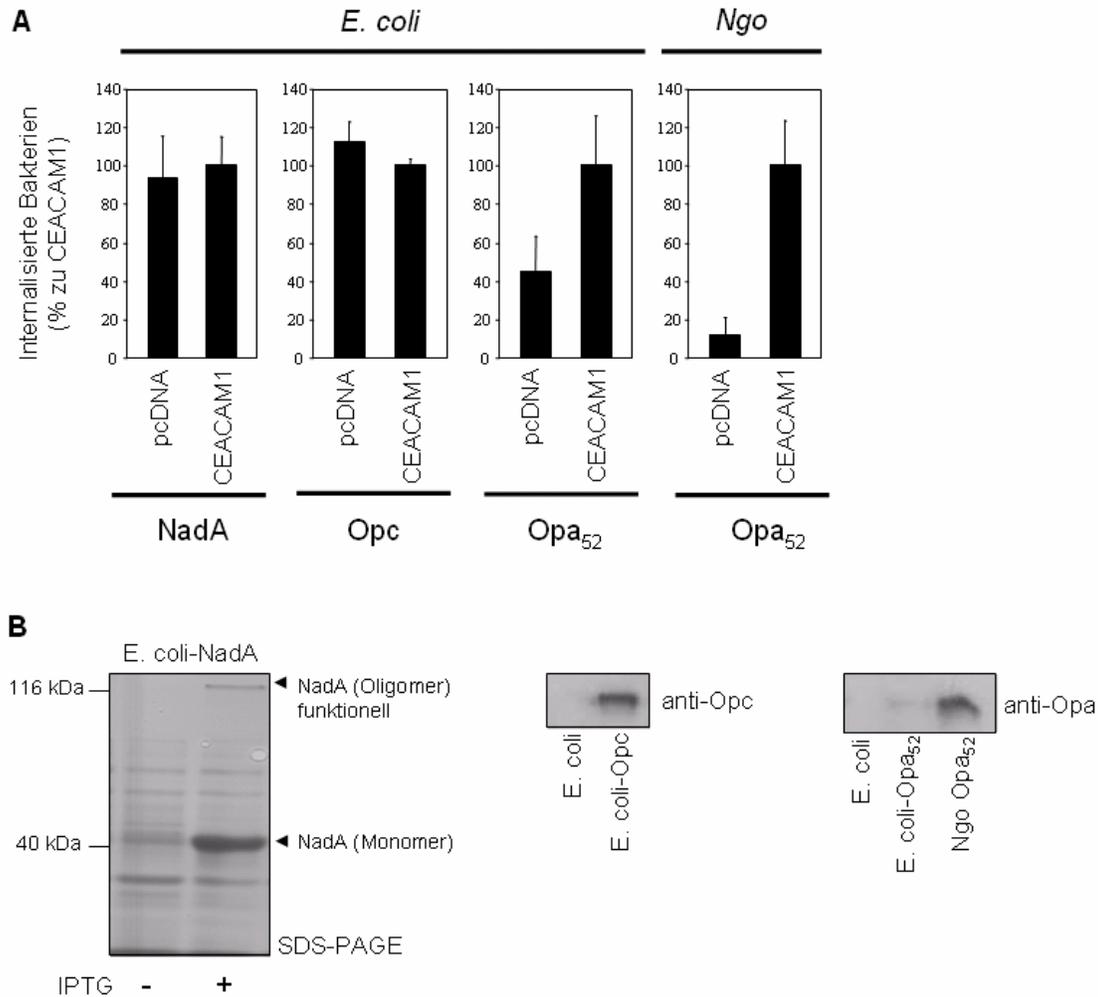


**Abb. 4.19: Multimerisiertes, lösliches CEA1-NA1BA2-3xHA bindet an Opa-negative Meningokokken.**  $1 \times 10^7$  bzw.  $1 \times 10^6$  lebende Bakterien von Opa-negativen Meningokokken (Nm Opa<sup>-</sup>) und Gonokokken (Ngo Opa<sup>-</sup>) sowie Opa-positiven Meningokokken (Nm Opa<sup>+</sup>) und *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>r</sup> (*E. coli*) wurden auf eine PVDF-Membran in Form eines Dot Blots transferiert. Die PVDF-Membran wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit Zellkulturüberständen mit multimerisiertem CEA1-NA1BA2-3xHA inkubiert. Nach anschließendem Waschen erfolgte die Detektion von multimerisiertem CEA1-NA1BA2-3xHA durch einen Zweit-Antikörper gegen anti-HA. Zur Mengenkontrolle der transferierten Bakterien wurde die PVDF-Membran mit Coomassie gefärbt.

Bei Verwendung von mit anti-HA Antikörper behandelten Zellkulturüberständen ohne lösliches CEACAM1 als Kontrolle konnte bei keinem Bakterien-Stamm ein Signal festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus führte eine Inkubation Opa-negativer Meningokokken mit nicht-multimerisierten CEA1-NA1BA2-3xHA Zellkulturüberständen zu keiner Interaktion mit CEACAM1 (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde sprechen dafür, dass Opa-negative Meningokokken mit multimerisiertem CEA1-NA1BA2-3xHA assoziieren.

#### **4.2.11 Bekannte neisserielle Invasine spielen keine Rolle bei der CEACAM1-vermittelten Aufnahme Opa-negativer Meningokokken**

Aus einer Reihe von Untersuchungen ist bekannt, dass Meningokokken unterschiedliche Adhäsine exprimieren, um mit zellulären Rezeptoren zu interagieren. Bei verschiedenen neisseriellen Oberflächenstrukturen wie TypIV Pili, App, MspA und NhhA wurden adhäsive Eigenschaften nachgewiesen (Kallstrom et al., 1997; Serruto et al., 2003; Scarselli et al., 2006; Turner et al., 2006), wohingegen Opa-Proteine, Opc und NadA zusätzlich als Invasin fungieren können (Merker et al., 1997; Capecchi et al., 2005; Hauck und Meyer, 2003). Da die CEACAM1-vermittelte Invasion des verwendeten Meningokokkenstammes unabhängig von Opa-Proteinen ist, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die bereits bekannten Invasine NadA oder Opc an der Aufnahme der Bakterien beteiligt sind. Hierfür wurden CEACAM1-transfizierte bzw. kontrolltransfizierte Zellen mit *E. coli* Bakterien, die das jeweilige rekombinante Invasin exprimierten (Abb. 4.20 B), infiziert und die Invasionsrate im Antibiotika-Protektions-Assay ermittelt. Bei der Durchführung des Versuches wurde angenommen, dass sowohl NadA als auch Opc funktionelle Invasine in *E. coli* darstellen. Die Funktionalität von Opc im verwendeten *E. coli* Stamm wurde bereits von Olyhoek et al. (1991) nachgewiesen. Bezüglich des NadA-Proteins konnten Capecchi et al. (2005) zeigen, dass lediglich oligomeres NadA in *E. coli* als funktionelles Invasin fungiert. Auch der hier verwendete *E. coli* Stamm exprimierte oligomeres NadA (Abb. 4.20 B). Als Positivkontrolle für den Antibiotika-Protektions-Assay dienten Opa<sub>52</sub>-exprimierende *E. coli* und Opa<sub>52</sub>-exprimierende Gonokokken, die eine CEACAM1-vermittelte Invasion aufwiesen (Abb. 4.20 A). Im Gegensatz zu den Opa-exprimierenden Bakterien konnten bei NadA- und Opc-exprimierenden *E. coli* Bakterien keine Unterschiede bei der Invasion von kontrolltransfizierten bzw. CEACAM1-transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Die als neisserielle Invasine beschriebenen Proteine NadA und Opc scheinen daher keine Rolle bei der CEACAM1-vermittelten Aufnahme der Opa-negativen Meningokokken zu spielen.



**Abb. 4.20: Bekannte neisserielle Invasine wie NadA und Opc spielen keine Rolle bei der CEACAM1-vermittelten Aufnahme.** (A) 293T-Zellen wurden mit cDNA für CEACAM1-HA oder dem leeren Expressionsvektor (pcDNA) transient transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für zwei Stunden mit *E. coli* Stämmen die rekombinantes Opc, NadA oder Opa<sub>52</sub> exprimierten oder mit Opa<sub>52</sub>-exprimierende Gonokokken (Positivkontrolle) mit einer MOI von 40 infiziert. Die Anzahl der lebenden, internalisierten Bakterien wurde durch einen Antibiotika-Protektions-Assay ermittelt. Die Grafik zeigt die prozentualen Mittelwerte mit Standardabweichung von drei, in Triplets durchgeführten, unabhängigen Experimenten (B) Der Nachweis der Expression von Opa<sub>52</sub> und Opc erfolgte im Western Blot mittels anti-Opa bzw. anti-Opc Antikörper. Der Nachweis der Expression von NadA erfolgte nach Induktion mit IPTG mittels SDS-PAGE. Funktionelles NadA lag als Multimer vor (Capecchi et al., 2005). Als Negativkontrolle dienten nicht-induzierte *E. coli* Bakterien.

#### 4.2.12 Identifizierung des CEACAM1-interagierenden Adhäsins Opa-negativer Meningokokken durch eine lambda-Phagen-Genbank

Die bisherigen Ergebnisse belegen, dass Opa-negative Meningokokken direkt an CEACAM1 binden können und auf diesem Weg in Zellen eindringen können. Dieser Vorgang geschieht unabhängig von bisher bekannten neisseriellen Invasinen. Daher muss es sich bei dem von

den Opa-negativen Meningokokken exprimierten Invasin um ein bisher noch nicht identifiziertes Protein handeln.

Zur Identifizierung dieses Proteins wurde ein Screen mit löslichem, multimerisiertem CEACAM1 durchgeführt, um CEACAM1-interagierende neisserielle Proteine zu detektieren. Für diesen Screen wurde eine  $\lambda$ Phagen Genbank von *Neisseria meningitidis* MC58 (Opa<sup>-</sup>) hergestellt, bei der chromosomale DNA-Fragmente der Neisserien unter die Kontrolle eines *E. coli*-Promotors kloniert wurden. Phagenplaques, die nach Infektion eines *E. coli*-Rasens entstanden, wurden auf Interaktion mit löslichem CEACAM1 untersucht und anschließend weiter analysiert.

#### 4.2.12.1 Herstellung einer lambdaZAP Express Genbank von Opa-negativen Meningokokken

Zur Herstellung einer lambdaZAP Genbank wurde zunächst chromosomale DNA aus Opa-negativen Meningokokken isoliert. Die DNA wurde mit dem zu *Bam*HI-kompatiblen Enzym *Sau*3AI statistisch geschnitten. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Nach Isolierung und Fällung der 2-9kb großen DNA-Fragmente, wurden diese in die mit *Bam*HI geschnittenen  $\lambda$ ZAP-Arme unter die Kontrolle eines *lac*-Promotors kloniert. Anschließend wurden die lambda-Konstrukte in Phagenhüllen verpackt. Die hergestellte Genbank von Opa-negativen *Neisseria meningitidis* MC58 hatte einen Titer von  $2 \times 10^5$  pfu/ml mit einer Klonierungs-Effizienz von 88%.

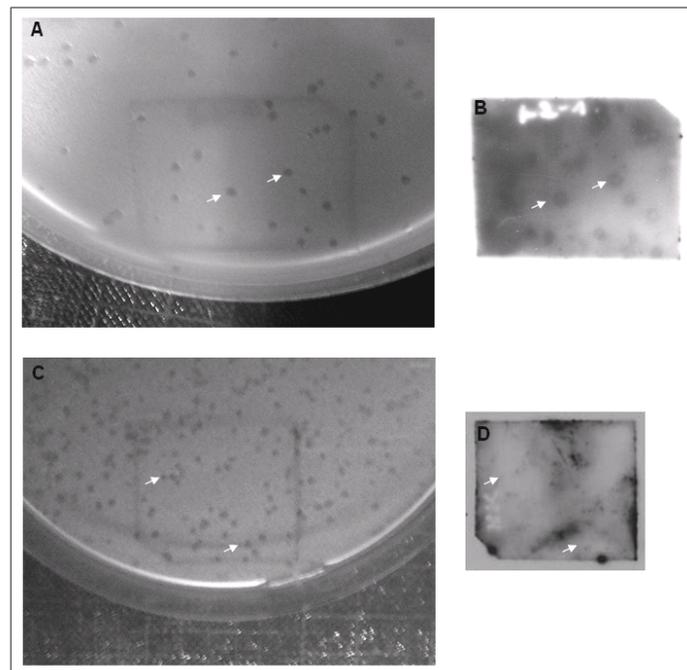
Bei einer durchschnittlichen Größe von etwa 4,5 kb der Inserts, können daher 574 unabhängige Phagen das 2,27 Mb große Genom von *Neisseria meningitidis* MC58 in seiner Gesamtheit abdecken.

#### 4.2.12.2 $\lambda$ Phagen Screen zu Identifizierung potentieller CEACAM1-interagierender Adhäsine

Um potentielle CEACAM1-interagierende Moleküle aus *Neisseria meningitidis* MC58 zu identifizieren, wurden insgesamt etwa 30000 Phagen-Plaques, die nach der Infektion von *E. coli* mit der  $\lambda$ Phagen-Genbank hervorgingen, auf Bindung an multimerisiertes CEACAM1 untersucht.

Zur Untersuchung wurden die in den Phagen-Plaques enthaltenen Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und durch Inkubation mit einem Kulturüberstand auf Interaktion mit multimerisierten CEA1-NA1BA2-HA Konstrukten analysiert. In den Plaques-enthaltene

Phagen, deren exprimierte Proteine mit löslichen CEACAM1-Konstrukten interagierten, wurden isoliert und erneut für weitere zwei Screening-Runden eingesetzt, um die Interaktion mit CEA1-NA1BA2-HA zu bestätigen. Als Negativkontrolle wurden Phagen-Klone verwendet, deren Plaques kein Signal nach Immunoscreening mit CEA1-NA1BA2-HA aufwiesen. Aus insgesamt etwa 30000 untersuchten Phagen konnten 13 isoliert werden, die konsistent eine Interaktion mit multimerisiertem CEA1-NA1BA2-HA zeigten (Abb. 4.21). Aus diesen Phagenklonen wurden die DNA-Inserts von *Neisseria meningitidis* MC58 durch eine *in vivo excision* herausgeschnitten und direkt in das Plasmid pBK-CMV überführt. Diese Subklonierung ermöglichte die Sequenzierung der aus den Phagen der Genbank stammenden meningokokkalen DNA-Inserts. Anhand der Sequenzen konnte durch Datenbankrecherchen mittels BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)) die entsprechenden, dazu korrespondierenden ORFs aus *Neisseria meningitidis* MC58 ermittelt werden, wie in Tabelle 4.4 dargestellt.



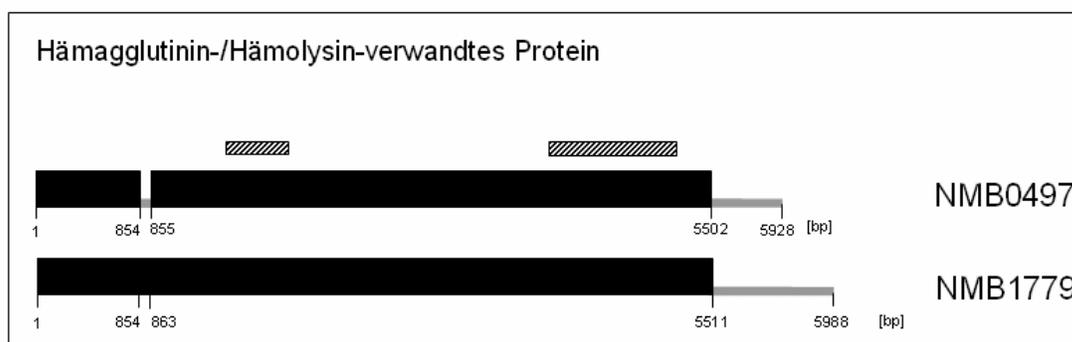
**Abb. 4.21: Beispiel für einen CEACAM1-interagierenden Phagenklon.** Ein *E. coli* Rasen wurde mit einem bereits isolierten, CEACAM1-interagierenden Phagenklon für 16h infiziert (A). Die Proteine der durch Lyse der mit Phagen infizierten Bakterien entstandenen Plaques wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und mit multimerisierten, löslichen CEACAM1-HA inkubiert. Anschließend wurde die Interaktion mit löslichem CEACAM1 und den transferierten Plaque-Proteinen mittels anti-HA Antikörper und HRP-gekoppelten Zweitantikörper im Immunoblot nachgewiesen (Pfeile dienen zur Orientierung) (B). (C und D) Beispiel für einen Phagen, der nicht mit CEACAM1-interagiert (Negativkontrolle) Dieser Phage wurde genauso wie der CEACAM1-interagierende Phagenklon behandelt.

**Tab. 4.4: Darstellung der ORFs der aus CEACAM1-interagierenden  $\lambda$ Phagen-Klone ermittelten neisseriellen DNA-Sequenzen.** Bis auf das „Hämagglutinin-/Hämolyisin-verwandte Protein“ werden alle aufgelisteten Sequenzen von unterschiedlichen ORFs kodiert.

Phagen-Klon	ermittelte Sequenzen
lambdaA	putativer Aminosäuresymporter
lambdaB	30S ribosomal protein S1 / integration host factor, beta subunit Polysialyltransferase SiaD
lambdaD	Hypothetisches Protein Hämagglutinin-/Hämolyisin-verwandtes Protein Eisen-Aufnahme-Regulations-Protein / leucyl/phenylalanyl-tRNA--Protein Transferase
lambdaK	Anthranilat-Synthase Komponente I Transposase, verkürzt putative IS1106 Transposase IS1106 Transposase Zucker Isomerase, KpsF/GutQ Familie Hypothetisches Protein Coproporphyrinogen III Oxidase putative dTDP-L-Rhamnose Synthase Hypothetisches Protein Pilin-Gen invertierendes Protein PivNM-1A Pilin-Gen invertierendes Protein PivNM-1B
lambdaO	putatives Tellurit-Resistenz-Protein Hypothetisches Protein Transposase, verkürzt IS1106 Transposase putative glutamyl-tRNA (Gln) Amidotransferase Untereinheit C / Glu-tRNA(Gln) Amidotransferase, Untereinheit A
lambdaP	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase 30S ribosomales Protein S9
lambdaQ	Hypothetisches Protein putative Oxidoreduktase <i>multiple transferable resistance system protein MtrD</i>
lambdaS	Thiazol-Synthase
lambdaDD	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter
lambdaHH	Histidinol-Phosphat-Aminotransferase / Imidazolglycerol-Phosphat Dehydratase Histidinol Dehydrogenase 30S ribosomales Protein S14 / 30S ribosomales Protein S8
lambdaJJ	Hypothetisches Protein / Phosphoglykolat-Phosphatase Hypothetisches Protein Phosphoenolpyruvat-Synthase
lambda1211	Lactoferrin-bindendes Protein A Hämagglutinin-/Hämolyisin-verwandtes Protein Hypothetisches Protein
lambda4211	Hypothetisches Protein 3-Dehydroquinat-Synthase große pilS Kasette

Eine Interaktion mit multimerisiertem CEA1-NA1BA2-HA konnte bei 13 der etwa 30000 analysierten Phagen nachgewiesen werden. Zwei der 13 ermittelten Phagen besaßen ein

DNA-Fragment aus *Neisseria meningitidis* MC58, das für ein „Hämagglutinin-/Hämolysin-verwandtes Protein“ kodiert. Interessanterweise ging aus den Datenbankrecherchen hervor, dass im Genom von *Neisseria meningitidis* MC58 zwei nahezu identische Gensequenzen vorkommen (Abb. 4.22), die für dieses „Hämagglutinin-/Hämolysin-verwandte Protein“ kodieren. Die Sequenzen befinden sich bei ORF NMB0497 und NMB1779. ORF NMB0497 hat eine Größe von 5928 bp, wohingegen ORF NMB1779 eine Größe von 5988 bp besitzt. Im Vergleich zu NMB1779 fehlen NMB0497 die Basenpaare 854-863. Ansonsten weisen die ORFs erst nach ca. 5500 bp unterschiedliche Sequenzen auf.

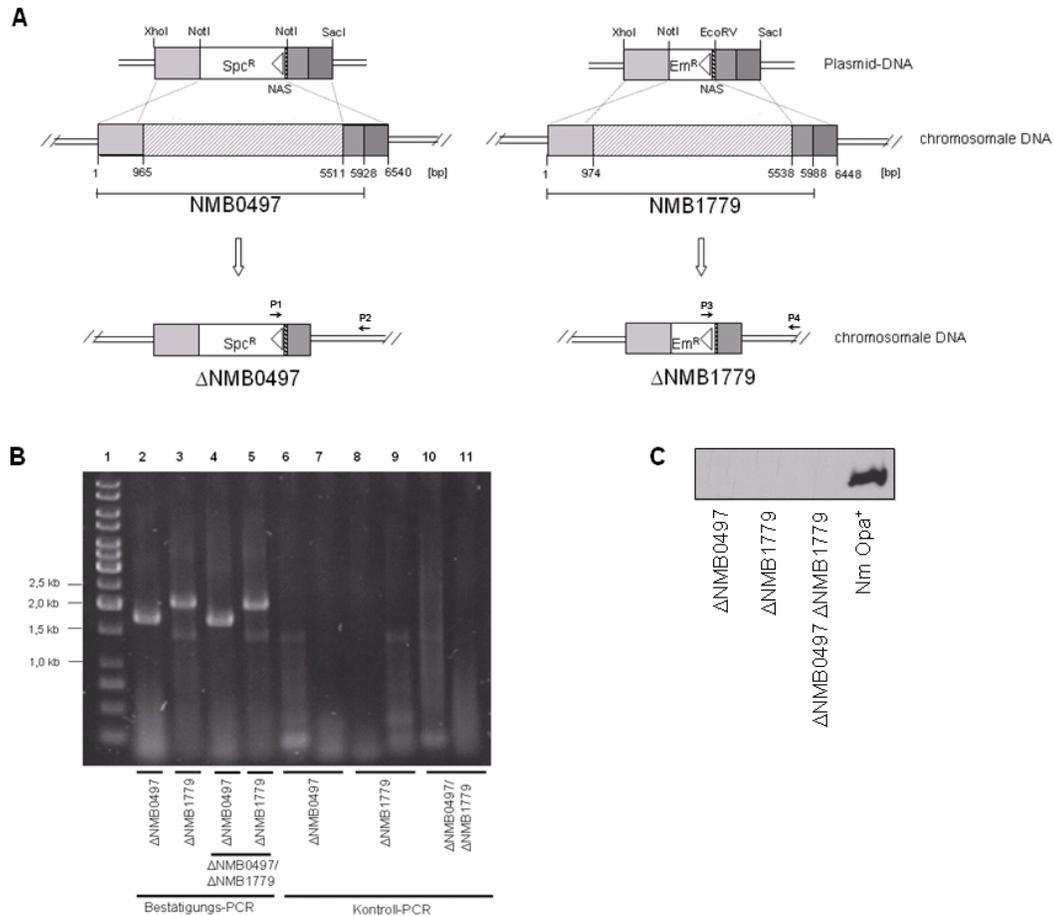


**Abb. 4.22:** Die für das „Hämagglutinin-/Hämolysin-verwandte Protein“ kodierenden ORFs NMB0497 und NMB1779 besitzen nahezu gleiche Sequenzen. Die ORFs NMB0497 und NMB1779 aus dem Genom von *Neisseria meningitidis* MC58 wurden mittels BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi)) verglichen. Schwarze dicke Balken stehen für homologe Sequenzen, graue dünne Balken für unterschiedliche Sequenzen der beiden ORFs. Gestreifte Balken zeigen die im Phagenscreen ermittelten CEACAM1-bindenden Bereiche des Genprodukts von NMB0497 und NMB1779.

#### 4.2.13 Untersuchung eines Hämagglutinin-/Hämolysin-verwandten Proteins als potentielles CEACAM1-interagierendes Adhäsion

##### 4.2.13.1 Inaktivierung des Hämagglutinin-/Hämolysin-verwandten Proteins aus *Nm* MC58

Aus dem Phagen-Screen ging hervor, dass das von ORF NMB0497 und NMB1779 kodierte „Hämagglutinin-/Hämolysin-verwandte Protein“ aus *Neisseria meningitidis* mit CEACAM1 zu interagieren scheint. Um die Rolle dieses Proteins in Meningokokken zu untersuchen, wurden die für das Protein kodierenden ORFs in dem Opa-negativen Meningokokkenstamm durch chromosomale Insertion zweier Antibiotika-Resistenzkassetten inaktiviert (Abb. 4.23). Hierzu wurden zunächst DNA-Fragmente der für das „Hämagglutinin-/Hämolysin-verwandte Protein“ kodierenden Bereiche aus der chromosomalen DNA der Opa-negativen Meningokokken amplifiziert und in den Vektor pBluescript kloniert. Bei ORFs NMB0497



**Abb. 4.23: Inaktivierung von NMB0497 und NMB1779.** (A) Mutagenesestrategie zur Inaktivierung der ORFs NMB0497 und NMB1779. Die Bereiche 1-965 bp und 5511-6540 bp stromabwärts vom Startcodon von NMB0497 bzw. die Bereiche 1-974 bp und 5538-6448 bp von NMB1779 wurden aus chromosomaler DNA Opa-negativer Meningokokken amplifiziert und in den Vektor pBluescript über die dargestellten Restriktionsschnittstellen über mehrere Subklonierungen (vgl. Plasmidkarten Kapitel 11.2) kloniert. Zwischen diese Bereiche wurde jeweils eine mit einer neisseriellen Aufnahmesequenz (NAS) und einem neisseriellen Promotor ausgestattete Antibiotika-Resistenzkassette (Erythromycin Em<sup>R</sup> bzw. Spectinomycin Spc<sup>R</sup>) kloniert. Nach Transformation der hervorgegangenen Plasmide in Opa-negative Meningokokken konnten die in der chromosomalen DNA lokalisierten ORFs NMB0497 und NMB1779 durch Insertion der entsprechenden Antibiotikaresistenzkassette mittels homologer Rekombination inaktiviert werden. (B) Bestätigung der Inaktivierung mittels PCR. Bestätigungs-PCR (Tasche 2-5): Hier wurden Primerkombinationen verwendet, die bei erfolgreicher Insertion der Resistenzkassette in die entsprechenden ORFs ein Amplifikat von 1,6 kb (NMB0497) bzw. 2 kb (NMB1779) erwarten lassen (Tasche 2: Primer SmR-start-anti (P1) – Primer NMB0497-check(NMB0498)-anti (P2); Tasche 3: Primer ErmC-Hermes6a-EcoRV-sense (P3) – Primer NMB1779-check(NMB1778)-anti (P4); Tasche 4: Primer (P1) – Primer (P2); Tasche 5: Primer (P3) – Primer (P4)). Kontroll-PCR (Tasche 6 – 11): Hier wurden Primerkombinationen von den zur Bestätigung der Insertion eingesetzten Primer verwendet, die kein Amplifikat erwarten ließen (Tasche 6: Primer (P1) – Primer (P4); Tasche 7: Primer (P3) – Primer (P2); Tasche 8: Primer (P3) – Primer (P2); Tasche 9: Primer (P1) – Primer (P4); Tasche 10: Primer (P1) – Primer (P4); Tasche 11: Primer (P3) – Primer (P2)). (C) Analyse der Opa-Expression der Mutanten. Die Expression von Opa-Proteinen wurde im Western-Blot mit anti-Opa Antikörpern untersucht. Als Positivkontrolle diente ein Lysat Opa-positiver Meningokokken.

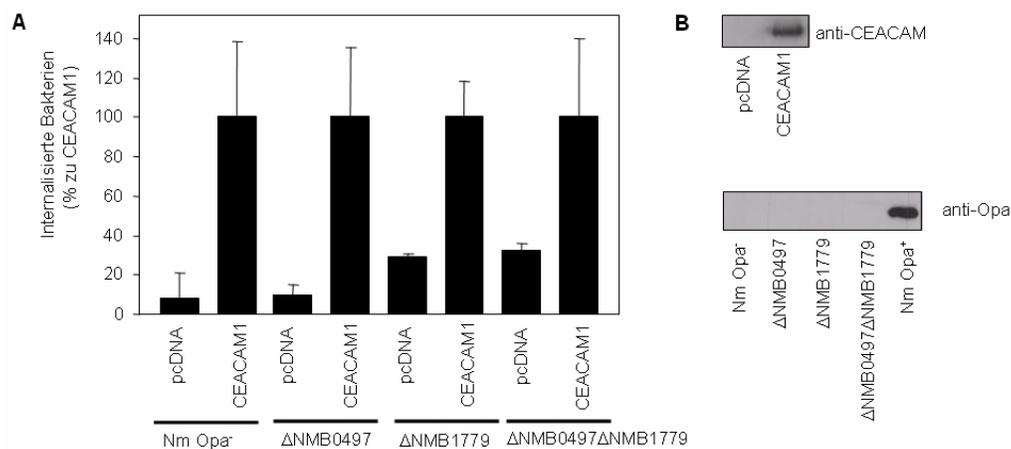
wurden die Bereiche 1-965 bp und 5511-6540 bp stromabwärts vom Startcodon kloniert, wohingegen bei NMB1779 die Bereiche 1-974 und 5538-6448 kloniert wurden. Zwischen diese Bereiche wurde eine Antibiotika-Resistenzkassette eingebaut, die jeweils so manipuliert wurde, dass sie eine neisserielle Aufnahmesequenz (NAS) enthielt und einen Promotor, der von Neisserien erkannt wird. Im Falle von NMB0497 wurde die ca. 2000 bp große Spectinomycin-Resistenzkassette, im Falle von NMB1779 die ca. 1000 bp große Erythromycin-Resistenzkassette eingebaut. Nach Transformation der aus der Klonierung resultierenden Plasmide in natürlich kompetente Opa-negative Meningokokken wurden die im Chromosom lokalisierten ORFs NMB0497 und NMB1779 durch Insertion der entsprechenden Antibiotika-Resistenzkassette mittels homologer Rekombination inaktiviert.

Der Einbau der Antibiotika-Resistenzkassette in die chromosomale DNA zeigte sich bei Klonen, die eine Resistenz gegenüber Spectinomycin bzw. Erythromycin erworben haben. Die korrekte Lokalisation der Antibiotika-Resistenzkassetten in der chromosomalen DNA der selektierten Klone wurde mittels PCR mit entsprechenden Primern bestätigt (Abb. 4.23 B). Die gewählten *sense*-Primer hybridisierten dabei mit Bereichen der entsprechenden Antibiotika-Resistenzkassette, wohingegen die *antisense*-Primer jeweils mit einer Lokus-spezifischen Region stromabwärts von NMB0497 bzw. NMB1779 hybridisierten. Die mit den Primern amplifizierten PCR-Fragmente entsprachen mit 1,6 kb und 2 kb der jeweils erwarteten Fragmentgröße nach chromosomaler Insertion der Resistenzkassette in NMB0497 bzw. NMB1779. Letztendlich konnten mit der beschriebenen Mutagenesestrategie die Einzelmutanten Nm  $\Delta$ NMB0497, Nm  $\Delta$ NMB1779 sowie die Doppelmutante Nm  $\Delta$ NMB0497  $\Delta$ NMB1779 hergestellt werden. Diese Mutanten hatten immer noch einen Opa-negativen Phänotyp (Abb. 4.23 C).

#### 4.2.13.2 Untersuchung der Mutanten auf Invasionsfähigkeit

Um zu überprüfen, ob das von ORF NMB0497 und NMB1779 kodierte „Hämagglutinin-/Hämolyysin-verwandte Protein“ eine Rolle bei der CEACAM1-vermittelten Aufnahme Opa-negativer Meningokokken spielt, wurden die hergestellten Deletionsmutanten Nm  $\Delta$ NMB0497, Nm  $\Delta$ NMB1779 und Nm  $\Delta$ NMB0497 $\Delta$ NMB1779 im Antibiotika-Protektions-Assay eingesetzt. Nach Infektion CEACAM1-transfizierter und kontrolltransfizierter Zellen mit den Mutanten und Opa-negativen Meningokokken wurden die extrazellulären Bakterien durch Zugabe von Gentamicin abgetötet und anschließend die Anzahl der lebenden, von den Zellen internalisierten Bakterien prozentual (Abb. 4.24) und absolut bestimmt. Die Ergebnisse

zeigten, dass sowohl die Opa-negativen Einzelmutanten Nm  $\Delta$ NMB0497 und Nm  $\Delta$ NMB1779 als auch die Opa-negative Doppelmutante Nm  $\Delta$ NMB0497 $\Delta$ NMB1779 ebenso wie Opa-negative Meningokokken von CEACAM1-exprimierenden Zellen internalisiert wurden. Dabei war die absolute Anzahl der durch CEACAM1 internalisierten Bakterien mit etwa  $220 \times 10^3$  bis  $250 \times 10^3$  cfu/ml bei allen analysierten Stämmen vergleichbar hoch. Das im Phageenscreen auf CEACAM1-Interaktion ermittelte Protein „Hämagglutinin-/Hämolysin-verwandte Protein“ scheint daher nicht für die Internalisation Opa-negativer Meningokokken über CEACAM1 verantwortlich zu sein.

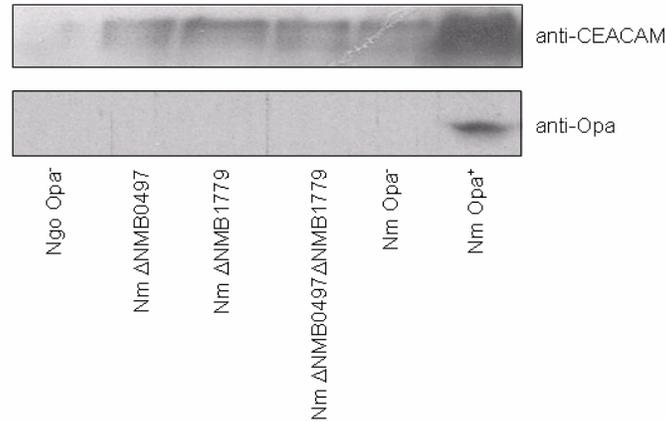


**Abb. 4.24: Das „Hämagglutinin-/Hämolysin-verwandte“-Protein spielt keine Rolle bei der CEACAM1-vermittelten Aufnahme Opa-negativer Meningokokken.** (A) 293T-Zellen wurden mit cDNA für CEACAM1-HA oder dem leeren Expressionsvektor (pcDNA) transient transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für zwei Stunden mit nicht-opaquen Meningokokken bzw. mit den Opa-negativen Mutanten Nm $\Delta$ 0497, Nm $\Delta$ 1779 und Nm $\Delta$ 0497 $\Delta$ 1779 mit einer MOI von 40 infiziert. Die Anzahl der lebenden, internalisierten Bakterien wurde durch einen Antibiotika-Protektions-Assay ermittelt. Die Grafik zeigt die prozentualen Mittelwerte mit Standardabweichung von drei, in Triplets durchgeführten, unabhängigen Experimenten. (B) Die Expression von CEACAM1-HA und Opa-Proteinen wurde im Western-Blot mit anti-HA bzw. anti-Opa Antikörpern nachgewiesen.

#### 4.2.13.3 Untersuchung der Mutanten auf CEACAM1-Bindefähigkeit

Auch beim Vergleich der CEACAM1-Bindungsfähigkeit der verschiedenen Meningokokkenstämme konnten keine Unterschiede gefunden werden. Wie die Western Blot Analyse zeigte (Abb. 4.25), resultierte die Inkubation der verschiedenen Meningokokkenstämme mit dem selben Zelllysate von CEACAM1-transfizierten Zellen in einer Bindung mit der gleichen Intensität an CEACAM1. Opa-negativer Meningokokkenstämme die kein „Hämagglutinin-/Hämolysin-verwandtes Protein“

exprimieren, können daher ebenso wie der in dieser Arbeit isolierte Opa-negative Meningokokkenstamm mit CEACAM1 interagieren.



**Abb. 4.25: Das „Hämagglutinin-/Hämolysin-verwandte“-Protein spielt keine Rolle bei der Interaktion der Meningokokken mit CEACAM1.** 293T-Zellen wurden mit cDNA für CEACAM1 transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit 1%-Triton-Puffer lysiert. Opa-negative bzw. Opa-positive Meningo- und Gonokokken wurden mit den Zelllysaten für 3h bei 4°C inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurden die Bakterien im Western Blot auf CEACAM-Bindung und Opa-Expression mittels anti-CEACAM bzw. anti-Opa Antikörper analysiert.

### 4.3 Diskussion

Eine wichtige Gruppe der Adhäsine pathogener Neisserien stellen die Opa<sub>CEA</sub>-Proteine dar. Diese phasenvariablen, integralen äußeren Membranproteine assoziieren mit Mitgliedern der CEACAM-Familie und können aufgrund der Interaktion Mechanismen auslösen, die zur Internalisierung der Bakterien führen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Phasenvariante aus dem Kapsel-defizienten Meningokokkenstamm *Neisseria meningitidis* MC58 isoliert, der keine Opa-Proteine exprimiert (Nm Opa<sup>-</sup>). Interessanterweise adhärierte dieser Stamm verstärkt an CEACAM1-exprimierende Zellen und konnte auch Zellen in Abhängigkeit von der CEACAM1-Expression invadieren. Dieser unvorhergesehene Effekt stellt eine bemerkenswerte Entdeckung dar, da die beschriebenen Vorgänge unabhängig von Opa<sub>CEA</sub>-Proteinen waren, den bis heute einzig bekannten neisseriellen Liganden für CEACAM1. Aus *Pulldown*-Untersuchungen mit Zelllysaten CEACAM1-exprimierender Zellen und Opa-negativer Meningokokken ging hervor, dass die CEACAM1-vermittelte Invasion auf eine direkte Interaktion zwischen den Bakterien und CEACAM1 zurückzuführen ist. Erstaunlicherweise konnten andere Wissenschaftler, die ebenfalls mit einem eigens isolierten,

Kapsel-defizienten, Opa-negativen Stamm aus *Neisseria meningitidis* MC58 arbeiteten, keine CEACAM1-Interaktion mit ihrem Opa-negativem Stamm feststellen. Die Interaktionsstudien dieser Arbeitsgruppe beruhen auf einem Rezeptorbindungs-Assay, bei dem Opa-negative Meningokokken mit löslichen Fc-fusionierten CEACAM1-Konstrukten inkubiert wurden und anschließend auf CEACAM-Bindung analysiert wurden. Aufgrund der kontroversen Ergebnisse bestand die Möglichkeit, dass der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Effekt der CEACAM1-vermittelte Invasion Opa-negativer Meningokokken auf einer möglichen Re-expression der Opa-Proteine vor oder während des Infektionsverlaufes zurückzuführen ist. Eine Reexpression ist denkbar, da Opa-Proteine dem Mechanismus der Phasenvariation unterliegen und unabhängig voneinander durch Veränderung im Leseraster der Gene an- und abgeschaltet werden können (Kupsch et al., 1993; Stern et al., 1986). Da Bakterienkolonien, die nach Infektion der CEACAM1-exprimierenden Zellen isoliert wurden, noch immer einen Opa-negativen Phänotyp besaßen, kann eine Expression der Opa-Proteine vor oder während des Infektionsverlaufes nahezu ausgeschlossen werden. Auch die Möglichkeit, dass der verwendete Opa-Antikörper nicht alle Opa-Proteine des verwendeten Stammes erkennt, wurde ausgeschlossen. So konnten alle vier Opa-Proteine des Stammes, die in *E. coli* exprimiert wurden, mit dem verwendeten Opa-Antikörper detektiert werden. Die beobachtete CEACAM1-vermittelte Aufnahme des isolierten Meningokokkenstammes geschieht demzufolge unabhängig von Opa-Proteinen. Es muss daher ein weiteres bakterielles Adhäsिन in *Neisseria meningitidis* MC58 existieren, das mit CEACAM1 interagiert und die Aufnahme der Bakterien initiiert. *Neisseria meningitidis* MC58 codiert für 102 putative phasenvariable Gene und gehört zu den Organismen mit einem sehr großen Repertoire an phasenvariablen Genen (Tettelin et al., 2000; Steller et al., 2005). Möglicherweise handelt es sich daher bei dem noch unbekanntem Adhäsिन um ein phasenvariables Protein, das in dem vorliegenden Opa-negativen Stamm exprimiert wird.

Eingehende Forschungen der letzten Jahre zeigten, dass verschiedene pathogene Bakterien mit einem oder mehreren Mitgliedern der CEACAM-Familie interagieren können. *E. coli*-DAEC (*diffusely adhering E. coli*) – Stämme assoziieren beispielsweise mit CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6, wohingegen für *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* nur eine Interaktion mit CEACAM1 und CEACAM3 beschrieben wurde (Virji et al., 2000; Hill et al., 2001; Hill et al., 2003; Schmitter et al., 2004; Schmitter, 2005; Berger et al., 2004; Leusch et al., 1991). Pathogene Neisserien können aufgrund ihrer Opa<sub>CEA</sub>-Proteine mit bis zu vier Mitgliedern der CEACAM-Familie (CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6) interagieren (Schmitter et al., 2007b; Hauck and Meyer, 2003).

Interessanterweise zeigten Invasionsstudien mit Opa-negativen Meningokokken und verschiedenen CEACAMs, dass CEACAM1 das einzige Mitglied der CEACAM-Familie zu sein scheint, das eine Invasion der nicht-opaquen Bakterien vermitteln kann. Da bei den Untersuchungen die erst kürzlich beschriebenen humanen CEACAMs (CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19, CEACAM20, CEACAM21) (Zebhauser et al., 2005) nicht berücksichtigt wurden, kann eine mögliche Interaktion der Bakterien mit diesen Mitgliedern der CEACAM-Familie jedoch nicht ausgeschlossen werden.

CEACAM1 stellt einen zellulären Rezeptor dar, der mit Adhäsinen verschiedener Pathogene assoziiert. Der IgV-ähnlichen aminoterminalen Domäne des Moleküls kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, da diese Domäne ausreichend für eine Interaktion mit den bakteriellen Adhäsinen UspA1 (*Moraxella catarrhalis*), Protein P5 (*Haemophilus influenzae*) und diversen Opa<sub>CEA</sub>-Proteinen (pathogene Neisserien) ist (Hill et al., 2001; Hill und Virji, 2003; Hauck und Meyer, 2003). Auch für die CEACAM1-vermittelte Invasion des Opa-negativen Meningokokkenstamm ist diese aminoterminal Domäne essentiell. So resultierte ein Austausch der aminoterminalen Domäne von CEACAM1 mit der aminoterminalen Domäne von CEACAM8 in einer Blockierung der Internalisierung der Bakterien. Interessanterweise ist die aminoterminal Domäne von CEACAM1 allein jedoch nicht ausreichend, um eine Internalisierung der Opa-negativen Meningokokken zu vermitteln. So wurden Opa-negative Meningokokken – im Gegensatz zu Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken - nicht von Zellen aufgenommen, die CEA1-N-variant exprimierten. Zur Internalisierung der Opa-negativen Meningokokken sind daher verschiedene extrazelluläre Domänen des Moleküls notwendig. Eine effiziente Internalisierung konnte dabei noch mit einem CEACAM1-Konstrukt beobachtet werden, welches die aminoterminal Domäne und zwei IgC-ähnliche Domänen (CEA1-NA1B-variant) auf seiner extrazellulären Seite exprimierte.

Die Interaktion der Opa-negativen Meningokokken mit den extrazellulären Domänen von CEACAM1 scheint dabei unabhängig von glykosylierten Bereichen des Rezeptors zu erfolgen. So resultierte eine Behandlung von CEACAM1-exprimierenden Zellen mit Chemikalien, wie NaIO<sub>4</sub> und Tunicamicin, die den Glykosylierungsgrad des Rezeptors reduzieren, in keiner Beeinträchtigung der CEACAM1-vermittelten Adhäsion bzw. Invasion. Auch nach Blockierung bestimmter Kohlenhydratstrukturen, wie  $\alpha$ -mannopyranosyl- oder  $\alpha$ -glucopyranosyl-Reste, mit dem Lektin ConcanavalinA konnte keine Veränderung der Invasion beobachtet werden. Opa-negative Meningokokken scheinen daher, genauso wie Opa<sub>CEA</sub>-exprimierende Bakterien, *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* an nicht-glykosylierte Bereiche des Rezeptors zu binden.

Durch die Bindung der Pathogene an diese Bereiche des Rezeptors wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Aufnahme der Bakterien führt. Aus Untersuchungen mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken ist bekannt, dass im Gegensatz zur CEACAM3-vermittelten Invasion (McCaw et al., 2003), die CEACAM1-vermittelte Invasion nahezu unabhängig vom Aktinzytoskelett ist, sondern über cholesterinreiche Membranmikrodomänen erfolgt (Schmitter et al., 2007b; Muenzner et al., 2007). Auch bei dem hier verwendeten Meningokokkenstamm konnte die CEACAM1-vermittelte Invasion nicht durch Inhibitoren der Aktinpolymerisation oder Mikrofilamentelongation blockiert werden. Das Aktinzytoskelett ist daher nicht an der Aufnahme Opa-negativer Meningokokken über CEACAM1 beteiligt. Es kann daher spekuliert werden, dass bei der CEACAM1-vermittelten Invasion Opa-negativer Meningokokken gleiche Signaltransduktionswege eingeleitet werden, die zur Aufnahme der Bakterien führen, wie bei Opa<sub>52</sub>-exprimierender Gonokokken. Dabei scheint es keine Rolle zu spielen, dass Opa-negative Meningokokken scheinbar auf eine andere Weise mit dem Rezeptor interagieren und mehrere extrazelluläre Domänen des Moleküls zur Invasion benötigen.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Inkubation Opa-negativer Meningokokken mit einem Zellysat CEACAM1-exprimierender Zellen, gezeigt werden, dass Opa-negative Meningokokken direkt mit CEACAM1 interagieren können. Bemerkenswerterweise scheint für diese Interaktion eine Multimerisierung von CEACAM1 essentiell zu sein. Dies lässt sich durch die Beobachtung begründen, dass nur lösliche CEACAM1-Konstrukte, die mit einem entsprechenden Antikörper quervernetzt wurden, mit Opa-negativen Meningokokken assoziierten. Eine Inkubation der Bakterien mit unbehandeltem, löslichem CEACAM1 führte zu keiner Interaktion. Diese Ergebnisse unterstützen die von Virji et al. (1996a) gemachten Beobachtungen. Auch diese Arbeitsgruppe konnte keine Interaktion mit Opa-negativen *Neisseria meningitidis* MC58 und nicht multimerisiertem, löslichem Fc-fusionierten CEACAM1 nachweisen.

Die Befunde lassen vermuten, dass zwischen den bakteriellen Liganden und CEACAM1 eine geringe Affinität vorliegt, die jedoch bei erhöhter Avidität zu einer spezifischen Bindung führen kann. Da für die CEACAM1-vermittelte Aufnahme Opa-negativer Meningokokken mehrere extrazelluläre Domänen des Moleküls notwendig sind, kann vermutet werden, dass CEACAM1 mehrere Bindungsstellen für den Liganden besitzt. Es wäre daher möglich, dass diese Bindungsstellen bei nicht multimerisierten Rezeptoren aufgrund der Konformation von CEACAM1 vom Liganden nicht alle erkannt werden können. Dies hätte eine sehr geringe Bindung zwischen CEACAM1 und Rezeptor zur Folge. Durch die Multimerisierung von

CEACAM1 liegen mehrere CEACAM1-Moleküle in einem Komplex vor. Es wäre vorstellbar, dass die CEACAM1-Moleküle in diesem Komplex räumlich so angeordnet sind, dass der Ligand an unterschiedliche Bindungsstellen einzelner CEACAM1-Moleküle binden kann. Dies hätte letztendlich eine erhöhte Avidität des Liganden für multimerisiertes CEACAM1 zur Folge.

Auch die Beobachtung (Daten nicht gezeigt), dass die CEACAM1-vermittelte Aufnahme von 5-(6)-Carboxyfluorescein-succinimidylester (CFSE)-markierten oder ConA-markierten Opa-negativen Meningokokken im Vergleich zu nicht markierten Bakterien viel geringer war, könnte für eine geringe Affinität zwischen dem putativen CEACAM1-Liganden und CEACAM1 sprechen. ConA interagiert mit verschiedenen Kohlenhydratstrukturen, wie  $\alpha$ -mannopyranosyl- oder  $\alpha$ -glucopyranosyl-Reste, wohingegen der Fluoreszenzfarbstoff CFSE mit Aminen reagiert. Eine Markierung der Bakterien mit diesen Chemikalien könnte somit die Affinität der Bindestellen des CEACAM1-Liganden zu CEACAM1 reduzieren, was letztendlich eine geringere Aufnahme der Bakterien zur Folge haben könnte. Da ConA an verschiedene Kohlenhydratstrukturen bindet, wäre es auch möglich, dass das noch unbekannte bakterielle Adhäsins Kohlenhydratstrukturen besitzt, die für die Interaktion mit CEACAM1 notwendig sind.

Neben der eingehenden Charakterisierung der CEACAM1-Interaktion mit Opa-negativen Meningokokken in Bezug auf CEACAM1 wurden in der vorliegenden Arbeit auch Versuche unternommen, das mit CEACAM1 interagierende als Invasin agierende Adhäsins Opa-negativer Meningokokken zu identifizieren. Eine Involvierung der als Adhäsins und Invasin beschriebenen Liganden NadA und Opc (Merker et al., 1997; Capecchi et al., 2005) an diesem Opa-Protein unabhängigen Prozess konnte ausgeschlossen werden, da *E. coli* Bakterien, die rekombinantes NadA bzw. Opc auf ihrer Oberfläche exprimierten unabhängig von der CEACAM1-Expression aufgenommen wurden. Die CEACAM1-vermittelte Invasion muss daher durch ein noch nicht charakterisiertes Adhäsins initiiert werden. Zur Identifizierung des Adhäsins wurden verschiedene Strategien angewandt. So sollte das Adhäsins beispielsweise durch eine Co-Immunpräzipitation identifiziert werden. Eine Inkubation CEACAM1-exprimierender Zellen mit biotinylierten Bakterien sollte zu einer Interaktion zwischen CEACAM1 und den unbekanntem, Biotin-markiertem Adhäsins führen. Nach Lyse der Zellen und der Bakterien sollte der Adhäsins-CEACAM1-Komplex mit entsprechenden Antikörpern immunpräzipitiert und im Western Blot aufgetrennt werden. Anschließend sollte das Adhäsins aufgrund seiner Biotinylierung mit HRP-gekoppeltem Streptavidin detektiert werden und dann mittels MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser*

*Desorption/Ionisation - time of flight*) – Massenspektrometrie analysiert und identifiziert werden. Eine Analyse der Präzipitate zeigte, dass im Vergleich zu Kontrollansätzen bei Opa-negativen Meningokokken ein Protein mit einer Größe von ca. 25 kDa detektiert wurde (Daten nicht gezeigt). Da sich dieses Ergebniss leider nicht reproduzieren ließ, wurde eine andere Methode zur Identifizierung des Adhäsins angewandt. Mit Hilfe eines Screens mit löslichem, multimerisiertem CEACAM1 sollten Proteine Opa-negativer Meningokokken identifiziert werden, die mit CEACAM1 interagieren. Für diesen Screen wurde eine lambda-Phagen Genbank von *Neisseria meningitidis* MC58 (Opa<sup>-</sup>) hergestellt, bei der chromosomale DNA-Fragmente der Neisserien unter die Kontrolle eines *E. coli*-Promotors kloniert wurden. Durch Infektion eines *E. coli*-Rasens mit der Genbank entstanden somit Phagen-Plaques, in denen sich unter anderem auch die vom Phagen kodierte neisserielle Proteine befanden. Aus 30000 untersuchten Phagen wurden 13 Phagen isoliert, die mit CEACAM1 interagierten. Zwei der 13 Phagen kodierte für ein „Hämagglutinin-/Hämolysin-verwandtes Protein“, das im Genom von *Neisseria meningitidis* MC58 von zwei ORFs kodiert wird (ORF NMB0497 und ORF NMB1779). Interessanterweise stellen Hämagglutinine häufig Adhäsine verschiedener Bakterien dar. Als ein Prototyp kann das filamentöse Hemagglutinin (FHA) von *Bordetella pertussis* gesehen werden (Relman et al., 1990). Dieses Protein interagiert mit dem auf Phagozyten exprimierten Rezeptor CR3 über ein RGD-Motiv. Auch Hämagglutinine anderer Pathogene wurden bereits als Adhäsine identifiziert. So verwendet beispielsweise *Porphyromonas gingivalis* HagB (Song et al., 2005) und *Moraxella catarrhalis* MhaB1, MhaB2 und Hag (Balder et al., 2007; Bullard et al., 2005), um mit verschiedenartigen zellulären Rezeptoren zu interagieren. Aufgrund der adhäsiven Eigenschaften von Hämagglutininen wurde postuliert, dass das durch den Phagenscreen identifizierte „Hämagglutinin-/Hämolysin-verwandte Protein“ das mögliche CEACAM1-bindende Adhäsins der Opa-negativen Meningokokken sein könnte. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden sowohl Einzelmutanten des Stammes *Neisseria meningitidis* MC58 (Opa<sup>-</sup>) mit einer Inaktivierung der einzelnen ORFs (Nm  $\Delta$ NMB0497; Nm  $\Delta$ NMB1779), als auch eine Doppelmutante hergestellt, bei der beide für das Protein kodierenden ORFs durch Insertion einer Antibiotika-Resistenzkassette zerstört wurden (Nm  $\Delta$ NMB0497 $\Delta$ NMB1779). Diese Mutanten wurden in Invasionsexperimenten mit CEACAM1-transfizierten Zellen eingesetzt. Leider zeigten diese Experimente, dass keine Unterschiede in der Invasionsfähigkeit Opa-negativer Meningokokken und den Mutanten bestehen. Auch eine Überprüfung der Bindefähigkeit der Mutanten an CEACAM1 ergab keine Unterschiede im Vergleich zu Opa-negativen Meningokokken. Das „Hämagglutinin-/Hämolysin-verwandte Protein“ ist daher

weder an der Adhäsion an CEACAM1 noch an der CEACAM1-vermittelten Invasion beteiligt. Die Vermutung, dass das „Hämagglutinin-/Hämolysin-verwandte Protein“ der bakterielle Ligand zu CEACAM1 ist wurde somit widerlegt. Im Zuge des Phagenscreens wurden noch weitere Proteine identifiziert, die mit löslichem, multimerisiertem CEACAM1 interagierten. Neben einigen hypothetischen Proteinen wurden auch Proteine, die an verschiedenen Stoffwechselwegen beteiligt sind, identifiziert. Da eine Involvierung der „Stoffwechsel-Proteine“ an der CEACAM1-vermittelten Aufnahme eher unvorstellbar ist, wäre es sinnvoll, die Rolle der hypothetischen Proteine bei der CEACAM1-vermittelten Invasion Opa-negativer Meningokokken in zukünftigen Experimenten zu untersuchen.

Leider konnte in der vorliegenden Arbeit das mit CEACAM1-interagierende Adhäsins Opa-negativer Meningokokken nicht identifiziert werden. Trotzdem konnte mit den hier dargestellten Untersuchungen ein sehr interessanter Beitrag zum Pathogeneseprozess von *Neisseria meningitidis* MC58 geleistet werden. So wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal die Existenz eines Adhäsins aus *Neisseria meningitidis* MC58 beschrieben, das mit CEACAM1 interagieren kann und kein Opa-Protein darstellt. Bei der Interaktion der Opa-negativen Bakterien mit CEACAM1 werden zelluläre Prozesse ausgelöst, die eine vom Aktinzytoskelett unabhängige Aufnahme der Bakterien zur Folge haben. Für diese CEACAM1-vermittelte Invasion Opa-negativer Meningokokken werden unterschiedliche extrazelluläre Domänen des Rezeptors benötigt, deren Glykosylierungsgrad keine Rolle spielt.

Die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen bieten somit eine gute Grundlage für weitere Studien der Interaktion von *Neisseria meningitidis* MC58 mit humanen Zellen.

## 5 Beteiligung der c-Jun N-terminalen Kinase an CEACAM3-vermittelten Signalwegen

### 5.1 Einleitung

Pathogene Neisserien sind humanspezifische Erreger, die über die Schleimhaut den menschlichen Körper besiedeln. Durch Interaktion von bestimmten bakteriellen Oberflächenproteinen mit humanen Rezeptoren können die Bakterien an die Zelloberfläche binden und durch die Stimulation von zellulären Signaltransduktionsprozessen in menschliche Zellen eindringen.

Solche Signalprozesse werden beispielsweise durch die Interaktion neisserieller Opa<sub>CEA</sub>-Proteine mit humanen CEACAMs ausgelöst. So konnten Hauck et al. (1998) bereits Ende der Neunziger Jahre zeigen, dass die Interaktion Opa<sub>52</sub>-exprimierender Gonokokken mit auf JOSK-M Zellen exprimierten CEACAMs (CEACAM1, CEACAM3, CEACAM6) zu einer Aktivierung der Src-Kinasen Hck und Fgr (Hauck et al., 1998) führt. Die Aktivierung dieser Kinasen resultiert in einer Phosphorylierung verschiedener Wirtsproteine und der Aktivierung der Rho-GTPase Rac. Aktiviertes Rac bewirkt die Reorganisation der Aktinfilamente, was wiederum eine wichtige Voraussetzung für die Phagozytose der Bakterien ist. Neben den genannten Proteinen werden außerdem noch die p21-aktivierte Kinase (PAK) und c-Jun N-terminale Kinase (JNK) aktiviert (Hauck et al. 1998), die möglicherweise Signale zur Induktion der Transkription Stress-regulierter Gene in den Zellkern leitet. Parallel zu dieser Signalkaskade kommt es zu einer Herunterregulation der Aktivität der Tyrosinphosphatase SHP-1 (Hauck et al., 1999) und zu einer Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (ASM) (Hauck et al., 2000).

Die genaue Beteiligung der Rezeptoren an den durch Opa<sub>52</sub> ausgelösten Signalkaskaden zur Aktivierung der Proteine ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch spielt CEACAM3 eine bedeutende Rolle bei den induzierten Signalereignissen. So konnten McCaw et al. (2003) zeigen, dass die ITAM-ähnliche Sequenz des Rezeptors nach Interaktion mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken durch Src-Kinasen Tyrosinphosphoryliert wird. Die Integrität und die Tyrosinphosphorylierung der ITAM-ähnlichen Sequenz sind dabei wichtig für die Stimulation der kleinen GTPase Rac (Schmitter et al., 2004). Aktuelle Studien zeigen, dass Rac direkt von dem mit der ITAM-ähnlichen Sequenz assoziierten Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav aktiviert wird, was letztendlich in einer effizienten Aufnahme Opa<sub>52</sub>-exprimierender Gonokokken über CEACAM3 resultiert (Schmitter et al., 2004; Schmitter et

al., 2007a). Die Phagozytose von Opa<sub>52</sub>-Gonokokken über den Rezeptor kann auch unabhängig von der ITAM-ähnlichen Sequenz erfolgen, jedoch mit deutlich geringerer Effizienz (McCaw et al., 2003; Schmitter et al., 2004).

Wie Coso et al. und Minden et al. bereits 1995 in einem CEACAM-unabhängigen System zeigen konnten, können GTPasen der Rho-Familie, wie Rac oder Cdc42 auch eine Rolle bei der Aktivierung von c-Jun N-terminalen Kinasen spielen. Die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNKs), oder auch Stress-aktivierte Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (SAPK) genannt, gehören neben den extrazellulär-Signal-regulierten Kinasen (ERK) und den p38 Kinasen zur Familie der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) (Schaeffer et al, 1999). Von den Stress-aktivierten Kinasen gibt es drei Isoformen, nämlich JNK1 (~ 49 kDa), JNK2 (~ 55 kDa) und JNK3 (~ 54 kDa). JNK1 und JNK2 werden nahezu ubiquitär exprimiert, wohingegen JNK3 fast ausschließlich in Neuronen vorkommt (Bogoyevitch, 2006a).

c-Jun N-terminale Kinasen werden aufgrund unterschiedlicher Stimuli, wie zum Beispiel osmotischer Stress, UV-Licht, oder Zytokine (Ip et al., 1998) über eine Kaskade von Protein Kinasen stimuliert. Die Signalwege der MAPK-Signalkaskade sind dabei hierarchisch angeordnet, d.h. jede Kinase wird als Substrat einer übergeordneten Kinase aktiviert. Die Aktivierung der MAPKs, darunter auch der c-Jun N-terminalen Kinasen, erfordert die Phosphorylierung eines Threonins und Tyrosins in einem Tripeptid-Motiv (Thr-X-Tyr). Im Falle von JNK1 und JNK2 findet die Aktivierung an Thr183 und Tyr185 durch die MAPK Kinasen (MAPKKs) MKK4 und MKK7 statt, die ihrerseits durch unterschiedliche Serin/Threonin-spezifische MAPKK Kinasen (MAPKKKs) reguliert werden (Ammerer et al., 1994; Kyriakis et al., 1994; Rouse et al., 1994; Kolch et al., 2000). Die Regulation der MAPKKK kann durch aktivierte GTPasen der Ras-Familie vermittelt werden, wohingegen für die Aktivierung von JNKs Rac und Cdc42 eine Rolle spielen können (Mackay and Hall, 1998). Aktiviertes JNK wiederum phosphoryliert verschiedene Proteine in der Zelle, einschließlich genregulatorische Proteine und andere Proteinkinasen. So werden diverse nukleäre Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel c-Jun, JunD, oder ATF-2 im Kern phosphoryliert, was letztendlich in einer veränderten Genexpression resultiert. Neben den nukleären Proteinen gibt es auch zytosolische oder mitochondriale Proteine, die von JNKs phosphoryliert werden können (Yoshida et al., 2004; Gao et al., 2004; Yu et al., 2004). Aufgrund der Vielfalt der Substrate der c-Jun N-terminalen Kinasen – bis heute sind etwa 50 bekannt (Bogoyevitch et al, 2006b) - scheinen diese Proteine daher in vielen zellulären Prozessen involviert zu sein. Neben der Mitwirkung an der Kontrolle des programmierten Zelltods (Tournier et al., 2000), sind JNKs beispielsweise auch an invasiven Prozessen

verschiedener Pathogene beteiligt. So werden die c-Jun N-terminale Kinasen in Epithelzellen nach Infektion mit verschiedenen Bakterien, wie beispielsweise pathogenen Neisserien oder *Porphyromonas gingivalis*, aktiviert (Hauck et al., 1998; Naumann et al., 1998; Watanabe et al., 2001; Sokolova et al., 2004). Aktivierte JNKs können dann eine Rolle bei Signaltransduktionsprozessen, die zur Aufnahme der Bakterien führen, spielen. So konnten Sokolova et al. (2001) beispielsweise zeigen, dass die Invasion von *Neisseria meningitidis* in HBMEC Zellen nach Inhibition von c-Jun N-terminalen Kinasen reduziert wird.

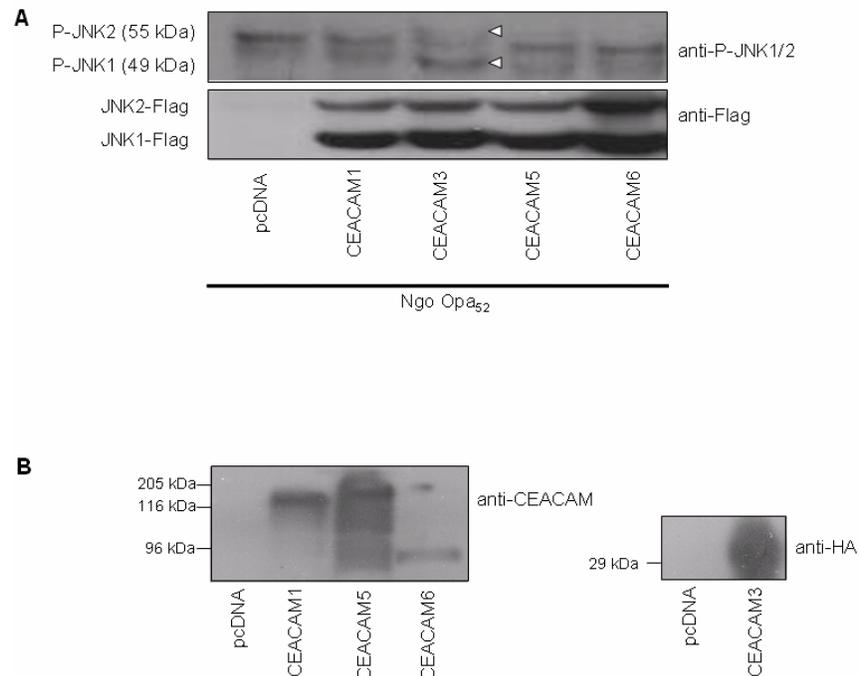
Bis heute ist noch nicht geklärt, welches Mitglied der CEACAM-Familie an der JNK-Aktivierung beteiligt ist. Dies sollte daher in der vorliegenden Arbeit analysiert werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, welche Rolle aktiviertes JNK in CEACAM-vermittelten Signaltransduktionsprozessen spielt.

## 5.2 Ergebnisse

### 5.2.1 CEACAM3 vermittelt die Aktivierung c-Jun N-terminaler Kinasen

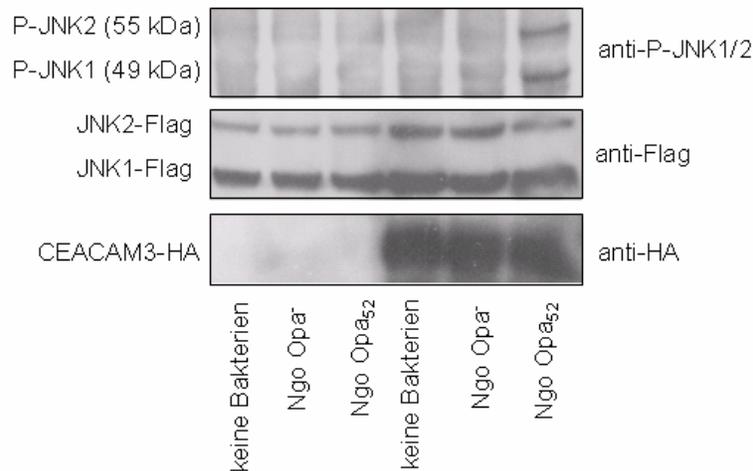
Hauck et al. (1998) konnten an *in vitro*-differenzierten, humanen myelomonozytären JOSK-M Zellen eine Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) nach Infektion der Zellen mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken beobachten. Die Aktivierung erfolgte dabei durch Stimulation eines Signaltransduktionsweges in Abhängigkeit von CEACAM-Molekülen. Da JOSK-M Zellen CEACAM1, CEACAM3 und CEACAM6 endogen auf ihrer Oberfläche exprimieren, sollte im Folgenden untersucht werden, welcher dieser zellulären Rezeptoren die Aktivierung der JNK nach Infektion mit Opa<sub>CEA</sub>-exprimierenden Gonokokken vermittelt. Für diese Untersuchungen wurden 293T Zellen verwendet, da sie keine endogenen CEACAMs exprimieren und genetisch leicht manipulierbar sind. Nach Infektion von CEACAM1-, CEACAM3- oder CEACAM6-transfizierten 293T Zellen mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken mit einer MOI von 25, zeigte sich besonders bei CEACAM3-transfizierten Zellen eine starke Aktivierung der JNK1 (49 kDa) und eine etwas schwächere Aktivierung der JNK2 (Abb. 5.1). Die Aktivierung wurde im Western Blot mit Zelllysaten der infizierten Zellen mit einem phosphospezifischen JNK-Antikörper nachgewiesen, der phosphoryliertes Threonin183 und Tyrosin185 und somit aktiviertes JNK erkennt. Neben der Analyse der Aktivierung über die auf den Phagozyten exprimierten CEACAM-Moleküle, wurde zusätzlich die Aktivierung über CEACAM5 getestet. CEACAM5 stellt ein weiteres Mitglied der CEACAM Familie dar, das mit Opa<sub>52</sub>-Gonokokken interagieren kann, aber nicht auf

Phagozyten exprimiert wird. Ebenso wie bei CEACAM1- und CEACAM6-transfizierten Zellen konnte auch bei Zellen, die mit CEACAM5-transfiziert wurden, kaum eine Aktivierung der hier untersuchten Stress-aktivierten Kinase festgestellt werden. CEACAM3 scheint daher eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase zu spielen.



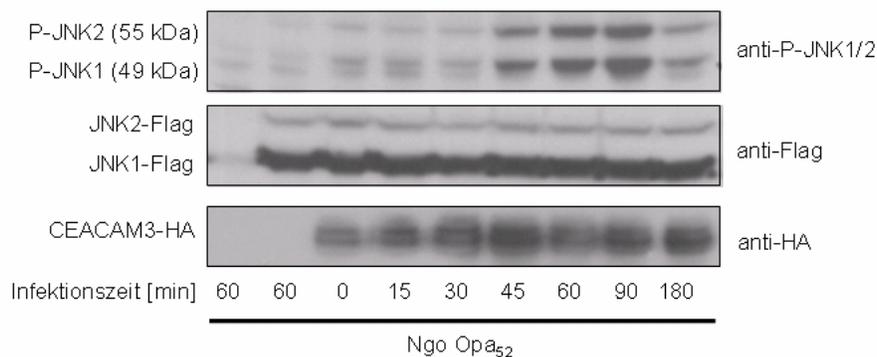
**Abb. 5.1: Die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) wird während der Internalisierung von Opa<sub>52</sub> Gonokokken über CEACAM3 aktiviert.** 293T-Zellen wurden mit cDNA für CEACAM1-HA, CEACAM3-HA, CEACAM5-GFP, CEACAM6 oder pcDNA (Kontrolle) transfiziert und mit Flag-markierten JNK1 und JNK2 kotransfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken mit einer MOI von 25 für 1 h infiziert. Nach Lyse der Zellen wurde die Expression der CEACAMs und JNK1 und JNK2 im Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen (B). Der Nachweis der Aktivierung von JNK1 und JNK2 erfolgte mittels anti-P-JNK1/2 Antikörper (A).

Die Phosphorylierung der Kinase ist dabei abhängig von der Interaktion zwischen Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken und dem zellulären Oberflächenrezeptor, wie aus Abbildung 5.2 hervorgeht. Lediglich in Zelllysaten mit CEACAM3-transfizierten Zellen, die mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken infiziert wurden, konnte ein Signal mit dem phosphospezifischen Antikörper gegen JNK detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte in kontrolltransfizierten (pcDNA) Zellen, die mit Opa-negativen Bakterien (können nicht mit CEACAMs interagieren), oder gar nicht infiziert wurden, keine Phosphorylierung der untersuchten SAP-Kinase nachgewiesen werden.



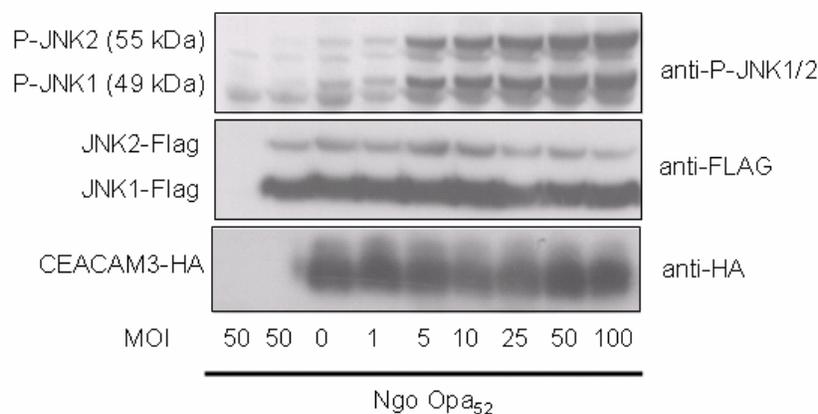
**Abb. 5.2: Die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) wird während der Internalisierung von Opa<sub>52</sub> Gonokokken über CEACAM3 aktiviert.** 293T-Zellen wurden mit pcDNA oder CEACAM3-HA transfiziert und mit Flag-markierten JNK1 und JNK2 kotransfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit nicht-opaen bzw. mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken mit einer MOI von 25 für 1 h infiziert oder blieben uninfiziert. Nach Lyse der Zellen wurde die Expression von CEACAM3 und JNK1 und JNK2 im Western Blot mit anti-HA bzw. anti-Flag Antikörpern nachgewiesen. Der Nachweis der Aktivierung von JNK1 und JNK2 erfolgte mittels anti-P-JNK1/2 Antikörper.

Die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase 1 und 2 in CEACAM3-transfizierten 293T Zellen war bereits 45 min nach Infektion mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken detektierbar und erreichte ein Maximum nach 60 bis 90 Minuten (Abb. 5.3). Nach längerer Infektionszeit (180 Minuten) ging das Aktivierungssignal stark zurück.



**Abb. 5.3: Zeitlicher Verlauf der Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) nach Infektion mit Opa<sub>52</sub> Gonokokken.** 293T-Zellen wurden mit pcDNA oder CEACAM3-HA transfiziert und mit Flag-markierten JNK1 und JNK2 kotransfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken mit einer MOI von 25 für unterschiedliche Zeitpunkte (0 min bis 180 min) infiziert. Nach Lyse der Zellen wurde die Expression von CEACAM3 und JNK1 und JNK2 im Western Blot mit anti-HA bzw. anti-Flag Antikörpern nachgewiesen. Der Nachweis der Aktivierung von JNK1 und JNK2 erfolgte mittels anti-P-JNK1/2 Antikörper.

In den beschriebenen Experimenten wurden die verwendeten Zellen stets mit 25 Bakterien pro Zelle infiziert. Um zu zeigen, dass nicht allein die große Anzahl der Bakterien und damit die hohe Zahl der Invasionsereignisse zu einer Aktivierung der untersuchten Stress-aktivierten Protein Kinasen führt, wurden CEACAM3-transfizierte 293T-Zellen mit unterschiedlichen Bakterientitern infiziert und die Zelllysate im Western Blot mittels anti-P-JNK auf Aktivierung der Kinase analysiert (Abb. 5.4). Die Ergebnisse zeigten, dass bereits bei einer MOI von 5 Bakterien pro Zelle eine starke Aktivierung der JNK1 und JNK2 detektierbar war. Das Signal stieg dabei leicht an, je mehr Bakterien pro Zelle zur Infektion verwendet wurden.

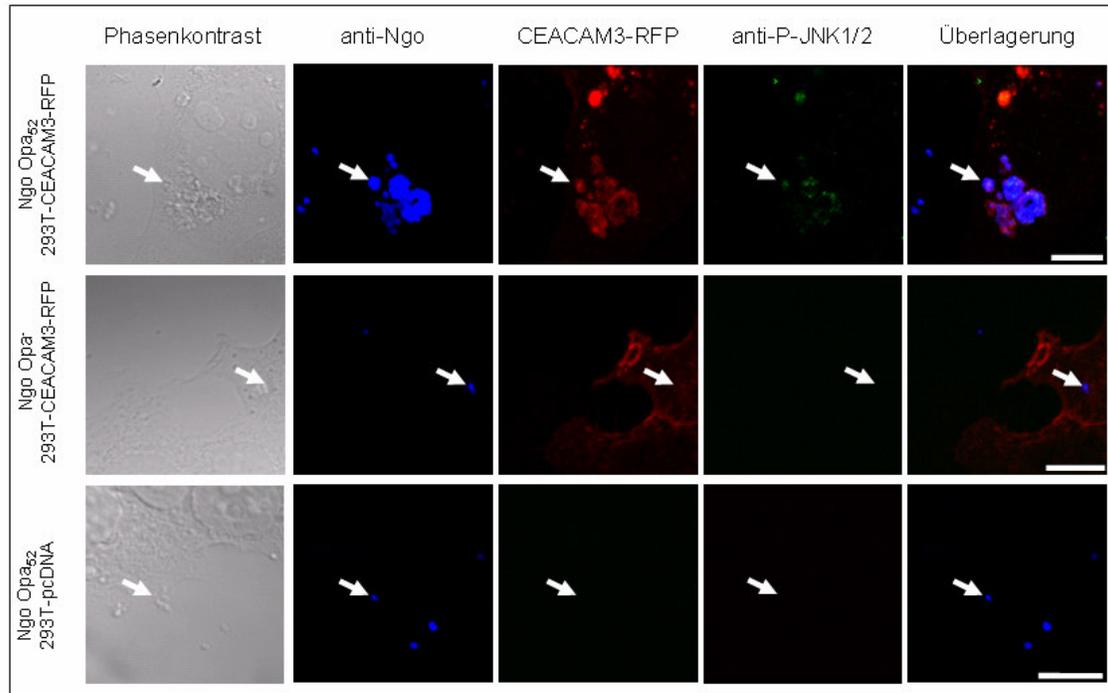


**Abb. 5.4: Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase durch unterschiedliche Bakterienmengen.** 293T-Zellen wurden mit pcDNA oder CEACAM3-HA transfiziert und mit Flag-markierten JNK1 und JNK2 kotransfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit unterschiedlicher Anzahl an Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken (MOI 0 bis 100) für 1 h infiziert. Nach Lyse der Zellen wurde die Expression von CEACAM3 und JNK1 und JNK2 im Western Blot mit anti-HA bzw. anti-Flag Antikörpern nachgewiesen. Der Nachweis der Aktivierung von JNK1 und JNK2 erfolgte mittels anti-P-JNK1/2 Antikörper

### 5.2.2 Aktivierte c-Jun N-terminale Kinasen kolokalisieren mit CEACAM3

Die CEACAM3-vermittelte Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase konnte auch mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie visualisiert und bestätigt werden. Lediglich in Zellen, die mit CEACAM3 transfiziert und mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken infiziert wurden, konnte aktiviertes JNK mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden (Abb. 5.5). Interessanterweise lokalisierte die aktivierte Kinase hauptsächlich in unmittelbarer Umgebung von mit CEACAM3-interagierenden Gonokokken, wie aus den differentiellen Fluoreszenzfärbungen von CEACAM3 (rot), Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Bakterien (blau) und aktiviertem JNK (grün) (Pfeil, Abb. 5.5) hervorging. In kontrolltransfizierten Zellen, die mit

Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken bzw. in CEACAM3-transfizierten Zellen die mit Opa<sub>52</sub>-negativen Gonokokken infiziert wurden, konnte keine Aktivierung der Kinase visualisiert werden.

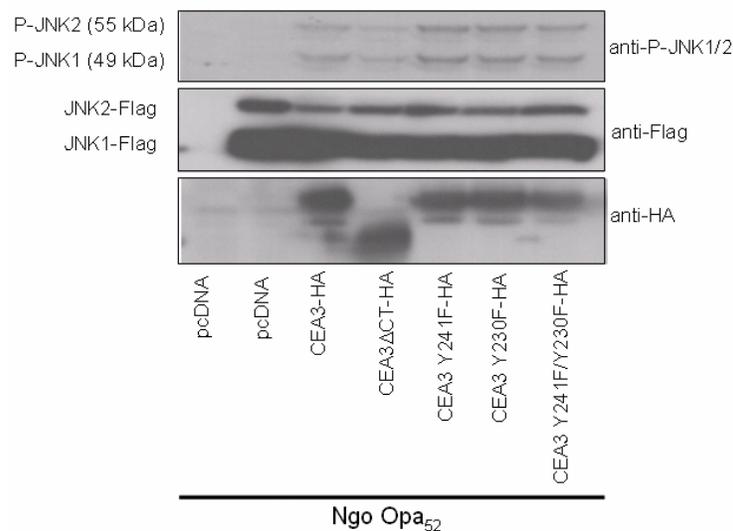


**Abb. 5.5: Kolokalisation von aktivierten JNK1/2 mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken und CEACAM3.** CEACAM3-RFP bzw. kontrolltransfizierte (pcDNA) 293T-Zellen wurden mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden (Ngo Opa<sub>52</sub>) bzw. nicht-opaen (Ngo Opa<sup>-</sup>) Gonokokken für 1 h mit einer MOI von 25 infiziert, fixiert und mit polyklonalen Antikörpern gegen Gonokokken (anti-Ngo) und monoklonalen Antikörpern gegen aktiviertes JNK1/2 (anti-P-JNK1/2) in einer Immunofluoreszenzfärbung (Kapitel 7.8.1) angefärbt. Neisserien (blau; Pfeil); aktiviertes JNK1/2 (grün); CEACAM3-RFP (rot). Die mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop erhaltenen Bilder zeigen eine Kolokalisation von Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken mit CEACAM3 und aktivierten JNK1/2. Die Balken repräsentieren 10 µm.

### 5.2.3 Die ITAM-ähnliche Sequenz von CEACAM3 ist nicht essentiell zur Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinasen

Die bisherigen Experimente weisen darauf hin, dass JNK über einen von CEACAM3 ausgehenden Signaltransduktionsweg aktiviert werden kann. Die Aktivierung geschieht dabei in Abhängigkeit von der Interaktion mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken und dem Transmembranprotein, welches in seiner zytoplasmatischen Domäne eine ITAM-ähnliche Sequenz besitzt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass diese Sequenz wichtig ist, um zelluläre Signale weiterzuleiten. Auch im Falle der CEACAM3-vermittelten,

effektiven Aufnahme von Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken und den damit einhergehenden zellulären Signaltransduktionsprozessen spielt die Integrität der zytoplasmatischen Domäne und der ITAM-ähnlichen Sequenz eine wichtige Rolle (Schmitter et al., 2004). Im Folgenden wurde daher untersucht, ob die zytoplasmatische Domäne notwendig ist für die CEACAM3-vermittelte Aktivierung von c-Jun N-terminalen Kinasen. Hierzu wurden 293T-Zellen mit CEACAM3 und verschiedenen Mutanten des Moleküls transfiziert. CEACAM3 $\Delta$ CT stellt eine Mutante des Moleküls mit einer Deletion der zytoplasmatischen Domäne dar, wohingegen bei den anderen verwendeten Mutanten die ITAM-ähnliche Sequenz durch Austausch eines (Y230F, Y241F) Tyrosinrestes oder beider Tyrosinreste (Y230/241F) verändert wurde. Nach Infektion der mit den CEACAM3-Konstrukten transfizierten und mit JNK1 und JNK2 kotransfizierten Zellen mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken wurde die Aktivierung von JNK1 und JNK2 im Western Blot mittels anti-P-JNK1/2 überprüft. Die Ergebnisse zeigten, dass die c-Jun N-terminale Kinase 1 und 2 in Zellen, die entweder wildtypisches CEACAM3 oder die verschiedenen Substitutionsvarianten von CEACAM3 exprimierten, nahezu gleich stark aktiviert wurde (Abb. 5.6).

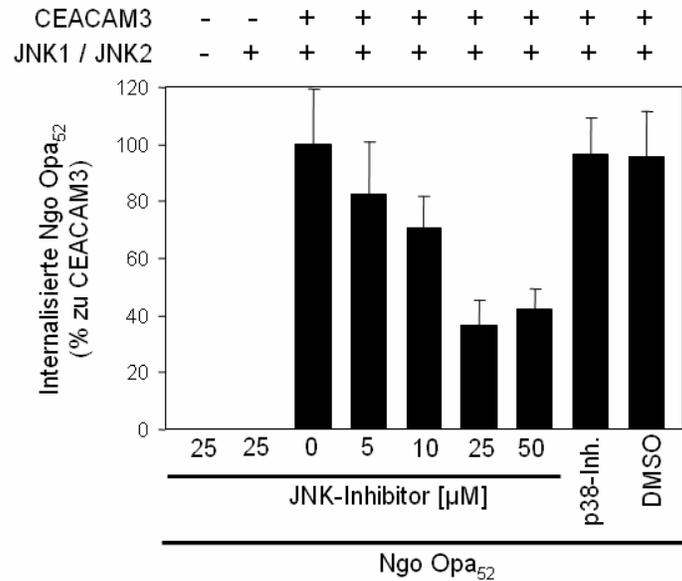


**Abb. 5.6: Die Integrität der ITAM-ähnlichen Sequenz von CEACAM3 ist nicht essentiell für die Aktivierung von JNK1 und JNK2.** 293T-Zellen wurden mit pcDNA oder verschiedenen CEACAM3-HA Konstrukten transfiziert und mit Flag-markierten JNK1 und JNK2 kotransfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken mit einer MOI von 25 für 1h infiziert. Nach Lyse der Zellen wurde die Expression der CEACAM3-Konstrukte und JNK1 und JNK2 im Western Blot mit anti-HA bzw. anti-Flag Antikörpern nachgewiesen. Der Nachweis der Aktivierung von JNK1 und JNK2 erfolgte mittels anti-P-JNK1/2 Antikörper.

Im Gegensatz dazu konnte bei Zellen, die mit CEACAM3 $\Delta$ CT transfiziert wurden, ein schwächeres Aktivierungssignal der JNK1 und JNK2 nachgewiesen werden. Die Integrität der ITAM-ähnlichen Sequenz von CEACAM3 scheint daher nicht notwendig für die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinasen 1 und 2 zu sein.

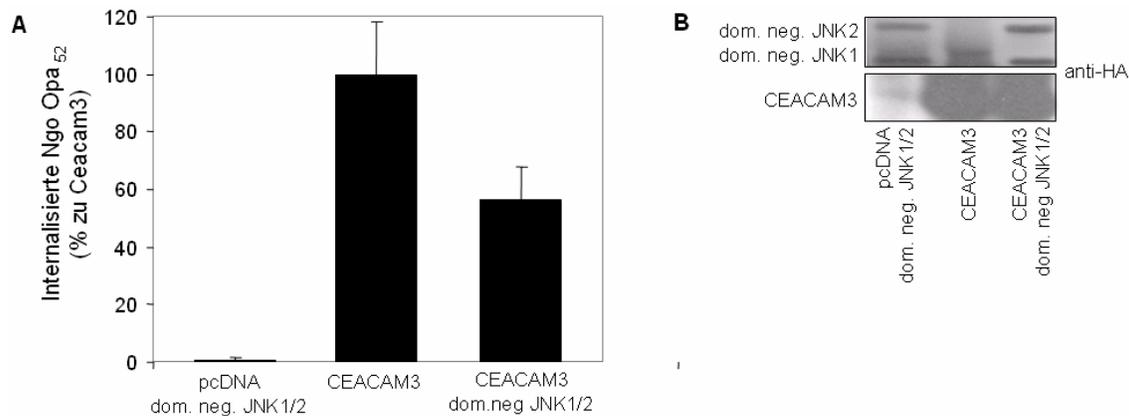
#### **5.2.4 c-Jun N-terminale Kinasen sind an CEACAM3-vermittelten bakteriellen Aufnahmeprozessen beteiligt**

Aus Studien verschiedener Arbeitsgruppen ist bereits bekannt, dass die Aktivierung von c-Jun N-terminalen Kinasen eine Rolle bei der Invasion von Bakterien in Zellen einnehmen kann. Beispielsweise konnten Sokolova et. al. (2004) eine Reduktion der Internalisierung von *N. meningitidis* in HBMEC-Zellen nach Inhibition von JNK1 und JNK2 beobachten. In den folgenden Experimenten sollte daher untersucht werden, ob c-Jun N-terminale Kinasen auch in die CEACAM3-vermittelten Aufnahme Opa<sub>52</sub>-exprimierender Gonokokken involviert sind. Hierzu wurden CEACAM3-transfizierte Zellen bzw. kontrolltransfizierte (pcDNA) Zellen in Anwesenheit oder Abwesenheit eines in DMSO gelösten pharmakologischen Inhibitors gegen JNK1, JNK2 und JNK3 (SP600125) mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken infiziert und die Invasionsrate der pathogenen Bakterien im Antibiotika-Protektions-Assay ermittelt. Das zur Inhibition verwendete Anthrapyrazolon SP600125 inhibiert mit hoher Spezifität die katalytische Aktivität der JNKs (IC<sub>50</sub>: 0,04 – 0,09  $\mu$ M) (Bennett et al., 2001). Die Ergebnisse zeigten, dass die Aufnahme Opa<sub>52</sub>-exprimierender Gonokokken über CEACAM3-transfizierte Zellen durch Präinkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des JNK-Inhibitors dosis-abhängig reduziert wurde (Abb. 5.7). Eine maximale Reduktion der Aufnahme, nämlich ca. 60%, konnte bei einer Inhibitor-Konzentration von 25  $\mu$ M beobachtet werden. Die nachgewiesene Inhibition scheint spezifisch zu sein, da eine Präinkubation der Zellen mit DMSO bzw. mit einem Inhibitor gegen die nahe verwandte p38 mitogen-aktivierte Kinase keine Reduktion der bakteriellen Aufnahme zur Folge hatte. Die mit dem JNK-Inhibitor erhaltenen Ergebnisse weisen daher darauf hin, dass c-Jun N-terminale Kinasen an den Signaltransduktionsprozessen zur CEACAM3-vermittelten Aufnahme opaquer Gonokokken involviert sind.



**Abb. 5.7: Die CEACAM3-vermittelte Internalisierung von Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken wird durch einen JNK-spezifischen Inhibitor reduziert.** 293T-Zellen wurden mit pcDNA oder CEACAM3-HA transfiziert und mit Flag-markierten JNK1 und JNK2 kotransfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen nach 30 minütiger Vorinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an JNK-Inhibitor (0 µM – 50 µM) bzw. den Kontrollen (p38-Inhibitor „SB203580“ (25µM), DMSO) für eine Stunde mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken mit einer MOI von 25 infiziert. Die Anzahl der lebenden, internalisierten Bakterien wurde durch einen Antibiotika-Protektions-Assay ermittelt. Die Grafik zeigt die prozentualen Mittelwerte mit Standardabweichung von drei, in Triplets durchgeführten, unabhängigen Experimenten.

Um die Beteiligung der c-Jun-N-terminalen Kinasen an der bakteriellen Aufnahme weiter zu bestätigen, wurden 293T Zellen mit cDNAs für CEACAM3 und den dominant-negativen Versionen der Stress-aktivierten Protein Kinase JNK1 (HA-JNK1-APF) und JNK2 (HA-JNK2-APF) (Wojtaszek et al., 1998) kotransfiziert und mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken infiziert. Als Negativkontrolle für die bakterielle Aufnahme dienten kontrolltransfizierte (pcDNA) Zellen. Wie in Abbildung 5.8 dargestellt, konnte die CEACAM3-vermittelte Aufnahme opaquer Bakterien mit den dominant-negativen Versionen von JNK1 und JNK2 um ca. 45 % inhibiert werden. c-Jun N-terminale Kinasen scheinen daher am Prozess der bakteriellen Aufnahme über CEACAM3 verwickelt zu sein.



**Abb. 5.8:** Die CEACAM3-vermittelte Internalisierung von Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken wird durch dominant-negative JNK Varianten reduziert. (A) Antibiotika-Protektions-Assay. 293T-Zellen wurden mit pcDNA oder CEACAM3-HA transfiziert und mit dominant-negativen Versionen von JNK1 (HA-JNK1-APF) und JNK2 (HA-JNK2-APF) kotransfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für eine Stunde mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken mit einer MOI von 25 infiziert. Die bakterielle Invasion wurde in einem Antibiotika-Protektions-Assay ermittelt. Die Grafik zeigt die prozentualen Mittelwerte mit Standardabweichung von drei, in Triplets durchgeführten, unabhängigen Experimenten. (B) Die Expression von CEACAM3-HA und HA-markiertem dominant negativem JNK1 und JNK2 wurde im Western Blot mit anti-HA nachgewiesen.

### 5.3 Diskussion

Aus der CEACAM-Familie sind bis heute vier Mitglieder, nämlich CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 und CEACAM6 bekannt, die mit diversen Opa<sub>CEA</sub>-Proteinen pathogener Neisserien interagieren können. Die Interaktion der Gonokokkenadhäsine mit den Rezeptoren induziert spezifische Signaltransduktionskaskaden, die letztendlich zur Internalisierung der Pathogene führen. Beispielsweise induziert die CEACAM-abhängige Interaktion von Opa<sub>52</sub> exprimierenden Gonokokken mit pro-myelomonozytären Zellen eine spezifische Stimulation der c-Jun N-terminalen Kinase (Hauck et al 1998). Da diese Zelllinie drei der vier Opa-erkennenden Rezeptoren (CEACAM1, CEACAM3, CEACAM6) exprimiert, ist bis heute noch nicht geklärt, welches der genannten Glykoproteine an der Aktivierung dieser Stress-aktivierten Kinase beteiligt ist. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Involvierung der CEACAMs an der Aktivierung der Kinase und den darin verwickelten Mechanismen untersucht werden. Hierzu wurde ein künstliches Modellsystem bestehend aus 293T Zellen, die keine endogenen CEACAMs exprimieren, verwendet. Durch Transfektion dieser Zellen mit entsprechenden cDNAs konnten spezifische Untersuchungen zur Signaltransduktionskaskade, die durch Opa<sub>52</sub>-CEACAM Interaktionen ausgelöst wurde, gemacht werden. So zeigte sich, dass von den CEACAM-Molekülen, die mit Opa<sub>52</sub>-Proteinen interagieren, lediglich CEACAM3 zu einer starken Aktivierung von JNK1 und JNK2 nach

Infektion mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken in 293T Zellen führt. Dabei kolokalisierte aktiviertes JNK mit CEACAM3 am Ort der Eintrittspforte der Bakterien. Die Tatsache, dass die Aktivierung der Stress-aktivierten Kinasen über CEACAM3 nur nach Inkubation mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken und nicht nach Inkubation mit nicht-opa-Gen Gonokokken bzw. nicht ohne Infektion erfolgte, unterstreicht die durch Opa<sub>52</sub>-CEACAM3 Interaktion ausgelöste Aktivierung von JNK. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass keine weiteren Komponenten bei der Aktivierung von JNK im verwendeten System eine Rolle spielen. Somit kann auch eine Beteiligung von bakteriellen Lipopolysaccharid (LPS), das besonders in dendritischen Zellen nach indirekter Interaktion dieser bakteriellen Komponente über das LPS-Bindeprotein, CD14 und MD-2 mit dem *Toll-like* Rezeptor TLR-4 eine starke Aktivierung von JNK hervorruft, an den beschriebenen zellulären Vorgängen ausgeschlossen werden. Dies wird auch durch die Tatsache, dass 293T Zellen keine endogenen TLRs exprimieren, weiter unterstützt (Akira, 2003; Matsuguchi et al., 2003).

Die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinasen erfolgt etwa 45 Minuten nach Infektion CEACAM3-exprimierender Zellen mit opa-Gen Gonokokken. Da die Stimulation von JNK in anderen Systemen mit pathogenen Bakterien und Epithelzellen ähnliche Zeiträume benötigt (Naumann et al., 1998; Watanabe et al., 2001), scheint dies einen üblichen Zeitrahmen der Pathogen-induzierten JNK-Aktivierung darzustellen.

Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der CEACAM-Familie, die mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken interagieren können, besitzt CEACAM3 in seiner zytoplasmatischen Domäne ein ITAM (*immunoreceptor tyrosine based activation motif*)-ähnliches Motiv (Reth, 1989; Cambier, 1995; Chen et al, 2001). Dieses Motiv kommt hauptsächlich in Rezeptoren, die zur Ig-Überfamilie gehören, wie phagozytische Rezeptoren der Fc-Familie oder auch Signalvermittelnde Untereinheiten der T- und B-Zellen vor und dient vor allem der Generierung aktivatorischer Signalketten (Campier, 1995; Barrow and Trowsdale, 2006). Diese Signalketten werden durch Tyrosinphosphorylierung des Phosphorylierungsmotivs YxxI/Lx(6-12)YxxI/L mittels Src-Tyrosinkinase ausgelöst. CEACAM3 besitzt die Phosphorylierungsstellen Tyr230 und Tyr241. Die Phosphorylierung dieser Aminosäuren stellt eine wichtige Voraussetzung für Signaltransduktionswege, die zur effizienten, CEACAM3-vermittelten Aufnahme Opa<sub>52</sub>-exprimierender Gonokokken führen, dar (Schmitter et al., 2004; Schmitter et al., 2007a). Erstaunlicherweise können Opa<sub>52</sub>-exprimierende Gonokokken – wenn auch ziemlich ineffektiv- auch unabhängig von der Tyrosinphosphorylierung des ITAM-Motivs sowie der gesamten zytoplasmatischen Domäne

über CEACAM3 aufgenommen werden (Billker et al., 2000, McCaw et al., 2003; Schmitter et al., 2004). Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass mehrere CEACAM3-abhängige Signalwege existieren müssen, die letztendlich zur Internalisierung der Bakterien führen. In der vorliegenden Arbeit konnte interessanterweise gezeigt werden, dass auch die CEACAM3-vermittelte Aktivierung von JNK unabhängig von der Phosphorylierung von Tyr230 und Tyr241 ist. Dies zeigte sich, da die Stress-aktivierte Kinase sowohl über CEACAM3, als auch über CEACAM3 Varianten mit einer Punktmutation in je einem Tyrosinrest (CEACAM3Y230F oder CEACAM3 Y241F) oder beiden Tyrosinresten (CEACAM3Y230F/Y241F) gleichermaßen stimuliert wurde. Auch die zytoplasmatische Domäne des Moleküls scheint nur bedingt eine Rolle bei der Aktivierung von JNK zu spielen. So konnte nach Infektion von Zellen, die CEACAM3 mit einer Deletion der zytoplasmatischen Domäne exprimierten, immer noch eine Aktivierung von JNK detektiert werden. Diese war im Vergleich zu CEACAM3-exprimierenden Zellen jedoch geringer. JNK ist daher an CEACAM3-vermittelten Signaltransduktionswegen beteiligt die nur teilweise von der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors abhängen und unabhängig von der Tyrosinphosphorylierung des ITAM-Motivs sind. Bemerkenswerterweise können diese Signaltransduktionswege auch mit Phagozytoseprozessen in Verbindung gebracht werden, da eine Inhibition des CEACAM3-vermittelten JNK-Signalweges zu einer reduzierten Aufnahme von Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken führt. Beispielsweise resultierte eine Vorbehandlung von mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken infizierten CEACAM3-exprimierenden Zellen mit dem JNK-spezifischen Inhibitor SP600125 in einer 60%igen Reduktion der bakteriellen Aufnahme. Darüber hinaus konnte auch bei Kotransfektion CEACAM3-exprimierender Zellen mit dominant-negativen JNK Varianten die Aufnahme um etwa 45% reduziert werden. Die Tatsache, dass die CEACAM3-vermittelte JNK-Aktivierung nur teilweise von der zytoplasmatischen Domäne abhängt und unabhängig von der Tyrosinphosphorylierung des ITAM-Motivs erfolgen kann und, dass diese Stress-aktivierte Kinase an CEACAM3-vermittelten Phagozytoseprozessen opaquer Bakterien beteiligt ist, spricht für die Existenz von ITAM-Motiv unabhängigen Signalkaskaden über JNK, die zur Aufnahme opaquer Bakterien führen. Mögliche zelluläre Prozesse, die bei der CEACAM3-vermittelten Aufnahme Opa<sub>52</sub>-exprimierender Gonokokken unabhängig von der Phosphorylierung der ITAM-Motive beteiligt sein könnten, wurden bereits von McCaw et al. (2003) diskutiert. So könnte die Aufnahme der Bakterien beispielsweise über eine Clathrin-abhängige Endozytose, welche die Aufnahme kleiner Partikel (< 1µm) bewirkt, erfolgen. Bei dieser Art der Endozytose bilden unphosphorylierte ITAM-Motive Andockstellen für Clathrin-assoziierte

Adaptermoleküle (AP-2), welche an der Signalkaskade zur Clathrin-abhängigen Endozytose beteiligt sind (Ohno et al., 1996). Da Gonokokken einen Durchmesser von etwa 1  $\mu\text{m}$  besitzen, könnte dies einen möglichen Aufnahmemechanismus darstellen. Des Weiteren befindet sich in der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM3 ein Dileucin-Motiv (Nagel et al., 1993). Da durch dieses Motiv ebenfalls Endozytoseereignisse hervorgerufen werden können (Hunziker und Fumey, 1994), könnte es an der ITAM-unabhängigen Phagozytose der Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Bakterien beteiligt sein (McCaw et al., 2003).

Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass die CEACAM3-vermittelte Aufnahme Opa<sub>CEA</sub>-exprimierender Gonokokken aufgrund einer Aktin-abhängigen Zytoskeletturnordnung erfolgt (Billker et al., 2002; McCaw et al., 2003). Es kann daher vermutet werden, dass beim CEACAM3-induzierten JNK-Signalweg Effektoren existieren müssen, die direkt oder indirekt an der Aktin-Reorganisation involviert sind. Otto et al. (2000) konnten zeigen, dass das aus *Drosophila*-stammende Protein p150-Spir eine Verbindung zwischen JNK und der Aktin-Reorganisation herstellt. Spir-Proteine gehören zur Familie der Wiskott-Aldrich homology Region 2 (WH2) Proteine und sind unter den Arten stark konserviert (Kerkhoff et al., 2001). Eine Kotransfektion CEACAM3-exprimierender Zellen mit dominant-negativen murinen Spir hatte keine Reduktion der bakteriellen Aufnahme zur Folge (Daten nicht gezeigt). Von daher scheint kein Zusammenhang zwischen Spir und der Aktin-abhängigen, CEACAM3-vermittelten Aufnahme Opa<sub>52</sub>-exprimierender Gonokokken zu bestehen. Ein weiterer möglicher Effektor, der an der JNK-vermittelten Aktinreorganisation involviert ist, könnte das fokale Adhäsionsprotein Paxillin sein. Paxillin ist an der Regulation der Zellmigration - ein ebenfalls Aktin-abhängiger zellulärer Prozeß - beteiligt und stellt ein Substrat der c-Jun N-terminalen Kinase dar (Huang et al., 2003; Amagasaki et al., 2006). Ob dieses Protein an der CEACAM3-vermittelten Aktinreorganisation beteiligt ist, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Die c-Jun N-terminalen Kinasen werden im Allgemeinen über eine MAP-Kinase-Kaskade aktiviert (Bogoyevitch et al., 2006b). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass bei dieser Aktivierung GTPasen wie Cdc42 und Rac involviert sein können. Interessanterweise ist Rac auch bei CEACAM3-vermittelten Signaltransduktionsprozessen, die letztendlich zur Aufnahme opaquer Bakterien führen, beteiligt (Schmitter et al., 2004; Schmitter et al., 2007a). Dabei ist die Integrität des ITAM-Motivs essentiell für eine effektive Stimulation dieser GTPase (Schmitter et al., 2004). Da die Phosphorylierung des ITAM-Motivs bei der CEACAM3-vermittelten Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinasen keine Rolle spielt, kann vermutet werden, dass Rac keine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Stress-

aktivierten Kinasen einnimmt. Ob dies der Fall ist, und ob noch andere GTPasen an der CEACAM3-vermittelten Aktivierung von JNK beteiligt sind, wird gegenwärtig untersucht.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass c-Jun N-terminale Kinasen durch einen CEACAM3-abhängigen Signaltransduktionsweg aktiviert werden können. Dieser Signalweg wird durch Interaktion von CEACAM3 mit Opa<sub>52</sub>-exprimierenden Gonokokken induziert. Die Aktivierung der JNKs geschieht dabei unabhängig von der Phosphorylierung der ITAM-ähnlichen Sequenzen des Rezeptors. Darüber hinaus sind die untersuchten Stress-aktivierten Kinasen auch an der CEACAM3-vermittelten Aufnahme Opa<sub>52</sub>-exprimierender Gonokokken beteiligt. Insgesamt konnte mit den vorliegenden Untersuchungen ein Beitrag zur Entschlüsselung von CEACAM3-induzierten Signaltransduktionswegen geleistet werden.

## 6 Material

### 6.1 Bakterien

#### 6.1.1 *Neisseria*-Stämme

##### 6.1.1.1 *Neisseria meningitidis*

*N. meningitidis* MC58 (Opa<sup>+</sup>) *siaD::cam*, *lgtA::kan*

*N. meningitidis* MC58 (Opa<sup>-</sup>) *siaD::cam*, *lgtA::kan*

*N. meningitidis* MC58 (opc<sup>-</sup>) *siaD::cam*, *opc::kan*

*N. meningitidis* MC58 (Opa<sup>-</sup>) ΔNMB0497 *siaD::cam*, *lgtA::kan*, *NMB0497::spc*

*N. meningitidis* MC58 (Opa<sup>-</sup>) ΔNMB1779 *siaD::cam*, *lgtA::kan*, *NMB1779::em*

*N. meningitidis* MC58 (Opa<sup>-</sup>) ΔNMB0497/ΔNMB1779 *siaD::cam*, *lgtA::kan*, *NMB0497::spc*,  
*NMB1779::em*

##### 6.1.1.2 *Neisseria gonorrhoeae*

N280 (MS11-F3) PilE<sub>F3</sub>, P<sup>+</sup>, Opa<sub>30-</sub>, *opaC::cat*, (Cam<sup>R</sup>)

N303 (MS11-B1) PilE<sub>B1</sub> (S), Opa<sub>30-</sub>, *opaC::cat*, pTH6a::*opa*<sub>50</sub> (pEMK55), (Tet<sup>R</sup>), (Em<sup>R</sup>),  
(Cam<sup>R</sup>)

N302 (MS11-B1) PilE<sub>B1</sub>(S), Opa<sub>30-</sub>, *opaC::cat*, pTH6a, (Tet<sup>R</sup>), (Em<sup>R</sup>), (Cam<sup>R</sup>)

N309 (MS11-B1) PilE<sub>B1</sub>(S), Opa<sub>30-</sub>, *opaC::cat*, pTH6a::*opa*<sub>52</sub> (pEMK62), (Tet<sup>R</sup>), (Em<sup>R</sup>),  
(Cam<sup>R</sup>)

N310 (MS11-B1) PilE<sub>B1</sub>(S), Opa<sub>30-</sub>, *opaC::cat*, pTH6a::*opa*<sub>60</sub> (pEMK63), (Tet<sup>R</sup>), (Em<sup>R</sup>),  
(Cam<sup>R</sup>)

##### 6.1.1.3 *kommensale Neisserien*

N340 *N. cinerea*

N348 *N. lactamica*

N349 *N. sicca*

N350 *N. mucosa*

#### 6.1.2 *Escherichia coli*-Stämme

NovaBlue *endA1*, *hsdR17*(r<sub>k12</sub><sup>-</sup>m<sub>k12</sub><sup>+</sup>), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*  
[F'*proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup> *lacI*<sup>q</sup>*ZAM15::Tn10*(Tet<sup>R</sup>)], (Novagen)

BL21 DE3 F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>* (t<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>), *gal*, *dcm* (DE3), (Novagen)

XLOLR	$\Delta(mcrA)183$ , $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ , <i>endA</i> , <i>thi</i> <sup>-</sup> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> (F' <i>proAB laqI<sup>q</sup>ZΔM15Tn10</i> (Tet <sup>R</sup> )), Su <sup>-</sup> , λ <sup>R</sup> (Stratagene)
XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183$ , $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ , <i>endA</i> , <i>supE44 thi</i> <sup>-</sup> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> (F' <i>proAB laqI<sup>q</sup>ZΔM15Tn10</i> (Tet <sup>R</sup> )) (Stratagene)

## 6.2 Zelllinien

293T (humane embryonale Nierenzelllinie)

COS7 (Nierenzellen aus Meerkatzen)

COS7 CEACAM1

CHO-K1 (Ovarzellen aus Chinesischen-Hamster)

CHO-K1 CEACAM1-HA

## 6.3 Phagen

lambda ZAP-Express „Phage“ (Stratagene)

*ExAssist* Helferphage (Stratagene)

## 6.4 Nährmedien für Bakterien und Zellkultur

### 6.4.1 Medien und Platten für Bakterien

LB-Medium	10g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl, pH 7,0, ad 1l mit A.bidest.
LB-Platten	10g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl, 10ml MgCl <sub>2</sub> (1M), 12g Agar- Agar, pH 7,0, ad 1l mit A.bidest.
LBMM-Medium	LB-Medium mit 0,2% Maltose und 10 mM MgSO <sub>4</sub>
NZY-Medium	5 g NaCl, 2 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 5 g Hefeextrakt, 10 g NZ Amin, ad 1l A. bidest., pH 7,5
NZY-Agarplatten	5 g NaCl, 2 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 5 g Hefeextrakt, 10 g NZ Amin, 15 g Agar, ad 1l A. bidest., pH 7,5
NZY-Top-Agar	1l NZY-Medium, 0,7% Agar
2xYT Medium	10 g NaCl, 10 g Hefeextrakt, 16 g Trypton, ad 1l A. bidest, pH 7,5
PPM-Medium	15g Proteose-Pepton, 5g NaCl, 0,5g Stärke, 4g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , ad 1l mit A. bidest., pH 7,5; 1% Vitaminmix, 0,5% NaHCO <sub>3</sub> (8,4%)
GC – Platten	36g GC-Agar, ad 1l mit A.bidest., 10ml Vitaminmix

Vitaminmix	20g Dextrose, 2g L-Glutamin, 3,2g L-Cystein, 0,02g Cocarboxylase, 0,004g Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , 0,0006g Thiamin-HCl, 0,05g NAD, 0,002g VitaminB12, 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 mit A.bidest., sterilfiltrieren. (10ml auf 1l GC-Agar)
Antibiotika	Ampicillin: 100 µg/ml Chloramphenicol: 30 µg/ml in LB-Medium, 10 µg/ml in GC-Agar Erythromycin: 7 µg/ml Kanamycin: 30 µg/ml

#### 6.4.2 Medien für Zellkultur

DMEM	Synthetisches Zellkulturmedium mit L-Glutamin (PAA Laboratories)
FCS	Fötale Kälberserum (PAA Laboratories)
CS	Kälberserum (PAA Laboratories)
OptiMEM	
Gentamicin	50 µg/ml (PAA Laboratories)

### 6.5 Antikörper, Enzyme und Proteine

#### 6.5.1 Antikörper

##### 6.5.1.1 Primärantikörper

Spezifität	Typ	Name	Herkunft	Bezug
CD66 (CEA; human)	monoklonal	Gran10	Maus	PeliCluster
CD66 (CEA; human)	monoklonal	D14HD11	Maus	Genovac
CD66 (CEACAM1, -5, -6)	monoklonal	Kat4c	Maus	Dako
CD66 (CEACAM3, -5)	monoklonal	Col1	Maus	Zymed
CD66 (CEACAM6)	monoklonal	9A6	Maus	Genovac
<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitidis</i>	polyklonal	IG-511	Hase	
Opa	monoklonal	4B12/C11	Maus	M. Achtmann
GFP	monoklonal	JL-8	Maus	BD Bioscience
GFP	polyklonal	ab290	Hase	Abcam
HA-Epitop	monoklonal	12CA5	Maus	Hybridoma
FLAG-Epitop	monoklonal		Maus	Sigma
P-JNK	monoklonal		Maus	Santa Cruz Biotechnology
P-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	polyklonal		Hase	Cell Signaling

### 6.5.1.2 Sekundärantikörper

Peroxidase-gekoppelter Hase-anti-Maus (Jackson Immunoresearch)

Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Hase (Jackson Immunoresearch)

Cy2-gekoppelter Ziege-anti-Maus (Jackson Immunoresearch)

Cy3-gekoppelter Ziege-anti-Maus (Jackson Immunoresearch)

Cy5-gekoppelter Ziege-anti-Maus (Jackson Immunoresearch)

Cy2-gekoppelter Ziege-anti-Hase (Jackson Immunoresearch)

Cy3-gekoppelter Ziege-anti-Hase (Jackson Immunoresearch)

Cy5-gekoppelter Ziege-anti-Hase (Jackson Immunoresearch)

### 6.5.1.3 Antikörperunabhängige Färbereagenzien

Biotin (Sulfo-NHS-LC-biotin) (Perbio Science)

CFSE (5-(6)-carboxyfluorescein-succinylester)

Cy5-gekoppeltes ConcanavalinA

## 6.5.2 Enzyme und Proteine

Taq-DNA-Polymerase (New England BioLabs), Restriktionsenzyme (NewEngland Bio Labs), Trypsin (PAA Laboratories), Vent-DNA-Polymerase (NewEngland Bio Labs), Cre-Rekombinase (New England BioLabs), In-Fusion Enzym (BD Bioscience), *Antarctic*-Phosphatase (New England BioLabs), Fibronectin (BD Bioscience), Protein A/G-Plus Sepharose (Santa Cruz Biotechnology)

## 6.6 Plasmide und Primer

### 6.6.1 Plasmide

pDNR-Dual *ori<sub>pUC\*</sub>*, *loxP*, MCS, SD, 6xHis-tag, (Cam<sup>R</sup>), *SacB* (BD Bioscience)

pLPS-3´EGFP *ori<sub>pUC\*</sub>*, *loxP*, MCS, SA, EGFP, (Kan<sup>R</sup>), (Neo<sup>R</sup>) (BD Bioscience)

pLPS-3´EGFP CEACAM1-N-NEF

*ori<sub>pUC\*</sub>*, *loxP*, MCS, SA, EGFP, (Kan<sup>R</sup>), (Neo<sup>R</sup>) (S. Wäckerle)

pLPS-3´EGFP CEACAM3-N-NEF

*ori<sub>pUC\*</sub>*, *loxP*, MCS, SA, EGFP, (Kan<sup>R</sup>), (Neo<sup>R</sup>) (D. Deininger)

pLPS-3´EGFP CEACAM4-N-NEF

---

	<i>ori<sub>pUC*</sub></i> , <i>loxP</i> , MCS, SA, EGFP, (Kan <sup>R</sup> ), (Neo <sup>R</sup> ) (D. Deininger)
pLPS-3'EGFP	CEACAM5-N-NEF
	<i>ori<sub>pUC*</sub></i> , <i>loxP</i> , MCS, SA, EGFP, (Kan <sup>R</sup> ), (Neo <sup>R</sup> ) (D. Deininger)
pLPS-3'EGFP	CEACAM6-N-NEF
	<i>ori<sub>pUC*</sub></i> , <i>loxP</i> , MCS, SA, EGFP, (Kan <sup>R</sup> ), (Neo <sup>R</sup> ) (D. Deininger)
pLPS-3'EGFP	CEACAM8-N-NEF
	<i>ori<sub>pUC*</sub></i> , <i>loxP</i> , MCS, SA, EGFP, (Kan <sup>R</sup> ), (Neo <sup>R</sup> ) (S. Wäckerle)
pcDNA3.1	CEACAM1-HA
	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , MCS, (Amp <sup>R</sup> ) (J. Blass)
pcDNA3.1	CEACAM3-HA
	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , MCS, (Amp <sup>R</sup> ) (J. Blass)
pcDNA3.1	CEACAM5
	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , MCS, (Amp <sup>R</sup> ) (D. Deininger)
pRC/CMV	CEACAM6
pRC/CMV	CEACAM7 (W. Zimmermann)
pRC/CMV	CEACAM8
pDNR-CMV	<i>ori<sub>pUC*</sub></i> , <i>loxP</i> , MCS, (Cam <sup>R</sup> ), (Amp <sup>R</sup> ), <i>SacB</i> , P <sub>CMV</sub> (BD Bioscience)
pDNR-CMV	CEA8/1-chimera
	<i>ori<sub>pUC*</sub></i> , <i>loxP</i> , MCS, (Cam <sup>R</sup> ), (Amp <sup>R</sup> ), <i>SacB</i> , P <sub>CMV</sub> (vorliegende Arbeit)
pDNR-CMV	CEA1-NA1BA2-variant
	<i>ori<sub>pUC*</sub></i> , <i>loxP</i> , MCS, (Cam <sup>R</sup> ), (Amp <sup>R</sup> ), <i>SacB</i> , P <sub>CMV</sub> (vorliegende Arbeit)
pDNR-CMV	CEA1-NA1B-variant
	<i>ori<sub>pUC*</sub></i> , <i>loxP</i> , MCS, (Cam <sup>R</sup> ), (Amp <sup>R</sup> ), <i>SacB</i> , P <sub>CMV</sub> (vorliegende Arbeit)
pDNR-CMV	CEA1-N-variant
	<i>ori<sub>pUC*</sub></i> , <i>loxP</i> , MCS, (Cam <sup>R</sup> ), (Amp <sup>R</sup> ), <i>SacB</i> , P <sub>CMV</sub> (vorliegende Arbeit)
pcDNA3.1	CEA1ΔCT
	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , MCS, (Amp <sup>R</sup> ) (J. Blass)
pDNR-Dual	<i>ori<sub>pUC*</sub></i> , <i>loxP</i> , MCS, SD, 6xHis-tag, (Cam <sup>R</sup> ), <i>SacB</i> (BD Bioscience)
pDNR-Dual	CEA1-NA1BA2-SP
	<i>ori<sub>pUC*</sub></i> , <i>loxP</i> , MCS, SD, 6xHis-tag, (Cam <sup>R</sup> ), <i>SacB</i> (vorliegende Arbeit)
pDNR-Dual	CEA1-NA1B-SP
	<i>ori<sub>pUC*</sub></i> , <i>loxP</i> , MCS, SD, 6xHis-tag, (Cam <sup>R</sup> ), <i>SacB</i> (vorliegende Arbeit)
pDNR-Dual	CEA8/1-SP

	<i>ori<sub>pUC*</sub></i> , <i>loxP</i> , MCS, SD, 6xHis-tag, (Cam <sup>R</sup> ), <i>SacB</i> (vorliegende Arbeit)
pLPS-3'EGFP	CEA1-NA1BA2-SP
	<i>ori<sub>pUC*</sub></i> , <i>loxP</i> , MCS, SA, EGFP, (Kan <sup>R</sup> ), (Neo <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pLPS-3'EGFP	CEA1-NA1B-SP
	<i>ori<sub>pUC*</sub></i> , <i>loxP</i> , MCS, SA, EGFP, (Kan <sup>R</sup> ), (Neo <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pLPS-3'EGFP	CEA8/1-SP
	<i>ori<sub>pUC*</sub></i> , <i>loxP</i> , MCS, SA, EGFP, (Kan <sup>R</sup> ), (Neo <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pLPS3'	CEA1-NA1BA2-3xHA
	<i>ori<sub>pUC*</sub></i> , <i>loxP</i> , MCS, SA, (Kan <sup>R</sup> ), (Neo <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pET28a(+)	<i>ori</i> , <i>lacI</i> , MCS, 6xHis-tag, (Kan <sup>R</sup> ) (Novagen)
pET28a(+)	Opa1 (Nm MC58 NMB0442) – <i>HindIII/NcoI</i>
	<i>ori</i> , <i>lacI</i> , MCS, 6xHis-tag, (Kan <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pET28a(+)	Opa2 (Nm MC58 NMB0926) – <i>HindIII/NcoI</i>
	<i>ori</i> , <i>lacI</i> , MCS, 6xHis-tag, (Kan <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pET28a(+)	Opa3 (Nm MC58 NMB1465) – <i>HindIII/NcoI</i>
	<i>ori</i> , <i>lacI</i> , MCS, 6xHis-tag, (Kan <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pET28a(+)	Opa4 (Nm MC58 NMB1636) – <i>HindIII/NcoI</i>
	<i>ori</i> , <i>lacI</i> , MCS, 6xHis-tag, (Kan <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pET28a(+)	NadAwt (Nm MC58) – <i>XhoI/NcoI</i>
	<i>ori</i> , <i>lacI</i> , MCS, 6xHis-tag, (Kan <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pBluescript SK+	<i>ori<sub>pUC</sub></i> , P <sub>lac</sub> , MCS, <i>lacZ'</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (Stratagene)
pBluescript SK+	NMB0497/NMB1779 (1-2000bp) – <i>XhoI/SacI</i>
	<i>ori<sub>pUC</sub></i> , P <sub>lac</sub> , MCS, <i>lacZ'</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pBluescript SK+	NMB0497/NMB1779(1-965bp) / NMB0497(5511-6540bp) – <i>NotI/SacI</i>
	<i>ori<sub>pUC</sub></i> , P <sub>lac</sub> , MCS, <i>lacZ'</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pBluescript SK+	NMB0497/NMB1779(1-965bp)/(Spc <sup>R</sup> )– <i>NotI</i> / NMB0497(5511-6540bp)
	<i>ori<sub>pUC</sub></i> , P <sub>lac</sub> , MCS, <i>lacZ'</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pBluescript SK+	NMB0497/NMB1779(1-965bp)/NMB1779(5538-6448bp)– <i>EcoRV/SacI</i>
	<i>ori<sub>pUC</sub></i> , P <sub>lac</sub> , MCS, <i>lacZ'</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pBluescript SK+	NMB0497/NMB1779(1-965bp)/(Em <sup>R</sup> )– <i>EcoRV/NotI</i> / NMB1779(5538- 6448bp)
	<i>ori<sub>pUC</sub></i> , P <sub>lac</sub> , MCS, <i>lacZ'</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pHP45Ω	P <sub>Nm</sub> , (Spc <sup>R</sup> ) (H. Claus)

---

Hermes6a	P <sub>Oppa</sub> , (Em <sup>R</sup> )
pBK-CMV	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , P <sub>Lac</sub> , <i>αlacZ</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (Stratagene)
pBK-CMV	lambdaA
	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , P <sub>Lac</sub> , <i>αlacZ</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pBK-CMV	lambdaB
	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , P <sub>Lac</sub> , <i>αlacZ</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pBK-CMV	lambdaD
	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , P <sub>Lac</sub> , <i>αlacZ</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pBK-CMV	lambdaK
	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , P <sub>Lac</sub> , <i>αlacZ</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pBK-CMV	lambdaO
	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , P <sub>Lac</sub> , <i>αlacZ</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pBK-CMV	lambdaP
	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , P <sub>Lac</sub> , <i>αlacZ</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pBK-CMV	lambdaQ
	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , P <sub>Lac</sub> , <i>αlacZ</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pBK-CMV	lambdaS
	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , P <sub>Lac</sub> , <i>αlacZ</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pBK-CMV	lambdaDD
	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , P <sub>Lac</sub> , <i>αlacZ</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pBK-CMV	lambdaHH
	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , P <sub>Lac</sub> , <i>αlacZ</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pBK-CMV	lambdaJJ
	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , P <sub>Lac</sub> , <i>αlacZ</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pBK-CMV	lambda1211
	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , P <sub>Lac</sub> , <i>αlacZ</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pBK-CMV	lambda4211
	<i>ori<sub>ColE1</sub></i> , P <sub>CMV</sub> , P <sub>Lac</sub> , <i>αlacZ</i> , (Amp <sup>R</sup> ) (vorliegende Arbeit)
pDSRedN1	CEACAM3-RFP (J. Blass)
nicht bekannt	JNK1-FLAG (Scripps Institute)
nicht bekannt	JNK2-FLAG (Scripps Institute)
pLNCX2	JNK1-APF-HA (L. Heasley)
pLNCX2	JNK2-APF-HA (L. Heasley)

pECFP

m-Spir-1CT (dominant-negative) (E. Kerkhoff)

### 6.6.2 Primer

Name	Sequenz (5'-3')
pcDNA3 sense T7 seq	TAATACGACTCACTATAGG
HA-CEACAM-IF-anti	ATGGTCTAGAAAGCTTGCAGCGTAATCTGGAACGTC ATATGG
CEACAM1-IF-sense	GAAGTTATCAGTCGACACCATGGGGCACCTCTCAGC CCC
CEA8/1-chimera-anti	GGGCTTGGGCAGCTCCGGATGTACGCTGAACTGG
CEA8/1-chimera-sense	TTCAGCGTACATCCGGAGCTGCCAAGCCCTCC
CEA1/3-chimera-anti	GCCTGGGGCATTTCGGGTATACATGGAAGTGTCC
CEA1/3-chimera-sense	TTCCATGTATACCCGGAAAATGCCCCAGGCCTTCC
CEA8/1-secr-prot-anti	ATGGTCTAGAAAGCTTGGGTCGCTTTGGTTCTTACTG ATTGG
CEA1-B-Dom-IF-anti	ATGGTCTAGAAAGCTTGGTGTGGTCCTGTTGCAGC
CEA1A1-Dom-IF-anti	ATGGTCTAGAAAGCTTGGGTCAGTGCAGTTTCGC
HA-stop-CEACAM-IF-anti	ATGGTCTAGAAAGCTTTATGCAGCGTAATCTGGAAC GTCATATGG
C1-Chim-N-TM-sense	CAGTTCATGTATACCCCATCATGCTGAACGTA
C1-Chim-N-TM-anti	TACGTTCAAGCATGATGGGGTATACATGGAAGTGG
C1-Chim-N.A1-TM-sense	GTGCGAACCAGCAGTGACCCCATCATGCTGAACGTA
C1-Chim-N.A1-TM-anti	TACGTTCAAGCATGATGGGGTCACTGCGGTTTCGCAC
C1-Chim-N.A1.B-TM-sense	GCTGCAACAGGACCACCCCATCATGCTGAACGTA
C1-Chim-N.A1.B-TM-anti	TACGTTCAAGCATGATGGGTGTGGTCCTGTTGCAGC
CEA1-NA1BA2-HAstop-IF-anti	ATGGTCTAGAAAGCTTTAAGCGTAATCTGGAACGTC ATATGGATAGTCGCTTTGGTTCTTACTGATTGG
NadA-MC58-sense	CGGATCCCATGGGCAAACACTTTCATCC
NadA-MC58-anti	CCCGCTCGAGTTACCACTCGTAATTGACGCC
NadA-MC58-w/o-stop-anti	CCCGCTCGAGCCACTCGTAATTGACGCC
NadA-MC58-dCT-stop-anti	CCCGCTCGAGCCGACCCACGTTGTAAGGTTG
T7-term-pET28a-anti	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
Opa-MC58(E.coli)-mitte-sense	ATCGCTTCTATTTAGCTCTTTATTGTTCAAGTCCCTAC TCTTCAGCTCCGCAGCGCAGGCGGCAAGTGA
OpaMC58(pET28)-NcoI-sense	GGCGCCCATGGAACCAGCCCCCAAAAACCTTCTCT CCTGTTCTCATCGCTTCTATTTAGCTCTTTA
OpaMC58(Hermes)-BamHI-sense	GGCGCGGATCCACGGAGTCGAAAATGAATCCA
Opa1/2MC58-HindIII-anti	GGTCAAAGCTTTTCAGAAGCGGTAGCG
Opa3/4MC58-HindIII-anti	GGTCAAAGCTTTTCAGAAGTGGTAGCGCAT
Opa3MC58-HV2-sense	GTACAAGGTCCGACCAACA
Opa1MC58-HV2-sense	CCAAAGAACGGCTCTCCA
3xHA-tag-HindIII-sense	GGCGCAAGCTTAGGCCGCATCTTTTACCCA
3xHA-tag-EcoRI-anti	GGCGCAATTCCAGCTAGCTGTCATTCAAGTTG
NMB0497-XhoI-sense	CCCGCTCGAGATGAATAAAGGTTTACATCGCA
NMB0497-SacI-anti	CCCGGAGCTCCAACCGATCCTGCATTGACA
ErmC-Hermes6a-EcoRV-sense	CCCCGGATATCGCCGCTGAAGATCCGGTTTTTGTTA ATCC
ErmC-NotI-anti	CCCCGGCGCCGCTTACTTATTAATAATTTATAGCT

	ATTG
NMB0497II-NotI-sense	CCCCGGCGGCCCGCCAGACAGTTAAAGAACTTGATGG C CCCCCGAGCTCCATTGAGCCGTAAATCATGGAACG
NMB0497II-SacI-anti	CCCCGGAGCTCCATTGAGCCGTAAATCATGGAACG
NMB1779II-EcoRV-sense	CCCGGATATCGGCAAATTTAGCCAAAGCAGAACAGC
NMB1779II-SacI-anti	CCCCGGAGCTCGGCCTTGTTATTTATAAAGTTTGCT G
SmR-pHP45O-sense	CCCGGCCGCGAATTCGCCGGGGATCC
SmR-pHP45O-anti	CCCGGCCGCCGCCGTCTGAAGGTGATTGATTGAGC
NMB1779-check(NMB1778)-anti	CGAATGAAATGCCAAGTTGCAAGGCCGTC
NMB0497-check(NMB0498)-anti	CCGCGTCTGTACAGCATAACAGGGAATCTG
SmR-ende-sense	GAGATCACCAAGGTAGTCGGC
SmR-start-anti	GGTTCTGGACCAGTTGCGTGAGCG

## 6.7 Lösungen und Puffer

### 6.7.1 Lösungen und Puffer für eukaryontische Zellen

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

NaVO<sub>4</sub>, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Pefabloc, 10 µg/ml Pepstatin, ad 250 ml mit A.bidest.

### 6.7.2 Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie

TAE-Puffer (1x)	4,84 g Tris-Base, 1 mM EDTA, 1,14 ml Eisessig, ad 1l mit A.bidest.
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8
GEBS	50 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerin, 0,5% (w/v) Sarcosyl, 0,05% (w/v) Bromphenolblau
dNTPs	1,25 mM dNTPs in TE-Puffer pH 8 lösen
P1-Puffer	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0, 4°C
P2-Puffer	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS, RT
P3-Puffer	3 M Kaliumacetat, pH 4,8, RT
Größenstandard	1kb DNA Ladder, Mass Ruler DNA Ladder (Fermentas)
DEPC-H <sub>2</sub> O	250 ml A. bidest, 250 µl DEPC, Inkubation über Nacht bei 37°C, 2x autoklavieren
10 x MOPS	0,4 M MOPS, 0,1 M Natriumacetat, 10 mM EDTA (pH8,0), mit 2N NaOH auf pH7,0 einstellen
20 x SSC	3,0 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat
SM-Puffer	5,8 g NaCl, 2 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 50 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5), 5 ml aus 2% (w/v) Gelatine

### 6.7.3 Lösungen und Puffer für SDS-PAGE, Proteingelfärbung und Western Blot

2xSDS-Probenpuffer	125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% (v/v) β-Mercaptoethanol, 5% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 20% (v/v) Glycerin
4xSDS-Probenpuffer	250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 20% (v/v) β-Mercaptoethanol, 10% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, 20% (v/v) Glycerin
Acrylamidlösung	40% Acrylamid/BIS
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
APS	10% Ammoniumpersulfat
TEMED	0,1% N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
SDS	20% (w/v) SDS
Laufpuffer	25 mM Tris-HCl, 192 mM 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
Fixierlösung	50% Methanol, 12% Essigsäure, 0,5 ml/l 37% Formaldehyd
Aktivierungslösung	0,13 g/l Natriumthiosulfat in A. bidest.
Entwickler	30 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 1,25 mg Natriumthiosulfat, 0,25 ml 37% Formaldehyd ad 500 ml A. bidest
Imprägnierlösung	0,1 g AgNO <sub>3</sub> , 37,5 µl 37% Formaldehyd, 50ml A. bidest.
Kathoden-Puffer (5x)	125 mM Tris-Base, 200mM 6-Aminohexansäure, pH 9,4
Anoden-Puffer (5x)	125 mM Tris-Base, pH 10,4
Transferpuffer	6,0 g Tris-Base, 28,8 g Glycin, 430 ml Methanol, 0,1% (w/v) SDS, ad 2l mit A.bidest.
TBS	25 mM Tris (pH 7,5), 125 mM NaCl
TBS/Tween	25 mM Tris (pH 7,5), 125 mM NaCl, 0,1% Tween-20
Blocklösung	2% (w/v) BSA in TBST, 0,05% (w/v) NaN <sub>3</sub>
ECL	0,225 mM p-Coumaratsäure, 1,25 mM Luminol, 0,1 M Tris-Base pH 8,5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung	35% (v/v) Wasserstoffperoxid
stripping-Puffer	0,8% (w/v) SDS, 0,8% (v/v) β-Mercaptoethanol, 80 mM Tris-HCl pH 6,8

#### 6.7.4 Chemikalien und Kits

Acrylamid (Roth), Agar-Agar (Roth), Agarose (Roth), Antibiotika (Roth, AppliChem), APS (Roth), BSA (Roth), Ethanol (AppliChem), GC-Agar (Difco), Glycerin (Roth), Glycin (AppliChem), Hefeextrakt (Roth), JNK-Inhibitor „SP600125“ (Sigma), Methanol (AppliChem), mounting Medium (Sigma), Natriumchlorid (AppliChem), Nucleotide (BioLabs), Paraformaldehyd (AppliChem), PP2 (Calbiochem), p38-Inhibitor „SB203580“ (Calbiochem), Saccharose (Roth), Saponin (Roth), TEMED (Roth), Tris-Base (AppliChem), Triton-X-100 (Roth), Trypton (Roth), Tween-20 (Roth), β-Mercaptoethanol (Roth), Cytochalasin D (Calbiochem), Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen), In-FusionPCRCloning Kit (BD Bioscience), BD Creator DNA Cloning Kit (BD Bioscience), λZAP Express Predigested (*Bam*HI) Vektor Kit (Stratagene).

## 6.8 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Autoklav (Varioklav), Brutschränke (Heraeus, Memmert), Deckgläschen/Objektträger (Knittel), Elektrobplot-Apparatur (Bio Rad, Schleicher & Schuell), Entwickler (Agfa), FACSCalibur (Becton Dickinson), Fluoreszenzmikroskop (Nikon), Gelapparatur für Polyacrylamidgelelektrophorese (Bio Rad), Geldokumentation (Bio Rad), Gelkammern für Agarosegele (Bio Rad), Glaswaren (Schott, VWR Brand), Heizblöcke (Roth, GrantBoeckel), Konfokales Mikroskop (Zeiss), Kühl- und Gefrierschränke (Privileg), Kryo-Einfrierbox (Nalgene), Magnetrührer (Ika), Master Cycler Gradient (Eppendorf), Mikrowelle (Electronia), pH-Meter (Beckman), Photometer (Biochrom), Hybridisierungsöfen (Biometra), Pipetten (Gilson), Plastikwaren (Eppendorf, Greiner, Costar), PVDF-Membranen (Millipore), Röntgenfilme (Retina), Rotator (Stuart), 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), 96-Well Dot-Blotter (Pepqlab)

## 6.9 Software

Adobe Photoshop 7.0

Clone Manager for Windows V4.1

Zeiss LSM Image Browser

ImaGene, Version 4.0 (Biodiscovery Inc.)

Cell Quest Pro (Becton Dickinson)

## 7 Methoden

### 7.1 Arbeiten mit Bakterien

#### 7.1.1 Kultur von Bakterien

##### 7.1.1.1 Kultur von Neisserien

Die verschiedenen Varianten von *Neisseria meningitidis* MC58 und *Neisseria gonorrhoeae* MS11 sowie die kommensalen Neisserien-Stämme wurden auf GC-Agarplatten, supplementiert mit Vitaminen und mit den bzw. ohne die entsprechenden Antibiotika (Cam, Em, Spc), bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle Neisserien-Stämme wurden mit Hilfe der Stereolupe anhand des opaquen Kolonie-Phänotyps selektioniert und täglich subkultiviert.

##### 7.1.1.2 Kultur von *Escherichia coli*

Expressionsstämme und kompetente Stämme von *Escherichia coli* wurden auf LB-Agarplatten oder in LB-Medium mit den entsprechenden selektiven Antibiotika bei 37°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei 220 rpm geschüttelt.

#### 7.1.2 Einfrieren von Bakterien

Die einzufrierenden Bakterien wurden mit einem sterilen Wattestäbchen von der Agarplatte abgenommen und in einer sterilen Lösung aus 600 µl LB-Medium und 600 µl 50% Glycerin in einem 2 ml Kryoröhrchen mit Schraubverschluß suspendiert und anschließend bei -80°C gelagert.

#### 7.1.3 Bestimmung der Bakterienzahl

Die Anzahl von Bakterien in einer Suspension konnte mit Hilfe einer Eichgerade nach Messung der optischen Dichte am Photometer bestimmt werden. Als Referenz diente das entsprechende Suspensions-Medium ohne Bakterien. Gemessen wurde in einem OD-Bereich von 0,1 bis 0,3. Bei Überschreitung des Bereiches wurde die Suspension entsprechend verdünnt.

Die Messung der optischen Dichte von Neisserien erfolgte bei einer Wellenlänge von 550 nm. Die Anzahl von *Neisseria meningitidis* wurde nach folgender Eichgerade bestimmt:

$$y [(cfu/ml) \times 10^8] = 1,99 \times [OD_{550}]$$

Die Anzahl der restlichen Neisserien-Stämme errechnete sich nach folgender Eichgerade

$$y [(cfu/ml) \times 10^7] = 8,6 \times [OD_{550}]$$

Die Messung der optischen Dichte von *E. coli* erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die Anzahl der *E. coli*-Bakterien wurde nach folgender Eichgerade bestimmt:

$$y [(cfu/ml) \times 10^8] = 4 \times [OD_{600}]$$

#### 7.1.4 Transformation von Bakterien durch Temperaturschock

Kompetente Bakterien können durch einen Temperaturschock, bei dem die Bakterien kurzzeitig auf 42°C erwärmt werden, exogene DNA aus der Umgebung aufnehmen. Zur Transformation wurden 100µl kompetente Bakterien vorsichtig auf Eis aufgetaut und mit 0,5µg Plasmid-DNA bzw. mit 20µl eines Ligationsansatzes (Ligation, In-Fusion, Cre-Lox) versetzt. Dieser Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 75 sec in ein auf 42°C aufgeheiztes Wasserbad überführt. Anschließend wurde die Suspension mit 1ml LB-Medium versetzt und für 1h bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden dann abzentrifugiert und unter selektiven Bedingungen auf Agarplatten mit den entsprechen Antibiotika ausplattiert und bei 37°C bebrütet.

## 7.2 Arbeiten mit Zellen

### 7.2.1 Kultur von verschiedenen Zelllinien

Humane 293T Zellen, COS7 Zellen und CHO Zellen wurden in Zellkulturschalen in DMEM/10%CS bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Konfluente Kulturen wurden mit 1ml Trypsinlösung in Suspension gebracht und durch Zentrifugation bei 600rpm für 3min pelletiert. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium suspendiert und in einer 1:5 bzw. 1:10 Verdünnung weiterkultiviert.

Für Antibiotika-Protektions-Assays (Kapitel 7.7.1) wurden die Zellen in 24-well Platten (4x10<sup>5</sup> Zellen/well) kultiviert. Diese Platten wurden zuvor mit Fibronectin (4µg/ml) in PBS über Nacht bei 4°C beschichtet. Für Infektionsexperimente, die mittels der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (Kapitel 7.7.2) analysiert wurden, sind 8x10<sup>4</sup> Zellen in 24-well Platten auf Glas-Deckgläschen, beschichtet mit Fibronectin (4µg/ml) und Poly-Lysin (10µg/ml), kultiviert worden.

### 7.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden semikonfluente Zellkulturen nach Trypsinierung durch Zentrifugation bei 600rpm für 3min pelletiert. Das Pellet mit einer Zelldichte von ca.  $5 \times 10^6$  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 Kryo-Einfrierbox über Nacht bei  $-80^\circ\text{C}$  gekühlt und anschließend zur Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff ( $-180^\circ\text{C}$ ) überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen schnellstmöglich in einem Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut. Die Zellsuspension wurde mit frischem DMEM Medium versetzt und bei 600rpm für 3min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10ml DMEM/10%CS aufgenommen und in einer Zellkulturschale für 24-48h inkubiert. Nach diesem Zeitraum erfolgte die erste Subkultivierung der Zellkultur.

### 7.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Für Infektionsexperimente wurde die Zellzahl durch Auszählung der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierzu wurden 20  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension für die Zählung eingesetzt und mit Hilfe eines Mikroskops ausgezählt. Die Zellzahl ließ sich dann wie folgt berechnen:

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

### 7.2.4 Transfektion von eukaryontischen Zellen durch die Calcium-Phosphat Kopräzipitationsmethode

Eukaryontische Zellen sind in der Lage exogene Partikel über Endozytose aufzunehmen. Die Fähigkeit zur Endozytose wird bei der Transfektion von eukaryontischen Zellen ausgenutzt, indem DNA mittels  $\text{CaCl}_2$  in eine kristalline Form überführt wird, die mit besonders großer Effizienz von den Zellen endozytotisch aufgenommen wird. Um die Aufnahme der DNA-Kristalle zu steigern wurden die Zellen für 10 min unmittelbar vor der Transfektion mit 10 $\mu\text{l}$  Chloroquin (25mM) inkubiert. Für die Transfektion wurden 1-10 $\mu\text{g}$  DNA in 500 $\mu\text{l}$  sterilem A.bidest. gelöst und mit dem gleichen Volumen an gekühltem 2xHBS versetzt. Um eine DNA-Kristallisation auszulösen, wurde der Ansatz unter Schütteln tropfenweise mit 50 $\mu\text{l}$  2,5M  $\text{CaCl}_2$  versetzt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -DNA-Suspension wurde tropfenweise auf den mit 10 $\mu\text{l}$

Chloroquin behandelten Zelllayer aufgebracht; die Zellkultur wurde für 6-8h im Brutschrank bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurde das Kulturmedium erneuert und die Zellen wurden für weitere 12 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellen hatten nach dieser Inkubationsphase das Genprodukt der cDNA exprimiert; bei GFP- oder RFP-gekoppelten Proteinen konnte die Transfektionseffizienz durch Fluoreszenzmikroskopie abgeschätzt werden. Für die quantitative Analyse der Proteinexpression wurden die Zellen lysiert (Kapitel 7.6.5) und in einem Western-Blot (Kapitel 7.6.3) eingesetzt.

## 7.3 Arbeiten mit Phagen

### 7.3.1 Konstruktion einer $\lambda$ ZAP-Express Genbank

Eine Genbank ist eine statistische Repräsentation der Gesamt-DNA eines Organismus in Form von definierten DNA-Fragmenten auf Vektoren in einzelligen Trägerorganismen oder Phagen. Die Trägerorganismen ermöglichen die Speicherung und Vervielfältigung der DNA-Fragmente zum Zweck molekularbiologischer Untersuchungen. Für die Konstruktion der genomischen Genbank von *Neisseria meningitidis* MC58 (Opa<sup>-</sup>;  $\Delta$ siaD;  $\Delta$ IgtA) wurden DNA-Fragmente der Gesamt-DNA des Organismus in  $\lambda$ Pagen unter Verwendung des  $\lambda$ ZAP-Express Genbank-Systems (Stratagene) kloniert.

#### 7.3.1.1 Partielle Restriktion von genomischer DNA aus *Neisseria meningitidis* MC58 und Dichtegradientenzentrifugation

Zur Konstruktion der Genbank musste die chromosomale DNA (Isolierung siehe Kapitel 7.4.1) statistisch in Fragmente der gewünschten Größe geschnitten werden. Dies wird durch partielle Restriktion mit einer Endonuklease (*Sau3AI*) erreicht, die eine Tetranukleotid-Erkennungssequenz besitzt. Endonukleasen mit Tetranukleotid-Erkennungssequenz schneiden sehr oft und eignen sich deshalb zur statistischen Restriktion. Durch eine Verdünnungsreihe der Enzymkonzentration bei gleicher DNA-Menge kann eine DNA-Fraktion hergestellt werden, die Fragmente der gewünschten Größe enthält.

Es folgte eine weitere Auftrennung der benötigten Fragmente durch Ultrazentrifugation in einem NaCl-Gradienten. Die Ausbildung eines NaCl-Gradienten wird durch das Einfrieren und Auftauen einer 20%igen NaCl-Lösung in Zentrifugenröhrchen bei -20°C erreicht. Die DNA wurde vorsichtig auf den Gradienten aufgetragen und für 2,5 h in einer Ultrazentrifuge (Beckman) bei 42000g im „SW60Ti“ Rotor zentrifugiert. Danach wurden durch vorsichtiges

Durchstechen des Zentrifugenröhrchen-Bodens mit einer Kanüle Fraktionen von ca. 250 µl (5 Tropfen) gesammelt und im Agarosegel kontrolliert. Die Fraktionen, die DNA-Fragmente von 2 – 9 kb enthielten, wurden mittels Ethanol-Präzipitation (Kapitel 7.4.3.1) gefällt und anschließend in 10 µl H<sub>2</sub>O bidest. gelöst. Nach Überprüfung der Fraktionierung im Agarosegel und Bestimmung der DNA-Konzentration, konnte die fraktionierte DNA für die Ligation mit dem λZAP-Express-Vektor verwendet werden.

#### 7.3.1.2 Ligation mit dem λZAP-Express Vektor

Die Ligation der DNA-Fragmente mit den Phagenarmen erfolgte mittels T4-DNA Ligase (NewEngland Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 5µl unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen bei 14°C über 2 Tage. Im Ligationsansatz wurden 1 µg mit BamHI vorgeschchnittener λZAP-Express Vektor und 100 ng DNA-Fragment bei 1,5 U Ligase eingesetzt.

#### 7.3.1.3 Verpackung der Ligationsansätze in Phagenpartikel

Die Verpackung der Ligationsansätze erfolgte mit den „Gigapack® III Gold Packaging Kit“. Der Verpackungsansatz wurde auf Eis aufgetaut, mit 2,5 µl des Ligationsansatzes versetzt und für 2 h bei 22°C inkubiert. Danach wurden 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform zugegeben. Der Ansatz wurde vermischt und kurz abzentrifugiert, um vorhandene zelluläre Bruchstücke abzutrennen. Der Überstand mit den DNA-enthaltenden Phagen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, erneut mit 20 µl Chloroform versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

### 7.3.2 Phageninfektion und Titerbestimmung

Zur Bestimmung des Phagentiters wurde zunächst eine Einzelkolonie *E. coli* XL1Blue MRF' in 10 ml LB-Maltose-MgSO<sub>4</sub>-Medium (0,2% Maltose, 10 mM MgSO<sub>4</sub>) überführt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 1,0 bei 220 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden dann abzentrifugiert (1000g/ 10 min) und mit einer 10 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 eingestellt. Anschließend wurden von der Phagen-Genbank Verdünnungen von 10<sup>0</sup> bis 10<sup>-5</sup> in SM-Puffer hergestellt. 200 µl der *E. coli*-Suspension wurden mit je 1 µl der entsprechenden Phagen-Verdünnung infiziert und 20 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml NZY-Top-Agar (50°C) wurde der Ansatz auf vorgewärmte (37°C) NZY- Platten ausplattiert und

über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung des Phagen-Titers (pfu/ml) wurden die Plaques auf den einzelnen Platten ausgezählt.

### 7.3.3 Screenen einer $\lambda$ ZAP-Express Genbank

Zum Durchsuchen der Meningokokken-Genbank wurden 30000 Plaques untersucht die nach der Infektion von *E. coli* XL1Blue MRF' mit den Phagen (vgl. Kapitel 7.3.2) hervorgingen. Die Infektionsrate von *E. coli* wurde anhand des berechneten Phagentiters so gewählt, dass sich etwa 1500 Plaques pro NZY-Agar-Platte (Durchmesser 10 cm) ergaben.

Die in den Plaques enthaltenen Proteine wurden auf eine PVDF-Membran durch luftblasenfreies Auflegen der Membran auf die Agarplattenoberfläche transferiert. Die Orientierung der Membran musste dabei markiert werden, um später positive Klone identifizieren zu können. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran vorsichtig von der NZY-Platte genommen und mittels Western Blot (vgl. Kapitel 7.6.3) auf CEACAM-Interaktion untersucht. Hierfür wurde die Membran nach 2 stündigem Abblocken unspezifischer Bindungsstellen mit BSA-Lösung über Nacht mit löslichem multimerisiertem CEA1-NA1BA2-3xHA (CEA1-NA1BA2-3xHA + anti-HA-Antikörper; vgl. Kapitel 7.6.6) inkubiert. Die Detektion von multimerisiertem CEA1-NA1BA2-3xHA erfolgte durch Inkubation der Membran mit einem Sekundärantikörper gegen den anti-HA-Antikörper. Die Phagen, die mit multimerisiertem löslichem CEACAM1-HA interagierten, wurden aus dem Agar mit einer sterilen Pipettenspitze ausgestochen, in ein Eppendorfgefäß mit 500  $\mu$ l SM-Puffer und 20  $\mu$ l Chloroform überführt, für 2-4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und bei 4°C gelagert. Diese Phagen wurden für weitere zwei Screening-Runden mit geringerer Phagen-Dichte pro Platte (ca. 200 pfu/Platte) eingesetzt. Auf diese Weise konnte die CEACAM1-Interaktion überprüft werden und ein reiner Phagen-Klon gewonnen werden.

### 7.3.4 In vivo excision

Bei der *in vivo* excision können DNA-Inserts, die in den  $\lambda$ ZAP Express Vektor kloniert worden sind, durch einen (*ExAssist*) Helferphagen herausgeschnitten und in pBKCMV-Phagemide subkloniert werden (Alting-Mees *et al.*, 1992; Short *et al.*, 1988; Short und Sorge, 1992). Dazu werden *E. coli*-Zellen mit dem beim Genbankscreening erhaltenen positiven Phagen infiziert. Zusätzlich werden die *E. coli*-Zellen mit einem Helferphagen infiziert. Innerhalb der *E. coli* Zellen erkennen dann sogenannte „*Transacting*-Proteine“ des

Helferphagen die Initiator- und Terminatorsequenzen des  $\lambda$ ZAP-Express-Vektors. Beide Signale werden von dem Helferphagen Gen II-Protein erkannt und ein neuer DNA-Strang synthetisiert, der den zwischen Initiator und Terminator liegenden Strang ersetzt. Der ersetzte DNA-Strang wird dann zirkularisiert, als filamentöser Phage von den Helferphagenproteinen verpackt und von den Zellen abgegeben. Durch Infektion eines F'-Stammes mit diesem Phagen und Inkubation in Gegenwart von Kanamycin können dann die pBK-CMV-Plasmide mit den gewünschten DNA-Fragmenten erhalten werden. Für die *in vivo excision* wurden je 10 ml LBMM-Medium mit *E. coli* XL1-Blue MRF' und *E. coli* XLOLR beimpft und über Nacht bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Beide *E. coli*-Stämme wurden abzentrifugiert (1000 g, 10 min) und in 10 mM MgSO<sub>4</sub> auf eine OD<sub>600</sub> von 1,0 eingestellt. *E. coli* XLOLR wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Anschließend wurden 200 µl der *E. coli* XL1-Blue MRF'-Suspension mit 250 µl Phagenstocklösung und 1 µl *ExAssist* Helferphagen (Stratagene) versetzt und 20 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml NZY-Medium erfolgte eine weitere Inkubation für 4 h bei 37°C und 220 rpm. Der Ansatz wurde dann für 20 min bei 70°C inkubiert und bei 1000g abzentrifugiert (15 min). Der Überstand, der den pBK-CMV-Phagemid-Vektor als filamentöse Phagenpartikel enthält, wurde zur Infektion von *E. coli* XLOLR verwendet. Hierzu wurden 10 µl und 100 µl des Phagenüberstandes mit jeweils 200 µl *E. coli* XLOLR-Zellen versetzt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl NZY-Medium erfolgte eine erneute Inkubation für 45 min bei 37°C. Der Ansatz wurde auf LB-Kan Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Von den auf den Platten gewachsenen Klonen wurden die Plasmide isoliert (Kapitel 7.4.2) und durch Restriktionsanalysen auf DNA-Insertionen analysiert. Plasmide mit entsprechenden Inserts wurden sequenziert. Die erhaltene DNA-Sequenz wurde in Datenbankrecherchen zur Ermittlung des zugehörigen Proteins eingesetzt.

## 7.4 Arbeiten mit DNA

### 7.4.1 Isolierung chromosomaler DNA aus Neisserien

Über Nacht auf GC-Platten gewachsene Neisserien-Stämme wurden mit einem sterilen Wattestäbchen von der Platte abgenommen und in 0,5 ml TE-Puffer suspendiert. Nach Zugabe von 0,5 ml Lysepuffer und 0,5 ml Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wurden die Ansätze für 15 min geschüttelt und abzentrifugiert (10 min, 13000 g). Die obere, wässrige Phase wurde mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und wiederum für 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Die DNA der oberen, wässrigen Phase wurde mittels

Isopropanolpräzipitation (Kapitel 7.4.3.2) gefällt und anschließend in 1 ml TE Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 50 µg RNase A und zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde die im Ansatz befindliche DNA erneut durch Isopropanolpräzipitation gefällt und dann in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

## 7.4.2 Plasmidpräparation

### 7.4.2.1 Plasmidpräparation (nach Birnboim-Doly)

Diese Methode wurde eingesetzt, um in kurzer Zeit aus sehr vielen Bakterienstämmen Plasmid-DNA zu gewinnen und den Erfolg einer Klonierung durch Verdau der Plasmid-DNA zu überprüfen. Da durch diese Methode keine hochreine Plasmid-DNA gewonnen wird, wurde die isolierte DNA nicht für Sequenzierungen und Transfektionen verwendet.

Eine Impföse *E. coli* wurde in 300µl P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 300µl P2-Puffer wurde die Suspension durch Invertieren durchmischt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 300µl P3-Puffer dazu pipettiert, der Ansatz invertiert und weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde dann 15 min bei 14000 g zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene plasmidale DNA wurde dann mittels Isopropanolpräzipitation gefällt und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen (Kapitel 7.4.3.2).

### 7.4.2.2 Plasmidpräparation mittels Kit

Diese Aufreinigungsmethode lieferte hochreine Plasmid DNA, die für Sequenzierungen, Transfektionen und alle sonstigen Anwendungen hervorragend geeignet war. Die Plasmid-DNA wurde mit den „Nucleobond-Midi bzw. mit den Qiagen Mini-Kit“ wie vom Hersteller beschrieben isoliert. Quantität und Reinheit der Plasmid DNA wurden sowohl im Agarosegel (Kapitel 7.4.7) als auch im Photometer (Kapitel 7.4.4) bestimmt.

## 7.4.3 Fällung der DNA

### 7.4.3.1 Ethanolpräzipitation

Die wässrige DNA-Lösung wurde mit ¼ Volumen 10 M  $\text{NH}_4^+$ -Acetat und 2 Volumen eiskaltem Ethanol p.a. (98%) versetzt. Die Fällung der DNA wurde in flüssigem Stickstoff ausgeführt (3-5 min). Der Ansatz wurde anschließend nach dem Auftauen für 15 min bei 14000 g abzentrifugiert und die Fällungslösung wurde vorsichtig dekantiert und verworfen.

Das DNA-Pellet wurde dann mit 0,5 ml Ethanol (70%) zur Entfernung mitgefällter Salze gewaschen (10 min, 14000 g) und anschließend bei 37°C für 20 min getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

#### 7.4.3.2 Isopropanolpräzipitation

Zur Fällung der DNA wurde die wässrige DNA-Lösung mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und durch Invertieren gut vermischt. Der Ansatz wurde anschließend für 15 min bei 14000 g abzentrifugiert und die Fällungslösung wurde vorsichtig dekantiert und verworfen. Das DNA-Pellet wurde dann mit 0,5 ml Ethanol (70%) zur Entfernung mitgefällter Salze gewaschen (10 min, 14000 g) und anschließend bei 37°C für 20 min getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

### 7.4.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption DNA-haltiger wässriger Lösungen in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten gegen TE-Puffer als Nullwert.

Folgende Richtwerte wurden für die Konzentrationsbestimmung verwendet (Sambrook et al., 2001):

Bei doppelsträngiger DNA:  $1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ ng DNA}/\mu\text{l}$

Bei einzelsträngiger DNA:  $1 \text{ OD}_{260} = 33 \text{ ng DNA}/\mu\text{l}$

Das Verhältnis  $\text{OD}_{260}$  zu  $\text{OD}_{280}$  ist ein Maß für die Reinheit der DNA und sollte idealerweise 1,8 bis 2,0 betragen.

### 7.4.5 Enzymatische Modifikationen der DNA

#### 7.4.5.1 DNA-Hydrolyse durch Restriktionsenzyme

Zur enzymatischen Hydrolyse von DNA wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, welche spezifische Tetra- bis Oktanukleotidsequenzen erkennen. Der Verdau führte je nach Enzym zu stumpfen oder einzelsträngigen 3'- bzw. 5'- überstehenden Enden. Die Restriktionsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 10-50  $\mu\text{l}$  unter den von den Herstellern (Fermentas, NewEngland Biolabs) empfohlenen Pufferbedingungen durchgeführt.

Der Verdau erfolgte dabei jeweils unter dem angegebenen Temperaturoptimum für mindestens 2 Stunden. Die erfolgreiche Hydrolyse der Plasmid-DNA wurde anschließend durch analytische Gelelektrophorese überprüft.

#### 7.4.5.2 Dephosphorylierung plasmidaler DNA

Bei der Klonierung von Restriktionsfragmenten in geeignete linearisierte Vektoren tritt eine hohe Eigenligationsrate des Vektors auf, sofern dieser nicht mit alkalischer Phosphatase behandelt wurde. Dieses Enzym katalysiert die hydrolytische Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe der Vektor-DNA, wodurch die Fähigkeit zur Religation verloren geht.

Die Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA erfolgte mit der Antarctic-Phosphatase (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers.

#### 7.4.5.3 Ligation

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden von DNA Doppelsträngen, die als Produkte des Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen entstehen.

Die Ligation erfolgte mittels der T4-DNA Ligase (NewEngland Biolabs) und wurde in einem Gesamtvolumen von 10 - 20 µl unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Ein typischer Ligationsansatz setzte sich aus 10 fmol geschnittenem Vektor und 50 -100 fmol Insert zusammen.

#### 7.4.5.4 In-Fusion Reaktion

Die *In-Fusion* PCR Klonierung ist eine Methode zur Generierung von PCR-Produkten, welche ohne weitere Behandlung mit Restriktionsenzymen und Ligasen durch Einsatz eines proprietären Enzyms zur Klonierung in entsprechende Vektoren eingesetzt werden können. Für die *In-Fusion* Reaktion wurde der *In-Fusion Dry-Down Kit* (Beckton Dickinson) verwendet. Die Durchführung der *In-Fusion* Reaktion erfolgte unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen.

#### 7.4.5.5 *Cre-lox site-spezifische Rekombination*

Für die Cre-Rekombination wurde der „*BD Creator DNA Cloning Kit*“ verwendet. Mit diesem Kit können Zielgene durch Rekombination mittels Cre-Rekombinase von einem Donorvektor in einen Akzeptorvektor transferiert werden.

Die Rekombinationsreaktion erfolgte in einem 10µl Ansatz unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen.

Als Donor-Vektor wurde der Vektor pDNR-Dual, der das zu transferierende PCR-Fragment enthielt, eingesetzt. Als Akzeptorvektor diente der eukaryontische Expressionsvektor pLPS-3'EGFP. Für einen Reaktionsansatz wurden 100 ng Donorvektor und 200 ng Akzeptorvektor verwendet.

#### 7.4.6 **Polymerase-Ketten-Reaktion und *Gene-SOEing***

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können DNA-Fragmente mit definierter Länge und definierter Sequenz unter Verwendung von geeigneten Primern sowie der DNA-Polymerasen thermophiler Bakterien amplifiziert werden. Ein typischer PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen (Tab. 7.1):

**Tab. 7.1: Typischer PCR-Ansatz**

10x PCR-Puffer	5 µl
dNTPs (20 mM)	1 µl
Primer I (100 pmol/µl)	1 µl
Primer II (100 pmol/µl)	1µl
Template-DNA	5-100 ng
Vent-Polymerase	2 U
Taq-Polymerase	2 U
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 50 µl

Die Lösungen wurden auf Eis im PCR-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. Für die Amplifizierung der gewünschten DNA-Fragmente wurde der in Tabelle 7.2 dargestellte Reaktionszyklus verwendet:

**Tab. 7.2: PCR-Programm**

Initiale Denaturierung	95°C	2 min
Hauptprogramm (32 Zyklen)		
Denaturierung	95°C	30 sec
Hybridisierung	45°C – 68°C	30 sec
Polymerisation	72°C	30 sec – 4 min
Finale Verlängerung	72°C	5 min

Die Hybridisierungstemperatur richtete sich nach dem GC-Gehalt der Primer und wurde meist so gewählt, dass sie 4-6°C unter deren Schmelztemperatur lag. Die Polymerisationszeit bei 72°C richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden DNA. Pro kb zu synthetisierender DNA wurde mit 1 min gerechnet. Nach Beendigung der Reaktionszyklen erfolgte eine Überprüfung des PCR-Produktes im Agarosegel mit anschließender Aufreinigung durch eine präparative Gelelektrophorese (Kapitel 7.4.7).

Zur Herstellung der verschiedenen CEACAM1-Varianten und CEACAM-Chimären wurde die von Horton et al. (1990) beschriebene Methode des *Gene-SOEing* (*splicing by overlap extension*) angewendet. Um verschiedene Rezeptorteile zu einem Hybridmolekül zusammenzufügen, wurden zunächst die beiden Teile des Rezeptors in separaten PCR-Ansätzen amplifiziert. Die Primer wurden hierbei so gewählt, dass an den 3'-Enden der Moleküle homologe Bereiche mit dem jeweils zu fusionierenden DNA-Fragment entstanden. Die beiden PCR Amplifikate wurden durch eine präparative Gelelektrophorese aufgereinigt (Kapitel 7.4.7) und gleiche Mengen der Amplifikate in einer *SOEing* PCR als Templates eingesetzt (Tab. 7.3):

**Tab. 7.3: *SOEing*-PCR Ansatz**

10x PCR-Puffer	5 µl
dNTPs (2 mM)	1 µl
Template-DNA I	10-50 ng
Template-DNA II	10-50 ng
Vent-Polymerase	2 U
Taq-Polymerase	2 U
H2O bidest.	ad 50 µl

Mit diesem Ansatz wurde wie oben beschrieben eine PCR ohne Primer gefahren (20 Zyklen), um die gewünschten Endprodukte herzustellen. Danach wurden dem Ansatz Primer zugesetzt, die der Amplifikation des Endproduktes dienten und ein normales PCR-Programm wie oben

beschrieben gefahren. Nach Überprüfung des PCR-Produktes im Agarosegel erfolgte dessen Aufreinigung durch eine präparative Gelelektrophorese.

#### **7.4.7 Agarosegelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese in Agarosegelen, die je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente 0,7% bzw. 1,4% Agarose enthielten. Zur Gelherstellung wurde die Agarose in 1xTAE-Puffer durch Kochen in der Mikrowelle gelöst, auf etwa 50°C abgekühlt und in die vorbereitete Gelkammer (PeqLab) gegossen. Die erstarrte Gelmatrix wurde mit 1xTAE-Puffer überschichtet und die mit 1/4 Volumen GEBS versetzten Nukleinsäureproben wurden in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard diente „Gene Ruler 1kb Ladder“ (Fermentas). Die Elektrophorese erfolgte für gewöhnlich bei einer konstanten Spannung von 5V/cm (analytische Gelelektrophorese). Sollten aus den Agarosegelen DNA-Fragmente aufgereinigt werden, dann erfolgte die Auftrennung bei 20V für 12-16 Stunden (präparative Gelelektrophorese). Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel für 10min in einer Ethidiumbromidlösung (3µg/ml) gefärbt. Die DNA konnte nach Spülen des Gels mit H<sub>2</sub>O aufgrund der Interkalation des EtBr zwischen die Basen der dsDNA durch einen UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden.

#### **7.4.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurden die gewünschten Fragmente aus einem präparativen Gel ausgeschnitten (Kapitel 7.4.7) und mit Hilfe des „QIA quick gel extraction“-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Menge und Reinheit der DNA wurde durch analytische Gelelektrophorese überprüft.

### **7.5 Arbeiten mit RNA und Mikroarrays**

#### **7.5.1 RNA-Isolierung**

Der Umgang mit RNA erfordert besondere Maßnahmen, um RNase-freies Arbeiten zu gewährleisten. RNasen sind sehr stabile Enzyme, die RNA-Moleküle in kleine Moleküle zerlegen. Um Kontaminationsprobleme zu vermeiden, wurden RNA-Arbeiten generell mit Handschuhen durchgeführt. Darüber hinaus wurden nur RNase-freie Gefäße eingesetzt und

sämtliche Lösungen wurden mit 0,1% DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt. DEPC bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine, wodurch die Aktivität der RNasen zerstört wird.

#### 7.5.1.1 Mechanischer Aufschluß von Bakterien zur RNA-Isolierung

Der Aufschluß der Bakterien erfolgte mechanisch mit Hilfe einer Silica/Ceramid-Matrix im FastRNA Blue Röhrchen. Hierzu wurden die Bakterien mit 0,1%  $\beta$ -Mercaptoethanol in 1ml RLT-Lysepuffer (Qiagen) versetzt. Das im RLT-Puffer enthaltene chaotrope Salz Guanidinisothiocyanat wirkt denaturierend auf Proteine und inaktiviert daher auch RNasen. Die Zellsuspension wurde anschließend in FastRNA Blue Röhrchen überführt. Der mechanische Aufschluß erfolgte durch die Silica/Ceramid-Matrix der Röhrchen für 45 sec bei einer Geschwindigkeit von 6,5 in einem FastPrep FP120 Schüttler. Die Röhrchen wurden anschließend für 1 min bei 8000g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur RNA-Isolierung (Kapitel 7.5.1.2) verwendet.

#### 7.5.1.2 RNA-Isolierung aus Bakterien und Analyse

Die RNA-Isolierung erfolgte je nach benötigter Menge an RNA mit den „RNeasy Protect Mini Kit“ bzw. mit den „RNeasy Protect Midi Kit“ von Qiagen. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers nach dem Protokoll „*Isolation of total RNA from Bacteria*“

Um eventuell vorhandene DNA-Reste zu entfernen, wurde die RNA-Probe einem Verdau mit DNase unterzogen (500 $\mu$ l Ansatz: MgSO<sub>4</sub> (0,5 mol/l) 50  $\mu$ l, Na-Acetat (1 mol/l) 50  $\mu$ l, DNase (10U/ $\mu$ l) 10  $\mu$ l, RNA-Probe 350 -380  $\mu$ l, ad 500  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O).

Nach Inkubation bei 37°C für 60 min wurde die Probe noch einmal über einen „RNeasy Protect Kit“ aufgereinigt.

Die aufgereinigten Proben wurden mit Gelelektrophorese aufgetrennt (Kapitel 7.4.7). Dadurch kann man die charakteristischen 16S und 23S-Banden der prokaryontischen ribosomalen RNA sichtbar machen. Die mRNA-Fragmente verteilen sich über einen weiteren Größenbereich unterhalb der 16S-Banden verteilt.

Um eine Kontamination der RNA mit DNA auszuschließen, wurde 1  $\mu$ l der Probe entnommen und als Templat in einer PCR (Kapitel 7.4.6) eingesetzt. Als Positivkontrolle diente genomische DNA, als Negativkontrolle reines H<sub>2</sub>O.

### 7.5.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die Absorption RNA-haltiger wässriger Lösungen in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten gegen Aqua dest. als Nullwert.

Folgende Richtwerte wurden für die Konzentrationsbestimmung verwendet (Sambrook et al., 2001):  $1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ ng RNA}/\mu\text{l}$

Das Verhältnis  $\text{OD}_{260}$  zu  $\text{OD}_{280}$  ist ein Maß für die Reinheit der RNA und sollte idealerweise 1,8 bis 2,0 betragen.

### 7.5.3 Mikroarrays

Die Technologie der DNA-Mikroarrays ermöglicht die simultane Analyse einer großen Anzahl von Gensequenzen zum Zweck der Gen- und Sequenzdifferenzierung, zu Expressionsstudien und zur Detektierung von Polymorphismen. Hauptsächlich finden Mikroarrays Anwendung im Sektor der RNA-Expressionsanalyse. Die Technologie des Mikroarrays basiert auf der Hybridisierung zwischen zwei einzelsträngigen komplementären Nukleinsäuren, die eine davon ist auf der Matrix fixiert, die andere wird aus dem jeweiligen Versuchsansätzen gewonnen. Zur Analyse der Genexpression wird RNA aus Experiment- und Kontrollzellen gewonnen, in cDNA umgeschrieben und dabei mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Nach Hybridisierung der cDNAs mit den Spots wird die Signalintensität der unterschiedlichen Farbstoffe an jedem Spot gemessen und ausgewertet.

In der vorliegenden Arbeit wurden Epoxy-Slides verwendet, die DNA-Fragmente aus allen 2158 ORFs des Genoms von *Neisseria meningitidis* MC58 in dreifacher Ausführung enthielten. Darüber hinaus waren die Slides mit diversen Standard-DNA Fragmenten ausgestattet (vgl. Guckenberger et al., 2002).

#### 7.5.3.1 Reverse Transkription mit Einbau der Farbstoffe Cy3 und Cy5

Identische RNA-Mengen, die miteinander verglichen werden sollten (RNA aus Experiment und Kontrolle), wurden während einer Erststrangsynthese mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert, nämlich Cy3 und Cy5. Der Einbau der Farbstoffe erfolgte durch *nick translation* von Cy3- bzw. Cy5-dCTPs. Nach Vereinigung der beiden markierten Proben erfolgte die Hybridisierung.

Für die Reverse Transkription wurden jeweils 20 µg RNA auf ein Volumen von 14,1 µl eingestellt und mit 0,9 µl Nona-Random-Primer (5µg/µl) versetzt. Des Weiteren wurde der Ansatz mit 1 µl Luciferase-RNA (10 ng/µl; (Promega)) und 2 µl Standard-Saccharomyces-RNA (jeweils unterschiedlich für Cy3 bzw. Cy5-Markierung) versetzt, welche später nach Hybridisierung der Slides als Kontrolle der cDNA Synthese fungieren. Der Ansatz wurde für 5 min bei 70°C inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen und dann sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe des vorher angesetzten Reaktionsmixes (0,8 µl 10 mM dCTP, 1µl 20 mM dATP, 1 µl 20 mM dGTP, 1 µl 20 mM dTTP, 0,1 µl 0,1 M DTT, 8 µl 5x *first strand buffer*, 5,8 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 1 µl RNase Out, 1 µl Superscript II RNase H- Reverse Transkriptase, 2 µl Cy3- bzw. Cy5-dCTP) wurde der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur zur Anlagerung der Primer an die RNA inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 2h bei 42°C zur cDNA Synthese mittels Super Script II Reverser Transkriptase inkubiert. Da die Farbstoffe stark lichtempfindlich sind, wurde dieser und alle darauf folgenden Arbeitsschritte im Dunkeln durchgeführt. Das Enzym wurde anschließend für 15 min bei 70°C deaktiviert. Nachdem die Probe abgekühlt war, wurden mögliche Spuren von RNA durch Zugabe von 2 µl DNase-freier RNase entfernt. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei 37°C erfolgte die Aufreinigung der cDNA über G50-Säulchen (Amersham-Pharmacia) nach Angaben des Herstellers. Die Proben konnten dann zur Hybridisierung verwendet werden.

#### 7.5.3.2 Hybridisierung der Slides

Vor Hybridisierung der Epoxy-Slides mit markierter cDNA mussten die gespotteten Slides gewaschen werden, um ungebundene DNA-Moleküle und Kopplungspufferreste zu entfernen. Das Waschen erfolgte auf einem magnetischen Rührgerät unter ständigem Rühren nach folgendem Protokoll:

1. 1 x 5 min in Waschlösung 1 (0,1% Triton-X 100) bei RT
2. 2 x 2 min in Waschlösung 2 (HCl-Lösung pH4) bei RT
3. 1 x 10 min in Waschlösung 3 (100 mM KCl) bei RT
4. 1 x 1 min in bidestilliertem Wasser bei RT
5. 1 x 15 min in QMT Blocking Solution bei 50°C
6. 1 x 1 min in bidestilliertem Wasser

Nach Waschen der Epoxy-Slides wurden diese durch Zentrifugation (3 min, 1600 g) getrocknet und konnten dann für die Hybridisierung mit der markierten cDNA verwendet werden.

Zur Hybridisierung wurden die Cy3- und Cy5- markierten cDNA-Proben vereinigt, in einer Vakuum-Zentrifuge auf 30  $\mu$ l einkonzentriert und mit 0,1% SDS und 3xSSC versetzt (30  $\mu$ l Probe, 6  $\mu$ l 20xSSC, 4  $\mu$ l 1% SDS). Anschließend wurde der Ansatz für 3 min bei 95°C inkubiert und sofort auf Eis gestellt. 30 $\mu$ l des Ansatzes wurden dann auf den vorbehandelten Slide gegeben und mit einem Deckgläschen luftblasenfrei abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgte in einer Corning-Hybridisierungskammer bei 50°C über Nacht im Wasserbad.

Nach erfolgter Hybridisierung mussten die Slides erneut nach folgendem Protokoll bei Raumtemperatur unter Rühren gewaschen werden:

1. 1 x 10 min Waschpuffer 1 (2x SSC + 0,2% SDS)
2. 1 x 10 min Waschpuffer 2 (2x SSC)
3. 1 x 10 min Waschpuffer 3 (0,2x SSC)

Nach Waschen der Epoxy-Slides wurden diese durch Zentrifugation (3 min, 1600 g) getrocknet und konnten dann in einem Fluoreszenz-Scanner gescannt werden.

### 7.5.3.3 Scannen und Auswertung

Das Scannen der hybridisierten Slides erfolgte mit einem geeigneten Fluoreszenz-Scanner (Affimetrix 418 Scanner, MWG-Biotech AG) unter Verwendung der entsprechenden Farbkanäle für Cy3 (Anregungswellenlänge: 550 nm, Emissionswellenlänge: 570 nm) bzw. für Cy5 (Anregungswellenlänge: 649 nm, Emissionswellenlänge: 670 nm). Anschließend wurden die durch das Scannen erhaltenen, digitalisierten Bilder mit entsprechender Software ausgewertet. Hierzu wurde zunächst die durchschnittliche Signalintensität und die Messung des lokalen Hintergrunds durch ImaGene, Version 4.0 Software (Biodiscovery Inc., Los Angeles, Kalifornien) für jeden Spot ermittelt. Die beiden Farbkanäle wurden dann normalisiert, wobei die Mittelwerte von allen *N. meningitidis* DNA Spots berücksichtigt wurden. Anschließend wurden von den normalisierten Werten die Cy3/Cy5 Fluoreszenzverhältnisse berechnet und die durchschnittlichen Signalverhältnisse der Spots ermittelt. Letztere dienen dann zur Berechnung der einzelnen Transkript-Verhältnisse jedes einzelnen ORFs. Die weitere Auswertung erfolgte dann mittels Microsoft Excel bzw. mittels Microsoft Access.

## 7.6 Arbeiten mit Proteinen

### 7.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine können mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Zur Herstellung der Proteingele wurden das vertikale Gelsystem von BRL (18x12cm) und die Mini-Protean II-Kammern von BioRad (8x6 cm) verwendet. Trenngele besaßen eine Polyacrylamid (PA)-Konzentration zwischen 10% und 15%. Die Konzentration richtete sich nach der Größe der zu untersuchenden Proteine. Beim Sammelgel wurden stets 5% Polyacrylamidlösungen eingesetzt (Tab. 7.4).

**Tabelle 7.4: Schema zur Herstellung von Trenn- und Sammelgelen für die SDS-PAGE**

	Trenngel			Sammelgel 5%
	10%	12,5%	15%	
PA (40%)	2,5 ml	3,1 ml	3,75 ml	1,25 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	5 ml
H <sub>2</sub> O dest.	5 ml	4,3 ml	3,65 ml	6,15 ml
ENTGASUNG				
SDS 20%	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
APS 10%	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Das Trenngel wurde nach Zugabe von APS und TEMED zwischen zwei mit Ethanol und H<sub>2</sub>O dest. gereinigten Glasplatten gegossen und mit H<sub>2</sub>O bidest. überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel über das Trenngel gegossen und mit einem Kamm vor dessen Aushärtung versehen. Das vollständig polymerisierte Gel wurde nach entfernen des Kamms in eine Gelkammer gespannt und mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Die Proteinproben wurden in SDS-Puffer aufgenommen, für 5 min. bei 95°C aufgeköcht und in die mit zuvor mit Elektrophorese-Puffer gespülten Probenaschen mit einer Hamilton-Pipette eingefüllt. Die Probenauftrennung erfolgte bei 120V für 1-2h.

### 7.6.2 Coomassie-Färbung und Silberfärbung von Proteingelen

Zur Coomassie-Färbung wurde das Gel 5 – 15 min in der Coomassiefärbelösung unter leichtem Schütteln gefärbt und fixiert. Anschließend wurde das Gel in der Entfärbelösung solange entfärbt, bis nur noch die blauen Proteinbanden sichtbar waren. Zur Aufbewahrung wurde das Gel in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

Für die Silberfärbung wurde das Gel nach der Elektrophorese mit Handschuhen in eine saubere Schale gebracht und mindestens 1 h (eventuell über Nacht) bei Raumtemperatur in Fixierlösung inkubiert. Danach wurde dreimal mit 50% Ethanol für 20 min bei Raumtemperatur gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde das Gel kurz (2 – 3 min) in H<sub>2</sub>O bidest. gebadet, um wieder Originalgröße zu erreichen. Nach 1 Minute Inkubation bei Raumtemperatur in Aktivierungslösung mit Natriumthiosulfat wurde das Gel 3 x 20 Sekunden mit H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen und für 20 – 30 min bei Raumtemperatur mit frischer Imprägnierlösung inkubiert. Nach weiteren drei kurzen Waschschriften in H<sub>2</sub>O bidest. wurde das Gel mit Entwickler inkubiert bis braune Banden erschienen (Sekunden bis wenige Minuten). Bevor der Hintergrund zu stark wurde, wurde mit Stopplösung abgestoppt. Das Gel wurde kurz mit 50% Ethanol gewaschen (1 – 2 min) und zur Aufbewahrung bei 4°C Plastikfolie eingeschweißt.

### **7.6.3 Western Blot**

#### *7.6.3.1 Nass-Transfer und Semidry-Verfahren*

Nach der Proteinauftrennung wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und das Sammelgel entfernt. Die Proteine wurden aus dem Gel per Nass-Transfer oder im Semi-Dry-Verfahren elektrophoretisch auf eine mit Methanol vorbehandelte PVDF-Membran übertragen. Für den Nass-Transfer wurde das Gel auf eine PVDF-Membran gelegt und zwischen Filterpapier in eine Haltevorrichtung geklemmt. Dabei wurden eventuell vorhandene Luftblasen zwischen Filterpapier, Gel und Membran durch Walzen mit einem Plastikstab entfernt. Die Vorrichtung wurde in eine mit Transfer-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingespannt und für 12 – 14 h bei 30V dem Transfer unterzogen. Beim Semi-Dry-Verfahren wurden drei mit Anodenpuffer getränkte Filterpapiere und eine mit Anodenpuffer befeuchtete PVDF-Membran übereinander auf eine Graphitanode gelegt, gefolgt von dem in Kathodenpuffer befeuchteten Gel und weiteren 3 mit Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren. Nach Entfernung eventueller Luftblasen zwischen Filterpapier, Gel und Membran durch Walzen mit einem Plastikstab wurde die Graphitkathode aufgelegt und der Transfer für 1 – 2 h bei einer konstanten Stromstärke von 0,7 mA pro cm<sup>2</sup> Gelfläche durchgeführt.

### 7.6.3.2 Immundetektion von Proteinen

Nach Abschluß des Transfers wurde die Membran in Coomassielösung gefärbt um die Proteinbanden sowie den Größenstandard sichtbar zu machen. Nach der Entfärbung in einer Methanol-Lösung wurde die Membran für mindestens 2 h in einer BSA-haltigen Blockierlösung zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Zum Nachweis des gewünschten Proteins wurde die Membran anschließend mit dem gegen das Protein gerichteten Erstantikörper für mindestens 2 h bei Raumtemperatur (bzw. über Nacht bei 4°C) inkubiert (Verdünnung meist 1:1000). Nach Waschen der Membran in TBS/Tween (3 x 10 min), erfolgte eine zweistündige Inkubation mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Zweitantikörper (Verdünnung 1:5000). Die Membran wurde erneut gewaschen (3 x 10 min) und anschließend für 2 min mit Substrat-Lösung versetzt (10 ml ECL-Lösung, 3 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35%)). Die Detektion der Lumineszenz erfolgte mit Hilfe eines Röntgenfilms, der abhängig von der Signalstärke für wenige Sekunden bis zu mehreren Minuten aufgelegt wurde.

### 7.6.3.3 Strippen

Durch Inkubation der Membran in einer SDS-β-Mercaptoethanol-haltigen Lösung für 2 – 5 min bei 70°C konnte die Membran von gebundenen Antikörpern befreit werden (sog. *stripfen*). Diese Membran konnte nach 2 h Blockieren erneut mit einem Erstantikörper inkubiert werden, was eine Detektion von verschiedenen Proteinen innerhalb derselben Ausgangsprobe ermöglichte.

## 7.6.4 Protein-Überexpression in *Escherichia coli*

Zur Überexpression von Proteinen wurde der entsprechende *E. coli*-Expressionsstamm über Nacht bei 37°C und 220 rpm in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. Nach 12-18 h Wachstum wurde antibiotikahaltiges LB-Medium mit den gewachsenen Bakterien mit einer OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (220 rpm) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 inkubiert. Die Expression wurde dann durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und der Ansatz für weitere 4 h inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquots entsprechend einer OD<sub>600</sub>-Einheit entnommen, abzentrifugiert (3 min, 6000 g), in 200 µl 2xSDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Analyse der Überexpression erfolgte anschließend mittels SDS-PAGE oder Western Blot.

### **7.6.5 Herstellung von pro- und eukaryontischen Zelllysaten und Nachweis der zellulären Proteinmenge**

Zur Bestimmung des zellulären Gehalts bestimmter Proteine wurde eine definierte Zahl von Bakterien bzw. humanen Zellen in RIPA-Puffer (0,5 – 1,0 ml) auf Eis lysiert. Zelltrümmer und chromosomale DNA wurden nach Zugabe von 100 µl Sepharose-Lösung durch Zentrifugation bei 13000 g für 15 min entfernt. Der Überstand wurde in konzentriertem 2xSDS-Probenpuffer aufgenommen und vor der SDS-PAGE für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine mittels Western-Blot auf PVDF-Membranen transferiert und mit entsprechenden Antikörpern detektiert.

### **7.6.6 Herstellung von löslichen Rezeptordomänen und Multimerisierung der Domänen**

293T Zellen wurden mit 5 – 10 µg an cDNA, die für lösliche Rezeptordomänen kodiert, transfiziert (Kapitel 7.2.4). Das Medium wurde dann nach 6-8 Stunden erneuert. Nach 12 stündiger Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte der Austausch des Kulturmediums mit OptiMem. Nach erneuter Inkubation der Zellen für 48-72 Stunden bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> wurde der Zellkulturüberstand gesammelt (enthält lösliche Rezeptordomänen), durch Zentrifugation (4000 g, 4°C) von Zelltrümmern befreit und für *Pulldown*-Experimente eingesetzt.

Gegebenenfalls wurden die löslichen Rezeptordomänen vor der Verwendung in *Pulldown*-Experimenten multimerisiert. Die Multimerisierung erfolgte durch Quervernetzung der löslichen Domänen mit entsprechenden Antikörpern. Hierzu wurden die Zellkulturüberstände, die die löslichen Rezeptordomänen enthielten, mit den jeweiligen Antikörpern über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Rezeptordomänen, die mit den *green fluorescent protein* fusioniert waren, wurden mit anti-GFP-Antikörper (polyklonal) multimerisiert (10 ml Kulturüberstand inkubiert mit bis zu 2 µg Antikörper), Rezeptordomänen, die mit einem 3-fachen HA-Epitop fusioniert waren, wurden mit anti-HA-Antikörper (monoklonal) multimerisiert (10 ml Kulturüberstand inkubiert mit 5 µl Antikörper).

### **7.6.7 Bakterien-Rezeptor-Interaktionsstudien**

#### *7.6.7.1 Bakterien-Pulldown mit löslichen, fluoreszenzmarkierten Rezeptordomänen*

Diese Methode wurde für Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien zwischen Bakterien und löslichen, GFP markierten Rezeptordomänen eingesetzt.

Über Nacht gewachsene Neisserien wurden von den GC-Platten mit einem sterilen Wattestäbchen abgenommen, in PBS<sup>++</sup> resuspendiert und zweimal in PBS<sup>++</sup> gewaschen. Nach anschließender photometrischer Bestimmung der Bakteriendichte ( $OD_{550}$ ) wurde die Bakterienzahl mittels einer Eichkurve ermittelt.  $4 \times 10^6$  Bakterien wurden dann zu 1 ml Zellkulturüberstand, der die jeweilige lösliche, GFP-markierte Rezeptordomäne enthielt (Kapitel 7.6.6), pipettiert und der Ansatz wurde für 30 min bei 20°C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien erneut zweimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und entweder durch Western Blot (Kapitel 7.6.3) mit Hilfe eines GFP-Antikörpers oder durch FACS-Analyse (Kapitel 7.6.8.1) auf Interaktion mit löslichen GFP-CEACAM untersucht.

Für die FACS-Analyse wurden die Bakterien in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und mittels FACS Calibur analysiert.

#### *7.6.7.2 Bakterien-Pulldown mit Rezeptor-enthaltenden Zelllysaten*

Diese Methode wurde für Rezeptor-Ligand Bindungsstudien zwischen Bakterien und im Zelllysate befindlichen Rezeptoren angewandt.

Über Nacht gewachsene Neisserien wurden von den GC-Platten mit einem sterilen Wattestäbchen abgenommen, in PBS<sup>++</sup> resuspendiert und zweimal in PBS<sup>++</sup> gewaschen. Eine  $OD_{550}$ -Einheit der Bakterien wurde abzentrifugiert und in 800  $\mu$ l PBS<sup>++</sup> resuspendiert. Nach Zugabe von 300  $\mu$ l Zelllysate aus Zellen, die den entsprechenden Rezeptor (z.B. CEACAM1) exprimierten ( $1 \times 10^7$  Zellen lysiert in 1% Triton-X-100), wurde der Ansatz für 2 h bei 4°C Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien erneut zweimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen. Die Untersuchung der Interaktion mit dem Rezeptor erfolgte im Western Blot (Kapitel 7.6.3) mit entsprechenden Antikörpern.

#### *7.6.7.3 Rezeptor-Overlay-Assay mit Bakterien im Dot Blot Format*

Über Nacht gewachsene Neisserien oder *E. coli*-Bakterien wurden von den Platten mit einem sterilen Wattestäbchen abgenommen, in PBS<sup>++</sup> resuspendiert und zweimal in PBS<sup>++</sup> gewaschen. Je  $1 \times 10^7$  bzw.  $1 \times 10^6$  lebende Bakterien wurden mit einem 96-Well Dot-Blotter (PeqLab) auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach 2 stündigem Abblocken unspezifischer Bindungsstellen mit BSA-Lösung wurde die PVDF-Membran für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur mit Zellkulturüberständen mit multimerisiertem CEA1-NA1BA2-3xHA inkubiert (vgl. Kapitel 7.6.6). Nach anschließendem Waschen erfolgte die Detektion von

multimerisiertem CEA1-NA1BA2-3xHA durch einen Sekundärantikörper gegen anti-HA. Auf dem Dot Blot befindliche Bakterien, die mit löslichen Rezeptordomänen interagierten, konnten so identifiziert werden.

### 7.6.8 Durchflußzytometrie

Mit Hilfe eines Durchflußzytometers kann man Zellen aufgrund von Fluoreszenz- oder Streulichteigenschaften analysieren. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Analysemethode sowohl zur Bestimmung der Transfektionseffizienz als auch zur Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Bindungen angewandt.

Die Analyse der Zellen erfolgte in einem FACS Calibur (Beckton Dickinson) mit der entsprechenden Software (Cell Quest Pro). Nach Abgrenzung der Zellen von den übrigen gemessenen Ereignissen durch die Parameter FSC (forward scatter) und SSC (sideward scatter) erfolgte die Detektion der fluoreszierenden Zellen im geeigneten Fluoreszenz-Kanal. Pro Ansatz wurden jeweils 10000 Zellen gemessen.

#### 7.6.8.1 *Bestimmung der Interaktion zwischen GFP-markierten Rezeptordomänen und Bakterien mittels Durchflußzytometrie*

Die Bakterien wurden im Zuge eines Bakterien *Pulldowns* (Kapitel 7.6.7.1) mit löslichen, fluoreszenzmarkierten Rezeptordomänen inkubiert, gewaschen und in FACS-Puffer aufgenommen.

Die Untersuchung der Interaktion zwischen GFP-markierten Rezeptordomänen und den Bakterien erfolgte im Durchflußzytometer. Dabei wurden fluoreszierende Bakterien mit den Fluoreszenzkanal1 (FHL-1) detektiert.

#### 7.6.8.2 *Bestimmung der Transfektionseffizienz in Zellen mittels Durchflußzytometrie*

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz in Zellen, die mit nicht-fluoreszierenden Proteinen transfiziert wurden, wurden die Zellen durch Trypsin von der Zellkulturschale gelöst. Nach Zugabe von Zellkulturmedium wurden  $1 \times 10^6$  Zellen zweimal mit Zellkulturmedium gewaschen und in 300  $\mu$ l Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,2  $\mu$ g Erstantikörper gegen das nachzuweisende, oberflächenexponierte Protein. Der Ansatz wurde dann für 30 – 45 min bei 4°C unter

Rotation inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 300  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert und mit 2  $\mu$ l des fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpers versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C unter ständiger Rotation wurden die Zellen wiederum dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und letztendlich in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und es erfolgte die Messung am FACS-Gerät.

Die Transfektionseffizienz von Zellen, die mit fluoreszierenden Proteinen transfiziert wurden, konnten direkt (ohne Färbeschritte) im Durchflußzytometer analysiert werden. Hierzu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen von der Zellkulturschale gelöst und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflußzytometer analysiert.

## 7.7 Infektionsexperimente

### 7.7.1 Antibiotika-Protektions-Assay

Der Antibiotika-Protektions-Assay wurde zur Ermittlung der Anzahl an lebenden intrazellulären Bakterien nach erfolgter Infektion von Epithelzellen eingesetzt.

Hierzu wurden einen Tag vor Infektion  $4 \times 10^5$  Zellen untransfizierter oder mit den entsprechenden Konstrukten stabil bzw. transient transfizierter 293T-, COS7- oder CHO-Zellen in mit Fibronectin (4  $\mu$ g/ml) beschichtete 24-well Platten in Kulturmedium (DMEM+10%CS) eingesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den entsprechenden Bakterien infiziert. Für die Infektion wurden die am Tag vorher weiterkultivierten Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen von der Agarplatte abgenommen, in PBS resuspendiert und die OD<sub>550</sub> (bei *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis*) bzw. OD<sub>600</sub> (bei *E. coli*) zur Ermittlung der Bakterienzahl über eine Eichkurve bestimmt. Die Zellen wurden je nach Experiment mit 25 Bakterien/Zelle bzw. mit 40 Bakterien/Zelle durch Zugabe der entsprechenden Menge der Bakteriensuspension für ein bis zwei Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen für 1h in frischem DMEM+10%CS mit 50  $\mu$ g/ml Gentamicin bei 37°C inkubiert, um extrazelluläre Bakterien abzutöten. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgenommen und die Zellen mit 1% Saponin in PBS (1ml/well) für 15 min bei 37°C sanft lysiert, um intrazelluläre Bakterien freizusetzen. Je 20  $\mu$ l einer  $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  Verdünnung der Lysate wurden dann auf GC- bzw. LB-Platten ausplattiert, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und die Zahl der Kolonien nach 24h bestimmt.

Um die Genauigkeit und Signifikanz der Ergebnisse zu erhöhen wurde in einem Experiment jede Probe dreifach angesetzt. Außerdem wurden von den verwendeten Zellen je  $1 \times 10^6$  Zellen in eine 6 cm Zellkulturschale eingesät, um Lysate zur Expressionskontrolle herstellen zu können (Kapitel 7.6.5).

### **7.7.2 Infektion von Zellen für die Analyse durch konfokale Laser-Scanning Mikroskopie**

Zur Analyse von Infektionsexperimenten mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie wurden am Tag vor der Infektion  $8 \times 10^4$  293T Zellen auf mit Fibronectin (4  $\mu\text{g/ml}$ ) und Poly-Lysin (10 $\mu\text{g/ml}$ ) beschichtete Deckgläschen in 24-well Platten eingesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen je nach Experiment mit 25 Bakterien/Zelle bzw. mit 40 Bakterien/Zelle für 1 bis 2 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen einmal vorsichtig mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und für 20 min mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Präparate mit verschiedenen Antikörpern gegen Zellproteine oder Bakterien markiert (Kapitel 7.8).

## **7.8 Immunfluoreszenzfärbung und Konfokalmikroskopie**

### **7.8.1 Doppelimmunfluoreszenzfärbung zur Färbung von extra- und intrazellulären Bakterien und einem eukaryontischen Markerprotein**

Die auf Deckgläschen fixierten Zellen (vgl. Kapitel 7.7.2) wurden dreimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für mindestens 10 min in Blockierlösung (PBS<sup>++</sup>/10%FCS) inkubiert. Zur Färbung extrazellulärer Bakterien wurden anschließend 20  $\mu\text{l}$  eines in Blockierlösung verdünnten polyklonalen Primärantikörpers gegen die Bakterien (z.B. polyklonaler anti-Neisseria (Verdünnung 1:100)) auf die fixierten Zellen getropft und der Ansatz wurde für 45 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS<sup>++</sup> wurden 20  $\mu\text{l}$  eines in Blockierlösung verdünnten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers (z.B. goat-anti-rabbit-Cy5 (Verdünnung 1:200)) auf die Ansätze gegeben und für weitere 45 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zur Färbung der intrazellulären Bakterien wurden die eukaryontischen Zellen nach dreimaligen Waschen zunächst mit 0,1% Triton X-100 in PBS<sup>++</sup> für 15 min permeabilisiert, wiederum dreimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und für mind. 10 min in Blockierlösung inkubiert. Anschließend wurden erneut 20  $\mu\text{l}$  einer

Antikörpermischung, die sich aus dem polyklonalen Primärantikörper gegen die Bakterien und einen monoklonalen Antikörper (Verdünnung ca. 1:100) gegen das eukaryontische Markerprotein zusammensetzte, auf die permeabilisierten Zellen gegeben und für 45 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurde erneut dreimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen, unspezifische Bindungsstellen für mind. 10 min in Blockierlösung abgeblockt und 20 µl Antikörpermischung, die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (z.B. goat-anti-rabbit-Cy2 (Verdünnung 1:200), goat-anti-mouse-Cy3 (Verdünnung 1:200)) enthält, auf die Zellen gegeben. Der Ansatz wurde anschließend für 45 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen dreimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen, anschließend mit *mounting medium* (Sigma) eingebettet und mit Nagellack luftdicht versiegelt. Die Präparate wurden bis zur Auswertung am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop bei 4°C gelagert.

### 7.8.2 Konfokale Mikroskopie

Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte am konfokalen Laser Scanning Mikroskop Zeiss LSM510 mit der entsprechenden Software (Zeiss LSM). Dieses Mikroskop ist mit verschiedenen Lasern ausgestattet, die eine Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen bei 488nm (Argon/Krypton Laser) bzw. bei 543nm und 633nm (Helium/Neon Laser) erlauben. Durch Verwendung von geeigneten Filterkombinationen konnten die emittierten Fluoreszenzsignale in drei verschiedenen, für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe typischen Wellenlängenbereichen (Kanal1: 505–530 nm, Detektion von FITC, GFP, Cy2; Kanal2: 560–615 nm, Detektion von Rhodamin-, Cy3-, AlexaFluor546; Kanal3:>650, Detektion von Cy5: > 650 nm) detektiert werden. Eine Detektion des Durchlichts ermöglichte eine digitale Phasenkontrastaufnahme des Präparats. Durch Auf- und Abfokussieren der Bildebene konnten extra- und intrazelluläre Strukturen unterschieden werden. Die Rohdaten wurden mittels der Bildbearbeitungsprogramme LSM Imager Browser (Zeiss) und Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, Canada) bearbeitet. Den Signalen aus den drei Fluoreszenzkanälen wurden unterschiedliche Farben zugeordnet (FITC, GFP, Cy2: grün, Rhodamin, Cy3, AlexaFluor546: rot; Cy5: blau). Bei Bedarf wurden die Einzelbilder in einem RGB (RotGrünBlau)-Farbbild vereinigt, wodurch Kollokalisierungen von markierten Strukturen durch entstehende Mischfarben besonders deutlich gemacht werden konnten.

## 8 Zusammenfassung

*Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae* sind humanpathogene Vertreter der Gattung *Neisseria*. Diese Erreger verfügen über eine Reihe von Virulenzfaktoren, um erfolgreich den menschlichen Körper zu besiedeln. Dabei spielen die neisseriellen Opa<sub>CEA</sub>-Proteine eine wichtige Rolle. Diese Adhäsine binden an bestimmte Rezeptoren der humanen CEACAM-Familie, die auf unterschiedlichen Zelltypen im menschlichen Körper exprimiert werden. Die Interaktion der Opa<sub>CEA</sub>-Proteine mit der stark konservierten aminoterminalen Domäne von bestimmten CEACAMs führt zu einer Aufnahme der Bakterien in die Zellen. Dort können sie, vor der humoralen Immunantwort geschützt, persistieren oder sich durch Transzytose in tiefer gelegene Gewebe weiter ausbreiten und letztendlich eine disseminierte Krankheit auslösen.

Da CEACAMs eine entscheidende Rolle bei der Infektion mit pathogenen Neisserien spielen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Interaktion dieser zellulären Rezeptoren mit pathogenen Neisserien und die daraus resultierenden molekularen Ereignisse auf bakterieller bzw. zellulärer Seite näher untersucht.

Zunächst wurde eine neuartige Methode entwickelt, die im Gegensatz zu herkömmlichen Strategien eine schnelle und quantitative Erfassung von Neisserien-CEACAM-Interaktionen ermöglicht. Bei dieser Methode wurden GFP-fusionierte, lösliche aminoterminalen CEACAM-Domänen eingesetzt, die spezifisch an Opa<sub>CEA</sub>-exprimierende Bakterien binden. Einzelne Bakterien einer Population, die mit den fluoreszierenden Rezeptordomänen assoziierten, konnten aufgrund ihrer erhöhten Fluoreszenz im Durchflußzytometer sehr schnell und quantitativ bestimmt werden.

Diese Rezeptordomänen wurden außerdem als molekulares Werkzeug zur Erstellung eines Opa<sub>CEA</sub>-induzierten Transkriptionsprofils von Opa-positiven Meningokokken verwendet. Transkriptomanalysen mittels Mikroarrays zeigten, dass die Interaktion Opa<sub>CEA</sub>-exprimierender Meningokokken mit der löslichen, aminoterminalen Domäne von CEACAM1 eine Herunterregulation von 56 Genen sowie eine Hochregulation von sieben Genen in *Neisseria meningitidis* MC58 zur Folge hatte. Dabei konnte ein hochreguliertes Gen identifiziert werden, dessen Genprodukt aufgrund seiner Homologie zu einem bakteriellen  $\alpha$ -Hämolyysin möglicherweise virulenz-assoziiert ist.

Die Erstellung dieses Transkriptionsprofils beruhte auf der Interaktion zwischen der aminoterminalen Domäne von CEACAM1 und seinen bis heute einzig bekannten

neisseriellen Liganden, den Opa<sub>CEA</sub>-Proteinen. Bemerkenswerterweise konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Opa-negativer Meningokokkenstamm isoliert werden, der ebenfalls an CEACAM1 bindet und von CEACAM1-exprimierenden Zellen internalisiert wird. Da dieser Meningokokkenstamm keine Opa-Proteine exprimierte, muß er über ein weiteres Adhäsion verfügen, das mit CEACAM1 assoziiert. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass für die CEACAM1-vermittelte Aufnahme dieser Opa-negativen Meningokokken mehrere extrazelluläre Domänen des Rezeptors notwendig sind. Im Gegensatz zur Aufnahme Opa<sub>CEA</sub>-exprimierender Bakterien war die aminoternale Domäne essentiell, aber nicht ausreichend für diesen phagozytischen Vorgang, der unabhängig vom Aktinzytoskelett erfolgte. Auch bei Bindungsstudien mit löslichen CEACAM1 Konstrukten gab es Differenzen zwischen den opaquen und nicht-opaquen Bakterienstämmen. So zeigte sich, dass im Gegensatz zu Opa<sub>CEA</sub>-exprimierenden Meningokokken, die mit monomeren Formen des löslichen Rezeptors assoziieren konnten, Opa-negativen Meningokokken nur mit multimerisierten Formen des Rezeptors interagierten. CEACAM1 stellt den einzigen Rezeptor aus der CEACAM-Familie dar, mit dem Opa-negative Meningokokken interagieren können.

Demgegenüber assoziieren Opa<sub>CEA</sub>-exprimierende Neisserien mit mehreren Mitgliedern der CEACAM-Familie, unter anderem mit CEACAM3. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die c-Jun N-terminale Kinase an Signaltransduktionswegen, die durch Interaktion von Opa<sub>CEA</sub>-exprimierenden Neisserien mit CEACAM3 ausgelöst wurden, beteiligt ist. Erstaunlicherweise konnte durch Inhibition der c-Jun N-terminalen Kinase CEACAM3-vermittelte Aufnahme der opaquen Bakterien in die Zelle reduziert werden. Da die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase unabhängig von der Phosphorylierung der ITAM-ähnlichen Sequenz erfolgte, scheint dieses Molekül an einem neuartigen Signalweg beteiligt zu sein, der komplementär zu bereits bekannten CEACAM3-vermittelten Signalprozessen abläuft.

Die in der vorliegenden Arbeit zusammengefassten Befunde liefern neue Einblicke in die Wechselwirkung zwischen pathogenen Neisserien und ihren Wirtszellen und können als Ausgangspunkt für interessante weiterführende Analysen dienen.

## 9 Summary

The human specific pathogens *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* have developed several mechanisms to colonize their human host. Colonization can be mediated by binding of neisserial Opa<sub>CEA</sub> proteins to members of the human CEACAM-family, which are expressed in various human tissues and cell types. Interaction of Opa<sub>CEA</sub> proteins with the aminoterminal domain of these receptors results in the uptake of *Neisseria* into the cells, allowing the bacteria to escape host defences and to persist within the host. Besides, bacteria can transcytose across the mucosal barrier and cause systemic dissemination.

As CEACAMs play an important role during infection with pathogenic *Neisseria* the aim of this doctoral thesis was to investigate *Neisseria*-CEACAM interactions and resulting molecular events on bacterial and cellular levels.

Therefore, a novel method was developed which allows rapid and quantitative analysis of *Neisseria*-CEACAM association. Soluble GFP-tagged aminoterminal domains of CEACAMs are utilized for recognition of CEACAM-binding bacteria. Bacteria binding this receptor domains are therefore labelled with a fluorescent protein. Analysis via flow cytometry allows a rapid and specific detection of receptor binding events on a single bacteria level .

The soluble receptor domains were also used as a molecular tool for microarray analysis to assess Opa<sub>CEA</sub> induced changes on transcriptional level in Opa-positive *Neisseria meningitidis* MC58. Interaction of Opa<sub>CEA</sub>-expressing meningococci with soluble aminoterminal domains of CEACAM1 resulted in downregulation of 56 bacterial genes and upregulation of seven other genes. Interestingly, one of these upregulated genes might be involved in virulence due to its homology to an  $\alpha$ -hemolysin of other bacteria.

Opa<sub>CEA</sub> proteins are the only neisserial proteins known that associate with CEACAM1. However, in this study a meningococcal strain was isolated, which does not express Opa-proteins but nevertheless specifically interacts with CEACAM1. Therefore, these Opa-negative meningococci must express an additional adhesin, which mediates CEACAM1-interaction.

Internalisation of Opa-negative meningococci via CEACAM1 requires several extracellular domains of this receptor. In contrast to Opa<sub>CEA</sub>-expressing bacteria, the aminoterminal domain was necessary but not sufficient for internalisation. Differences between CEACAM1-binding of Opa-negative and Opa-positive meningococci were also observed by binding-assays with soluble CEACAM1 receptor. While Opa-positive meningococci associated with

---

monomeric forms of soluble CEACAM1, Opa-negative meningococci bound exclusively to multimeric forms of soluble CEACAM1. CEACAM-interactions with Opa-negative meningococci were only observed for CEACAM1.

Opa<sub>CEA</sub>-expressing *Neisseria* can interact with several members of the CEACAM family, amongst others CEACAM3. Interestingly, interaction of Opa<sub>CEA</sub>-expressing *Neisseria* with CEACAM3 causes the activation of c-Jun N-terminal kinase. Inhibition of this kinase resulted in a reduced CEACAM3-mediated uptake of *Neisseria* into the cells. Remarkably, activation of c-Jun N-terminal kinase was independent of phosphorylation of the ITAM-like sequence of CEACAM3. Therefore, c-Jun N-terminal kinase seems to be involved in a novel signaling pathway, complementary to known CEACAM3-mediated signaling processes.

The results presented in this study give new insights regarding the interaction of pathogenic *Neisseria* and host cells and pave the way for further interesting studies.

## 10 Literaturverzeichnis

- Abraham, S. N., Sun, D., Dale, J. B. and Beachey, E. H.** (1988). Conservation of the D-mannose-adhesion protein among type 1 fimbriated members of the family Enterobacteriaceae. *Nature* **336**, 682-4.
- Achtman, M.** (1997). Microevolution and epidemic spread of serogroup A *Neisseria meningitidis*—a review. *Gene* **192**, 135-40.
- Akira, S.** (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **15**, 5-11.
- Alting-Mees, M. A., Sorge, J. A. and Short, J. M.** (1992). pBluescriptII: multifunctional cloning and mapping vectors. *Methods Enzymol* **216**, 483-95.
- Amagasaki, K., Kaneto, H., Heldin, C. H. and Lennartsson, J.** (2006). c-Jun N-terminal kinase is necessary for platelet-derived growth factor-mediated chemotaxis in primary fibroblasts. *J Biol Chem* **281**, 22173-9.
- Ammerer, G.** (1994). Sex, stress and integrity: the importance of MAP kinases in yeast. *Curr Opin Genet Dev* **4**, 90-5.
- Balder, R., Hassel, J., Lipski, S. and Lafontaine, E. R.** (2007). *Moraxella catarrhalis* strain O35E expresses two filamentous hemagglutinin-like proteins that mediate adherence to human epithelial cells. *Infect Immun* **75**, 2765-75.
- Barlow, A. K., Heckels, J. E. and Clarke, I. N.** (1989). The class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*: gene sequence and structural and immunological similarities to gonococcal porins. *Mol Microbiol* **3**, 131-9.
- Barrow, A. D. and Trowsdale, J.** (2006). You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling. *Eur J Immunol* **36**, 1646-53.
- Bennett, B. L., Sasaki, D. T., Murray, B. W., O'Leary, E. C., Sakata, S. T., Xu, W., Leisten, J. C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y. et al.** (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13681-6.
- Benz, R. and Bauer, K.** (1988). Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. Review on bacterial porins. *Eur J Biochem* **176**, 1-19.
- Berger, C. N., Billker, O., Meyer, T. F., Servin, A. L. and Kansau, I.** (2004). Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* (Afa/Dr DAEC). *Mol Microbiol* **52**, 963-83.
- Bhat, K. S., Gibbs, C. P., Barrera, O., Morrison, S. G., Jahnig, F., Stern, A., Kupsch, E. M., Meyer, T. F. and Swanson, J.** (1992). The opacity proteins of *Neisseria gonorrhoeae* strain MS11 are encoded by a family of 11 complete genes. *Molecular Microbiology* **6**, 1073-1076.
- Billker, O., Popp, A., Brinkmann, V., Wenig, G., Schneider, J., Caron, E. and Meyer, T. F.** (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**, 560-71.
- Blomberg, L., Cohen, P. S. and Conway, P. L.** (1993). A study of the adhesive capacity of *Escherichia coli* strain Bd 1107/7508 (K88ac) in relation to growth phase. *Microb Pathog* **14**, 67-74.
- Bogoyevitch, M. A.** (2006a). The isoform-specific functions of the c-Jun N-terminal Kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting. *Bioessays* **28**, 923-34.

- Bogoyevitch, M. A. and Kobe, B.** (2006b). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 1061-95.
- Booth, J. W., Telio, D., Liao, E. H., McCaw, S. E., Matsuo, T., Grinstein, S. and Gray-Owen, S. D.** (2003). Phosphatidylinositol 3-kinases in carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule-mediated internalization of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Biol Chem* **278**, 14037-45.
- Bos, M. P., Grunert, F. and Belland, R. J.** (1997). Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Opa variants of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infection & Immunity* **65**, 2353-2361.
- Bos, M. P., Kuroki, M., Krop-Watorek, A., Hogan, D. and Belland, R. J.** (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**, 9584-9.
- Bos, M. P., Kao, D., Hogan, D. M., Grant, C. C. and Belland, R. J.** (2002). Carcinoembryonic antigen family receptor recognition by gonococcal Opa proteins requires distinct combinations of hypervariable Opa protein domains. *Infect Immun* **70**, 1715-23.
- Boulton, I. C. and Gray-Owen, S. D.** (2002). Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nature Immunology* **3**, 229-36.
- Brandtzaeg, P.** (1997). Mucosal immunity in the female genital tract. *J Reprod Immunol* **36**, 23-50.
- Bullard, B., Lipski, S. L. and Lafontaine, E. R.** (2005). Hag directly mediates the adherence of *Moraxella catarrhalis* to human middle ear cells. *Infect Immun* **73**, 5127-36.
- Burch, C. L., Danaher, R. J. and Stein, D. C.** (1997). Antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*: production of multiple lipooligosaccharides. *J Bacteriol* **179**, 982-6.
- Cambier, J. C.** (1995). Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol* **155**, 3281-5.
- Capecci, B., Adu-Bobie, J., Di Marcello, F., Ciocchi, L., Massignani, V., Taddei, A., Rappuoli, R., Pizza, M. and Arico, B.** (2005). *Neisseria meningitidis* NadA is a new invasin which promotes bacterial adhesion to and penetration into human epithelial cells. *Mol Microbiol* **55**, 687-98.
- Chen, T., Grunert, F., Medina-Marino, A. and Gotschlich, E. C.** (1997). Several carcinoembryonic antigens (CD66) serve as receptors for gonococcal opacity proteins. *Journal of Experimental Medicine* **185**, 1557-1564.
- Chen, T., Bolland, S., Chen, I., Parker, J., Pantelic, M., Grunert, F. and Zimmermann, W.** (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**, 17413-9.
- Cooper, M. D., McGee, Z. A., Mulks, M. H., Koomey, J. M. and Hindman, T. L.** (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.
- Da Silva-Azevedo, L. and Reutter, W.** (1999). The long isoform of the cell adhesion molecule C-CAM binds to actin. *Biochem Biophys Res Commun* **256**, 404-8.

- de Vries, F. P., Cole, R., Dankert, J., Frosch, M. and van Putten, J. P.** (1998). *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. *Molecular Microbiology* **27**, 1203-12.
- Deghmane, A. E., Giorgini, D., Larribe, M., Alonso, J. M. and Taha, M. K.** (2002). Down-regulation of pili and capsule of *Neisseria meningitidis* upon contact with epithelial cells is mediated by CrgA regulatory protein. *Mol Microbiol* **43**, 1555-64.
- Dehio, C., Gray-Owen, S. D. and Meyer, T. F.** (2000). Host cell invasion by pathogenic *Neisseriae*. *Subcell Biochem* **33**, 61-96.
- Dietrich, G., Kurz, S., Hubner, C., Aepinus, C., Theiss, S., Guckenberger, M., Panzner, U., Weber, J. and Frosch, M.** (2003). Transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* during infection. *J Bacteriol* **185**, 155-64.
- Dos Santos, P. C., Smith, A. D., Frazzon, J., Cash, V. L., Johnson, M. K. and Dean, D. R.** (2004). Iron-sulfur cluster assembly: NifU-directed activation of the nitrogenase Fe protein. *J Biol Chem* **279**, 19705-11.
- Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. and Trent, J. M.** (1999). Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* **21**, 10-4.
- Duim, B., Bowler, L. D., Eijk, P. P., Jansen, H. M., Dankert, J. and van Alphen, L.** (1997). Molecular variation in the major outer membrane protein P5 gene of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* during chronic infections. *Infect Immun* **65**, 1351-6.
- Elkins, C., Thomas, C. E., Seifert, H. S. and Sparling, P. F.** (1991). Species-specific uptake of DNA by gonococci is mediated by a 10-base-pair sequence. *J Bacteriol* **173**, 3911-3.
- Ergun, S., Kilik, N., Ziegeler, G., Hansen, A., Nollau, P., Gotze, J., Wurmbach, J. H., Horst, A., Weil, J., Fernando, M. et al.** (2000). CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell* **5**, 311-20.
- Fedarovich, A., Tomberg, J., Nicholas, R. A. and Davies, C.** (2006). Structure of the N-terminal domain of human CEACAM1: binding target of the opacity proteins during invasion of *Neisseria meningitidis* and *N. gonorrhoeae*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**, 971-9.
- Finlay, B. B. and Falkow, S.** (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**, 136-169.
- Finne, J., Leinonen, M. and Makela, P. H.** (1983). Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* **2**, 355-7.
- Fussenegger, M., Rudel, T., Barten, R., Ryll, R. and Meyer, T. F.** (1997). Transformation competence and type-4 pilus biogenesis in *Neisseria gonorrhoeae*—a review. *Gene* **192**, 125-34.
- Gao, M., Labuda, T., Xia, Y., Gallagher, E., Fang, D., Liu, Y. C. and Karin, M.** (2004). Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science* **306**, 271-5.
- Gibbs, C. P., Reimann, B.-Y., Schultz, E., Kaufmann, A., Haas, R. and Meyer, T. F.** (1989). Reassortment of pilin genes in *Neisseria gonorrhoeae* occurs by two distinct mechanisms. *Nature* **338**, 651-652.
- Goh, L. L., Barkham, T. and Sim, T. S.** (2005). Molecular cloning and functional characterization of fumarases C in *Neisseria* species. *Antonie Van Leeuwenhoek* **87**, 205-13.

- Gold, R., Goldschneider, I., Lepow, M. L., Draper, T. F. and Randolph, M.** (1978). Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. *J Infect Dis* **137**, 112-21.
- Gotschlich, E. C., Seiff, M. E., Blake, M. S. and Koomey, M.** (1987). Porin protein of *Neisseria gonorrhoeae*: cloning and gene structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8135-9.
- Grant, C. C., Bos, M. P. and Belland, R. J.** (1999). Proteoglycan receptor binding by *Neisseria gonorrhoeae* MS11 is determined by the HV-1 region of OpaA. *Molecular Microbiology* **32**, 233-42.
- Grassl, G. A., Bohn, E., Muller, Y., Buhler, O. T. and Autenrieth, I. B.** (2003). Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion. *Int J Med Microbiol* **293**, 41-54.
- Grassme, H. U. C., Ireland, R. M. and van Putten, J. P. M.** (1996). Gonococcal opacity protein promotes bacterial entry-associated rearrangements of the epithelial cell actin cytoskeleton. *Infection & Immunity* **64**, 1621-1630.
- Grassmé, H., Gulbins, E., Brenner, B., Ferlinz, K., Sandhoff, K., Harzer, K., Lang, F. and Meyer, T. F.** (1997). Acidic sphingomyelinase mediates entry of *Neisseria gonorrhoeae* into non-phagocytic cells. *Cell* **91**, 605-15.
- Gray-Owen, S. D., Dehio, C., Haude, A., Grunert, F. and Meyer, T. F.** (1997a). CD66 carcinoembryonic antigens mediate interactions between Opa-expressing *Neisseria gonorrhoeae* and human polymorphonuclear phagocytes. *The EMBO Journal* **16**, 3435-3445.
- Gray-Owen, S. D., Lorenzen, D. R., Haude, A., Meyer, T. F. and Dehio, C.** (1997b). Differential Opa specificities for CD66 receptors influence tissue interactions and cellular response to *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **26**, 971-80.
- Gray-Owen, S. D.** (2003). Neisserial opa proteins: impact on colonization, dissemination and immunity. *Scand j Infect Dis* **35**, 614-618.
- Gray-Owen, S. D. and Blumberg, R. S.** (2006). CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol* **6**, 433-46.
- Grifantini, R., Bartolini, E., Muzzi, A., Draghi, M., Frigimelica, E., Berger, J., Ratti, G., Petracca, R., Galli, G., Agnusdei, M. et al.** (2002). Previously unrecognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarrays. *Nat Biotechnol* **20**, 914-21.
- Guckenberger, M., Kurz, S., Aepinus, C., Theiss, S., Haller, S., Leimbach, T., Panzner, U., Weber, J., Paul, H., Unkmeir, A. et al.** (2002). Analysis of the heat shock response of *Neisseria meningitidis* with cDNA- and oligonucleotide-based DNA microarrays. *J Bacteriol* **184**, 2546-51.
- Haas, R. and Meyer, T. F.** (1986). The repertoire of silent pilus genes in *Neisseria gonorrhoeae*: evidence for gene conversion. *Cell* **44**, 107-115.
- Hamilton, H. L. and Dillard, J. P.** (2006). Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Mol Microbiol* **59**, 376-85.
- Hammarstrom, S.** (1999). The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* **9**, 67-81.
- Hammerschmidt, S., Birkholz, C., Zahringer, U., Robertson, B. D., van Putten, J., Ebeling, O. and Frosch, M.** (1994). Contribution of genes from the capsule gene complex

(cps) to lipooligosaccharide biosynthesis and serum resistance in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **11**, 885-96.

**Hammerschmidt, S., Muller, A., Sillmann, H., Muhlenhoff, M., Borrow, R., Fox, A., van Putten, J., Zollinger, W. D., Gerardy-Schahn, R. and Frosch, M.** (1996). Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol* **20**, 1211-20.

**Handsfield, H. H.** (1990). *Neisseria gonorrhoeae*. In *Principles and practice of infectious diseases*, (eds G. L. Mandell R. G. Douglas and J. E. Bennett), pp. 1613-1631. New York: Churchill Livingstone.

**Hauck, C. R. and Meyer, T. F.** (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., Meyer, T. F., Lang, F. and Gulbins, E.** (1998). CD66-mediated phagocytosis of Opa<sub>52</sub> *Neisseria gonorrhoeae* requires a Src-like tyrosine kinase- and Rac1-dependent signalling pathway. *The EMBO Journal* **17**, 443-454.

**Hauck, C. R., Gulbins, E., Lang, F. and Meyer, T. F.** (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., Grassme, H., Bock, J., Jendrossek, V., Ferlinz, K., Meyer, T. F. and Gulbins, E.** (2000). Acid sphingomyelinase is involved in CEACAM receptor-mediated phagocytosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *FEBS Lett* **478**, 260-6.

**Hauck, C. R.** (2002). Cell adhesion receptors — signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens. *Medical Microbiology and Immunology* **191**, 55-62.

**Hauck, C. R. and Meyer, T. F.** (2003). “Small”talk: Opa proteins as mediators of *Neisseria*-host cell communication. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 43-49.

**Hauck, C. R.** (2006). The role of bacterial adhesion to epithelial cells in pathogenesis. In *Bacterial-Epithelial Cell Cross-Talk: Molecular Mechanisms in Pathogenesis*, (ed.s B. A. McCormick), pp. 158-183. Cambridge: Cambridge University Press.

**Hebeler, B. H. and Morse, S. A.** (1976). Physiology and metabolism of pathogenic neisseria: tricarboxylic acid cycle activity in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* **128**, 192-201.

**Hefta, L. J., Schrewe, H., Thompson, J. A., Oikawa, S., Nakazato, H. and Shively, J. E.** (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**, 2397-403.

**Henderson, I. R., Owen, P. and Nataro, J. P.** (1999). Molecular switches—the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol* **33**, 919-32.

**Hersh, D., Weiss, J. and Zychlinsky, A.** (1998). How bacteria initiate inflammation: aspects of the emerging story. *Curr Opin Microbiol* **1**, 43-8.

**Hill, D. J., Toleman, M. A., Evans, D. J., Villullas, S., Van Alphen, L. and Virji, M.** (2001). The variable P5 proteins of typeable and non-typeable *Haemophilus influenzae* target human CEACAM1. *Molecular Microbiology* **39**, 850-62.

**Hill, D. J. and Virji, M.** (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**, 117-29.

- Hoiczky, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A. and Heesemann, J.** (2000). Structure and sequence analysis of Yersinia YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins. *Embo J* **19**, 5989-99.
- Hopper, S., Vasquez, B., Merz, A., Clary, S., Wilbur, J. S. and So, M.** (2000). Effects of the Immunoglobulin A1 Protease on Neisseria gonorrhoeae Trafficking across Polarized T84 Epithelial Monolayers. *Infect. Immun.* **68**, 906-911.
- Horst, A. K., Ito, W. D., Dabelstein, J., Schumacher, U., Sander, H., Turbide, C., Brummer, J., Meinertz, T., Beauchemin, N. and Wagener, C.** (2006). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates vascular remodeling in vitro and in vivo. *J Clin Invest* **116**, 1596-605.
- Horton, R. M., Cai, Z. L., Ho, S. N. and Pease, L. R.** (1990). Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* **8**, 528-35.
- Hsieh, J. T., Earley, K., Pong, R. C., Wang, Y., Van, N. T. and Lin, S. H.** (1999). Structural analysis of the C-CAM1 molecule for its tumor suppression function in human prostate cancer. *Prostate* **41**, 31-8.
- Huang, C., Rajfur, Z., Borchers, C., Schaller, M. D. and Jacobson, K.** (2003). JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature* **424**, 219-23.
- Hunziker, W. and Fumey, C.** (1994). A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *Embo J* **13**, 2963-9.
- Ip, Y. T. and Davis, R. J.** (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)—from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 205-19.
- Jennings, H. J., Bhattacharjee, A. K., Bundle, D. R., Kenny, C. P., Martin, A. and Smith, I. C.** (1977). Structures of the capsular polysaccharides of Neisseria meningitidis as determined by <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Infect Dis* **136 Suppl**, S78-83.
- Jerse, A. E. and Rest, R. F.** (1997). Adhesion and invasion by the pathogenic neisseria. *Trends Microbiol* **5**, 217-21.
- Johannsen, D. B., Johnston, D. M., Koymen, H. O., Cohen, M. S. and Cannon, J. G.** (1999). A Neisseria gonorrhoeae immunoglobulin A1 protease mutant is infectious in the human challenge model of urethral infection. *Infect Immun* **67**, 3009-13.
- Jones, C., Virji, M. and Crocker, P. R.** (2003). Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake. *Mol Microbiol* **49**, 1213-25.
- Jones, R. B., Newland, J. C., Olsen, D. A. and Buchanan, T. M.** (1980). Immune-enhanced phagocytosis of \*Neisseria gonorrhoeae by macrophages: characterization of the major antigens to which opsonins are directed. *Journal of General Microbiology* **121**, 365-372.
- Jonsson, A. B., Nyberg, G. and Normark, S.** (1991). Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in pilC, a novel gene for pilus assembly. *Embo J* **10**, 477-88.
- Kahler, C. M. and Stephens, D. S.** (1998). Genetic basis for biosynthesis, structure, and function of meningococcal lipooligosaccharide (endotoxin). *Crit Rev Microbiol* **24**, 281-334.
- Kallstrom, H., Liszewski, M. K., Atkinson, J. P. and Jonsson, A. B.** (1997). Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic Neisseria. *Molecular Microbiology* **25**, 639-47.

- Kammerer, R., Popp, T., Singer, B. B., Schlender, J. and Zimmermann, W.** (2004). Identification of allelic variants of the bovine immune regulatory molecule CEACAM1 implies a pathogen-driven evolution. *Gene* **339**, 99-109.
- Keenan, C. and Kelleher, D.** (1998). Protein kinase C and the cytoskeleton. *Cell Signal* **10**, 225-32.
- Kirchner, M., Heuer, D. and Meyer, T. F.** (2005). CD46-Independent Binding of Neisserial Type IV Pili and the Major Pilus Adhesin, PilC, to Human Epithelial Cells. *Infect Immun* **73**, 3072-82.
- Kolch, W.** (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* **351 Pt 2**, 289-305.
- Koomey, M., Gotschlich, E. C., Robbins, K., Bergstrom, S. and Swanson, J.** (1987). Effects of recA mutations on pilus antigenic variation and phase transitions in *Neisseria gonorrhoeae*. *Genetics* **117**, 391-8.
- Kuespert, K., Pils, S. and Hauck, C. R.** (2006). CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 565-71.
- Kuespert, K., Weibel, S. and Hauck, C. R.** (2007a). Profiling of bacterial adhesin – host receptor recognition by soluble immunoglobulin superfamily domains. *Journal of Microbiological Methods* **68**, 478-485.
- Kuespert, K. and Hauck, C. R.** (2007b). Characterizing host receptor recognition by individual bacterial pathogens. In *Methods in Molecular Biology*, vol. in press (eds S. Rupp K. Sohn and N. Hauser). Totowa: Humana Press.
- Kuijpers, T. W., Hoogerwerf, M., van der Laan, L. J., Nagel, G., van der Schoot, C. E., Grunert, F. and Roos, D.** (1992). CD66 nonspecific cross-reacting antigens are involved in neutrophil adherence to cytokine-activated endothelial cells. *Journal of Cell Biology* **118**, 457-66.
- Kunath, T., Ordonez-Garcia, C., Turbide, C. and Beauchemin, N.** (1995). Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene* **11**, 2375-2382.
- Kupsch, E.-M., Knepper, B., Kuroki, T., Heuer, I. and Meyer, T. F.** (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.
- Kurzai, O., Schmitt, C., Claus, H., Vogel, U., Frosch, M. and Kolb-Maurer, A.** (2005). Carbohydrate composition of meningococcal lipopolysaccharide modulates the interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. *Cell Microbiol* **7**, 1319-34.
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J. and Woodgett, J. R.** (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**, 156-60.
- Laga, M., Meheus, A. and Piot, P.** (1989). Epidemiology and control of gonococcal ophthalmia neonatorum. *Bull World Health Organ* **67**, 471-7.
- Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaiken, M., Gumbiner, B. and Cossart, P.** (1999). A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Embo J* **18**, 3956-63.
- Leung, N., Turbide, C., Olson, M., Marcus, V., Jothy, S. and Beauchemin, N.** (2006). Deletion of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (Ceacam1) gene contributes to colon tumor progression in a murine model of carcinogenesis. *Oncogene*, doi: 10.1038/sj.onc.1209541.

- Leusch, H. G., Drzeniek, Z., Hefta, S. A., Markos-Pusztai, Z. and Wagener, C.** (1991). The putative role of members of the CEA-gene family (CEA, NCA and BGP) as ligands for the bacterial colonization of different human epithelial tissues. *Zentralbl Bakteriol* **275**, 118-22.
- Lin, L., Ayala, P., Larson, J., Mulks, M., Fukuda, M., Carlsson, S. R., Enns, C. and So, M.** (1997). The Neisseria type 2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells. *Molecular Microbiology* **24**, 1083-1094.
- Mackay, D. J. and Hall, A.** (1998). Rho GTPases. *J Biol Chem* **273**, 20685-8.
- Malorny, B., Morelli, G., Kusecek, B., Kolberg, J. and Achtman, M.** (1998). Sequence diversity, predicted two-dimensional protein structure, and epitope mapping of neisserial Opa proteins. *J Bacteriol* **180**, 1323-30.
- Massari, P., Ho, Y. and Wetzler, L. M.** (2000). Neisseria meningitidis porin PorB interacts with mitochondria and protects cells from apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 9070-5.
- Matsuguchi, T., Masuda, A., Sugimoto, K., Nagai, Y. and Yoshikai, Y.** (2003). JNK-interacting protein 3 associates with Toll-like receptor 4 and is involved in LPS-mediated JNK activation. *Embo J* **22**, 4455-64.
- McCaw, S. E., Schneider, J., Liao, E. H., Zimmermann, W. and Gray-Owen, S. D.** (2003). Immunoreceptor tyrosine-based activation motif phosphorylation during engulfment of *Neisseria gonorrhoeae* by the neutrophil-restricted CEACAM3 (CD66d) receptor. *Mol Microbiol* **49**, 623-37.
- Merker, P., Tommassen, J., Kusecek, B., Virji, M., Sesardic, D. and Achtman, M.** (1997). Two-dimensional structure of the Opc invasin from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **23**, 281-93.
- Merz, A. J., So, M. and Sheetz, M. P.** (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* **407**, 98-102.
- Meyer, T. F., Billyard, E., Haas, R., Storzbach, S. and So, M.** (1984). Pilus genes of *Neisseria gonorrhoeae*: chromosomal organization and DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 6110-4.
- Meyer, T. F., Gibbs, C. P. and Haas, R.** (1990). Variation and control of protein expression in *Neisseria*. *Annu Rev Microbiol* **44**, 451-77.
- Muenzner, P., Billker, O., Meyer, T. F. and Naumann, M.** (2002). Nuclear factor- $\kappa$ B directs CEACAM1 receptor expression in *Neisseria gonorrhoeae*-infected epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 7438-7446.
- Muenzner, P., Dehio, C., Fujiwara, T., Achtman, M., Meyer, T. F. and Gray-Owen, S. D.** (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**, 3601-7.
- Muenzner, P., Rohde, M., Kneitz, S. and Hauck, C. R.** (2005). CEACAM engagement by human pathogens enhances cell adhesion and counteracts bacteria-induced detachment of epithelial cells. *Journal of Cell Biology* **170**, 825-836.
- Muenzner, P., Bachmann, V. and Hauck, C. R.** (2007) CEACAM1-mediated bacterial invasion does not require the cytoplasmic domain of the receptor and occurs via membrane-microdomains. *Cellular Microbiology* (in revision).

- Muller, A., Gunther, D., Brinkmann, V., Hurwitz, R., Meyer, T. F. and Rudel, T.** (2000). Targeting of the pro-apoptotic VDAC-like porin (PorB) of *Neisseria gonorrhoeae* to mitochondria of infected cells. *Embo J* **19**, 5332-43.
- Müller, A., Günther, D., Düx, F., Naumann, M., Meyer, T. F. and Rudel, T.** (1999). Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. *The EMBO Journal* **18**, 339-352.
- Murphy, G. L., Connell, T. D., Barritt, D. S., Koomey, M. and Cannon, J. G.** (1989). Phase variation of gonococcal protein II: regulation of gene expression by slipped-strand mispairing of a repetitive DNA sequence. *Cell* **56**, 539-47.
- Nagel, G., Grunert, F., Kuijpers, T. W., Watt, S. M., Thompson, J. and Zimmermann, W.** (1993). Genomic organization, splice variants and expression of CGM1, a CD66-related member of the carcinoembryonic antigen gene family. *Eur J Biochem* **214**, 27-35.
- Nagy, G., Altenhoefer, A., Knapp, O., Maier, E., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Benz, R., Emody, L. and Hacker, J.** (2006). Both alpha-haemolysin determinants contribute to full virulence of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Microbes Infect* **8**, 2006-12.
- Naumann, M., Rudel, T., Wieland, B., Bartsch, C. and Meyer, T. F.** (1998). Coordinate activation of activator protein 1 and inflammatory cytokines in response to *Neisseria gonorrhoeae* epithelial cell contact involves stress response kinases. *J Exp Med* **188**, 1277-86.
- Nicolson, I. J., Perry, A. C., Virji, M., Heckels, J. E. and Saunders, J. R.** (1987). Localization of antibody-binding sites by sequence analysis of cloned pilin genes from *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of General Microbiology* **133**, 825-833.
- Obrink, B.** (1997). CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 616-26.
- Ohno, H., Fournier, M. C., Poy, G. and Bonifacino, J. S.** (1996). Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains. *J Biol Chem* **271**, 29009-15.
- Oikawa, S., Kosaki, G. and Nakazato, H.** (1987). Molecular cloning of a gene for a member of carcinoembryonic antigen (CEA) gene family; signal peptide and N-terminal domain sequences of nonspecific crossreacting antigen (NCA). *Biochem Biophys Res Commun* **146**, 464-9.
- Oikawa, S., Inuzuka, C., Kuroki, M., Arakawa, F., Matsuoka, Y., Kosaki, G. and Nakazato, H.** (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**, 7995-8001.
- Oikawa, S., Sugiyama, M., Kuroki, M. and Nakazato, H.** (2000). Extracellular N-domain alone can mediate specific heterophilic adhesion between members of the carcinoembryonic antigen family, CEACAM6 and CEACAM8. *Biochem Biophys Res Commun* **278**, 564-8.
- Okamoto, A. C., Gaetti-Jardim, E., Jr., Cai, S. and Avila-Campos, M. J.** (2000). Influence of antimicrobial subinhibitory concentrations on hemolytic activity and bacteriocin-like substances in oral *Fusobacterium nucleatum*. *New Microbiol* **23**, 137-42.
- Olyhoek, A. J., Sarkari, J., Bopp, M., Morelli, G. and Achtman, M.** (1991). Cloning and expression in *Escherichia coli* of *opc*, the gene for an unusual class 5 outer membrane protein from *Neisseria meningitidis* (meningococci/surface antigen). *Microb Pathog* **11**, 249-57.

- Otto, I. M., Raabe, T., Rennefahrt, U. E., Bork, P., Rapp, U. R. and Kerkhoff, E.** (2000). The p150-Spir protein provides a link between c-Jun N-terminal kinase function and actin reorganization. *Curr Biol* **10**, 345-8.
- Paxton, R. J., Mooser, G., Pande, H., Lee, T. D. and Shively, J. E.** (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**, 920-4.
- Piccione, E., Case, R. D., Domchek, S. M., Hu, P., Chaudhuri, M., Backer, J. M., Schlessinger, J. and Shoelson, S. E.** (1993). Phosphatidylinositol 3-kinase p85 SH2 domain specificity defined by direct phosphopeptide/SH2 domain binding. *Biochemistry* **32**, 3197-202.
- Pizarro-Cerda, J., Sousa, S. and Cossart, P.** (2004). Exploitation of host cell cytoskeleton and signalling during *Listeria monocytogenes* entry into mammalian cells. *C R Biol* **327**, 523-31.
- Pizarro-Cerda, J. and Cossart, P.** (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* **124**, 715-27.
- Plaut, A. G., Gilbert, J., Artenstein, M. S. and Carpa, J. D.** (1975). *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: Extracellular enzyme cleaves human immunoglobulin A. *Science* **190**, 1103-1105.
- Popp, A., Dehio, C., Grunert, F., Meyer, T. F. and Gray-Owen, S. D.** (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**, 169-81.
- Poy, M. N., Yang, Y., Rezaei, K., Fernstrom, M. A., Lee, A. D., Kido, Y., Erickson, S. K. and Najjar, S. M.** (2002). CEACAM1 regulates insulin clearance in liver. *Nat Genet* **30**, 270-276.
- Preston, A., Mandrell, R. E., Gibson, B. W. and Apicella, M. A.** (1996). The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol* **22**, 139-80.
- Ravetch, J. V. and Lanier, L. L.** (2000). Immune inhibitory receptors. *Science* **290**, 84-9.
- Relman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D. T., Saukkonen, K. and Wright, S. D.** (1990). Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* **61**, 1375-82.
- Rest, R. F. and Shafer, W. M.** (1989). Interactions of *Neisseria gonorrhoeae* with human neutrophils. *Clinical Microbiology Reviews* **2** (Suppl.), S83-S91.
- Reth, M.** (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* **338**, 383-4.
- Roggenkamp, A., Ackermann, N., Jacobi, C. A., Truelzsch, K., Hoffmann, H. and Heesemann, J.** (2003). Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol* **185**, 3735-44.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T. and Nebreda, A. R.** (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**, 1027-37.
- Rudel, T., Facius, D., Barten, R., Scheuerpflug, I., Nonnenmacher, E. and Meyer, T. F.** (1995a). Role of pili and the phase-variable PilC protein in natural competence for transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7986-90.

- Rudel, T., Scheuerpflug, I. and Meyer, T. F.** (1995b). *Neisseria* PilC protein identified as type-4 pilus-tip located adhesin. *Nature* **373**, 357-359.
- Rudel, T., Schmid, A., Benz, R., Kolb, H.-A., Lang, F. and Meyer, T. F.** (1996). Modulation of *Neisseria* porin (PorB) by cytosolic ATP/GTP of target cells: parallels between pathogen accommodation and mitochondrial endosymbiosis. *Cell* **85**, 1-20.
- Ryll, R. R., Rudel, T., Scheuerpflug, I., Barten, R. and Meyer, T. F.** (1997). PilC of *Neisseria meningitidis* is involved in class II pilus formation and restores pilus assembly, natural transformation competence and adherence to epithelial cells in PilC-deficient gonococci. *Molecular Microbiology* **23**, 879-892.
- Sambrook and Russel** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sarkari, J., Pandit, N., Moxon, E. R. and Achtman, M.** (1994). Variable expression of the Opc outer membrane protein in \**Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing poly-cytidine. *Molecular Microbiology* **13** (2), 207-217.
- Scarselli, M., Serruto, D., Montanari, P., Capecchi, B., Adu-Bobie, J., Veggi, D., Rappuoli, R., Pizza, M. and Arico, B.** (2006). *Neisseria meningitidis* NhhA is a multifunctional trimeric autotransporter adhesin. *Mol Microbiol* **61**, 631-44.
- Schaeffer, H. J. and Weber, M. J.** (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**, 2435-44.
- Schmitter, T., Agerer, F., Peterson, L., Munzner, P. 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. *J Exp Med* **199**, 35-46.
- Schmitter, T** (2005). CEACAM3: ein neuartiger phagozytischer Rezeptor der angeborenen Immunantwort zur Erkennung humanspezifischer Pathogene. Dissertation
- Schmitter, T., Pils, S., Sakk, V., Frank, R., Fischer, K. D. and Hauck, C. R.** (2007). The granulocyte receptor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 3 (CEACAM3) directly associates with Vav to promote phagocytosis of human pathogens. *J Immunol* **178**, 3797-805.
- Schmitter, T., Pils, S., Weibel, S., Agerer, F., Peterson, L., Buntru, A., Kopp, K. and Hauck, C. R.** (2007). Opa proteins of pathogenic *Neisseriae* initiate Src-kinase-dependent or lipid raft-mediated uptake via distinct human CEACAM isoforms. *Infect Immun.*
- Schubert, W. D., Urbanke, C., Ziehm, T., Beier, V., Machner, M. P., Domann, E., Wehland, J., Chakraborty, T. and Heinz, D. W.** (2002). Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell* **111**, 825-36.
- Schumann, D., Chen, C. J., Kaplan, B. and Shively, J. E.** (2001). Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 directly associates with cytoskeleton proteins actin and tropomyosin. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 47421-33.
- Seiler, A., Reinhardt, R., Sarkari, J., Caugant, D. A. and Achtman, M.** (1996). Allelic polymorphism and site-specific recombination in the *opc* locus of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **19**, 841-56.
- Serruto, D., Adu-Bobie, J., Scarselli, M., Veggi, D., Pizza, M., Rappuoli, R. and Arico, B.** (2003). *Neisseria meningitidis* App, a new adhesin with autocatalytic serine protease activity. *Mol Microbiol* **48**, 323-34.

- Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A. and Huse, W. D.** (1988). Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* **16**, 7583-600.
- Short, J. M. and Sorge, J. A.** (1992). In vivo excision properties of bacteriophage lambda ZAP expression vectors. *Methods Enzymol* **216**, 495-508.
- Sokolova, O., Heppel, N., Jagerhuber, R., Kim, K. S., Frosch, M., Eigenthaler, M. and Schubert-Unkmeir, A.** (2004). Interaction of *Neisseria meningitidis* with human brain microvascular endothelial cells: role of MAP- and tyrosine kinases in invasion and inflammatory cytokine release. *Cell Microbiol* **6**, 1153-66.
- Song, H., Belanger, M., Whitlock, J., Kozarov, E. and Progulske-Fox, A.** (2005). Hemagglutinin B is involved in the adherence of *Porphyromonas gingivalis* to human coronary artery endothelial cells. *Infect Immun* **73**, 7267-73.
- Spiegel, S., Foster, D. and Kolesnick, R.** (1996). Signal transduction through lipid second messengers. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 159-67.
- Steller, S., Angenendt, P., Cahill, D. J., Heuberger, S., Lehrach, H. and Kreutzberger, J.** (2005). Bacterial protein microarrays for identification of new potential diagnostic markers for *Neisseria meningitidis* infections. *Proteomics* **5**, 2048-55.
- Stern, A., Brown, M., Nickel, P. and Meyer, T. F.** (1986). Opacity genes in *Neisseria gonorrhoeae*: Control of phase and antigenic variation. *Cell* **47**, 61-71.
- Stern, A. and Meyer, T. F.** (1987). Common mechanism controlling phase and antigenic variation in pathogenic neisseriae. *Molecular Microbiology* **1**, 5-12.
- Stins, M. F., Prasadarao, N. V., Ibric, L., Wass, C. A., Lockett, P. and Kim, K. S.** (1994). Binding characteristics of S fimbriated *Escherichia coli* to isolated brain microvascular endothelial cells. *Am J Pathol* **145**, 1228-36.
- Stocks, S. C. and Kerr, M. A.** (1993). Neutrophil NCA-160 (CD66) is the major protein carrier of selectin binding carbohydrate groups LewisX and sialyl lewisX. *Biochem Biophys Res Commun* **195**, 478-83.
- Suker, J., Feavers, I. M., Achtman, M., Morelli, G., Wang, J. F. and Maiden, M. C.** (1994). The *porA* gene in serogroup A meningococci: evolutionary stability and mechanism of genetic variation. *Mol Microbiol* **12**, 253-65.
- Tettelin, H., Saunders, N. J., Heidelberg, J., Jeffries, A. C., Nelson, W. C., Eisen, J. A., Ketchum, K. A., Hood, D. W., Peden, J. F., Dodson, R. J. et al.** (2000). Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* **287**, 1809-1815.
- Thompson, J. A., Grunert, F. and Zimmermann, W.** (1991). Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **5**, 344-366.
- Thompson, J. A.** (1995). Molecular cloning and expression of carcinoembryonic antigen gene family members. *Tumour Biol* **16**, 10-6.
- Toleman, M., Aho, E. and Virji, M.** (2001). Expression of pathogen-like Opa adhesins in commensal *Neisseria*: genetic and functional analysis. *Cell Microbiol* **3**, 33-44.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D. D., Xu, J., Turner, T. K., Nimmual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S. N., Flavell, R. A. and Davis, R. J.** (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* **288**, 870-4.

- Turner, D. P., Marietou, A. G., Johnston, L., Ho, K. K., Rogers, A. J., Wooldridge, K. G. and Ala'Aldeen, D. A.** (2006). Characterization of MspA, an immunogenic autotransporter protein that mediates adhesion to epithelial and endothelial cells in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **74**, 2957-64.
- Unkmeir, A., Latsch, K., Dietrich, G., Wintermeyer, E., Schinke, B., Schwender, S., Kim, K. S., Eigenthaler, M. and Frosch, M.** (2002). Fibronectin mediates Opc dependent internalisation of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Molecular Microbiology* **42**, 933-946.
- Urbanik, E. and Ware, B. R.** (1989). Actin filament capping and cleaving activity of cytochalasins B, D, E, and H. *Arch Biochem Biophys* **269**, 181-7.
- van der Ley, P., Heckels, J. E., Virji, M., Hoogerhout, P. and Poolman, J. T.** (1991). Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria* spp. *Infection & Immunity* **59**, 2963-2971.
- van Putten, J. P.** (1993). Phase variation of lipopolysaccharide directs interconversion of invasive and immuno-resistant phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae*. *Embo J* **12**, 4043-51.
- Verkhusha, V. V. and Lukyanov, K. A.** (2004). The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat Biotechnol* **22**, 289-96.
- Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D. J., Achtman, M., Sarkari, J. and Moxon, E. R.** (1992). Expression of the Opc protein correlates with invasion of epithelial and endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. *Molecular Microbiology* **6**, 2785-95.
- Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D. J., Achtman, M. and Moxon, E. R.** (1993). Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol* **10**, 499-510.
- Virji, M., Makepeace, K. and Moxon, E. R.** (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**, 173-184.
- Virji, M., Makepeace, K., Peak, I. R., Ferguson, D. J., Jennings, M. P. and Moxon, E. R.** (1995). Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides. *Mol Microbiol* **18**, 741-54.
- Virji, M., Watt, S. M., Barker, S., Makepeace, K. and Doyonnas, R.** (1996a). 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.
- Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D. J. P. and Watt, S. M.** (1996b). Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic *Neisseriae*. *Molecular Microbiology* **22**, 941-950.
- Virji, M., Evans, D., Hadfield, A., Grunert, F., Teixeira, A. M. and Watt, S. M.** (1999a). 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**, 538-51.
- Virji, M.** (1999b). Glycans in meningococcal pathogenesis. *Biochem Soc Trans* **27**, 498-507.
- Virji, M., Evans, D., Griffith, J., Hill, D., Serino, L., Hadfield, A. and Watt, S. M.** (2000). Carcinoembryonic antigens are targeted by diverse strains of typable and non-typable *Haemophilus influenzae*. *Molecular Microbiology* **36**, 784-95.

- Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N. C. and Elson, E. L.** (2001). Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *J Cell Sci* **114**, 1025-36.
- Wang, J., Gray-Owen, S. D., Knorre, A., Meyer, T. F. and Dehio, C.** (1998). Opa binding to cellular CD66 receptors mediates the transcellular traversal of *Neisseria gonorrhoeae* across polarized T84 epithelial cell monolayers. *Molecular Microbiology* **30**, 657-71.
- Watanabe, K., Yilmaz, O., Nakhjiri, S. F., Belton, C. M. and Lamont, R. J.** (2001). Association of mitogen-activated protein kinase pathways with gingival epithelial cell responses to Porphyromonas gingivalis infection. *Infect Immun* **69**, 6731-7.
- Watt, S. M., Teixeira, A. M., Zhou, G. Q., Doyonnas, R., Zhang, Y., Grunert, F., Blumberg, R. S., Kuroki, M., Skubitz, K. M. and Bates, P. A.** (2001). Homophilic adhesion of human CEACAM1 involves N-terminal domain interactions: structural analysis of the binding site. *Blood* **98**, 1469-79.
- Webb, D. C. and Cripps, A. W.** (1998). Secondary structure and molecular analysis of interstrain variability in the P5 outer-membrane protein of non-typable Haemophilus influenzae isolated from diverse anatomical sites. *J Med Microbiol* **47**, 1059-67.
- Wilder-Smith, A. and Memish, Z.** (2003). Meningococcal disease and travel. *Int J Antimicrob Agents* **21**, 102-6.
- Wojtaszek, P. A., Heasley, L. E., Siriwardana, G. and Berl, T.** (1998). Dominant-negative c-Jun NH2-terminal kinase 2 sensitizes renal inner medullary collecting duct cells to hypertonicity-induced lethality independent of organic osmolyte transport. *J Biol Chem* **273**, 800-4.
- Wolff, K. and Stern, A.** (1995). Identification and characterization of specific sequences encoding pathogenicity associated proteins in the genome of commensal Neisseria species. *FEMS Microbiol Lett* **125**, 255-63.
- Yang, Q. L. and Gotschlich, E. C.** (1996). Variation of gonococcal lipooligosaccharide structure is due to alterations in poly-G tracts in lgt genes encoding glycosyl transferases. *J Exp Med* **183**, 323-7.
- Yoshida, H., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Cohen, P. and Goedert, M.** (2004). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK). *J Neurochem* **90**, 352-8.
- Yu, C., Minemoto, Y., Zhang, J., Liu, J., Tang, F., Bui, T. N., Xiang, J. and Lin, A.** (2004). JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell* **13**, 329-40.
- Zebhauser, R., Kammerer, R., Eisenried, A., McLellan, A., Moore, T. and Zimmermann, W.** (2005). Identification of a novel group of evolutionarily conserved members within the rapidly diverging murine Cea family. *Genomics* **86**, 566-80.
- Zhu, P., Morelli, G. and Achtman, M.** (1999). The opcA and (psi)opcB regions in Neisseria: genes, pseudogenes, deletions, insertion elements and DNA islands. *Mol Microbiol* **33**, 635-50.

## 11 Anhang

### 11.1 Abkürzungen

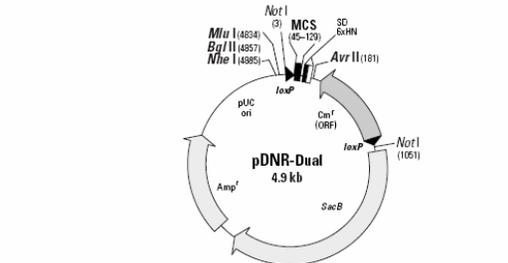
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CEACAM	<i>carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule</i>
ConA	ConcanavalinA
CFU	<i>colony forming unit</i>
CFSE	5-(6)-Carboxyfluorescein-succinimidylester
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CS	Kälberserum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Em	Erythromycin
et al.	<i>et altera</i> ; und andere
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	fötale Kälberserum
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
Ig	Immunglobulin
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif</i>
kDa	Kilodalton
l	Liter

---

LB	Luria- Bertani
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
OD	optische Dichte
Opa	<i>opacity associated</i>
ORF	offenes Leseraster
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
pmol	Picomol
PTK	Proteintyrosinkinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannte
Spc	Spectinomycin
TAE	Tris- Acetat- EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
rpm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
z.B.	zum Beispiel

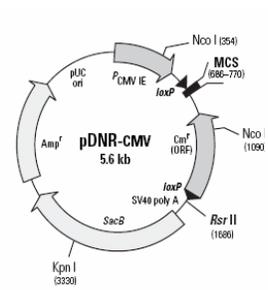
# 11.2 Plasmide

## Zur Plasmidkonstruktion verwendete Vektoren

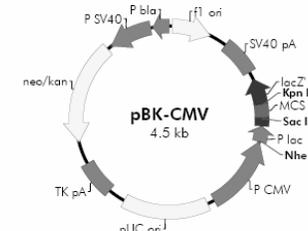
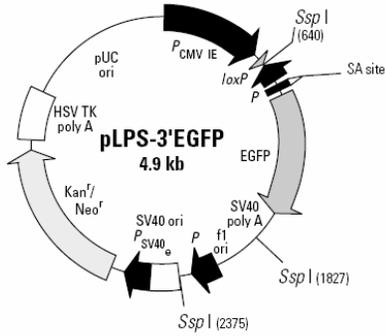


686  
 TTA TCA GTC GAC GGT ACC GGA CAT ATG CCG GGG AAT TCC TGC AGG ATC CCG TGG AGA AGC TTT CTA GAC CAT TCG TTT GGC GCG C  
 SalI KpnI NdeI SmaI EcoRI PstI BamHI XbaI HindIII XbaI BstXI BstII

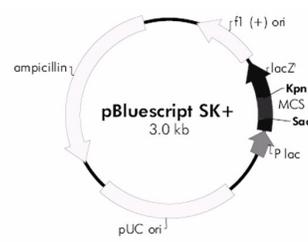
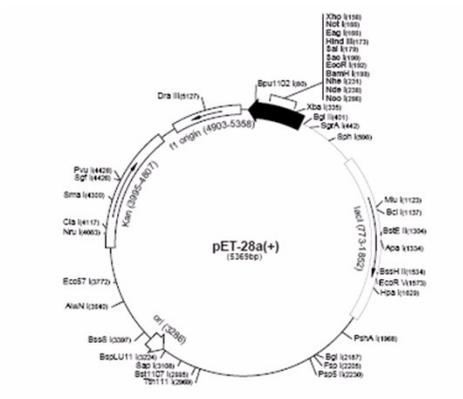
124 SD site 6xHN tag  
 GG GCC CAG GTA AGI GGT CAT AAT CAT AAT CAT AAT CAT AAT CAT AAT CAC AAC TAG CDT  
 Bsp120I ApoI STOP Frame 2 STOP Frame 3 STOP Frame 1



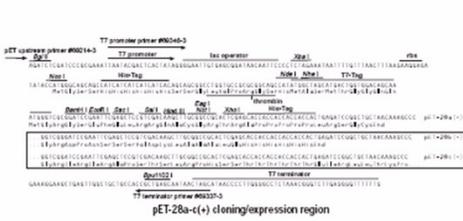
686 770  
 TAT TCA GTC GAC GGT ACC GGA CAT ATG CCG GGG AAT TCC TGC AGG ATC CCG TGC AGA AGC TTT CTA GAC CAT TCG TTT GGC GCG CCG GCC CAG T  
 SalI SmaI EcoRI PstI BamHI XbaI HindIII XbaI BstXI BstII Bsp120I ApoI



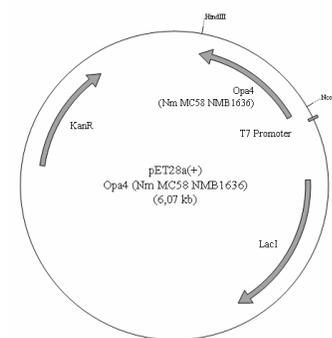
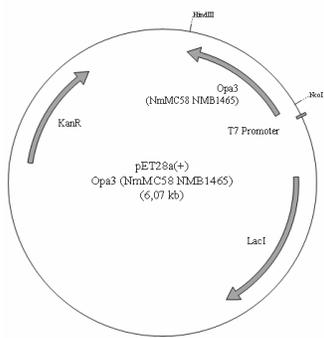
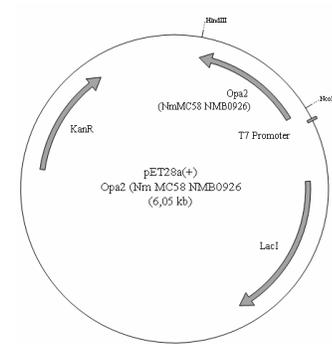
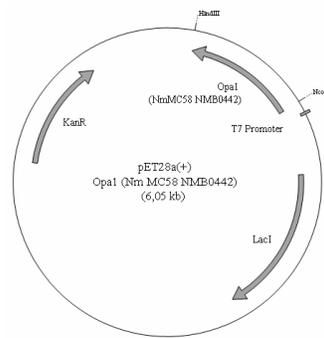
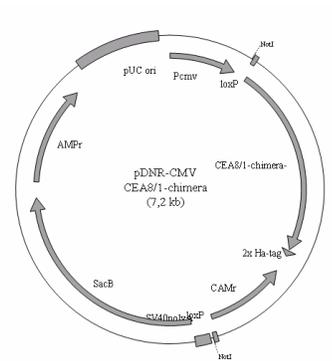
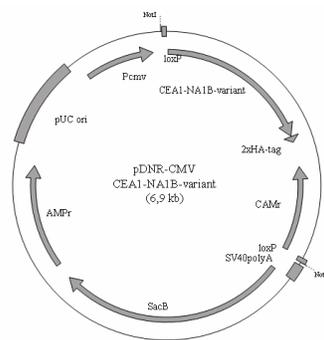
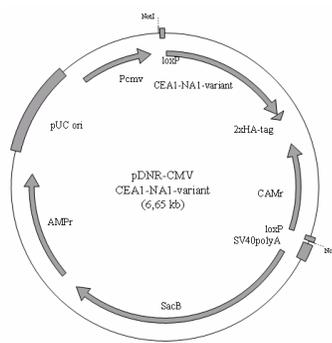
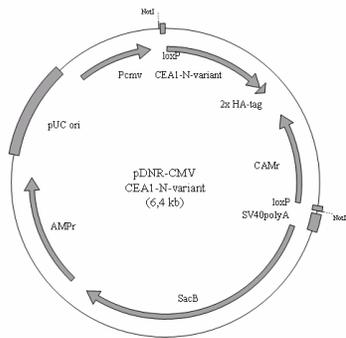
pBK-CMV Multiple Cloning Site Region (sequence shown 952-1196)  
 GTAAAAGGACGGCCAGTGAATTTAATACGACTCATATAGGGGAATTGGGTACACTTACCTGGTACCCACCCGGGTGAAA...  
 ...ATCGATGGGCGGGCGCTGTAAGACTCTGAGAGAGCTTTTGAATTTTGGATCAGTCTAGTGTGAGCTGCAG...  
 ...GGGGCGAGCTCAAGTTTGTCCCTTATGAGGGTAAATTCGAGGTTGGGTATCAAGGTCTAGGCTTTCCCTGT



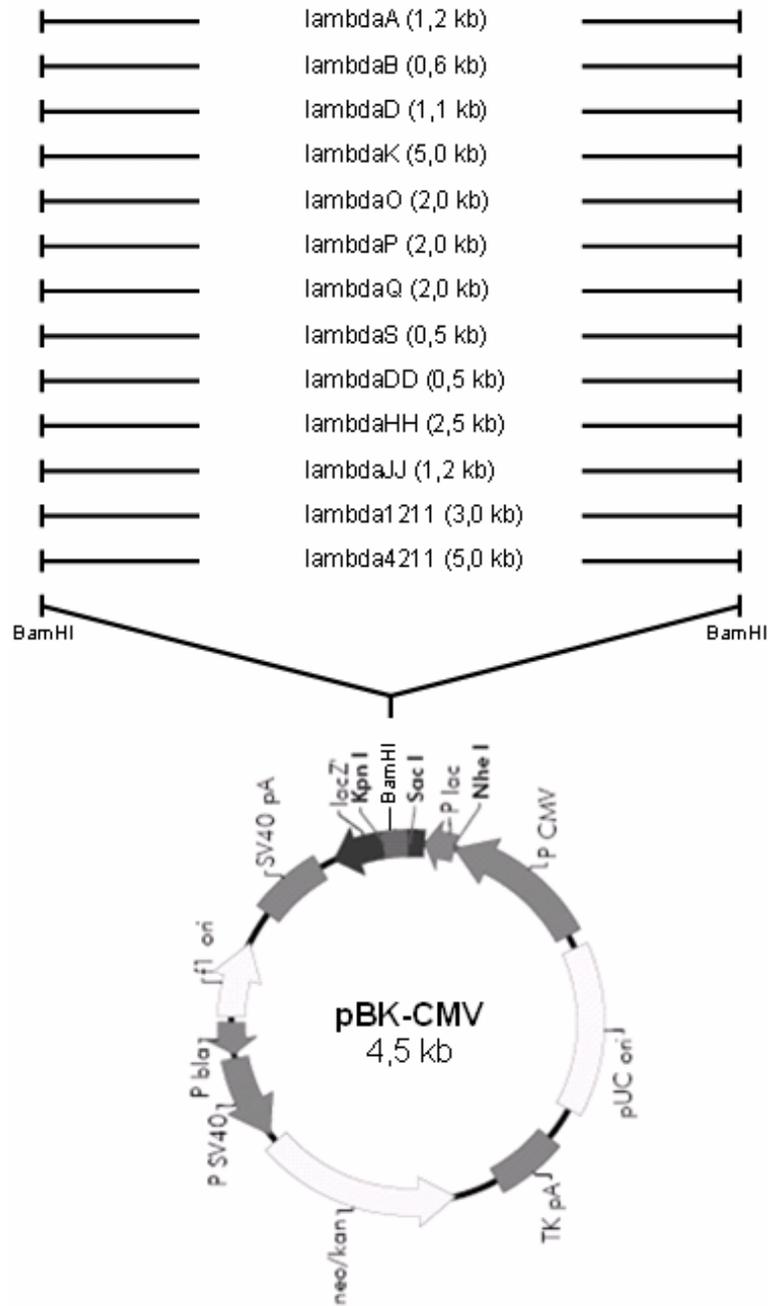
pBluescript SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 601-826)  
 TTGTAAGACGACGGCCAGTGAATTTAATACGACTCATATAGGGGAATTGGGTACACTTACCTGGTACCCACCCGGGTGAAA...  
 ...ATCGATAGGCTGATATGAAATTCGAGGCGGGGATCCACTAGTCTAGAGGGCGCCACCGCGGTGAGCTCA...  
 ...GCTTTTGTCCCTTATGAGGGTAAATTCGAGGTTGGGTATCAAGGTCTAGGCTTTCCCTGT



Für diese Arbeit konstruierte Plasmide







---

### 11.3 Publikationen

**Kuespert, K., Pils, S. and Hauck, C. R.** (2006). CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 565-71.

**Kuespert, K., Weibel, S. and Hauck, C. R.** (2007). Profiling of bacterial adhesin – host receptor recognition by soluble immunoglobulin superfamily domains. *Journal of Microbiological Methods* **68**, 478-485.

**Kuespert, K. and Hauck, C. R.** (2007). Characterizing host receptor recognition by individual bacterial pathogens. In *Methods in Molecular Biology*, vol. in press (eds S. Rupp K. Sohn and N. Hauser). Totowa: Humana Press.

**Kuespert, K., Sprissler, C. and Hauck, C. R.** c-Jun N-terminal kinases are involved in CEACAM3 dependent signaling processes for neisserial uptake. (In Vorbereitung)

**Kuespert, K. and Hauck, C. R.** CEACAM1-mediated invasion of non-opaque meningococci. (In Vorbereitung)

## 11.4 Lebenslauf

- Persönliches** Katharina Küspert  
geboren am 06.02.1978 in Bad Brückenau
- Schulbildung**  
09/1984 – 07/1988 Grundschule in Marktleuthen  
09/1988 – 06/1997 Gymnasium in Wunsiedel  
Abschluss: Abitur
- Hochschulbildung**  
09/1997 – 01/2003 Studium der Biologie an der Universität Bayreuth mit den Schwerpunkten Mikrobiologie, Genetik und Biochemie  
10/2000 – 03/2001 Studiensemester an der “University of York” in England (ERASMUS-Stipendiat)  
04/2002 – 01/2003 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Bayreuth unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Diethelm Kleiner  
  
Thema: „Das *hesAB*-Operon von *Anabaena* PCC 7120“  
  
01/2003 Studienabschluss als Diplom-Biologin
- Praktische Tätigkeiten**  
04/2003 – 05/2003 Wissenschaftliche Mitarbeit am Lehrstuhl für Terrestrische Mikrobiologie am Bayreuther Institut für Terrestrische Ökosystemforschung (BITÖK)  
07/2003 Wissenschaftliche Mitarbeit am Lehrstuhl für Geoökologie der Universität Bayreuth
- Promotion**  
09/2003 – 06/2007 Promotion am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg und am Lehrstuhl für Zellbiologie der Universität Konstanz unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Christof Hauck  
  
Thema: Interaktion pathogener Neisserien mit zellulären Rezeptoren: Molekulare Untersuchungen zu neisseriellen Adhäsinen und ihrer Wechselwirkung mit humanen CEACAMs  
  
10/2007 Promotionsprüfung

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation

**„Interaktion pathogener Neisserien mit zellulären Rezeptoren:**

**Molekulare Untersuchungen zu neisseriellen Adhäsinen und ihrer Wechselwirkung mit  
humanen CEACAMs“**

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

.....

(Katharina Küspert)



