

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Mikrobiologie

Funktionelle Charakterisierung trimerer Autotransporteradhäsine von
Neisseria meningitidis (NadA)
und *Yersinia enterocolitica* (YadA)

Virginie Nägele

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung
des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Liebl

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer (i. R.)
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Heesemann,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 14.01.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt am 25.02.2010 angenommen.

Meinen Eltern

1	Einleitung	1
1.1	Die Gattung <i>Yersinia</i>	1
1.2	Verbreitung und Klinik enteropathogener <i>Yersinia</i>	2
1.3	Pathogenese und Virulenz von <i>Y. enterocolitica</i>	3
1.3.1	Myf-Antigen	3
1.3.2	<i>Yersinia enterocolitica</i> Enterotoxin (Yst).....	3
1.3.3	Typ III Sekretionssystem (T3SS)	4
1.3.4	„ <i>Yersinia</i> outer proteins“ (Yops)	4
1.3.5	Adhäsine	7
1.3.6	Autotransporter	14
1.4	Die Gattung <i>Neisseria</i>	16
1.5	Verbreitung und Klinik humanpathogener <i>Neisseria</i>	17
1.6	Pathogenese und Virulenz von <i>N. meningitidis</i>	18
1.6.1	Allgemeine Virulenzfaktoren	18
1.6.2	<i>Neisseria meningitidis</i> Adhäsine (NadA).....	23
	Ziel der Arbeit	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Bakterienstämme und Plasmide	29
2.1.1	<i>Escherichia coli</i> Stämme	29
2.1.2	<i>Yersinia enterocolitica</i> Stämme	29
2.1.3	<i>Neisseria</i> Stämme	29
2.1.4	Plasmide	30
2.2	Oligonukleotide.....	32
2.3	Bakterielle Nährmedien	34
2.4	Antibiotika	34
2.5	Antikörper	35
2.6	Proteine und Peptide	36
2.7	Enzyme	37
2.8	Molekularbiologische Kits.....	37
2.9	Zellkultur	37
2.9.1	Eukaryotische Zellen	38
2.9.2	Zellkulturmedien und Zusätze	38
2.10	Puffer und Lösungen.....	39
2.11	Geräte.....	44
2.12	Chemikalien und Biochemikalien.....	44
2.13	Mikrobiologische Methoden.....	46
2.13.1	Kultivierungsverfahren.....	46
2.13.2	Stammhaltung.....	47
2.13.3	Isolierung von Plasmid-DNS.....	47
2.13.4	Modifikation von DNS	47
2.13.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	47

2.13.6	Aufreinigung von PCR-Produkten	48
2.13.7	Agarosegelelektrophorese	48
2.13.8	Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen.....	48
2.13.9	Photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration.....	49
2.13.10	DNS-Sequenzanalyse	49
2.13.11	Kompetente Zellen und Elektroporation	49
2.13.12	Konjugation	51
2.13.13	Konstruktion von Plasmiden und Stämmen	51
2.14	Methoden zum Arbeiten mit Proteinen.....	54
2.14.1	Präparation von <i>Y. enterocolitica</i> Ganzzelllysaten – <i>yadA</i> -Expression.....	54
2.14.2	Präparation von <i>Neisseria</i> Ganzzelllysaten	54
2.14.3	Präparation bakterieller Außenmembranproteine.....	55
2.14.4	Autoaggregationsnachweis.....	55
2.14.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	56
2.14.6	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	57
2.14.7	Coomassie-Färbung.....	58
2.14.8	Westernblot (Immunoblot).....	58
2.14.9	Far Westernblot	59
2.14.10	Proteinaufreinigung	60
2.14.11	Markierung von Proteinen mit Alexa488	62
2.15	Methoden zum Arbeiten mit eukaryotischen Zellen.....	62
2.15.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien.....	62
2.15.2	Ausdifferenzierung von HL-60 zu dHL60 Zellen	63
2.15.3	Transfektion von Hek-293 Zellen.....	63
2.15.4	Kryokonservierung von Zellen.....	64
2.15.5	Auftauen von Zellen.....	64
2.15.6	Zellzahlbestimmung	64
2.16	Methoden zur Untersuchung der Interaktion von Yersinien mit eukaryotischen Zellen	65
2.16.1	Kultivierung von <i>Y. enterocolitica</i> für Infektionsversuche	65
2.16.2	Kultivierung eukaryotischer Zellen für Infektionsversuche	65
2.16.3	Infektionsversuche mit Chang, GE-11 und GE-11-β1 Zellen	67
2.16.4	Infektionsversuche mit dHL60 Zellen.....	68
2.17	Methoden zur Untersuchung der Interaktion von Neisserien mit eukaryotischen Zellen....	68
2.17.1	Kultivierung von <i>N. meningitidis</i> für Infektionsversuche	68
2.17.2	Infektionsversuche mit GE-11 und GE-11-β1 Zellen.....	69
2.18	Immunologische Methoden	69
2.18.1	Nachweis von β Integrinen auf eukaryotischen Zellen.....	69
2.18.2	Nachweis von CEACAMs auf eukaryotischen Zellen	70
2.18.3	Nachweis von YadA und NadA auf der Oberfläche von <i>Y. enterocolitica</i>	70
2.18.4	Doppelimmunfluoreszenzfärbung	71
2.18.5	Bindungsnachweis isolierter Proteine an eukaryotische Zellen oder Yersinien.....	71
2.18.6	Interaktion von Yersinien mit humanem Serum.....	73
2.18.7	Herstellung von anti-NadA Kaninchen Serum.....	75
2.19	Tierversuche.....	75
2.19.1	Mäuse	75
2.19.2	Infektion von Mäusen mit <i>Y. enterocolitica</i>	75
2.19.3	Erfassung von <i>Y. enterocolitica</i> in Mausorganen.....	75
2.19.4	Erfassung von <i>Y. enterocolitica</i> in Mäusen mit dem Lux-System	76
2.20	Auswertung durchflusszytometrischer Analysen.....	76

2.21	Statistische Auswertung.....	76
3	Ergebnisse	79
3.1	<i>nadA</i> - und <i>nadA-yadA</i> -exprimierende <i>Y. enterocolitica</i> Stämme	79
3.1.1	Herstellung von <i>nadA</i> - und <i>nadA-yadA</i> -Fusionsgenen.....	80
3.1.2	Synthese der NadA, YadA und NadA-YadA Proteine in <i>Y. enterocolitica</i>	82
3.2	Oberflächenlokalisierung der NadA und NadA-YadA Hybridproteine in <i>Y. enterocolitica</i>	86
3.2.1	Immunoblots mit Außenmembranproteinen.....	86
3.2.2	Immunofluoreszenznachweis von NadA, YadA und NadA-YadA Proteinen auf der Zelloberfläche von <i>Y. enterocolitica</i>	89
3.3	<i>nadA</i> -exprimierende <i>N. meningitidis</i> Stämme	92
3.3.1	Synthesenachweis von NadA in <i>N. meningitidis</i>	93
3.4	rekombinantes NadA Protein.....	94
3.4.1	Herstellung von NadA ₂₄₋₂₁₀	94
3.4.2	Synthese und Reinigung von NadA ₂₄₋₂₁₀	94
3.4.3	Native PAGE mit NadA ₂₄₋₂₁₀	95
3.4.4	Herstellung und Synthese von anti-NadA Serum.....	96
3.5	Bindung von <i>nadA</i> - und <i>nadA-yadA</i> -exprimierenden Yersinien an extrazelluläre Matrixproteine	97
3.6	Autoagglutination <i>nadA</i> - und <i>nadA-yadA</i> -exprimierender Yersinien.....	98
3.7	Interaktion von Yersinien mit Serumkomponenten	99
3.7.1	Serumresistenz.....	99
3.7.2	Bindung von komplementinhibitierenden Faktoren C4BP und Faktor H an <i>nadA</i> -exprimierende Yersinien	100
3.8	Interaktion von NadA mit eukaryotischen Zellen.....	103
3.8.1	Interaktion <i>nadA</i> -exprimierender Yersinien mit Chang Zellen	103
3.8.2	Interaktion <i>nadA</i> -exprimierender Yersinien mit dHL-60 Zellen.....	105
3.9	Die Rolle von NadA im Mausinfektionsmodell	108
3.10	Identifizierung NadA-spezifischer Wirtszellrezeptoren	112
3.10.1	CEACAMs als potentielle Wirtszellrezeptoren für NadA.....	112
3.10.2	β1 Integrine als Wirtszellrezeptoren für NadA.....	116
4	Diskussion	137
4.1	<i>Y. enterocolitica</i> als Modellsystem für die Synthese von NadA und NadA-YadA-Hybridproteinen.....	138
4.2	Funktionelle Charakterisierung des NadA.....	141
4.3	Die Rolle von NadA im <i>in vivo</i> Mausmodell.....	146
4.4	Identifizierung NadA-spezifischer Wirtszellrezeptoren	147
4.4.1	Die Rolle von CEACAMs als potentielle NadA-Wirtszellrezeptoren.....	147
4.4.2	β1 Integrine als Wirtszellrezeptoren für NadA.....	148
4.4.3	Die Bedeutung von β1 Integrinen für die <i>nadA</i> -abhängige Kolonisierung von Wirtszellen.....	152
5	Zusammenfassung	157
6	Summary	159

7	Literaturverzeichnis	161
8	Anhang	183
8.1	Danksagung.....	183
8.2	Lebenslauf.....	185
8.3	Veröffentlichungen	187

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
α	anti
Amp ^R	Ampicillinresistenz
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CEACAM	engl.: „carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule“
CFU	engl.: „colony-forming units“
CIAP	engl.: „calf intestine alkaline phosphatase“
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
CLSM	engl.: „confocal laser scanning microscopy“
Cy3	Indocarbocyanin
d	engl.: „day“
D	Aspartat
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
ECL-Lösung	„enhanced chemiluminescence“-Lösung
EZM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	engl.: „fetal calf serum“
FITC	Fluorescein-Isothiacyanate
g	Gramm
G	Glycin
G	Guanin
GFP	engl.: „green fluorescent protein“
h	Stunde
His	Histidin
H ₂ O _{dest.}	einfach destilliertes Wasser
H ₂ O _{bidest.}	doppelt destilliertes Wasser
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMAC	engl.: „immobilized metal ion affinity chromatography“
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropylthio- β -galactosid
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaare

Abkürzungsverzeichnis

kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LKZ	Lebendkeimzahl
M	Molar (mol/l)
m	milli (10^{-3})
MFI	engl.: „mean fluorescence intensity“
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOI	engl.: „multiplicity of infection“
MW	Molekulargewicht
μ	mikro (10^{-6})
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
n	nano (10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
n.s.	Nicht signifikant
OD	Optische Dichte
OMP	engl.: „outer membrane protein“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte NaCl-Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pI	Isoelektrischer Punkt
PMN	polymorphonukleare Neutrophile
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidinfluoride
rpm	engl.: „rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spc ^R	Spectinomycinresistenz
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
T _M	Schmelztemperatur
U	Unit (Enzymeinheit)
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	Über Nacht
V	Volt
(w/v)	Gewichtsanteil
(w/w)	Gewichtsprozent

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Yersinia*

Bakterien der Gattung *Yersinia* gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* und wurden nach dem Schweizer Alexandre Emile Yersin benannt, der *Y. pestis* 1894 erstmals isolierte, und die Bedeutung von Ratten bei der Übertragung der Pest aufdeckte. Yersinien sind Gram-negative, stäbchenförmige, fakultativ anaerobe, nicht-sporulierende Bakterien die in einem Temperaturbereich von 4-42 °C wachsen. Ihr Temperaturoptimum liegt jedoch zwischen 26-28 °C. Die Gattung *Yersinia* beinhaltet 11 verschiedene Arten, mit drei humanpathogenen Vertretern: *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* (Bottone, 1997; Garrity *et al.*, 2004).

Bei *Y. pestis* handelt es sich primär um ein für Nagetiere pathogenes Bakterium, welches durch den Biss infizierter Flöhe (*Xenopsylla cheopis*) auf den Menschen übertragen werden kann, und zur Ausbildung der Lungen-, Beulenpest oder Pestsepsis führt (Perry und Fetherston, 1997). Im Gegensatz zu *Y. pestis* welches bei 37 °C beweglich ist, sind die beiden in der Umwelt weit verbreiteten enteropathogenen *Yersinia* Arten, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*, bei 37 °C unbeweglich. Basierend auf biochemischen und serologischen Eigenschaften kann *Y. enterocolitica* in sechs Biovare 1A, 1B, 2, 3, 4 und 5, und in ungefähr 60 Serovare unterteilt werden (O-, H-Antigene) (Wauters *et al.*, 1987). Die *in vitro* Biotypen können zusätzlich aufgrund ihrer Mauspathogenität in eine apathogene, eine schwach-pathogene und eine mauslethale Gruppe unterteilt werden. Zur apathogenen Gruppe gehört das Biovar 1A, die schwach-pathogene Gruppe umfasst Biovar 2-5 mit den Serotypen O:3, O:9, O:5,27, und die mauslethale Gruppe beinhaltet Biovar 1B mit den Serotypen O:4, O:8, O:13ba, O:13b, O:18, O:20, O:21) (McNally *et al.*, 2004; Prentice *et al.*, 1991; Schubert *et al.*, 2004). *Y. enterocolitica* ist geographisch weit verbreitet, wobei Biovar 1B mit den medizinisch relevanten Serotypen O:4, O:8, O:13, O:18, O:20 und O:21 vor allem in Nordamerika auftritt („new-world strains“), während die Biovare 2 und 4 mit den Serotypen O:3, O:5,27 und O:9 vermehrt in Europa und Japan auftreten („old-world strains“) (Bottone *et al.* 1997, Schubert 2004). *Y. pseudotuberculosis* bildet eine biochemisch heterogene Gruppe welche in 21 Serotypen unterteilt wird (Wren, 2003), wobei die Serotypen O:1-O:3 in Europa, und die Serotypen O:4b und O:3, O:5a und O:5b vermehrt in Japan auftreten (Aleksic *et al.*, 1995; Tsubokura *et al.*, 1989). Bei *Y. pestis* wird aufgrund von Deletionen im O-Antigen-

Cluster kein O-Antigen produziert (Skurnik *et al.*, 2000), wodurch eine Unterteilung in verschiedene Serotypen nicht möglich ist. *Y. pestis* wird phenotypisch aufgrund der Nitatreduktion und Glycerolfermentation in die drei Biovare Antiqua, Orientalis und Medievalis unterteilt (Achtman *et al.*, 1999). Zusätzlich hat die Genotypisierung von *Y. pestis* in den letzten Jahren zur Unterteilung in den endemischen und epidemischen *Y. pestis* Typ geführt, die sich beide vor ca. 1500-20000 Jahren aus *Y. pseudotuberculosis* entwickelten (Achtman *et al.*, 1999; Lindler, 2009).

1.2 Verbreitung und Klinik enteropathogener *Yersinia*

Y. enterocolitica ist ein in der Natur weit verbreitetes Bakterium, das vor allem in aquatischen und tierischen Reservoirs (Wild-, Nutz- und Heimtiere) auftritt, wobei Schweine das Hauptreservoir für humanpathogene *Y. enterocolitica* Stämme darstellen (Tauxe *et al.*, 1987). Auch kontaminierte Milchprodukte und Wasser wurden als Infektionsquellen nachgewiesen (Black *et al.*, 1978; Bockemuhl *et al.*, 2003). Die Infektion mit *Y. enterocolitica* beginnt in der Regel mit der oraler Aufnahme von kontaminiertem Wasser, Nahrungsmitteln, oder durch kontaminierte Bluttransfusionen (Stenhouse und Milner, 1982). Infektionen mit *Y. pseudotuberculosis* treten vermehrt bei Tieren auf, und werden eher selten beim Menschen beobachtet. Die wichtigsten Reservoirs für *Y. pseudotuberculosis* sind Mäuse, Ratten, Hasen, Kaninchen und Wildvögel. Die durch *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* verursachte Yersiniose, kann in drei klinische Formen unterteilt werden, die meist vom Alter und Gesundheitszustand der betroffenen Person abhängig ist. Die häufigste Form der Yersiniose ist die Enteritis (1), die in der Regel bei jungen Kindern auftritt und sich in Form von Fieber und wässrigem Durchfall äußert. Die akute Yersiniose tritt vermehrt bei älteren Kindern und Jugendlichen auf, und äußert sich meist in einer Entzündung des terminalen Ileums und mesenterialen Lymphadenitis, die häufig mit einer Appendizitis verwechselt wird (2). In seltenen Fällen führt die Infektion mit *Y. enterocolitica* zu Komplikationen in Form einer Sepsis, die zur Ausbildung von fokalen Abszessen in der Leber und Niere führen kann (3) (Bockemuhl und Roggentin, 2004). Sekundäre immunologisch-vermittelte Folgeerkrankungen wie die reaktive Arthritis, das Erythema Nodosum und die Uveitis treten vor allem bei jungen Erwachsenen auf. Diese Erkrankungen sind mit dem Histokompatibilitätsantigen HLA-B27 assoziiert. Patienten mit reaktiver Arthritis zeigen in betroffenen Gelenken *Yersinia*-Antigene, die eine T- und B-Zellantwort induzieren (Granfors, 1998; Lahesmaa-Rantala *et al.*, 1987).

1.3 Pathogenese und Virulenz von *Y. enterocolitica*

Nach der oralen Aufnahme von *Y. enterocolitica* über kontaminierte Nahrungsmittel, oder Wasser, gelangen die Bakterien zunächst in den Dünndarm und überwinden die intestinale Barriere durch Invasion einer Gruppe spezialisierter, follikel-assoziiierter Epithelzellen, den M-Zellen. Nach der Invasion des intestinalen Epitheliums vermehren sich die Yersinien extrazellulär in den Peyer'schen Plaques (lymphoide Follikel) (Cornelis, 1998), und gelangen von dort aus in die mesenterischen Lymphknoten. Lediglich in seltenen Fällen erreichen sie die Blutbahn (Bottone, 1997; Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2006). Ausschlaggebend für die Pathogenität ist eine Vielzahl chromosomal- und plasmidkodierter Virulenzfaktoren. Zu den chromosomal-kodierten Virulenzfaktoren von *Y. enterocolitica* gehören das Inv (Invasin), das Ail („attachment and invasion locus“), das hitzestabile Enterotoxin Yst, das Myf-Antigen und das Yersiniabactin Siderophorsystem das auf einer HPI („high pathogenicity island“) kodiert ist (Perry *et al.*, 1999). Zusätzliche Virulenzfaktoren sind auf dem 70 kb großen *Yersinia* pYV-Virulenzplasmid kodiert (Portnoy und Martinez, 1985) das bei *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis* und *Y. enterocolitica* Biovar 1B, und 2-5 vorkommt. Das pYV-Plasmid kodiert Gene für die Synthese eines Typ III Sekretionssystem (T3SS), der „*Yersinia* outer proteins“ (Yops), und des *Yersinia* Adhäsins (YadA).

1.3.1 Myf-Antigen

Das Myf-Antigen ist ein Proteinpolymer aus 21 kDa-Untereinheiten, das bei einem pH von 6 und einer Temperatur von 37 °C produziert wird. Der *myf* Locus beinhaltet das *myfA* (kodiert für die Fimbrienuntereinheit), das *myfB* (kodiert für ein putatives Chaperon) und das *myfC* (kodiert für ein putatives Außenmembranprotein) (Holmgren *et al.*, 1992; Iriarte *et al.*, 1993a). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen das Myf-Antigen als eine fibrillen-ähnliche Struktur auf der bakteriellen Oberfläche (Iriarte *et al.*, 1993b). Das Myf-Antigen ist lediglich bei humanpathogenen *Y. enterocolitica* Stämmen vertreten, und zeigt eine Sequenzidentität von 44 % zum pH6-Antigen von *Y. pestis* (Lindler *et al.*, 1990). Eine Beteiligung des Myf-Antigens an der Pathogenität von *Y. enterocolitica* konnte bisher nicht gezeigt werden.

1.3.2 *Yersinia enterocolitica* Enterotoxin (Yst)

Das Yst ist ein hitzestabiles Enterotoxin das als 71 Aminosäuren langes Vorläuferprotein synthetisiert wird, und nach Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz aus 30 Aminosäuren

besteht (Takao *et al.*, 1984; Takao *et al.*, 1985). Lediglich pathogene *Y. enterocolitica* Stämme synthetisieren Yst (Delor *et al.*, 1990). Unter normalen Kulturbedingungen erfolgt die Expression von *yst* nur bei 30 °C, während die Erhöhung der Salzkonzentration und des pH-Wertes die Synthese des Enterotoxins auch bei 37 °C ermöglicht (Mikulskis *et al.*, 1994). Weiterhin zeigte die Untersuchung von Yst im Tiermodell, dass das Enterotoxin an der Ausbildung des *Yersinia*-vermittelten wässrigen Durchfalls bei Kaninchen beteiligt ist (Delor und Cornelis, 1992).

1.3.3 Typ III Sekretionssystem (T3SS)

Das als Ysc-Injektisom bezeichnete *Yersinia* T3SS besteht aus einem Basalkörper, der die Peptidoglykanschicht, sowie die innere und äußere Membran durchspannt, und einer externen Nadel (Cornelis, 2002a; Hoiczky und Blobel, 2001). Insgesamt besteht das Injektisom aus 29 Ysc-Proteinen wobei die 10 Ysc-Proteine YscD-, J, L, N, Q, R, S, T, V und U in jedem bekannten T3SS und im Flagellenapparat konserviert sind. Der obere Teil des Basalkörpers enthält das YscC-Protein, das einen Ring bildet, der in Kontakt mit der äußeren Membran steht und zur Familie der Sekretine gehört. Der untere Teil des Basalkörpers wird durch die Sekretionsproteine YscD, YscR, YscS, YscT, YscU und YscV gebildet. YscQ bildet vermutlich einen multimeren Ring an der Basis des Basalkörpers und interagiert mit der ATPase YscN, die die Energie für die Sekretion liefert (Jackson und Plano, 2000). Die 60-80 nm Länge Nadel wird durch YscP gebildet und von LcrV abgeschlossen (Cornelis, 2002a). Für die Translokation der Effektorproteine in die Wirtszelle sind die sogenannten Translokationsproteine YopB, YopD und LcrV notwendig (Cornelis, 2002a; Galan und Wolf-Watz, 2006). YopB und D haben hydrophobe Eigenschaften und sind an der Porenbildung beteiligt, während LcrV einen hydrophilen Charakter aufweist und für die korrekte Lokalisierung von YopB und D in der Zielmembran notwendig ist (Cornelis und Wolf-Watz, 1997; Goure *et al.*, 2005).

1.3.4 „*Yersinia* outer proteins“ (Yops)

Das pYV-Plasmid kodiert Gene für sechs verschiedene Effektorproteine, die als „*Yersinia* outer proteins“ (Yops) bezeichnet, und kontaktabhängig in die Wirtszelle injiziert werden. Die Yops modulieren eine Vielzahl intrazellulärer Prozesse wie die Regulation des Zytoskeletts, der Zytokinproduktion und Kontrolle der Apoptose. Die Expression der Yops erfolgt bei 37 °C durch den Transkriptionsaktivator VirF. Zusätzlich gehören die Yop und

Ysc-Proteine zum „low calcium response stimulon“ (LCRS), da ihre Transkription in Anwesenheit von Ca^{2+} reprimiert ist (Straley *et al.*, 1993; Wattiau und Cornelis, 1994). In allen *Yersinia* Spezies kommen die fünf Effektoren YopH, YopM, YopE, YopO (YpkA), YopJ (YopP) vor, während YopT in vielen *Y. pseudotuberculosis* Stämmen fehlt.

YopT ist eine 35 kDa große Cystein Protease des Klan CA („clan of cysteine proteases“), deren katalytische Aktivität am C-Terminus lokalisiert ist (Shao und Dixon, 2003). YopT spaltet das C-terminale Cystein von Rho-GTPasen mit einem Isoprenoid-Motiv ab, wodurch RhoA, Rac1 und Cdc42 nicht mehr an der Zelloberfläche verankert sind und ihre Funktionalität gestört wird (Shao *et al.*, 2003; Shao und Dixon, 2003). YopT wirkt dabei besonders effektiv auf RhoA was zur Zerstörung von Aktinstressfasern führt, modifiziert aber auch andere GTPasen wie Rac1 (Wong und Isberg, 2005; Zumbihl *et al.*, 1999). Durch die Modifikation von Rho-GTPasen ist YopT an der Inhibierung der Phagozytose durch Makrophagen und Neutrophile beteiligt (Grosdent *et al.*, 2002) und induziert zusammen mit YopE eine reduzierte Porenbildung (Viboud *et al.*, 2006). Das 25 kDa große **YopE** ist ein GTPase aktivierendes Protein (GAP), das die Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 von der aktiven GTP-gebundenen Form in die inaktive GDP-gebundene Form überführt (Aili *et al.*, 2006; Andor *et al.*, 2001). YopE ahmt somit eukaryotischer GAPs nach und führt zur Deaktivierung der Rho-GTPasen wodurch eine Depolymerisierung der Aktinfasern induziert wird und die Zellstruktur zerstört wird. Zusätzlich werden pro-inflammatorische Prozesse wie die IL-8 Produktion unterdrückt (Viboud *et al.*, 2006). **YopH** ist eine Phosphotyrosinphosphatase mit einem Molekulargewicht von 50 kD und einer katalytischen Domäne am C-Terminus. Am N-Terminus von YopH befindet sich sowohl die für die Translokation und Sekretion verantwortliche Domäne, als auch die Substratbindedomäne für phosphoryliertes p130^{Cas} (Black *et al.*, 1998; Montagna *et al.*, 2001). Eine Interaktion bakterieller Adhäsine, wie Invasin mit $\beta 1$ Integrinen führt zu einer Zusammenlagerung der Integrine und der Induktion einer intrazellulären Signalkaskade bei der Substrate wie das Crk-assoziierte p130^{Cas} (Cas), die fokale Adhäsionskinase (FAK) und Paxillin phosphoryliert werden, und zur Ausbildung von fokalen Adhäsionskomplexen führen (Cornelis, 2002c). Durch die von YopH induzierte Dephosphorylierung dieser Substrate in Neutrophilen, Makrophagen und Epithelzellen kommt es zur Zerstörung der Aktinstrukturen und somit zur Inhibierung der bakteriellen Phagozytose (Andersson *et al.*, 1996; Persson *et al.*, 1997). Neben dem anti-phagozytotischen Effekt ist das *Y. enterocolitica* YopH durch die

Blockierung der NADPH-Oxidase an der Unterdrückung des „oxidativen burst“ in PMNs beteiligt (Ruckdeschel *et al.*, 1996) während für das *Y. pseudotuberculosis* YopH eine Beteiligung bei der Fc-Rezeptor-vermittelten Inhibierung des „oxidativen burst“ nachgewiesen werden konnte (Bliska und Black, 1995). Des Weiteren blockiert YopH die Aktivierung von B- und T-Lymphozyten und ist bei der Induktion der Apoptose von T-Zellen beteiligt (Bruckner *et al.*, 2005, Alonso 2004). **YopO** von *Y. enterocolitica* (YpkA bei *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) ist ein 80 kDa großes Protein mit einer Serinprotease-Aktivität. Der N-Terminus des Proteins beinhaltet die Sekretions- und Translokationsdomäne und die Serin/Threonin Kinase-Domäne, gefolgt von der Rho-GTPase-Bindedomäne und einer Aktinbindedomäne im C-Terminus (Galyov *et al.*, 1993; Juris *et al.*, 2000). Die Aminosäuren 424-615 von YopO beinhalten ein Rac1-Bindedomäne die eine ähnliche Struktur zu den GDIs („guanidine nucleotide dissociation inhibitors“) der Rho-GTPasen hat und den Nukleotidaustausch in Rac1 und RhoA vermittelt (Prehna *et al.*, 2006). YpkA interferiert mit der für die Phagozytose nötigen Signaltransduktionskaskade, die über Gαq kontrolliert wird und verhindert die GTP-Bindung (Navarro *et al.*, 2007). Somit ist YopO/YpkA an der Modulierung des Aktinzytoskeletts und der Blockierung der Phagozytose durch Makrophagen beteiligt (Grosdent *et al.*, 2002). **YopP** von *Y. enterocolitica* (YopJ in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) inaktiviert die NF-κB- und MAPK-anhängigen Signalkaskaden die durch *Yersinia* über TLR2 und TLR4 induziert werden. Zunächst wurde vermutet, dass YopP als Cysteinprotease fungiert und die Ubiquitinreste von Komponenten der Signalkaskade wie TRAF6 („TNF-receptor-associated factor“ 6) abspaltet. Allerdings konnte gezeigt werden, dass YopP als Acetyltransferase fungiert und mit Hilfe von Acetyl-CoA die Serin- und Threoninreste acetyliert und somit die Aktivierungsdomäne von Map-Kinasen (MAPK) blockiert, da diese nicht mehr phosphoryliert werden können (Mittal *et al.*, 2006; Mukherjee *et al.*, 2006). Die durch YopP vermittelte Blockierung der NF-κB- und MAPK-anhängigen Signalkaskade induziert die Aktivierung der apoptotischen Kaskade und führt zur Apoptose in Makrophagen und dendritischen Zellen (Erfurth *et al.*, 2004; Viboud und Bliska, 2005). **YopM** besteht aus einer variablen Anzahl (13-20) 19 Aminosäuren langen Leucin-reichen Wiederholungen (LRR: „leucin-rich repeats“) und besitzt eine C-terminale Transportsequenz für den Nukleus (Cornelis, 2002b). Die Kristallstruktur zeigt YopM als eine zylindrische Form, die aus 4 Monomeren aufgebaut ist (Evdokimov *et al.*, 2001). Basierend auf seiner nuklearen Lokalisierung wurde YopM eine Beteiligung bei der Gentranskription

zugeschrieben, allerdings konnte dies bisher nicht eindeutig geklärt werden (Hoffmann *et al.*, 2004; Sauvonnnet *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass YopM mit den ribosomalen Proteinkinasen Rrk2 und Rsk1 interagiert und diese aktiviert, allerdings konnte bisher nicht gezeigt werden, dass diese Kinasen zelluläre Funktionen reguliert werden (McDonald *et al.*, 2003). Dennoch ist YopM essentiell für die Virulenz im Mausmodell (Leung *et al.*, 1990).

1.3.5 Adhäsine

Die Bindung von Bakterien an die Oberfläche von Wirtszellen ist essentiell für die ersten Schritte der Infektion, und ermöglicht die Besetzung spezieller Nischen. Diese Bindung resultiert in der Regel in einer Internalisierung durch Phagozytose oder durch Endozytose (Finlay und Cossart, 1997). Die für die Adhärenz verantwortlichen Moleküle werden als Adhäsine bezeichnet und können in Fimbrien-Adhäsine (Fimbrien und Pili) und nicht-Fimbrien-Adhäsine unterteilt werden. Nicht-Fimbrien-Adhäsine beinhalten alle nicht-Pilus-Adhäsine, wie das AfaD und AfaE von *E. coli*, das filamentöse Hämagglutinin (FHA) von *Bordetella pertussis*, die Opa-Proteine („opacity proteins“) von Neisserien, sowie Mitglieder der Oca-Familie wie das *Yersinia* Adhäsion YadA. Diese Adhäsine ermöglichen die Kolonisierung verschiedener Wirtszellen durch Interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen.

1.3.5.1 Invasin

Das *Yersinia* Invasin ist ein nicht-fimbrielles Außenmembranprotein, das durch das chromosomale *inv* Gen kodiert wird und N-terminal in der äußeren Membran verankert ist. Der C-terminale Teil des Proteins bildet die extrazelluläre Domäne. Das Invasin von *Y. pseudotuberculosis* hat ein Molekulargewicht von 103 kDa und besteht aus fünf globulären Domänen (D1-D5) (Hamburger *et al.*, 1999). Die CTLD („C-type-lectin-like domain“) Domäne D5 und die Ig-ähnliche Domäne D4 bilden eine Subdomäne, die als Adhäsionsmodul für die Interaktion mit Wirtszellen fungiert (Isberg und Barnes, 2000). Die Domäne D2 hingegen vermittelt intermolekulare Interaktionen, wodurch die multimere Form des Invasins auf der Zelloberfläche präsentiert wird und die Invasivität erhöht wird. Dem *Y. enterocolitica* Invasin (92 kDa) fehlt die D2 Domäne (Young *et al.*, 1990), wodurch die geringere Invasivität von *Y. enterocolitica* im Vergleich zu *Y. pseudotuberculosis* erklärt werden kann (Dersch und Isberg, 2000). *Y. pestis* hingegen besitzt ein 708 bp langes Insertionselement im

inv Gen, wodurch die Invasion in Wirtszellen blockiert wird (Simonet *et al.*, 1996). Die Invasinsynthese ist sowohl temperatur-, als auch pH-Wert-abhängig. Die Synthese von Invasin ist bei 37 °C reduziert, während eine maximale Synthese bei neutralem pH-Wert und 23 °C erreicht wird (Pepe *et al.*, 1994). Die Regulation erfolgt dabei über den Derepressor RovA, der die H-NS abhängige Blockierung des *inv* Promotors aufhebt und so die *inv*-Transkription ermöglicht (Ellison und Miller, 2006; Nagel *et al.*, 2001). Die Transkription von RovA wird zusätzlich durch den negativen Regulator RovM beeinflusst (Heroven und Dersch, 2006; Revell und Miller, 2000). Invasin ist essentiell für die Internalisierung enteropathogener Yersinien in die M-Zellen des Dünndarms. Die Aufnahme wird dabei durch Bindung von Invasin an fünf verschiedene Mitglieder der $\beta 1$ Integrin Familie ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha v\beta 1$) ermöglicht (Isberg und Leong, 1990; Leong *et al.*, 1990), welche auf M-Zellen lokalisiert sind (Clark *et al.*, 1998). Die Interaktion von Invasin mit $\beta 1$ Integrinen induziert eine Signalkaskade, bei der Komponenten des Zytoskeletts rekrutiert werden und zur Ausbildung eines „phagocytic cups“ führen wodurch eine nachfolgende Internalisierung des Erregers erfolgt (Cossart und Sansonetti, 2004).

1.3.5.2 „Attachment and invasion locus“ (Ail)

Das Ail Protein ist ein 17 kDa großes, chromosomal kodiertes Außenmembranprotein, das aus 8 membranspannenden amphiphatischen β -Faltblättern besteht und 4 kurze extrazelluläre Schleifen bildet. Bisher konnte Ail lediglich bei humanpathogenen *Yersina* Stämmen nachgewiesen werden (Miller *et al.*, 1989) Das Ail von *Y. enterocolitica* vermittelt eine von Invasin unabhängige Invasion von *E. coli* HB101 in verschiedene Zelllinien. Die durch Ail vermittelte Invasionsrate scheint jedoch zellspezifisch zu sein, da die bakterielle Aufnahme durch CHO Zellen stärker ist als durch HEp-2 und Hec1B Zellen (Miller und Falkow, 1988). Die genaue Beteiligung von Ail bei der Pathogenität konnte bisher nicht geklärt werden, da auch Ail-Mutanten im Mausmodell nicht attenuiert waren (Wachtel und Miller, 1995). Weiterhin vermittelt Ail einen serumresistenten Phänotyp (Bliska und Falkow, 1992). Die Serumresistenz wird durch die Interaktion von Ail mit der α -Kette des C4b-bindenden Proteins (C4BP) vermittelt, wodurch die komplementvermittelte bakterielle Lyse reduziert wird (Biedzka-Sarek *et al.*, 2008; Kirjavainen *et al.*, 2008).

1.3.5.3 *Yersinia* Adhäsion A (YadA)

Das zunächst als P1 oder Yop1 bezeichnete *Yersinia* Adhäsion YadA, wurde zunächst als plasmidkodierter Virulenzfaktor beschrieben, der eine Autoagglutination in *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* induzierte (Bolin *et al.*, 1982; Skurnik *et al.*, 1984) und mit der Serumresistenz in *Y. pseudotuberculosis* assoziiert wurde (Balligand *et al.*, 1985). Das *yadA* Gen ist auf dem 70 kb großen *Yersinia* pYV-Plasmid lokalisiert, und in den meisten *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* Stämmen vorhanden. (Rosqvist *et al.*, 1988; Skurnik and Wolf-Watz, 1989). In *Y. pestis* wird YadA aufgrund einer Mutation im *yadA* Gen, die zu einer Verschiebung des Leserahmens führt, nicht synthetisiert (Rosqvist *et al.*, 1988; Skurnik and Wolf-Watz, 1989). 270 bp vor dem *yadA* Startkodon befindet sich ein σ^{70} -Typ Promotor, während der *yadA* Terminator rho-unabhängig ist (Skurnik und Wolf-Watz, 1989). Die *yadA* Expression erfolgt bei 37 °C durch den Transkriptionsaktivator VirF (LcrF), und ist im Gegensatz zur Expression der Yops unabhängig von der Ca^{2+} Konzentration (Bolin *et al.*, 1982; Skurnik *et al.*, 1994; Skurnik und Toivanen, 1992). Bereits zwei Minuten nach Erhöhung der Temperatur von 30 °C auf 37 °C, kann die Synthese von YadA in der äußeren Membran nachgewiesen werden (Böllin *et al.*, 1982). Zusätzlich ist für die verstärkte Synthese von YadA eine Anzucht in Mangelmedium von Vorteil (Kapperud *et al.*, 1985).

1.3.5.3.1 Struktur des YadA

Sequenzvergleiche des YadA verschiedener *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* Stämme zeigten, dass YadA ein Polypeptid aus 422-455 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 41-44 kDa ist (Skurnik und Wolf-Watz, 1989). Das YadA Protein bildet in SDS-Gelen hitzestabile Aggregate mit einem Molekulargewicht von 160-240 kDa, die eine Oligomerisierung von 3 Monomeren darstellen (El Tahir und Skurnik, 2001; Gripenberg-Lerche *et al.*, 1995; Tamm *et al.*, 1993). Die besondere Stabilität von nativem YadA wurde zusätzlich für *Yersinia* gezeigt werden, die selbst nach 20 minütiger Inkubation bei 80 °C, oder nach einer Proteasebehandlung noch an Kollagen Typ I banden (Emody *et al.*, 1989). Auch die Behandlung der Bakterien mit Harnstoff, oder die Veränderung des pHs auf Werte zwischen 5 und 10, zeigte keinen Effekt auf die Kollagenbindung (Skurnik *et al.*, 1984). Frühere elektronenmikroskopische Untersuchungen ließen vermuten, dass das YadA 50-70 nm lange fibrilläre Strukturen ausbildet (Kapperud *et al.*, 1985), aber erst später konnte

gezeigt werden, dass YadA als 23 nm lange Lollipop-ähnliche Oberflächenstrukturen auf der bakteriellen Außenmembran lokalisiert ist (Hoiczky *et al.*, 2000) (Abb. 1).

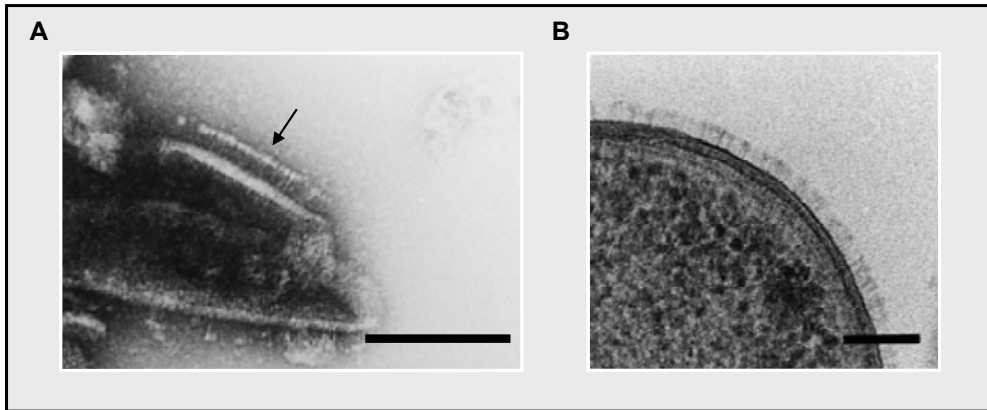


Abb. 1 Elektronenmikroskopischer Nachweis von YadA auf der Zelloberfläche von *Y. enterocolitica* O:8 nach Hoiczky *et al.* 2000. A: Ultrastrukturanalyse der negativ markierten Zellhülle von WA-314. Das YadA kann als „lollipop“-ähnliche Strukturen auf der bakteriellen Zelloberfläche nachgewiesen werden (Pfeil). B: YadA bedeckt die Zelloberfläche des Stamm WA-314. Größenbalken = 100 nm.

Weitere Analysen C- und N-terminal verkürzter YadA-Mutanten führte zur Identifizierung verschiedener YadA-Domänen, die mit diversen Funktionen des Proteins korrelieren (Roggenkamp *et al.*, 1995; Roggenkamp *et al.*, 1996; Tamm *et al.*, 1993). Basierend auf den funktionalen und strukturellen Eigenschaften des YadA, wurde das homotrimere YadA Protein in drei Domänen unterteilt: eine N-terminale Kopfdomäne, eine je nach Serotyp variable Stieldomäne und ein C-terminaler Membrananker (Hoiczky *et al.*, 2000; Roggenkamp *et al.*, 2003) (Abb. 2). Die YadA-Kopfdomäne umfasst die Aminosäuren 29-194 und besteht aus neun linkshändigen parallelen β -Faltblättern pro Monomer. Innerhalb der Kopfdomäne befindet sich achtmal ein NSVAIGXXS-Motiv das für die Kollagenbindung essentiell ist (Nummelin *et al.*, 2004; Tahir *et al.*, 2000). Die Verbindung der YadA-Kopfdomäne mit der Stieldomäne erfolgt durch die YadA-Halsdomäne, den sog. Konnektor, und ist aus drei haarnadelähnlichen Strukturen aufgebaut (Nummelin *et al.*, 2004). Der YadA-Stiel ist aus rechtshändigen „coiled-coils“ aufgebaut, die sich aus einer vom Serotyp abhängigen variablen Anzahl (6-9) an „15mer repeats“ zusammensetzen. Der hochkonservierte C-terminale Membrananker besteht aus 4 amphipathischen transmembranen β -Strängen pro Monomer, die eine 12-strängige Pore in der äußeren Membran bilden, wodurch das YadA in der äußeren Membran verankert wird (Nummelin *et al.*, 2004; Hoiczky *et al.*, 2000; Koretke *et al.*, 2006). Dabei ist vor allem der hydrophobe Charakter des C-

Terminus typisch für die Membranankerdomäne bakterieller Außenmembranproteine (Tamm *et al.*, 1993). Mit Hilfe spektroskopischer Untersuchungen konnten im C-terminalen Membrananker nicht nur β -Faltblattstrukturen, sondern auch ein α -helikaler Abschnitt identifiziert werden, der eine „coiled-coil“-Struktur bildet und somit die Transmembranpore verschließen kann, wodurch die extreme Hitzestabilität und Proteaseresistenz von YadA erklärt werden kann (Wollmann *et al.*, 2006). Diese als Linker bezeichnete Region bildet ein rechtshändigen „coiled-coil“.

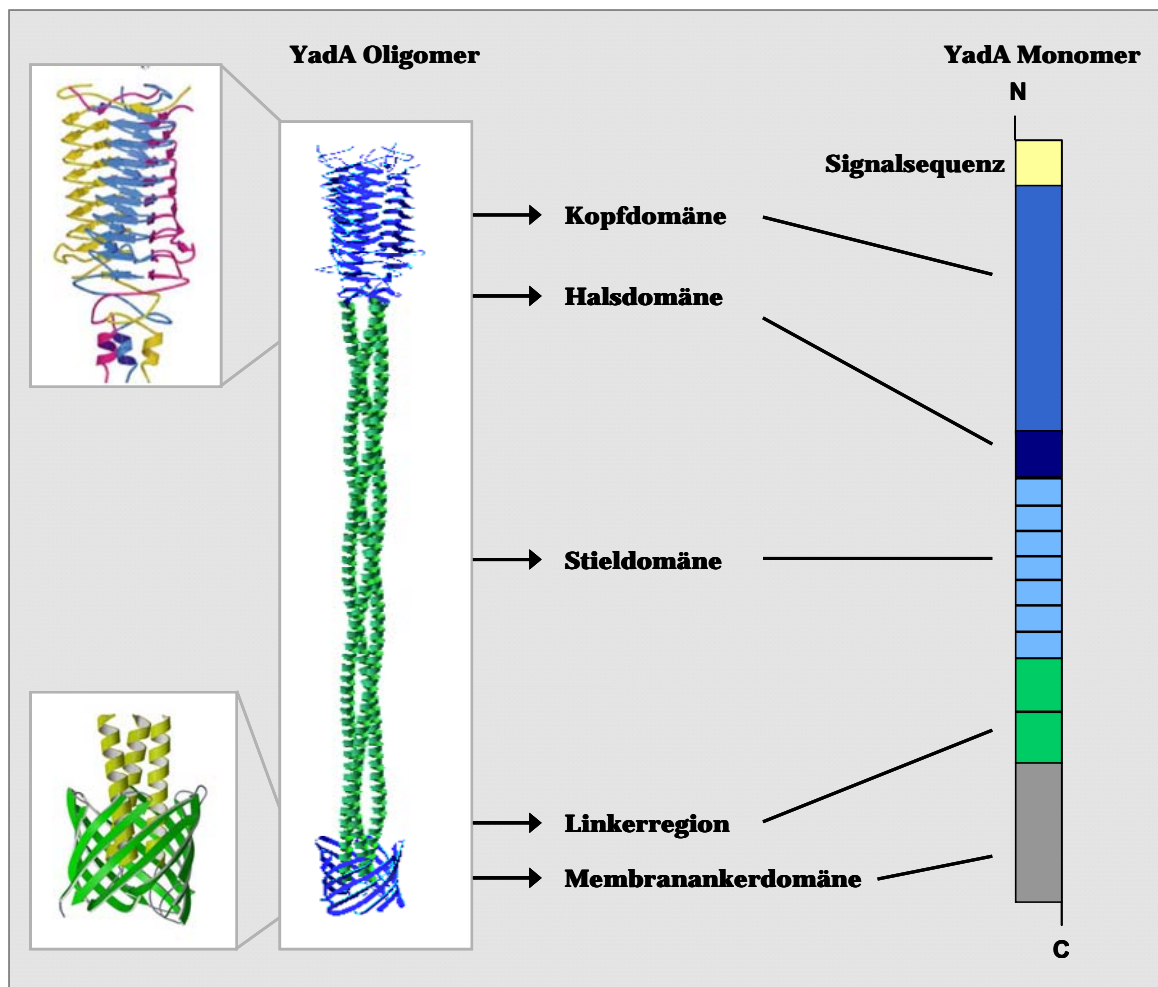


Abb. 2 Struktur des *Yersinia* Adhäsins YadA. Links: Modell des YadA Oligomers erstellt mit dem DeepView PDB Programm. Struktur des Membranankers nach Koretke *et al.*, 2004, und Struktur der Kopfdomäne nach Nummelin *et al.*, 2004. Rechts: lineare Darstellung des YadA Monomers von *Y. enterocolitica* WA-314. Die N-terminale Signalsequenz, die Kopfdomäne, die Halsdomäne (Konnektor), die Stieldomäne (aus sieben „15mer repeats“), die Linkerregion (aus zwei „7mer repeats“), sowie der C-terminale Membrananker sind dargestellt.

1.3.5.3.2 Funktionen des YadA

Bei YadA handelt es sich um ein multifunktionales Protein, dessen unterschiedliche Funktionen durch bestimmte YadA-Domänen vermittelt werden. Studien verschiedener YadA-Deletionsmutanten zeigten, dass die YadA-Kopfdomäne für die Bindung an Kollagen verantwortlich ist, da eine YadA_{Ye03-Δ83-104} Mutante keine Kollagenbindung mehr aufwies (Tamm *et al.*, 1993), und der Austausch der Histidine im HSSH-Motiv des YadA (AS 159-162) gegen Tyrosine die Bindung des YadA von *Y. enterocolitica* O:8 an Kollagen deutlich reduzierte (Roggenkamp *et al.*, 1995). Zusätzlich konnte die für die Kollagenbindung notwendige Interaktionsdomäne auf die YadA Aminosäuren 26-241 festgelegt werden, wobei vor allem die hydrophoben NSVAIGXXS-Motive der YadA-Kopfdomäne an der Bindung von Kollagen Typ I und IV beteiligt sind (Tahir *et al.*, 2000), aber auch die YadA-Halsdomäne (AS 190-221) essentiell für die Interaktion mit Kollagen ist (Roggenkamp *et al.*, 2003). Die Identifizierung der für die Interaktion notwendigen Strukturen im Kollagen werden kontrovers diskutiert, da früher eine konservierte Region in der $\alpha 1$ -Kette des Kollagen für die Bindung von YadA identifiziert wurde (Schulze-Koops *et al.*, 1992; Schulze-Koops *et al.*, 1995), eine neuere Studie aber vermuten lässt, dass die dreifach-helikale Struktur des Kollagens für die YadA-Bindung ausreichend ist (Leo *et al.*, 2008) (Abb. 3). Neben Kollagen, interagiert YadA mit weiteren EZM-Proteinen, wie Laminin und Fibronectin, wobei die Bindung an Fibronectin im Vergleich zur Bindung an Kollagen und Laminin schwächer ist (Heise und Dersch, 2006; Roggenkamp *et al.*, 2003). Neben der Fähigkeit EZM-Proteine zu binden, vermittelt die YadA-Kopfdomäne die bakterielle Autoagglutination/Aggregation (Balligand *et al.*, 1985; Hoiczky *et al.*, 2000; Skurnik *et al.*, 1994) (Abb. 3). Der exakte Bereich in YadA, der die Autoaggregation vermittelt, konnte zwar bisher nicht identifiziert werden, allerdings scheint eine hydrophobe Domäne innerhalb der YadA-Kopfdomäne beteiligt zu sein (Skurnik *et al.*, 1984; Tamm *et al.*, 1993). Weiterhin ist die YadA-Kopfdomäne an der Bindung verschiedener Epithelzellen wie HeLa und HEp-2 Zellen beteiligt und vermittelt so die Anheftung der Yersinien an die Wirtszellen (Bukholm *et al.*, 1990; Heesemann und Gaede, 1989; Roggenkamp *et al.*, 1995; Roggenkamp *et al.*, 1996). Das YadA von *Y. pseudotuberculosis* induziert eine Internalisierung in HEp-2 Zellen durch Interaktion mit $\beta 1$ Integrinen über Fibronectin (Brückenmechanismus) (Bliska *et al.*, 1993; Eitel und Dersch, 2002; Heise und Dersch, 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass für die Interaktion von YadA mit humanen Neutrophilen die N-terminalen Aminosäuren 29-81

notwendig sind (Roggenkamp *et al.*, 1996). Dieser Kontakt ermöglicht die Injektion der Effektorproteine in die Zellen, wodurch der „oxidative burst“ der neutrophilen Granulozyten unterdrückt wird (Ruckdeschel *et al.*, 1996).

Eine weitere wichtige YadA-vermittelte Virulenzeigenschaft ist die Resistenz gegen die komplementvermittelte bakterielle Lyse. Es konnte gezeigt werden, dass ein Überleben von Yersinien in humanem Serum sowohl unabhängig von der YadA-Kopf- und Halsregion, als auch von den ersten vier „15mer repeats“ der YadA-Stieldomäne ist, da Deletionen in diesen Bereichen die Serumresistenz von Yersinien nicht beeinträchtigen (Roggenkamp *et al.*, 2003). Durch den Austausch der YadA-Membranankerdomäne durch Membrananker homologer Oca-Proteine wie das *E. coli* EibA, *Haemophilus influenzae* Hia, oder *Moraxella catarrhalis* UspA1 konnte gezeigt werden, dass vor allem die YadA-Membranankerdomäne für das Überleben in humanem Serum essentiell ist (Ackermann *et al.*, 2008). C4BP (C4b-bindendes Protein) und Faktor H sind Regulatoren des Komplementsystems welche die Aktivierung des klassischen oder alternativen Weges regulieren. Beide Regulatoren wirken als Cofaktoren, wobei Faktor H an der Faktor I-abhängigen Spaltung von C3b in die inaktive Form iC3b beteiligt ist (Sim *et al.*, 1981; Whaley und Ruddy, 1976), während C4BP an der Faktor I-abhängigen Spaltung von C4b in C4a und C4c beteiligt ist. Zusätzlich induzieren Faktor H und C4BP den Abbau der C3 Konvertase des alternativen und klassischen Komplementweges (Gigli *et al.*, 1979). Für das *Y. enterocolitica* O:3 YadA konnte gezeigt werden, dass es zusammen mit dem Ail Protein an der Bindung von C4BP beteiligt ist und die komplementvermittelte Lyse verhindert (Biedzka-Sarek *et al.*, 2008). Zusätzlich wurden verschiedenen Motive im YadA-Stielbereich für die Bindung von Faktor H identifiziert, wobei die Bindung von Faktor H alleine, für Komplementresistenz nicht ausreicht (Biedzka-Sarek *et al.*, 2008).

Der C-terminale YadA-Membrananker ist an der Insertion von YadA in die äußere Membran verantwortlich (Tamm *et al.*, 1993), wobei die Stabilität und Exportrate des YadA von einem Glycin (AS 389) im Membrananker beeinflusst wird (Grosskinsky *et al.*, 2007). Weiterhin zeigte der Austausch der YadA-Membranankerdomäne durch Membrananker homologer Oca-Proteine wie UspA1, Hia und EibA, eine korrekte Translokation des YadA auf die Zelloberfläche, so dass angenommen werden kann, dass sich die Membrananker YadA-homologer Proteine gegenseitig ersetzen können (Ackermann *et al.*, 2008). Die Rolle des *Y. enterocolitica* YadA als Virulenzfaktor konnte im Mausinfektionsmodell aufgezeigt werden,

da *yadA* Mutanten mit fehlender Kollagenbindeigenschaften, oder Neutrophilbindefunktion vollständig attenuiert sind (Roggenkamp *et al.*, 1996; Tamm *et al.*, 1993). Außerdem wird vermutet, dass YadA an der Persistenz von Yersinien in den Peyer'schen Plaques beteiligt ist (Bliska *et al.*, 1993).

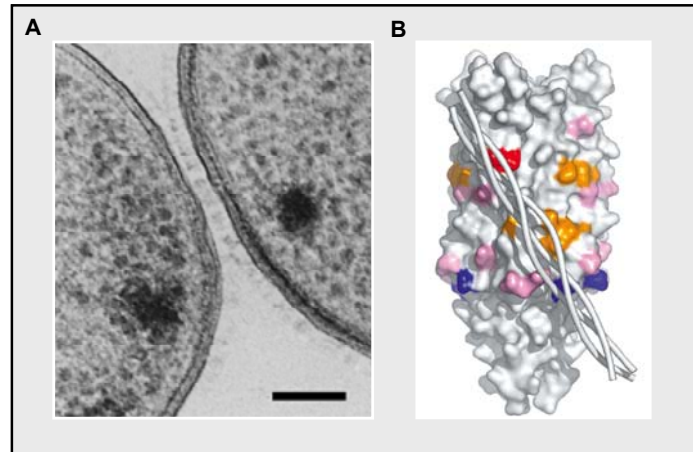


Abb. 3 YadA-vermittelte Autoaggregation und Kollagenbindung. A: Elektronenmikroskopischer Nachweis der Autoaggregation in *Y. enterocolitica* O:8. Größenbalken = 100 nm (Hoiczky *et al.*, 2000). B: Modell der Interaktion von YadA (Serotyp O:3) mit der dreifach-helikalen Kollagen Typ I-Faser nach Nummelin *et al.*, 2004.

1.3.6 Autotransporter

Die Proteinsekretion Gram-negativer Bakterien erweist sich durch das Vorhandensein der äußeren Membran im Vergleich zu Gram-positiven Bakterien als besonders komplex, und führte zur Entwicklung verschiedener Proteinsekretionsmechanismen. Die Sekretionswege Gram-negativer Bakterien werden in die Sekretionssysteme Typ I-VII unterteilt (Dautin und Bernstein, 2007; Pukatzki *et al.*, 2006) wobei das Typ VII System erst 2007 in Mykobakterien entdeckt wurde (Abdallah *et al.*, 2007). Des Weiteren kann der Proteintransport in Sec-abhängige (Typ II, Chaperon Usher CU, Typ V) und Sec-unabhängige Transportsysteme (Typ I, III, IV) unterteilt werden. Proteine die Sec-abhängig transportiert werden, besitzen eine N-terminale Signalsequenz, die eine Translokation der Proteine über den Sec-Apparat ins Periplasma ermöglicht, und abgespalten wird. Die Sekretion der periplasmatisch lokalisierten Proteine durch die äußere Membran erfolgt anschließend entweder über den Chaperon Usher Weg, das Typ II Sekretionssystem oder durch das Typ V Sekretionssystem, dem sogenannten Autotransporter System. Das Typ V Sekretionssystem beinhaltet die konventionellen Autotransporter, das Zwei-Partner-Sekretionssystem („two partner system“-TPS) und die

trimeren Autotransporter, und ist im Gegensatz zu den Systemen I, II, III, IV, VI und VII relativ einfach, da alle für die Translokation des Proteins notwendigen Informationen im Protein selbst enthalten sind (Henderson *et al.*, 2004). Autotransporter bestehen aus einer N-terminalen Signalsequenz, die eine Sec-abhängige Translokation durch die innere Membran ermöglicht und anschließend abgespalten wird, einer sog. Passengerdomäne die das reife Protein darstellt, und einem C-terminalen Translokator, der eine Pore aus β -Faltblättern („ β -barrel“) in der Membran bildet (Henderson *et al.*, 1998). Der genaue Mechanismus der Translokation der Passengerdomäne durch die äußere Membran ist bisher unklar, allerdings wurden drei verschiedene Modelle vorgeschlagen. Beim „Hairpin-Modell“ wird angenommen, dass der C-Terminus der Passengerdomäne zunächst eine Schleife in der Pore bildet, und das Protein C-terminal durch die Pore gezogen wird (Oomen *et al.*, 2004). Das Omp85 Modell nimmt an, dass die Passengerdomäne bereits teilweise im Periplasma gefaltet wird, und die Translokation des Passengers sowie die die Integration der β -Domäne durch das Außenmembranprotein Omp85/YaeT stattfindet (Voulhoux *et al.*, 2003; Voulhoux und Tommassen, 2004). Das multimere Modell geht davon aus, dass die Passengerdomäne teilweise im Periplasma gefaltet wird, und schließlich durch einen Kanal, aus einem multimeren Komplex von „ β -barrel“-Poren transloziert wird (Veiga *et al.*, 2002).

Bei klassischen Autotransportern erfolgt nach der Translokation eine proteolytische oder autokatalytische Abspaltung der Passengerdomäne, und diese wird entweder ins extrazelluläre Milieu abgegeben wie es bei der IgA Protease von *N. gonorrhoeae* der Fall ist, oder bleibt wie beim *E. coli* AIDA-I Protein nicht-kovalent am „ β -barrel“ gebunden (Pohlner *et al.*, 1987). Im Gegensatz zu konventionellen Autotransportern, die als ein einziges Polypeptid transloziert werden, werden im Zwei-Partner-Sekretionssystem die Passengerdomäne (TpsA =Exotoxin) und die Translokatorodomäne (TpsB) als zwei getrennte Proteine transloziert, wobei das ungefaltete TpsA aufgrund eines Sekretionssignals in die Pore eingefädelt werden kann (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004). Eine weitere Subfamilie der Autotransporter stellen die sogenannten Oca-Proteine („oligomeric coiled-coil adhesins“) dar, die auch als trimere Autotransporter-Adhäsine (TAA) bezeichnet werden (Cotter *et al.*, 2005; Hoiczky *et al.*, 2000; Roggenkamp *et al.*, 2003). Der Prototyp dieser Familie nicht-Fimbrien-Adhäsine ist das *Yersinia* Adhäsine YadA (Hoiczky *et al.*, 2000). Sequenzvergleiche zeigen eine Vielzahl YadA-homologer Proteine innerhalb der α -Proteobakterien (*Sinorhizobium meliloti*), β -Proteobakterien (*Neisseria meningitidis* NadA) und γ -Proteobakterien (*Escherichia coli* Eib,

Haemophilus influenzae Hia, *Moraxella catarrhalis* UspA1, UspA2) (Hoiczky *et al.*, 2000) sowie einige Vertreter innerhalb der δ -, ϵ - Proteobakterien und Cyanobakterien (Szczeny und Lupas, 2008). Charakteristisch für Oca-Proteine ist ihre trimere Struktur bestehend aus einer variablen N-terminalen Kopfdomäne, einem Stiel der aus „coiled-coils“ aufgebaut ist, und einer C-terminalen Membranankerdomäne. Der C-terminale Membrananker ist innerhalb verschiedener Oca-Proteine stark konserviert, während die Kopf- und Stieldomänen meist eine unterschiedliche Anzahl repetitiver Elemente aufweisen (Hoiczky *et al.*, 2000; Szczeny und Lupas, 2008). Die Autotransportersekretion konventioneller und trimerer Autotransporter erfolgt zwar zunächst bei beiden Systemen über den Sec-Apparat, allerdings bilden konventionelle Autotransporter eine Pore in der äußeren Membran, die meist aus einer Einheit aus 12 β -Faltblättern aufgebaut ist (z.B. NalP von *Neisseria meningitidis*, Oomen *et al.*, 2004), während das „ β -barrel“ von trimeren Autotransportern durch drei identische Monomere mit je vier β -Faltblättern gebildet wird (Cotter *et al.*, 2005; Dautin und Bernstein, 2007). Dabei sind die C-terminalen Bereiche des Membranankers (~ 70 AS) für die Ausbildung eines effizienten Translokators essentiell (Roggenkamp *et al.*, 2003; Surana *et al.*, 2004). Zusätzlich besitzen viele konventionelle Autotransporter wie das BrkA von *Bordetella pertussis* eine intramolekulare Chaperondomäne, die für die extrazelluläre Abspaltung der Passengerdomäne verantwortlich ist, die bei trimeren Autotransportern jedoch fehlt (Surana *et al.*, 2004), da die Passengerdomäne trimerer Autotransporter nach der Translokation durch die äußere Membran an der Translokatoromäne kovalent gebunden bleibt (Cotter *et al.*, 2005).

1.4 Die Gattung *Neisseria*

Bakterien der Gattung *Neisseria* gehören zur Familie der *Neisseriaceae* (β -Proteobakterien) und wurden nach dem Mediziner Albert Neisser benannt, der *N. gonorrhoeae* 1897 erstmals entdeckte. Neisserien sind Gram-negative, unbewegliche, sporenlose Diplokokken mit einer Größe von 0,6-1,5 μm . Sie bilden runde, opaque, meist schleimige Kolonien und wachsen bei 37 °C und 3-10 % CO_2 . Die Gattung *Neisseria* beinhaltet 12 Arten mit kommensalen Vertretern, wie *Neisseria cinerea*, *Neisseria mucos*, *Neisseria lactamica* und *Neisseria sicca*, sowie zwei humanpathogene Vertreter, *Neisseria meningitidis* (Meningokokken) und *Neisseria gonorrhoeae* (Gonokokken). Sowohl Meningokokken als auch Gonokokken sind humanpathogene Erreger die den Nasenrachenraum, oder den Urogenitaltrakt besiedeln, und unterschiedliche Krankheitsbilder induzieren. Meningokokken werden basierend auf der

Zusammensetzung ihrer Polysaccharidkapsel in 13 verschiedene Serogruppen unterteilt (A, B, C, 29E, H, I, K, L, M, W135, X, Y und Z). Invasive Meningokokken-Stämme werden zusätzlich durch die Multilokus-Enzymelektrophorese-Technik in verschiedene elektrophoretische Typen (ET37, ET5, Cluster A4, Linie 3, und Untergruppe I, III, und IV-1) unterteilt (Caugant *et al.*, 1986). Eine weitere Klassifizierung von Meningokokken erfolgt durch das sogenannte „multilocus sequence typing“, wodurch Meningokokken in 49 Sequenztypen (ST) unterteilt werden (Maiden *et al.*, 1998).

1.5 Verbreitung und Klinik humanpathogener *Neisseria*

N. gonorrhoeae wird durch sexuellen Kontakt übertragen, und gilt allgemein als obligat pathogen. Primär infizieren Gonokokken den Urogenitaltrakt wo es zur Ausbildung der Gonorrhö, einer eitrigen infektiösen Urethritis kommt. Bei Frauen können Gonokokken auch asymptomatisch im Urogenitaltrakt persistieren. In seltenen Fällen gelangen die Gonokokken in tiefere Gewebe oder in die Blutbahn und können eine schwere Sepsis induzieren. Gonokokken infizieren in der Regel die Schleimhäute des Harnleiters oder der Gebärmutter, können aber auch das Rektum und die Bindehaut besiedeln (Handsfield und Schwebke, 1990; Merz und So, 2000).

Meningokokken besiedeln asymptomatisch die Schleimhäute der oberen Atemwege beim Menschen mit einer Häufigkeit von 3-30 %. Immunkompetente Menschen sind wahrscheinlich aufgrund einer erworbenen Immunität resistent gegen eine Infektion mit kolonisierenden Meningokokken. Im Gegensatz dazu kann *N. meningitidis* vor allem bei Abwehrschwachen (meist Patienten mit Defekten im Komplementsystem) und Kleinkindern zu schweren Septikämien und Gehirnhautinfektionen (Meningitis) führen. Invasive Meningokokkenerkrankungen treten vor allem bei Kindern unter 5 Jahren auf. Die häufigsten durch Meningokokken verursachten Krankheitsbilder sind die Meningitis (Entzündung der harten und weichen Hirnhäute oder Rückenmarkshäute) und die schwere Sepsis, die häufig zum Tode führt (20-30 %). Weitere Manifestationen sind die septische Arthritis, die Pneumonie, Otitis oder Sinusitis. Lediglich in seltenen Fällen kommt es zur Ausbildung einer chronischen Sepsis mit Fieber und starken Kopfschmerzen. Die am häufigsten mit Krankheiten assoziierten *N. meningitidis* Stämme gehören zu den Serogruppen A, B, C, W135 und Y (Tzeng und Stephens, 2000). *N. meningitidis* ist weltweit der Hauptverursacher der bakteriellen Meningitis und ist immer wieder für endemische und epidemische Ausbrüche

verantwortlich (Merz und So, 2000). Die Serogruppen B und C werden häufig mit Erkrankungen in Europa und Amerika assoziiert, und führten zu verschiedenen Ausbrüchen in Spanien (1995-75) und den USA (1992-93), während in Afrika vermehrt die Serogruppen A und C auftreten (Bernardini *et al.*, 2007; Tzeng und Stephens, 2000). Für Deutschland meldete das Robert-Koch Institut für das Jahr 2008 insgesamt 452 invasive Meningokokkeninfektionen, die durch B- und C-Meningokokken verursacht wurden und eine Letalitätsrate von 9,7 % aufwiesen (Robert Koch Institut, 2009). Eine wirksame Impfung basierend auf Kapselpolysacchariden ist bisher nur für die Stämme der Serogruppen A, C, W135 und Y vorhanden. Da die Polysaccharidkapsel von B-Meningokokken mit seinem Zuckerbaustein N-Acetylneuraminsäure Ähnlichkeiten zu den Zuckerresten von humanen Glykoproteinen hat, können keine auf der Kapsel-basierende Impfstoffe eingesetzt werden (Finne *et al.*, 1983). Für B-Meningokokken wurde daher ein 5 Komponenten Impfstoff (5CVMB) entwickelt, der Ratten vor einer Infektion mit B-Meningokokken schützt, und aus 5 verschiedenen Antigenen besteht (Giuliani *et al.*, 2006).

1.6 Pathogenese und Virulenz von *N. meningitidis*

Meningokokken gelangen über Aerosole, oder Sekret in Kontakt mit den Schleimhäuten der oberen Atemwege. Hier erfolgt zunächst die Besiedelung der oberen Schleimhaut. Unter bisher nicht klar definierten Bedingungen können die Meningokokken das Epithelium des Nasopharynx mittels Transzytose über Epithelzellen (Stephens *et al.*, 1983), oder mittels Phagozyten durchqueren und in die Submukosa gelangen. Von dort aus kann *N. meningitidis* in die Blutbahn übertreten und eine Bakteremie mit anschließender Sepsis induzieren, sowie die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Virji, 2009). Wie *N. meningitidis* die Blut-Hirn-Schranke überwindet, ist bisher nicht genau geklärt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Meningokokken, die an die apikale Oberfläche von HUVEC Endothelzellen binden, die Integrität der „adherence junctions“ (AJ) und „tight junctions“ (TJ) durch Ausbildung von „junction-ähnlichen“ Domänen an apikaler Stelle der Zelle destabilisieren, und so ein Durchbrechen der Endothelzellbarriere bewirken (Coureuil *et al.*, 2009).

1.6.1 Allgemeine Virulenzfaktoren

Das Genom von *N. meningitidis* ist mit seinen ca. 2200 kb relativ klein, kodiert aber für verschiedene Pathogenitätsfaktoren, die die Kolonisierung von Wirtszellen und Blockierung der Immunantwort ermöglichen (Abb. 4).

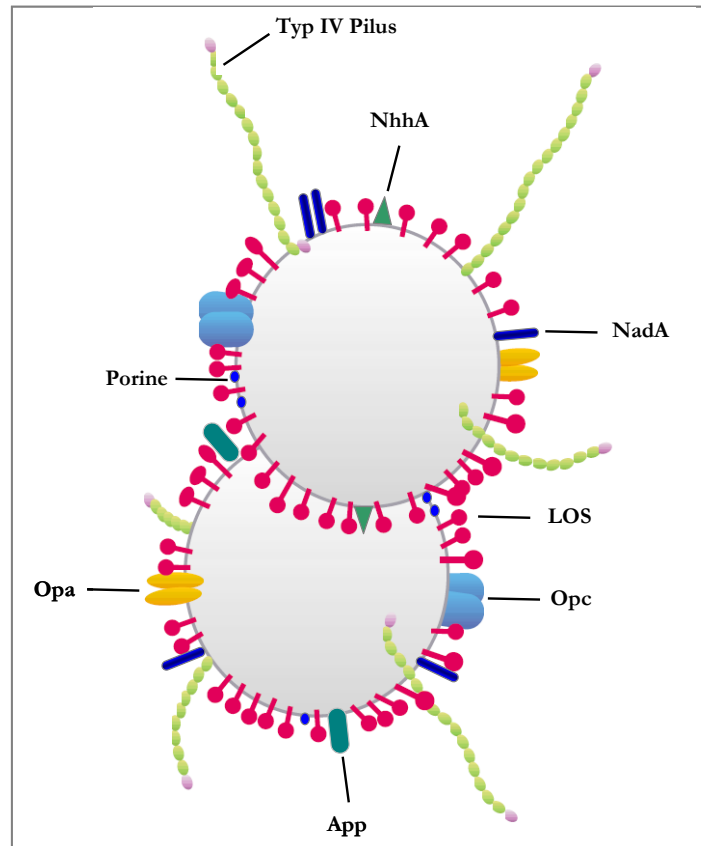


Abb. 4 Schematische Darstellung der wichtigsten Virulenzfaktoren von *N. meningitidis* nach Corbett *et al.*, 2004 modifiziert.

Die *Neisseria* Typ IV Pili vermitteln wahrscheinlich den ersten Kontakt der Bakterien mit der Wirtszelle und sind an der genetischen Kompetenz und „twitching motility“ beteiligt (Wall und Kaiser, 1999). Die Pilusfibrille besteht aus mehreren Pile-Einheiten (Hauptpilin) und verschiedenen pilus-assoziierten Proteinen, wobei das eigentliche Adhäsion, die 110 kDa PilC-Untereinheit an der Spitze der Fibrille lokalisiert ist und den Kontakt zur Wirtszelle herstellt (Nassif *et al.*, 1994). Der Pilusrezeptor pathogener Neisserien ist das Membrankofaktorprotein CD46 (Kallstrom *et al.*, 1997). Der *pilE*-Lokus beinhaltet variable Regionen, die durch homologe Rekombination mit dem inaktiven *pilS*-Lokus eine Veränderung der Pilustruktur ermöglichen (antigene Variation) (Gibbs *et al.*, 1989; Stephens *et al.*, 1985). Des Weiteren werden Pilustrukturen von *Neisseria* posttranslational modifiziert (z.B. glykosyliert), wodurch die Agglutination der Bakterien beeinflusst wird (Virji *et al.*, 1993).

In einem zweiten Schritt der Adhäsion bindet *N. meningitidis* über die Opa-Proteine und Opc an spezifische Rezeptoren der Wirtszelle, wodurch eine Transzytose durch die subepithelialen Zellschichten induziert wird. Opa („opacity associated“)-Proteine sind

Außenmembranproteine, die aus einem „ β -barrel“ aus 8 Transmembrandomänen und 4 extrazellulären Schleifen („loops“) aufgebaut sind. Diese vier Schleifen haben zwei variable und eine semi-variable Region, die vermutlich für die Ausbildung verschiedener Opa-Varianten verantwortlich sind. Die Opa-Proteine von *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* ermöglichen die Interaktion mit verschiedenen Zelltypen und geben den Kolonien ein opaques Erscheinungsbild. Opa_{HS}-Proteine induzieren die Bindung und Invasion in verschiedene Epithelzellen mittels Heparansulfatproteoglykanen wodurch eine intrazelluläre Signalkaskade induziert wird, die zur Phagozytose und Veränderung des Zytoskeletts führt (Dehio *et al.*, 1998a; Hauck und Meyer, 2003). Opa_{CEA}-Proteine hingegen interagieren mit Wirtszellrezeptoren der CEACAM-Familie („carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules“) (Virji *et al.*, 1996a; Virji *et al.*, 1996b), vor allem mit CEACAM1, das sowohl auf Endothel- als auch auf Epithelzellen vorkommt. CEACAMs sind Adhäsionsmoleküle einer Gruppe Immunglobulin-ähnlicher Glykoproteine, die von verschiedenen Erregern als Wirtszellrezeptoren verwendet werden können. Die Opa-CEACAM Interaktion führt zur zellulären Invasion und Transzytose der Neisserien (Muenzner *et al.*, 2000; Virji *et al.*, 1999). Das Opc von *N. meningitidis* ist ein Außenmembranprotein aus zehn Transmembrandomänen und 5 extrazellulären Schleifen, das wie die Opa-Proteine an der Invasion von Wirtszellen beteiligt ist (Merker *et al.*, 1997). Opc bindet Heparansulfatproteoglykan und extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin und Vitronectin, wodurch eine Interaktion mit Integrinen ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$) vermittelt werden kann (Unkmeir *et al.*, 2002b; Virji *et al.*, 1999). Dadurch wird eine verstärkte Invasion in „human brain microvascular cells“ (HBMC) induziert, was vermuten lässt, dass Opc an der Überwindung der Bluthirnschranke beteiligt ist (Unkmeir *et al.*, 2002b). Eine neuere Studie konnte zusätzlich zeigen, dass Opc mit α -Actinin interagiert (Cunha *et al.*, 2009). Die Interaktion der Meningokokken mit dem Endothel kann zur Aufnahme der Bakterien in die Blutbahn führen und eine Verbreitung der Infektion begünstigen.

Für das Überleben in humanem Serum sind weitere Virulenzfaktoren wie die Polysaccharidkapsel und die Lipooligosaccharide essentiell. Im Gegensatz zu *N. gonorrhoeae* besitzen Meningokokken eine Polysaccharidkapsel, die antiphagozytische und protektive Eigenschaften vermittelt, und so das Überleben der Bakterien in der Blutbahn, im Liquor und Vakuolen ermöglicht. Basierend auf der chemischen Struktur der Polysaccharidkapsel werden Meningokokken in 13 Serogruppen unterteilt. Die Kapsel der Serogruppen B, C, W135 und Y

besteht im Gegensatz zu A-Meningokokken (N-Acetylmannosaminphosphat) aus N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure). Bei den Serogruppen B und C ist das Sialinsäure-Homopolymer unterschiedlich verknüpft (B: α -2-8; C: α -2-9), während die Sialinsäure der W- und Y-Meningokokken mit Galaktose und Glukose verknüpft ist (Bhattacharjee und Jennings, 1976; DeVoe, 1982). Die Sialinsäuresynthese wird durch die Gene *siaA*, *siaB*, und *siaC* kodiert und benötigt die Polysialyltransferase *siaD*, die bei den verschiedenen Serogruppen variiert, wodurch die Unterschiede in der Kapselzusammensetzung erklärt werden können (Swartley *et al.*, 1996). Die Regulation der Kapselexpression erfolgt mittels Phasenvariation über sogenanntes „slipped-strand mispairing“, oder durch die Insertion von mobilen genetischen Elementen (Hammerschmidt *et al.*, 1996b; Hammerschmidt *et al.*, 1996a). Ein weiterer Virulenzfaktor von Neisserien sind die Lipooligosaccharide (LOS, Endotoxin). Das LOS besteht aus einer konservierten inneren Kernregion aus Ketose und 3-deoxy-D-manno-octo-2-ulosonsäure (Kdo), die an einen Lipid-A Teil gebunden ist, der in der äußeren Membran eingebettet ist. Im Vergleich zu Lipopolysacchariden (LPS) anderer Gram-negativer Bakterien besitzen LOS keine O-spezifische Seitenkette (O-Antigen), sondern zwei kurze Kohlenhydratketten (α - und β -Kette). Einige LOS-Varianten werden zusätzlich sialysiert, wodurch die Resistenz gegen die komplementvermittelte Lyse und Phagozytose induziert wird (Vogel und Frosch, 1999). Sialysiertes LOS hat einen anti-adhäsiven Effekt, da Adhäsine wie Opc und Opa durch die Expression von LOS maskiert werden. Daher sind unbekapselte Meningokokken mit unsialysiertem LOS besonders zellinvasiv (van Putten *et al.*, 1995). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass LOS zusammen mit Pilusstrukturen eine Aufnahme der Bakterien durch nicht-hämatopoetische Zellen induziert (Lambotin *et al.*, 2005).

Meningokokken exprimieren zwei Hauptporine, PorA und PorB, die auf der äußeren Membran lokalisiert sind und Transportporen für Salze und Nährstoffe bilden, und essentiell für das Überleben der Bakterien sind (Barlow *et al.*, 1989; Van der Ley *et al.*, 1991). Eine weitere wichtige Eigenschaft von Meningokokken ist die Fähigkeit der Adhäsinviation durch einen genetischen Rekombinationsmechanismus, was als sogenannte antigene Variation, und Phasenvariation bezeichnet wird. Die Variation betrifft unter anderem die Pilusstrukturen, Porine, LOS, Opa- und Opc-Proteine, und erfolgt in der Regel durch die Transformation homologer DNA, durch die Regulation von Promotorregionen, durch Rekombinationsmechanismen, durch den Einbau von Insertionselementen, oder durch das

„slipped-strand mispairing“ (SSM). Beim SSM werden Nukleotide innerhalb oder vor die kodierende Gensequenz eingebaut, wodurch die Transkription an- und abgeschaltet werden kann. Die Phasenvariation und antigene Variation sind ausschlaggebend für den Schutz der Bakterien vor dem Immunsystem und ermöglichen die Ausbildung verschiedener Phänotypen. Die Pathogenität von *N. meningitidis* wird des Weiteren durch die Fähigkeit bestimmt, die komplementvermittelte Phagozytose zu unterdrücken. Generell zeigen Meningokokken einen serumresistenten Phänotyp in Gegenwart von 5 % humanem Serum, und erst bei 25-50 % Serum werden die Bakterien abgetötet (Vogel und Frosch, 1999). Meningokokken verwenden verschiedene Mechanismen, um die komplementvermittelte Zellyse zu verhindern. Dabei spielt vor allem die Polysaccharidkapsel eine wichtige Rolle, da sie die Insertion der C5-C9-Komplementpore in die bakterielle Membran verhindert, und so die Bakteriolyse unterdrückt. Unbekapselte *N. meningitidis* Stämme sind daher verstärkt serumsensitiv (Geoffroy *et al.*, 2003). Die Komplementresistenz wird auch durch die Synthese der LOS Strukturen vermittelt, deren α -Kette eine Lakto-N-Neotetrose enthält, die ähnlich zu humanen Blutantigenen sind, und Wirtszellkomponenten imitieren. Die LOS Strukturen von Meningokokken werden von C4b gebunden, und erklären, warum vor allem C4b-defiziente Patienten anfällig für Meningokokkeninfektionen sind (Bishop *et al.*, 1990; Ram *et al.*, 2003). Ein weiterer Mechanismus ist die Rekrutierung von Regulatoren der Komplementaktivierung. Für *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* konnte gezeigt werden, dass beide vor allem mit ihren Porinen und Pilusstrukturen das C4b-Bindungsprotein (C4BP) binden, während *N. meningitidis* zusätzlich ein Faktor H-bindendes Protein synthetisiert (Schneider *et al.*, 2006). Weitere Pathogenitätsfaktoren gehören zur Klasse der Autotransporter (Typ 5 Sekretionssystem T5SS). Die IgA-Protease wurde als erster Autotransporter in *N. gonorrhoeae* beschrieben, kommt allerdings auch in *N. meningitidis* vor (Pohlner *et al.*, 1987). Sie enthält eine Serinproteasedomäne, die eine Abspaltung der Passengerdomäne von der Transportdomäne ermöglicht, und somit sekretiert wird. Die IgA-Protease spaltet humanes IgA1 und hat eine autokatalytische Aktivität, spaltet jedoch auch das LAMP1 Protein (lysosomal-associated membrane protein 1) und wird daher mit der intrazellulären Persistenz der Bakterien assoziiert. Ein weiteres klassisches Autotransporterprotein ist das App („adhesion and penetration protein“), das in *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* und in kommensalen *Neisseria* Arten vorkommt (Hadi *et al.*, 2001). App zeigt eine hohe Sequenzhomologie zum „*Haemophilus* adhesion and penetration protein“ (Hap) von

Haemophilus influenzae (St Geme *et al.*, 1994). App besitzt ein konserviertes Serinproteasemotiv, stimuliert B- und T-Zellen, und induziert eine bakterielle Antikörperantwort (Hadi *et al.*, 2001). Weiterhin ist App an der Interaktion mit Wirtszellen beteiligt (Serruto *et al.*, 2003). Die Meningokokken Serinprotease (MspA) ist ein Autotransporterprotein mit Homologie zu App und zur IgA-Protease. MspA wird in *N. meningitidis* synthetisiert, gespalten und ins extrazelluläre Milieu abgegeben und ist an der Bindung an Epithel- und Endothelzellen beteiligt (Turner *et al.*, 2006).

Neben konventionellen Autotransportern synthetisiert *N. meningitidis* zwei weitere Proteine der Oca-Proteinfamilie, NhhA und NadA. Aufgrund der Sequenzähnlichkeit von NhhA zu den Hia- und Hsf-Adhäsinen von *Haemophilus influenzae* (Barenkamp und St Geme, 1996) wurde das Protein als *Neisseria* Hia/Hsf-Homologe (NhhA) bezeichnet. NhhA wird von virulenten Meningokokkenisolaten synthetisiert, fehlt aber in *N. gonorrhoeae* (Peak *et al.*, 2000; Pizza *et al.*, 2000). NhhA ist ein ca. 600 AS großes Außenmembranprotein, das eine typische trimere Struktur besitzt, wobei die 72 C-terminalen Aminosäuren die Trimerisierung induzieren und für die Translokation der Passengedomäne auf die Oberfläche ausreichend sind (Scarselli *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass NhhA mit extrazellulären Matrixproteinen wie Laminin und Heparansulfat interagiert, jedoch keine Bindung an Fibronectin und Kollagen Typ I, III und IV vermittelt (Scarselli *et al.*, 2006). Eine Beteiligung von NhhA bei der Bindung an Epithelzellen wie Chang und Hec-1B Zellen konnte sowohl für rekombinantes NhhA Protein als auch für Nhh-synthetisierende Meningokokken gezeigt werden, so dass NhhA eine weiteres essentielles Meningokokken-Adhäsion darstellt. Zusätzlich vermittelt NhhA die Serumresistenz und Autoaggregation (Sjolinder *et al.*, 2008).

1.6.2 *Neisseria meningitidis* Adhäsion (NadA)

Das zunächst als NMB1994 bezeichnete *nadA* Gen wurde erstmal durch die Genomsequenzierung des *Neisseria meningitidis* Stamms MC58 als neues phasenvariables Außenmembranprotein identifiziert (Pizza *et al.*, 2000). Aufgrund der Sequenzähnlichkeit der C-terminalen NadA-Domäne mit dem C-Terminus von YadA und dem UspA2 Protein von *Moraxella catarrhalis* (ca. 32-34 %) (Hoiczky *et al.*, 2000), sowie der Interaktion von NadA mit Wirtszellen wurde das NadA der Familie der Oca-Proteine zugeordnet (Comanducci *et al.*, 2004). Analysen des *nadA*-Gens des Stamms MC58 zeigen eine 3'-terminale Terminatorsequenz und einen 5'-terminalen Promotorbereich, sowie eine potentielle

Ribosomenbindestelle (Comanducci *et al.*, 2004). 130 Nukleotide vor dem *nadA* Startkodon („untranslated region“ UTR) befinden sich neun TAAA-Wiederholungen, die als sogenannte Mikrosatelliten bezeichnet werden, und für eine phasenvariable *nadA*-Expression verantwortlich sind (Comanducci *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2003). Transkriptionsanalysen des *nadA* verschiedener *N. meningitidis* MC58 Varianten mittels RT-PCR zeigen eine unterschiedliche Anzahl an TAAA-Motifen, wobei TAAA₈ und TAAA₁₀ mit einer hohen, und TAAA₉ und TAAA₁₂ mit einer geringen *nadA*-Transkription assoziiert werden (Martin *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2004). Diese Veränderung der TAAA-Wiederholungen wird als Phasenvariation bezeichnet. Neben der phasenvariablen *nadA*-Expression findet die Regulation der Expression auch auf transkriptionaler Ebene statt. Dabei binden Transkriptionsregulatoren („ferric uptake regulatory protein“ Fur und „integration host factor“ IHF) an Sequenzabschnitte im *nadA*-Promotor und ermöglichen so die Regulation der *nadA*-Expression unter Eisenmangelbedingungen (Martin *et al.*, 2005). Zusätzlich wird die *nadA*-Expression durch einen transkriptionalen Regulator der MarR-Familie, FarR reguliert. FarR fungiert dabei als negativer Regulator durch Interaktion mit einer 16 bp langen Sequenz im *nadA*-Promotorbereich (Schielke *et al.*, 2009).

Der GC-Gehalt des *nadA* Gens liegt bei 45 %, im Vergleich zu den 51 % des restlichen Genoms, was auf eine Aufnahme des *nadA* über horizontalen Gentransfer hindeutet (Comanducci *et al.*, 2002). Das *nadA* Gen kommt in ungefähr 50 % aller Meningokokkenisolate vor und ist vor allem mit hypervirulenten Stämmen assoziiert. Das *nadA* Gen kommt in 100 % der hypervirulenten Sequenztypen ST-8, ST-11 und ST-32 Linien vor (ET-5, ET-37 und A4) und fehlt in ST-41/44 Stämmen (Line III). In „Carrier-Stämmen“ ist *nadA* unterrepräsentiert, während es in *N. lactamica*, *N. gonorrhoeae* und in A-Meningokokken vollständig fehlt (Comanducci *et al.*, 2002). In Stämmen des ET-15 Clusters ist das *nadA* häufig durch den Einbau eines Insertionselements (IS1301) inaktiviert (Elias und Vogel, 2007).

1.6.2.1 Struktur des NadA

NadA-positive Stämme besitzen ein *nadA* Gen mit 969-1215 kodierenden Basenpaaren, die vier verschiedenen Allelen zugeordnet werden können. *nadA1* kodiert für ein Protein von 362 AS, *nadA2* für eines von 398 AS, *nadA3* für eines von 405 AS, und *nadA4* für eines von 323 AS (Comanducci *et al.*, 2004). Das *nadA* Allel 1 kommt bei allen ET-5 Stämmen vor, während die Allele 2 und 3 vor allem in Stämmen des ET-37 Komplexes und im A4 Cluster,

sowie in nicht-hypervirulenten Clustern vorkommen (Comanducci *et al.*, 2002). Das *nadA* Allel 4 hingegen kommt lediglich in nicht-hypervirulenten „Carrier-Stämmen“ vor (Comanducci *et al.*, 2004). Analysen der Sekundärstruktur von NadA1, NadA2, und NadA3 ermöglichen die Unterteilung von NadA in drei Domänen: eine N-terminale globuläre Kopfdomäne, eine Stieldomäne aus „coiled-coils“, und einen C-terminalen Membrananker (Abb. 5). Die aminoternale Kopfdomäne zeigt keine vorhersagbare Struktur, während die Stieldomäne aus α -Helixstrukturen besteht, und zwei Bereiche mit der Fähigkeit zur Ausbildung von „coiled-coil“ Strukturen hat. Zusätzlich befindet sich im N-terminalen „coiled-coil“ Abschnitt jeweils ein Leucin gefolgt von 6 Aminosäuren, das sich viermal wiederholt (L-x[6]-L-x[6]-L-x[6]-L) und eine sogenannte Leucinzipper-Domäne bildet (Comanducci *et al.*, 2002). Der C-terminale Membrananker besteht aus vier amphipatischen β -Faltblättern mit einer für Außenmembranproteine typischen terminalen aromatische Aminosäure (Comanducci *et al.*, 2002) (Abb. 5). Das NadA4 zeigt zwar auch eine trimere Struktur, allerdings befindet sich in der Stieldomäne nur ein Modul das „coiled-coils“ ausbildet, und das Leucinzippermotiv ist unterbrochen (Abb. 5). Sequenzvergleiche der vier NadA-Allele zeigen dass die NadA4-Kopfdomäne lediglich 63 %, und die NadA4-Stieldomäne nur 25 % Sequenzhomologie zu den Allelen 1, 2 und 3 zeigt, wobei die α -Helixstrukturen in der Stieldomäne 60 % der Domäne ausmachen. Der C-terminale Membranankerbereich aller NadA-Allele ist zu 100 % konserviert (Comanducci *et al.*, 2004). Sequenzvergleiche mit anderen Proteinen der Oca-Familie wie YadA und UspA2 zeigen eine Sequenzhomologie von 56-63 % innerhalb der Membranankerregion, wobei die anderen Domänen nur 23-25 % Homologie aufweisen (Hoiczky *et al.*, 2000).

Das in der äußere Membran lokalisierte NadA-Protein bildet hitzestabile Aggregate in SDS-Gelen mit einem Molekulargewicht von ~140-170 kDa, was auf eine thermostabile Trimerisierung der Monomere hinweist. Des Weiteren kann NadA zwar auch auf der Zelloberfläche bekapselter Meningokokken nachgewiesen werden, jedoch weisen unbekapselte Meningokokken eine höhere Expositionsdichte von NadA auf (Comanducci *et al.*, 2002).

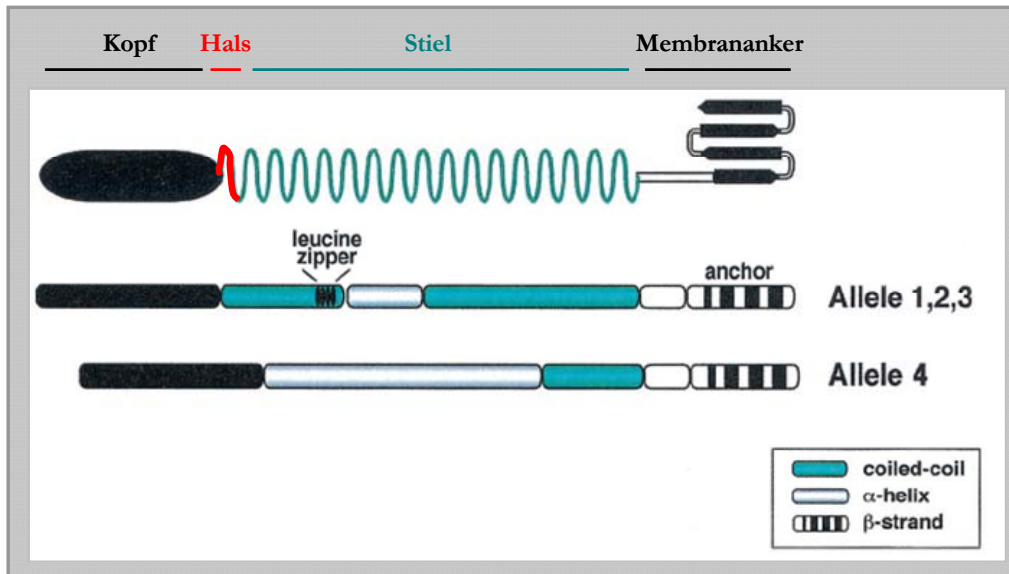


Abb. 5 Schematische Darstellung der NadA Struktur nach Comanducci *et al.*, 2004 modifiziert. Die Sekundärstruktur zeigt die NadA-Kopfdämen, die potentielle Halsdomäne (Konnektor), die Stiel-domäne und den C-terminalen Membrananker. Die Allele 1, 2, und 3 besitzen im Gegensatz um Allel 4 eine weitere Domäne aus „coiled-coils“ und ein Leucinzippermotiv.

1.6.2.2 Funktionen des NadA

Beim NadA Protein handelt es sich wie bei YadA um ein multifunktionales Oberflächenprotein, dessen verschiedenen Funktionen unterschiedlichen Domänen des Proteins zugeschrieben werden können. Erste Untersuchungen des NadA zeigten, dass das C-terminal verkürzte NadA $_{\Delta 351-405}$ Protein eine Interaktion mit Chang Zellen induziert, und dass anti-NadA Serum einen protektiven Effekt bei mit B-Meningokokken infizierten Ratten hat (Comanducci *et al.*, 2002). Studien verschiedener NadA-Deletionsmutanten konnten zeigen, dass die NadA-Kopfdomäne an der Interaktion mit humanen Chang Epithelzellen beteiligt ist, und dass diese Bindung durch einen bisher unbekanntem Proteinrezeptor vermittelt wird (Capecchi *et al.*, 2005). Im Vergleich zu Chang Zellen konnte lediglich eine schwache Interaktion von NadA mit Hep-2, HeLa, Hec-1B und Huvec-Zellen nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigt NadA keine Bindung an extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen Typ I, III und IV, Fibronectin, Laminin und Heparansulfat (Capecchi *et al.*, 2005).

Untersuchungen des NadA im *E. coli*-Modell zeigten nicht nur eine ausschlaggebende Rolle des NadA an der Bindung von Chang Zellen, sondern auch eine Beteiligung an der Internalisierung durch Modifizierung des Aktinzytoskeletts (Capecchi *et al.*, 2005). Untersuchungen der Rolle von NadA in Meningokokken zeigten, dass NadA sowohl an der

Bindung bekapselter als auch an der Internalisierung unbekapselter Meningokokken durch Chang Zellen beteiligt ist. Die NadA-vermittelte Invasion scheint vergleichbar zu sein mit der Opc-vermittelten Invasion, wobei beide Proteine während der Infektion unabhängig voneinander zu agieren scheinen (Capecchi *et al.*, 2005). Eine verstärkte Bindung *nadA*-exprimierender Meningokokken an Chang Zellen wurde durch Insertionsinaktivierung des negativen Regulatorgens *farR* nachgewiesen, und lässt vermuten, dass diese NadA-Regulation eine Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen darstellt (Schielke *et al.*, 2009). Neben der Interaktion von NadA mit humanen Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass NadA spezifisch mit Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen interagiert, während die Interaktion mit PMNs, NK-Zellen und Lymphozyten als unspezifisch bewertet wurde (Franzoso *et al.*, 2008; Mazzon *et al.*, 2007). Die Interaktion mit Immunzellen weist darauf hin, dass das NadA nicht nur an der Kolonisierung der Schleimhaut beteiligt ist, sondern auch eine Invasion ins Gewebe und Blut vermittelt. C-terminal verkürztes, lösliches NadA $\Delta_{351-405}$ stimuliert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-8, IL-6, MCP-1, MIP-1 α durch Monozyten, und induziert ihre Differenzierung in den Makrophagen-Phänotyp. NadA auf der Zelloberfläche von *E. coli* hingegen führt zur vermehrten Freisetzung von IL-8 und TNF- α (Franzoso *et al.*, 2008). Die durch NadA induzierte Produktion von Zytokinen/Chemokinen durch Makrophagen unterscheidet sich von der durch LPS induzierten Zytokinfreisetzung, da LPS verstärkt zur Freisetzung von IL-1 und TNF- α führt, während NadA vor allem anti-inflammatorische Zytokine wie IL-6 und IL-10 freisetzt (Franzoso *et al.*, 2008). Die Interaktion von NadA mit dendritischen Zellen führt hingegen zur Induktion eines ausgereiften Phänotyps und ist mit einer geringeren Produktion von Zytokinen und Chemokinen assoziiert (Mazzon *et al.* 2007). Basierend auf dieser immunogenen Wirkung wurde das NadA als Vakzinkandidat für die Entwicklung eines B-Meningokokken-Impfstoffes ausgesucht (Pizza *et al.*, 2000) und ist Bestandteil eines 5-Komponentenimpfstoffs (5CVMB) mit schützendem Effekt vor 77,7 % aller B-Meningokokken Stämme (Giuliani *et al.*, 2006).

Ziel der Arbeit

Die funktionelle Untersuchung einzelner Adhäsine von *N. meningitidis* wie des NadA erweist sich in Meningokokken durch das Vorhandensein einer Vielzahl verschiedener Adhäsine sowie der Polysaccharidkapsel, die einzelne Proteine maskieren können, als erschwert. Des Weiteren kann eine Beteiligung von NadA bei der Pathogenese von Meningokokken im Mausinfektionsmodell aufgrund des Fehlens eines entsprechenden Modells nicht untersucht werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurde daher *Y. enterocolitica* für die Präsentation von NadA auf der bakteriellen Oberfläche verwendet, wodurch eine Untersuchung von NadA in der Interaktion mit Wirtszellen und der Pathogenese und/oder Kolonisierung im Mausinfektionsmodell ermöglicht werden sollte. Der sehr gut definierte Modellerreger *Y. enterocolitica* eignet sich für die Untersuchung von NadA, da *Yersinia*-spezifische Virulenzfaktoren gezielt deletiert werden können. Weiterhin synthetisiert *Y. enterocolitica* den Prototyp der Oca-Proteinfamilie, das *Yersinia* Adhäsine YadA, und ermöglicht somit dessen Vergleich mit Funktionsdomänen des NadA Proteins.

Ziel der Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des NadA im *Yersinia* Modellerreger, wodurch neue Einblicke in die Interaktion von NadA mit Wirtszellen, der Mauspathogenität und der Rolle des NadA bei der Serumresistenz gewonnen werden sollten, sowie die Identifizierung bisher unbekannter NadA-spezifischer Wirtszellrezeptoren ermöglicht werden sollte. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob das C-terminale Autotransportermodul von YadA eine Translokation der N-terminalen NadA-Passengerdomäne auf die äußere Membran ermöglicht.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

2.1.1 *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5 α	<i>E. coli endA1 supE44 hsdR17</i> ($r_k^- m_k^+$) <i>thi-1 recA1 gyrA96 relA1</i> $\Delta(lacZYA-argF)$ <i>UI69</i> ($\phi 80lacZ\Delta M15$)	Hanahan, 1983
SM10 Δpir	<i>thi-1 thr leu tonA lacy supE recA::</i> RP4-2-TC:: Mu-Kan (λpir), Km ^r	Miller und Mekalanos, 1988
BL21 (DE3)	Expressionsvektor; F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>gal</i> λ (DE3)	Wood, 1966

Tab. 1 Verwendete *E. coli* Stämme.

2.1.2 *Yersinia enterocolitica* Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
WA-314	klinisches Isolat des Serotyp O:8; trägt das Virulenzplasmid pYVO8	Heesemann <i>et al.</i> , 1983
WA-314-lux	WA-314 mit LuxCDABE /Operon und Arabinose-induzierbarem <i>araBAD</i> -Promoter upstream von <i>glmS</i> , Km ^R	Trcek <i>et al.</i> , in Vorbereitung
WA-c-lux	Plasmidloses Derivat von WA-314-lux	diese Arbeit
WA-c	Plasmidloses Derivate von WA-314	Heesemann <i>et al.</i> , 1983
WA-c Δinv	Invasin-negative Mutante von WA-c	Ruckdeschel <i>et al.</i> , 1996

Tab. 2 Verwendete *Y. enterocolitica* Stämme.

2.1.3 *Neisseria* Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>N. meningitidis</i>		
MC58	Serogruppe B, Serotyp 74, klinisches Isolat des ST-32 Komplex	M. Frosch (Zentrum für Infektionsforschung, Würzburg)
MC58 $\Delta nadA$	Serogruppe B, Serotyp 74, klinisches Isolat des ST-32 Komplex mit Deletion von <i>nadA</i> , Spc ^f	Schielke <i>et al.</i> , 2009
MC58 $\Delta siaD$	Serogruppe B, Serotyp 74, klinisches Isolat des ST-32 Komplex mit Deletion von <i>siaD</i> , Cm ^r	Kurzai <i>et al.</i> , 2005
MC58 $\Delta siaD \Delta nadA$	Serogruppe B, Serotyp 74, klinisches Isolat des ST-32 Komplex mit Deletion von <i>siaD</i> und <i>nadA</i> , Spc ^f /Cm ^r	O. Kurzai (Zentrum für Infektionsforschung, Würzburg)

Fam18	Serogruppe C, Serotyp 11	M. Frosch (Zentrum für Infektionsforschung, Würzburg)
<i>N. gonorrhoeae</i>		
<i>N. gonorrhoeae</i> Ngo Opa _{CEA}	Opa _{CEA} -exprimierender (Opa ₅₂), Pili-negativer <i>N. gonorrhoeae</i> MS11-B2.1 Stamm N309	Kupsch <i>et al.</i> , 1993
<i>N. gonorrhoeae</i> Ngo Opa-	nicht-opaquer, pili-negativer <i>N. gonorrhoeae</i> Stamm MS11-B2.1 N302	Kupsch <i>et al.</i> , 1993

Tab. 3 Verwendete *Neisseria* Stämme.

2.1.4 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pHP45Ω	Ursprung der Spectinomycin (Spc)-Kassette	Prentki und Krisch, 1984
pUC-A-1	pUC13 mit 5kb EcoRI/HindIII Fragment von pYVO8, <i>yadA</i> -positiv	Roggenkamp <i>et al.</i> , 1995
pUC-A-H	pUC-A-1, bp 88-564 (AS 30-188) von <i>yadA</i> deletiert	Roggenkamp <i>et al.</i> , 2003
pUC:SS	pUC-A-1 mit <i>yadA</i> bp 1-87	diese Arbeit
pUC-A-N	pUC-A-1 mit <i>yadA</i> bp 568-645 deletiert	Roggenkamp <i>et al.</i> , 2003
pGP704	Suizidvektor, R6K ² Replikon benötigt π Protein in trans von <i>λpir</i> -besitzenden Empfänger	Miller und Mekalanos, 1988
pGP-SS	pGP704 mit EcoRI/SphI Fragment von pUC-SS	diese Arbeit
pGPS-A-1	pGP704, 1,8 kb Spc-Kassette in der EcoRI Seite, besitzt <i>yadA</i> als ein EcoRI/SphI Fragment von pUC-A-1	Roggenkamp <i>et al.</i> , 2003
pGPS-A-H	pGP704, 1,8 kb Spc-Kassette in der EcoRI Seite, besitzt <i>yadA</i> ohne bp 88-564 (AS 30-188) als ein EcoRI/SphI Fragment von pUC-A-H	Roggenkamp <i>et al.</i> , 2003
pGPS:A-N	pGP704, 1,8 kb Spc-Kassette in der EcoRI Seite, besitzt EcoRI/SphI Fragment von pUC-A-N	Roggenkamp <i>et al.</i> , 2003
pGPS:HNSO	pGPS-A-N ohne ClaI/SacI Fragment, mit <i>yadA</i> Signalsequenz	diese Arbeit
pGPS:SS	1,8 kb Spc-Kassette in der EcoRI Seite von pGP:SS	diese Arbeit
pGPS:M1	pGPS-A-H mit <i>nadA</i> MC58 bp 69-270 (AS 24-90) über SacI	diese Arbeit
pGPS:M2	pGPS:HNSO mit <i>nadA</i> MC58 bp 69-270 (AS 24-90) über SacI	diese Arbeit
pGPS:M3	pGPS-A-H mit <i>nadA</i> MC58 bp 69-630 (AS 24-210) über SacI	diese Arbeit
pGPS:M4	pGPS:HNSO mit <i>nadA</i> MC58 bp 69-630 (AS 24-210) über SacI	diese Arbeit
pGPS:MC1089	pGPS:SS mit <i>nadA</i> MC58 bp 69-1089 (AS 24-362) über SacI	diese Arbeit
pGPS:F1	pGPS-A-H mit <i>nadA</i> Fam18 bp 69-270 (AS 24-90) über SacI	diese Arbeit
pGPS:F2	pGPS:HNSO mit <i>nadA</i> Fam18 bp 69-270 (AS 24-90) über SacI	diese Arbeit
pGPS:F3	pGPS-A-H <i>nadA</i> Fam18 bp 69-609 (AS 24-203) über SacI	diese Arbeit
pGPS:F4	pGPS:HNSO mit <i>nadA</i> Fam18 bp 69-609 (AS 24-203) über SacI	diese Arbeit
pGPS:Fam1089	pGPS:SS mit <i>nadA</i> Fam18 bp 69-1197 (AS 24-397) über SacI	diese Arbeit

Material und Methoden

pYVO8	Virulenzplasmid von WA-314	Heesemann <i>et al.</i> , 1983
pYVO8-A-0 (<i>ΔyadA</i>)	pYVO8, <i>yadA</i> , Kanamycin-Kassette inseriert in die PstI Schnittstelle des <i>yadA</i> durch Austausch von Allelen	Roggenkamp <i>et al.</i> , 1995
pYVO8-A-1 (<i>ΔyadA:yadA</i>)	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-1, Wildtyp <i>yadA</i>	Roggenkamp <i>et al.</i> , 1995
pYVO8-A-H (<i>yadA_{Δ88-564}</i>)	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS-A-H	Roggenkamp <i>et al.</i> , 2003
pYVO8:SS (<i>ΔyadA:SS</i>)	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS:SS	diese Arbeit
pYVO8:M1 (<i>ΔyadA:M1</i>)	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS:M1	diese Arbeit
pYVO8:M2 (<i>ΔyadA:M2</i>)	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS:M2	diese Arbeit
pYVO8:M3 (<i>ΔyadA:M3</i>)	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS:M3	diese Arbeit
pYVO8:M4 (<i>ΔyadA:M4</i>)	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS:M4	diese Arbeit
pYVO8:MC1089 (<i>ΔyadA:MC1089</i>)	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS:MC1089	diese Arbeit
pYVO8:F1 (<i>ΔyadA:F1</i>)	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS:F1	diese Arbeit
pYVO8:F2 (<i>ΔyadA:F2</i>)	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS:F2	diese Arbeit
pYVO8:F3 (<i>ΔyadA:F3</i>)	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS:F3	diese Arbeit
pYVO8:F4 (<i>ΔyadA:F4</i>)	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS:F4	diese Arbeit
pYVO8:Fam1089 (<i>ΔyadA:Fam1089</i>)	pYVO8-A-0 mit integriertem pGPS:Fam1089	diese Arbeit
pACYC184	Klonierungsvektor	Chang und Cohen, 1978
pACYC184: <i>virF</i> (p)	pACYC184 mit <i>virF</i> von WA-314 (151 bp vor <i>virF</i> und 86 bp nach <i>virF</i>) über <i>Sall/SphI</i>	diese Arbeit
pACYC184: <i>virF:yadA</i> (<i>pyadA</i>)	pACYC184: <i>virF</i> mit <i>yadA</i> bp 1-1266 (AS 1-422) über <i>XbaI</i> und <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pACYC184: <i>virF:yadA_{Δ88-564}</i> (<i>pyadA_{Δ88-564}</i>)	pACYC184: <i>virF</i> mit <i>yadA</i> bp 565-1266 (AS 90-189) über <i>XbaI</i> und <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pACYC184: <i>virF</i> :M1 (pM1)	pACYC184: <i>virF</i> mit Hybrid <i>nadA</i> MC58 bp 69-270 (AS 24-90) und <i>yadA</i> bp 565-1266 (AS 189-422) über <i>XbaI</i> und <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pACYC184: <i>virF</i> :M2 (pM2)	pACYC184: <i>virF</i> mit Hybrid <i>nadA</i> MC58 bp 69-270 (AS 24-90) und <i>yadA</i> bp 681-1266 (AS 228-422) über <i>XbaI</i> und <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pACYC184: <i>virF</i> :M3 (pM3)	pACYC184: <i>virF</i> mit Hybrid <i>nadA</i> MC58 bp 69-630 (AS 24-210) und <i>yadA</i> bp 565-1266 (AS 189-422) über <i>XbaI</i> und <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pACYC184: <i>virF</i> :M4 (pM4)	pACYC184: <i>virF</i> mit Hybrid <i>nadA</i> MC58 bp 69-630 (AS 24-210) und <i>yadA</i> bp 681-1266 (AS 228-422) über <i>XbaI</i> und <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pACYC184: <i>virF</i> :MC1089 (<i>pnadA</i>)	pACYC184: <i>virF</i> mit <i>nadA</i> MC58 bp 69-1089 (AS 24-362) und <i>yadA</i> bp 1-90 (AS 1-30) über <i>XbaI</i> und <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pET-21b(+)	Expressionsvektor mit C-terminalem His-tag und T7-Promotor	Novagen (Darmstadt)
pET-21b(+): <i>nadA</i>	pET21b (+) mit <i>nadA</i> MC58 bp 69-630 (AS 24-210) über <i>NdeI</i> und <i>XbaI</i>	diese Arbeit
pRc/CMV-CEACAM1-4L	pRc/CMV mit HindIII/XbaI CEACAM1-4L cDNS Fragment	W. Zimmermann (Tumor Immunology, München)
pRc/CMV-CEACAM3-L	pRc/CMV mit NotI/HincII CEACAM3 cDNS Fragment	W. Zimmermann (Tumor Immunology, München)
pRc/CMV-CEACAM4	pRc/CMV mit HindIII/XbaI CEACAM4 cDNS Fragment	W. Zimmermann (Tumor Immunology, München)
pRc/CMV-CEACAM5 (CEA)	pRc/CMV mit HindIII/XbaI CEACA5 cDNS Fragment	W. Zimmermann (Tumor Immunology, München)
pRc/CMV-CEACAM6	pRc/CMV mit HindIII/XbaI CEACAM6 cDNS Fragment	W. Zimmermann (Tumor Immunology, München)

pRc/CMV-CEACAM7-2	pRc/CMV mit HindIII/XbaI CEACAM7-2 cDNS Fragment	W. Zimmermann (Tumor Immunology, München)
pRc/CMV-CEACAM8	pRc/CMV mit HindIII/XbaI CEACAM8 cDNS Fragment	W. Zimmermann (Tumor Immunology, München)

Tab. 4 Liste der konstruierten Plasmide die zur Transformation von *E. coli* und *Y. enterocolitica* Stämmen verwendet wurden.

2.2 Oligonukleotide

Alle in Tab. 5 aufgelisteten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) in lyophilisiertem und entsalztem Zustand erhalten, in H₂O_{bidest.} gelöst, und in Konzentrationen von 100 pmol/μl bei -20°C gelagert.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T _M [° C]	Verwendung
A-Cla-f	TTT TAA <u>GAT CGA</u> TTAGT GCT GT	60,0	Amplifizierung von <i>yadA</i> und <i>yadA-nadA</i> -Hybriden aus pYVO8 Plasmiden; Start 167 bp vor <i>yadA</i> , Einführung eine ClaI Schnittstelle
A-SphI-r	GTC AAT ACA GAG ATA GAA CAG CT	64,0	Amplifizierung von <i>yadA</i> und <i>yadA-nadA</i> -Hybriden aus pYVO8 Plasmiden; Start 569 bp nach <i>yadA</i> , 30 bp nach SphI Schnittstelle
A-1-f	ATG ACT AAA GAT TTT AAG ATC AGT	55,0	Sequenzierung von pGPS und pYVO8 Plasmiden mit integriertem <i>yadA</i> oder <i>yadA-nadA</i>
A-87r-SacI	TAC TGG <u>AGC TCG</u> TCA TTA TTG GCA AA	66,7	Amplifizierung der <i>yadA</i> Signalsequenz von <i>yadA</i> , Start bp 87; Einführung einer SacI Schnittstelle
A-684-r	CGA <u>GAG CTC</u> AGC TGA TTT TTT ATT TGC	62,4	Sequenzierung von pGPS und pYVO8 Plasmiden mit integriertem <i>yadA</i> oder <i>yadA-nadA</i> , Einführung einer SacI Schnittstelle
A-1134-r	CCC GAC ACC TGC AGG AAA GT	64,0	Überprüfung der Lokalisation von <i>yadA</i> und <i>yadA-nadA</i> -Hybriden in pYVO8 und pGPS Plasmiden
A-1270-f	CGC <u>GAG CTC</u> TAT CAT TTA GAA GTT AAC AAG TCT	65,5	Amplifizierung von <i>yadA</i> für pGPS-SS; Start bp 1270, Einführung einer SacI Schnittstelle
A-1269r-BamHI-	ATAATG <u>GAT CCT</u> TAC CAC TCG ATA TTA AAT G	60,2	Amplifizierung von <i>yadA</i> und <i>yadA-nadA</i> -Hybriden, Start bp 1269 des <i>yadA</i> , Einführung einer BamHI Schnittstelle
A-1269-r	TTA CCA CTC GAT ATT AAA TGC	51,0	Überprüfung der Lokalisation von <i>yadA</i> und <i>yadA-nadA</i> -Hybriden, Start bp 1269 des <i>yadA</i>
A-900-r	CTT GCT GTC TGC ATA CAC	52,7	Sequenzierung von pGPS und pYVO8 Plasmiden mit integriertem <i>yadA</i> oder <i>yadA-nadA</i> , Start bp 900 des <i>yadA</i>
A-975-r	ATT CAC GGA TTG CTT TCT TAG TCG AAT	63,1	Sequenzierung von pGPS und pYVO8 Plasmiden mit integriertem <i>yadA</i> oder <i>yadA-nadA</i> , Start bp 975

A-144f-XbaI	TTA <u>ATC TAG ATA</u> GTG CTG TTT TTT GCA TG	63,0	Amplifizierung von <i>yadA</i> und <i>yadA-nadA</i> aus pGPS Plasmiden, Start 144 bp vor <i>yadA</i> (= Promotor); Einführung einer XbaI Schnittstelle
A-119r-BamHI	AAT <u>TGG ATC CAA</u> CTG AAA CCA TGA TAA AAA GC	67,0	Amplifizierung von <i>yadA</i> und <i>yadA-nadA</i> aus pGPS Plasmiden, Start 119 bp nach <i>yadA</i> (= Terminator); Einführung einer BamHI Schnittstelle
virf-151f-SphI	AAT <u>AGC ATG CTT</u> GCC AGT CAC CTA ATA CC	69,0	Amplifizierung von <i>virF</i> aus pYVO8-A-1, Start 151 bp vor <i>virF</i> (= Promotor); Einführung einer SphI Schnittstelle
virf-86r-SalI	AAT <u>AGT CGA CTT</u> GGC TCA TCC CAT TGA ATC	69,0	Amplifizierung von <i>virF</i> aus pYVO8-A-1, Start 86 bp nach <i>virF</i> (= Terminator); Einführung einer SalI Schnittstelle
MC58-1f	TAC <u>TAG AGC TCG</u> CCA CAA GCG ACG ACG ATG	66,3	Amplifizierung von <i>nadA</i> MC58; Start bp 69; Einführung einer SacI Schnittstelle
Fam18-1f	TAC <u>TAG AGC TCG</u> CCA CAA AAC GAC GAC GAT G	64,9	Amplifizierung von <i>nadA</i> Fam18; Start bp 69; Einführung einer SacI Schnittstelle
N-270-r	GTC <u>AGG AGC TCC</u> ACG ACT TTT TTC AGA CCC AG	53,1	Amplifizierung von <i>nadA</i> MC58 und <i>nadA</i> Fam18; Start bp 270 MC58 und Fam18; Einführung einer SacI Schnittstelle
N-630-r	TTG <u>GTG AGC TCG</u> GCC GTC TGT TTG GCT T	57,1	Amplifizierung von <i>nadA</i> MC58 und <i>nadA</i> Fam18; Start bp 630 MC58 und bp 609 Fam18; Einführung einer SacI Schnittstelle
N-500-f	GAT GAA AAA TTA GAA GCC	46,8	Sequenzierung von pGPS und pYVO8 Plasmiden mit integriertem <i>nadA</i> oder <i>yadA-nadA</i>
N-1089-r	TTA CCA CTC GTA ATT GAC GC	55,2	Überprüfung von <i>nadA</i> MC58 und <i>nadA</i> Fam18; Start bp 1089 (MC58) und bp 1197 (Fam18); Sequenzierung
N-1089r-BamHI	ATA ATG <u>GAT CCT</u> TAC CAC TCG TAA TTG ACG C	65,5	Amplifizierung von <i>nadA</i> MC58 und <i>nadA</i> Fam18; Start bp 1089 (MC58) und bp 1197 (Fam18); Einführung einer BamHI Schnittstelle
N-1089r-SacI	TACTA <u>GAGCTC</u> TTA CCA CTC GTA ATT GAC GC	66,9	Amplifizierung von <i>nadA</i> MC58 und <i>nadA</i> Fam18; Start bp 1089 (MC58) und bp 1197 (Fam18); Einführung einer SacI Schnittstelle
MC58-69f-NdeI	TAA TTA <u>TCA TAT GGC</u> CAC AAG CGA CGA CGA TG	71,0	Amplifizierung von <i>nadA</i> MC58 für Proteinexpression in pET21b (+), Start bp 69; Einführung einer NdeI Schnittstelle
MC58-630r-XhoI	ATT ATC <u>TCG AGG</u> GCC GTC TGT TTG GCT TC	72,0	Amplifizierung von <i>nadA</i> MC58 für Proteinexpression in pET21b (+), Start bp 630; Einführung einer XhoI Schnittstelle

Tab. 5 Auflistung der verwendeten Oligonukleotide. T_M bezeichnet die berechnete Schmelztemperatur in °C. Restriktionsschnittstellen in der Nukleotidsequenz sind unterstrichen dargestellt. f: Vorwärtsprimer; r: Rückwärtsprimer.

2.3 Bakterielle Nährmedien

Alle folgenden Nährmedien wurden mit H₂O_{dest} angesetzt und für 20 min bei 121 °C und einem Überdruck von 1 bar autoklaviert.

Luria-Bertani (LB)-Medium	10 g/l 5 g/l 5 g/l	Trypton, pH 7,4 – 7,5 Hefeextrakt NaCl
LB-Agar	15 g Agar / 1000 ml LB-Medium	
LB-Einfriermedium	LB-Medium mit 20 % Glycerin	
Brain-Heart-Infusion (BHI)-Medium	37 g/l	
SOC-Medium	20 g/l 5 g/l 0,5 g/l 250 mM 20 mM	Trypton, pH 7,0 Hefeextrakt NaCl KCl Glukose (sterilfiltriert)

2.4 Antibiotika

<i>Antibiotikum</i>	<i>Stammlösung</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Lösungsmittel</i>
Einsatz zur Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>Y. enterocolitica</i>			
Ampicillin	10 mg/ml	100 µg/ml	H ₂ O _{dest.}
Kanamycin	5 mg/ml	50 µg/ml	H ₂ O _{dest.}
Tetrazyklin	2 mg/ml	20 µg/ml	70 % Ethanol
Spectinomycin	5 mg/ml	50 µg/ml	H ₂ O _{dest.}
Chloramphenicol	2 mg/ml	20 µg/ml	70 % Ethanol
Nalidixinsäure	6 mg/ml	60 µg/ml	0,5 M NaOH

Einsatz zur Kultivierung von <i>N. meningitidis</i>			
Spectinomycin	5 mg/ml	125 µg/ml	H ₂ O _{dest.}
Chloramphenicol	2 mg/ml	7 µg/ml	70 % Ethanol
Einsatz bei Infektionsversuchen			
Gentamicin	10 mg/ml	<i>Y. enterocolitica</i> 50 µg/ml <i>N. meningitidis</i> 100 µg/ml	H ₂ O _{dest.}
Einsatz in der Zellkultur			
Zeocin	100 mg /ml	220 µg/ml	H ₂ O _{dest.}
Geneticin (G418)	100 mg/ml	0,5-1 mg/ml	H ₂ O _{dest.}

Tab. 6 Liste der verwendeten Antibiotika und ihre eingesetzte Endkonzentration

2.5 Antikörper

Antikörper	Eingesetzte Verdünnung /Konzentration	Quelle /Firma
Unkonjugierte Primäantikörper		
Kaninchen anti-NadA Serum	1:500 (WB), 1:100 (IF)	Pineda-Antikörper Service (Berlin)
Maus anti-YadA 8D1 (Epitop: YadA-Stieldomäne AS-290-330)	1:1000 (WB), 1:500 (IF)	Roggenkamp <i>et al.</i> , 2003
Kaninchen WA-Vital Serum	1:5000 (IF), 1:10000 (ELISA)	Max von Pettenkofer-Institut
Maus anti-human CEACAM1 (CD66a)	1,2 µg / 10 ⁶ Zellen (FC), 4 µg/ml (WB)	Genovac (Freiburg)
Maus anti-human CEACAM1, 3, 4, 5, 6 (D14HD11)	1,2 µg / 10 ⁶ Zellen (FC), 4 µg/ml (WB)	Genovac (Freiburg)
Maus anti-human CEACAM5 (CEA; CD66e)	1,2 µg / 10 ⁶ Zellen (FC), 4 µg/ml (WB)	Genovac (Freiburg)
Maus anti-human CEACAM7 (BAC2)	1,2 µg / 10 ⁶ Zellen (FC), 4 µg/ml (WB)	Genovac (Freiburg)
Maus anti-human CEACAM8 (GM2H6)	1,2 µg / 10 ⁶ Zellen (FC), 4 µg/ml (WB)	Genovac (Freiburg)
Kaninchen anti-Alexa488 IgG	1:40 (FC)	Invitrogen (Karlsruhe)
Maus anti-human Integrin β1 MAB1981 (LM534)	1:1000 (WB, FC)	Millipore (Schwalbach)
Ratte anti-human β1 Integrin AIIB2 (blockierende Funktion)	1:40 (FC), 1:4 (IF)	Louisa Jiménez-Soto (Mvp)
Ratte anti-Maus CD29 (β1 Integrin, 9EG7)a	10 µl/10 ⁶ Zellen (FC)	BD Pharmingen (Heidelberg)
Maus anti-human β1 Integrin (P4G11) (aktivierende Funktion)	1 µg / 10 ⁶ Zellen (FC)	Millipore (Schwalbach)
Maus anti-human β2 Integrin (P4H9) (blockierende Funktion)	1 µg / 10 ⁶ Zellen (FC)	Millipore (Schwalbach)

Maus anti-human $\beta 3$ Integrin (25E11) (blockierende Funktion)	1 μg / 10^6 Zellen (FC)	Millipore (Schwalbach)
Maus anti-human $\beta 4$ Integrin (ASC-9) (blockierende Funktion)	1 μg / 10^6 Zellen	Millipore (Schwalbach)
Kaninchen anti-human $\beta 5$ Integrin (25E11)	1 μg / 10^6 Zellen	Millipore (Schwalbach)
Schaf anti-human C4BP	1:1000 (WB)	Bio Trend (Köln)
Ziege anti-human Faktor H	1:1000 (WB)	Millipore (Schwalbach)
Enzymkonjugierte Sekundärantikörper		
Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat	1:2000 (WB)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ziege anti-Maus IgG Peroxidase Konjugat	1:2000 (WB)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ziege anti-Schaf IgG Peroxidase Konjugat	1:2000 (WB)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kaninchen anti-Ziege Peroxidase Konjugat	1:10000 (WB)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ziege anti-Kaninchen IgG alkalische Phosphatase Konjugat	1:2000 (WB)	Dianova (Hamburg)
Schaf anti-Maus IgG alkalische Phosphatase Konjugat	1:2000 (WB)	Dianova (Hamburg)
Fluorochromkonjugierte Antikörper		
Ziege anti-Ratte IgG PE Konjugat	1:200 (FC), 1:100 (IF)	Invitrogen (Karlsruhe)
Hamster anti-Ratte CD29 ($\beta 1$ Integrin) FITC Konjugat	1:200 (FC)	BD Pharmingen (Heidelberg)
Maus anti-human CD18 ($\beta 2$ Integrin) PE Konjugat	1:40 (FC)	BD Pharmingen (Heidelberg)
Schaf anti-Kaninchen IgG Cy3 Konjugat	1:50 (IF), 1:1000 (FC)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Schaf anti-Maus IgG Cy3 Konjugat	1:50 (IF), 1:1000 (FC)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ziege anti-Kaninchen IgG FITC Konjugat	1:128 (IF), 1:1000 (FC)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ziege anti-Maus Ig (G,A,M) FITC Konjugat	1.100 (IF), 1:1000 (FC)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Tab. 7 Liste der verwendeten Antikörper und ihre eingestzte Verdünnung bzw. Konzentration. WB: Westernblot-Anwendung, IF: Immunfluoreszenz-Anwendung, FC: Durchflusszytometrische Anwendung.

2.6 Proteine und Peptide

Protein / Peptid	Konzentration	Quelle
NadA ₂₄₋₂₁₀	1,6 mg/ml	diese Arbeit
NadA ₂₄₋₂₁₀ Alexa488 markiert	1,6 mg/ml	diese Arbeit
humanes Integrin $\alpha 5\beta 1$	0,26 mg/ml	Millipore (Schwalbach)
humanes Integrin $\alpha \beta 3$	0,265 mg/ml	Millipore (Schwalbach)
Kollagen Typ I	1 mg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Fibronektin (von humanem Plasma)	1 mg /ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Matrigel (56 % Laminin, 31 % Kollagen IV, 8 % Entaktin)	1 mg/ml	BD Bioscience (Heidelberg)

Tab. 8 Liste der verwendeten Proteine und Peptide.

2.7 Enzyme

Folgenden Enzyme wurden verwendet.

Enzym	Funktion	Firma
AmpliAq DNA Polymerase	DNS-Amplifizierung	Applied Biosystems (Darmstadt)
Expand High fidelity PCR-System	DNS-Amplifizierung	Roche Diagnostics (Mannheim)
RNAse A	RNS-Abbau	AppliChem (Darmstadt)
Proteinase K	Protein-Abbau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Phosphilpase A2	Lipid-Abbau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Proteinase K Protease Inhibitor Cocktail Complete	Inhibition des Protein-Abbaus	Roche Diagnostics (Mannheim)
Lysozym	Peptidoglykan-Abbau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DNase I	DNS-Abbau	Machery Nagel (Düren)

Tab. 9 Verwendete Enzyme und ihre katalytischen Funktionen.

2.8 Molekularbiologische Kits

Für die Isolierung von Plasmid-DNS, Aufreinigung von PCR-Produkten, Extraktion von DNS aus Agarosegelen, sowie zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurden folgende molekularbiologische Kits und Lösungen verwendet.

Molekularbiologische Kits

QIAGEN Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
Plasmid DNA Purification Nucleo Bond PC100	Machery-Nagel, Düren
PCR Clean up, Gel-Extraction Kit Nucleo Spin Extract II	Machery-Nagel, Düren

Protein-Quantifizierung

Bradford Reagent	Bio-Rad, München
------------------	------------------

2.9 Zellkultur

Zur Untersuchung der Interaktion von Bakterienstämmen und eukaryotischen Zellen wurden verschiedene eukaryotische Zellen als *in vitro* Modellsystem eingesetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgt dabei unter den für die jeweilige Zelllinie optimalen Anzuchtbedingungen.

2.9.1 Eukaryotische Zellen

Zelllinie	Beschreibung	Zellart	Referenz
Chang	clone 1-5c-4 Wong-Kilbourne Derivat der Chang Konjunktiva	Humane Konjunktiva-Epithelzellen	Wong und Kilbourne, 1961
Hek-293	Humane primäre embryonale Nierenzellen transformiert durch Adenovirus Typ 5	Humane primäre embryonale Nieren-Epithelzellen	Graham <i>et al.</i> , 1977
GE-11	Humane $\beta 1$ Integrin-negative embryonale epithelzellähnliche Zellen	Murine embryonale epithelzellähnliche Zellen	Gimond <i>et al.</i> , 1999
GE-11- $\beta 1$	Humane $\beta 1$ Integrin-positive embryonale epithelzellähnliche Zellen	Murine embryonale epithelzellähnliche Zellen	Gimond <i>et al.</i> , 1999
2-4	Murine $\beta 1$ Integrin-negative embryonale fibroblastenähnliche Zellen	Murine embryonale fibroblastenähnliche Zellen	R. Fässler (MPI, Martinsried)
2-4-8	Murine $\beta 1$ Integrin-positive embryonale fibroblastenähnliche Zellen	Murine embryonale fibroblastenähnliche Zellen	R. Fässler (MPI, Martinsried)
HL-60	Humane akute myeloide Leukämiezellen; können mittels PMA zu Makrophagen und mittels DMSO zu PMNs differenziert werden	Humane promeolytische Leukämiezellen	Collins <i>et al.</i> , 1979

Tab. 10 Auflistung verwendeter eukaryotischer Zelllinien.

2.9.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Die Kultivierung aller in Tab. 10 aufgelisteten eukaryotischen Zelllinien erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ unter Zugabe entsprechender Zellkulturmedien die von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen wurden. Diese Medien enthalten ein isotonisches, gepuffertes Grundmedium mit anorganischen Salzen, Nährstoffen und Aminosäuren.

Zelllinie	Zellkulturmedium	Einfriermedium
Chang	Medium 199 10 % FCS 2 mM Glutamin	85 % Medium 199 10 % FCS 5 % DMSO
Hek-293	DMEM 10 % FCS 2 mM Glutamin	85 % DMEM 10 % FCS 5 % DMSO
GE-11	DMEM high Glucose (4,5 g/l) 10% FCS 2 mM Glutamin	85 % DMEM high Glucose (4,5 g/l) 10 % FCS 5 % DMSO
GE-11- $\beta 1$	DMEM high Glucose (4,5 g/l) 10 % FCS 2 mM Glutamin 220 μ g/ml Zeocin	85 % DMEM high Glucose (4,5 g/l) 10 % FCS 5 % DMSO
2-4	DMEM high Glucose (4,5 g/l) 10 % FCS 2 mM Glutamin	85 % DMEM high Glucose (4,5 g/l) 10 % FCS 5 % DMSO

2-4-8	DMEM high Glucose (4,5 g/l) 10 % FCS 2 mM Glutamin 220 µg/ml Zeocin	85 % DMEM high Glucose (4,5 g/l) 10 % FCS 5 % DMSO
HL-60	RPMI 1640 Superior 10 % FCS Superior	70 % RPMI 1640 Superior 20 % FCS 10 % DMSO

Tab. 11 Zellkultur- und Einfriermedium der verwendeten eukaryotischen Zelllinien.

2.10 Puffer und Lösungen

Gelelektrophorese

TAE-Puffer	40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA
10 x DNS-Probenpuffer	50 % Glycerin, 0,1 M EDTA, 1 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Färbebad	1 µg Ethidiumbromid pro ml H ₂ O _{dest}

Herstellung Ca²⁺-kompetenter Zellen

TFB1-Puffer	30 mM Kac, pH 5,8, 50 mM MnCl ₂ , 100 mM RbCl, 10 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerin
TFB2-Puffer	10 mM NaMops, pH 7,0, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM RbCl, 15 % Glycerin

SDS-PAGE

SDS-Probenpuffer	1 M MgCl ₂	5 ml
	10 % SDS	20 ml
	Glycerin	5 ml
	β-Mercaptoethanol	2,5 ml
	Bromphenolblau	25 mg
	1 M Tris, pH 8,8	4,9 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 50 ml

SDS-Probenpuffer (ohne Mercaptoethanol)	1 M MgCl ₂	5 ml
	10 % SDS	20 ml
	Glycerin	5 ml
	Bromphenolblau	25 mg
	1 M Tris, pH 8,8	4,9 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 50 ml
10 x SDS-Laufpuffer	Tris	30,3 g
	Glycin	144,1 g
	SDS	10 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
Native PAGE		
Laufpuffer (50x)	250 mM Tris	
	1,92 M Glycin	
Probenpuffer	Glycerol	3 ml
	50 x Laufpuffer	0,6 ml
	Bromphenolblau	0,5 mg
	H ₂ O _{dest.}	ad 10000 ml
Coomassie Färbung		
Coomassie-Lösung	Methanol	500 ml
	Essigsäure	100 ml
	Coomassie Brilliant	0,15 %
	Blau R250	
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000ml
Entfärberlösung	Methanol	500 ml
	Essigsäure	75 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Westernblot

10 x Blotting-Puffer	Tris	30,3 g
	Glycin	144,1 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
1 x Blotting-Puffer	10 x Blotting-Puffer	100 ml
	Methanol	200 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
10 x PBS, pH 7,4	NaCl	80 g
	KCl	2 g
	Na ₂ HPO ₄	14,4 g
	KH ₂ PO ₄	2,4 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
PBS-T	10 x PBS	10 ml
	Tween 20	2 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
Blockierungs-Lösung	Milchpulver	5 % in PBS-T
	oder: FCS	20 % in PBS-T
Substratlösung	Diethanolamin	100 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
Substratgebrauchslösung	Substratlösung	200 ml
	0,9 % NaCl	800 ml
	1 M MgCl ₂	100 µl
NBT-Lösung	NBT	1 mg/ml H ₂ O _{dest.}
BCIP-Lösung	BCIP	5mg/ml DMF

Puffer B	NaH ₂ PO ₄	40 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	500 mM
Gelfiltration		
Phosphat-Puffer	NaH ₂ PO ₄	20 mM
	NaCl	100 mM
ELISA		
Substratpuffer 0,1 M pH 5,0	Zitronensäure	0,034 M
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	0,066 M
Schwefelsäure 0,5 M	95 % Schwefelsäure	2,8 ml
	H ₂ O _{dest.}	90 ml
Moviol-Lösung	Moviol 488	20 g
	PBS	80 ml
	Glycerin	40 ml
1 M Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	84,01 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
PBS-5 mM MgCl ₂ -Puffer	NaCl	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
	KCl	2,7 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	MgCl ₂	5 mM
Serumabsorption		
Bindepuffer pH 7,4	100 mM NaCl	
	50 mM Tris	
	2 mM MgCl ₂	
4 % PFA-Lösung	37 % in PBS	

2.11 Geräte

Geräte	Bezeichnung	Firma
Analysenwagen	440-35N	Kern & Sohn (Balingen-Frommern)
Blot-Apparatur	Mini-Trans-Blot	Bio-Rad (München)
Brutschrank	Typ B-20	Hereaus (Hanau)
CLSM	TCS-SP5	Leica Microsystems (Wetzlar)
Elektrophoresekammer für PAGE	Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad (München)
Elektroporationsgerät	MicroPulser™	Bio-Rad (München)
Mikrotiterplattenphotometer	Sunrise	Tecan Deutschland GmbH (Crailsheim)
Epifluoreszenzmikroskop	LEITZ DMDR	Leica Microsystems (Wetzlar)
FACS	BD Facs Canto II	BD Bioscience (Heidelberg)
Filmentwickler	Fujifilm FPM-100A	Fuji (Düsseldorf)
Gelelektrophoresekammer	Mini-SUB ^R Cell GT	Bio-Rad (München)
Geldokumentation	GelDoc EQ	Bio-Rad (München)
Lichtmikroskop	Axiovert 25	Zeiss (Jena)
Neubauer Zählkammer	Neubauer improved 0,1 mm	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
PCR-Cycler	Gene Amp PCR System 2700	Applied Biosystems (Darmstadt)
pH-Meter	DIGITAL-pH-Meter	Bachofer (Reutlingen)
Photometer	Ultraspec 3100 pro	Amersham Biosciences (Freiburg)
Ultraschall-Applikator	Sonifier 250	Branson (Danbury)
Zentrifugen		
Kühlzentrifuge	Sigma 3K30	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Standardzentrifuge	Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Cytospin	Cytospin 3	life-science international (Frankfurt)

Tab. 12 Liste der verwendete Laborgeräte.

Zusätzlich zu den in Tab. 12 aufgeführten Geräten wurden Standardlaborgeräte verwendet.

2.12 Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalie/Biochemikalie	Firma
1 kb Plus DNS-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
Aceton	Merck (Darmstadt)
Acrylamid-N, N-Methylen-Bisacrylamid Agar	Serva (Heidelberg)
Agarose	Peqlab (Erlangen)
Agar	BD Bioscience (Heidelberg)
Alexa488 Succinimidyl Esters	Invitrogen (Karlsruhe)
Ammonium-Persulfat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
BCIP	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
BD FACS Clean	BD Bioscience (Heidelberg)
BD FACS Flow	BD Bioscience (Heidelberg)
BD FACS Shutdownsolution	BD Bioscience (Heidelberg)
Blutagarplatten	Oxoid (Hampshire)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)

Material und Methoden

BSA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
CIAP	Fermentas (St. Leon-Rot)
CIN-Agar Platten	Oxoid (Hampshire)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Coomassie Brilliant Blue™ R250	Merck (Darmstadt)
DAPI-Mounting Medium Vectashield	Vector laboratories (Burlingame)
DMF	Merck (Darmstadt)
DMSO	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DMEM	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTP Mix	Invitrogen (Karlsruhe)
D-PBS	Invitrogen (Karlsruhe)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
ECL Western Blotting Reagenz	GE Healthcare (Freiburg)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biptec (Auburn)
FCS	Invitrogen (Karlsruhe)
FBS Superior	Biochrom (Berlin)
FITC	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Folin-Ciocateu's Reagenz	Fluka (Neu-Ulm)
Fuji Medical X-Ray Film Super Rx	Hartenstein (Würzburg)
Gentamicin	AppliChem (Darmstadt)
Giemsa	Merck (Darmstadt)
Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	MP Biomedicals (Ohio)
Harnstoff	MP Biomedicals (Ohio)
Hefe-Extrakt	MP Biomedicals (Ohio)
Immersionsöl	Zeiss (Jena)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
jetPEI™ Lösung	Polyplus Transfection Inc (New York)
Kaliumthiocyanat	AppliChem (Darmstadt)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Medium 199	Invitrogen (Karlsruhe)
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Millex-HV Filter 0.45 µm	Millipore GmbH (Eschborn)

NBT	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ni-NTA Agarose	Qiagen (Hilden)
OPD	Dako (Glostrup)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
Phospholipase A2	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Proteinase K	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Proteinstandard "BenchMark Pre-Stained"	Invitrogen (Karlsruhe)
Proteinstandard Seebue pre-stained	Invitrogen (Karlsruhe)
Protran BA Nitrozellulose Transfer Membran	Schleicher und Schüll (Dassel)
PVDF-Star-Transfer Membran	AppliChem (Darmstadt)
Restriktionsenzyme	Fermentas (St. Leon-Rot)
RNAse A	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
RPMI 1640	Invitrogen (Karlsruhe)
RPMI 1640 Superior	Biochrom (Berlin)
SDS	Serva (Heidelberg)
Schokoladenagarplatten	Oxoid (Hampshire)
Spectinomycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
T4 DNA-Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)
TEMED	Tetracyclin
Tetracyclin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypanblau	Merck (Darmstadt)
Trypsin/EDTA	Invitrogen (Karlsruhe)
Zeocin	Invitrogen (Karlsruhe)

Tab. 13 Verwendete Chemikalien und Biochemikalien.

2.13 Mikrobiologische Methoden

2.13.1 Kultivierungsverfahren

Soweit nicht anders beschrieben erfolgte die Kultivierung von *E. coli* Stämmen (Tab. 1) und *Y. enterocolitica* Stämmen (Tab. 2) in LB- bzw. BHI-Medium in einem Schüttelinkubator (180 U/min) bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 27 °C (*Y. enterocolitica*) unter aeroben Bedingungen unter Zugabe entsprechender Antibiotika. *Neisseria*-Stämme (Tab. 3) wurden auf Schokoladenagarplatten mit Vitox und entsprechenden Antibiotika bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.13.2 Stammhaltung

Für die Stammhaltung wurden *E. coli* und *Y. enterocolitica* Stämme in Einfriermedium (2.3) angelegt und bei -80 °C aufbewahrt. *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* Stämme wurden im Cryotube MicroBank System der Firma Novodirect GmbH (Kehl) bei -80 °C gelagert.

2.13.3 Isolierung von Plasmid-DNS

Die Isolierung der Plasmid-DNS wurde mit dem QIAGEN Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) und dem Plasmid DNA Purification Nucleo Bond PC100 Kit (Machery-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.13.4 Modifikation von DNS

In vitro-Modifikationen von DNS-Fragmenten, wie Restriktionen und Ligationen, wurden unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Linearisierte Vektoren wurden zur Vermeidung von Religationen für 15 min bei 37 °C mit alkalischer Phosphatase (CIAP) behandelt, die anschließend bei 75 °C für 15 min inaktiviert wurde.

2.13.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um eine enzymatische Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNS-Fragmente (Saiki *et al.*, 1988). Die Auswahl der verwendeten Polymerase richtete sich dabei nach der Größe der zu amplifizierenden DNS-Fragmente. Für DNS-Fragmente bis zu einer Größe von 2,5 kb wurde die AmpliTaq DNS-Polymerase von Applied Biosystems verwendet. Größere DNS-Fragmente wurden mit dem Expand high fidelity PCR-System von Roche vervielfältigt. Als Matrize wurde entweder Plasmid-DNS, oder 1 µl eines Bakterienlysats eingesetzt, welches aus einer Bakterienkultur stammt, die 1:10 mit H₂O_{dest.} verdünnt und aufgeköcht wurde (95° C für 5-10 min). Die Standard PCR-Reaktionsansätze sowie die PCR-Reaktionsprogramme sind in Tab. 14 und Tab. 15 dargestellt.

Komponenten	AmpliTaQ Polymerase	Expand high-fidelity Polymerase
10 x Puffer (mit 15 mM MgCl ₂)	5 µl	5 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl	5 µl
Oligonukleotide vorwärts/rückwärts (100 pmol/µl)	jeweils 1 µl	jeweils 1 µl
Polymerase	0,25 µl	0,25 µl
DNS	100 ng	100 ng
H ₂ O _{dest.}	ad 50 µl	ad 50 µl

Tab. 14 Verwendeter Standard PCR-Reaktionsansatz.

PCR-Schritte	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5/ 10* min	1
Deanturierung	95	45 sec	25-30
Hybridisierung	$T_M \pm 2$	1 min	
Elongation	72/ 68*	1 min / 1 kb	
Finale Elongation	72/ 68*	10 min	1

Tab. 15 Verwendetes Standard PCR-Reaktionsprogramm. T_M : Schmelztemperatur; *für die Expand high-fidelity Polymerase wurde als Elongationstemperatur 68 °C gewählt und die initiale Denaturierung für 10 min durchgeführt.

Die Hybridisierungstemperatur wurde unter Berücksichtigung der Schmelztemperatur T_M des Oligonukleotidprimers gewählt, die sowohl von der Länge als auch von der Sequenz der verwendeten Oligonukleotidprimer abhängig ist. Die Schmelztemperatur T_M wird nach folgender Formel (Suggs *et al.*, 1981) berechnet:

$$T_M [°C] = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C) \quad (A, C, G, T: \text{Anzahl der entsprechenden Nukleotide})$$

2.13.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem PCR Clean up, Gel-Extraction Kit Nucleo Spin Extract II (Machery-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers. Die Lagerung von aufgereinigten PCR-Produkten erfolgte bei -20 °C.

2.13.7 Agarosegelelektrophorese

Ein Verfahren zur Auftrennung von DNS-Molekülen im elektrischen Feld ist die Agarosegelelektrophorese. Die Nukleinsäuren wandern dabei aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode und werden in Abhängigkeit ihrer Molekularmasse und Konformation (linear, offen zirkular, oder verdrillt) aufgetrennt. Für die Agarosegelelektrophorese wurden die Proben mit 1 x DNS-Probenpuffer versetzt und auf Gele mit 1,0-2,0 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer aufgetragen (5 µl). Zur Bestimmung der Fragmentgröße diente ein 1 kb Plus DNS Leiter (Invitrogen). Der Gellauf erfolgte in horizontalen Gelkammern der Firma Bio-Rad bei 90 V für 45-60 min. Die Gele wurden anschließend im Ethidiumbromid-Färbepool gefärbt, und die Detektion der aufgetrennten DNS-Fragmente erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 254 nm.

2.13.8 Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem PCR Clean up, Gel-Extraction Kit Nucleo Spin Extract II (Machery-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers.

2.13.9 Photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration

Die Absorptionsmaxima einzelner Nukleotide in der DNS liegen bei pH 7,0 zwischen 253 nm und 271 nm. Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde nach Clark und Swika (1977) photometrisch bestimmt. Aliquots von Nukleinsäurelösungen wurden in 1 cm Quarzküvetten überführt und die Extinktionsmessung erfolgte in einem Spektralphotometer bei 260 nm ($E_{260 \text{ nm}}$).

Als Grundlage zur Berechnung der vorliegenden DNS-Konzentrationen aus den erhaltenen Adsorptionswerten dienen folgende Näherungswerte:

Doppelsträngige (ds) DNS: $E_{260 \text{ nm}} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$

Einzelsträngige (ss) DNS: $E_{260 \text{ nm}} = 1$ entspricht 33 $\mu\text{g} / \text{ml}$

Einzelsträngige (ss) RNS: $E_{260 \text{ nm}} = 1$ entspricht 40 $\mu\text{g} / \text{ml}$

Verunreinigungen der DNS, z.B. durch RNS oder Proteine, können durch die Bestimmung der Extinktion (E) bei 230, 260 und 280 nm und Bildung der Quotienten $E_{260 \text{ nm}}/E_{280 \text{ nm}}$ sowie $E_{260 \text{ nm}}/E_{230 \text{ nm}}$ festgestellt werden. Der für die Weiterbearbeitung der DNS nötige Reinheitsgrad ist bei folgenden Werten gewährleistet (Marmur *et al.*, 1961):

$E_{260 \text{ nm}}/E_{280 \text{ nm}} > 1,9$ sowie $E_{260 \text{ nm}}/E_{230 \text{ nm}} > 2,2$

2.13.10 DNS-Sequenzanalyse

Alle in dieser Arbeit hergestellten Plasmide (Tab. 4) wurden mit entsprechenden Sequenzierungs-Oligonukleotiden (Tab. 5) durch die Firma Agowa (Berlin) sequenziert. Die Sequenzierung der doppelsträngigen DNS erfolgte dabei nach dem Prinzip des "Cycle Sequencing", welches auf dem nach (Sanger *et al.*, 1977) beschriebenen Kettenabbruchverfahren mit Didesoxynukleotiden basiert.

2.13.11 Kompetente Zellen und Elektroporation

2.13.11.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Elektrokompetente Zellen wurden für die *E. coli* Stämme DH5 α und BL21 (DE3), sowie für die *Y. enterocolitica* Stämme WA-c und WA-c Δinv hergestellt. Dafür wurden in LB-Medium angesetzte Übernachtskulturen 1:50 in LB-Medium unter Zugabe entsprechender Antibiotika verdünnt. *E. coli* Zellen und *Y. enterocolitica* Zellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase $OD_{600} = 0,5$ angezüchtet und auf Eis für 15 min abgekühlt. Nachdem die

Zellen bei 4 °C für 15 min bei 4000 g zentrifugiert wurden, erfolgte das dreimalige Waschen mit 100 ml H₂O_{dest.}. Die Zellen wurden ein weiteres Mal mit 10 % Glycerin in H₂O_{dest.} gewaschen und schließlich in 100–200 µl 10 % Glycerin in H₂O_{dest.} aufgenommen und in Aliquots von 40 µl bei -80 °C gelagert.

2.13.11.2 Herstellung Ca²⁺-kompetenter Bakterien

Die Herstellung Ca²⁺-kompetenter Zellen erfolgte für den *E. coli* Stamm SM10 λ pir sowie für den *Y. enterocolitica* Stamm WA-c basierend auf dem modifizierten Protokoll nach Hanahan (Hanahan, 1983). Dafür wurden die in LB-Medium angesetzten Übernachtskulturen 1:100 in LB-Medium unter Zugabe entsprechender Antibiotika verdünnt, und bis zur logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ = 0,5) angezüchtet. Die Bakterienkulturen wurden für 5 min auf Eis abgekühlt und bei 4 °C für 15 min bei 4000 g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 30 ml TFB1-Puffer pro 100 ml Bakterienkultur resuspendiert und ein weiteres Mal bei 4 °C für 15 min bei 4000 g zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Pellets in 4 ml TFB2-Puffer pro 100 ml Bakterienkultur resuspendiert und in Aliquots von 100 µl bei -80 °C gelagert.

2.13.11.3 Transformation elektrokompenter Bakterien

Elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit DNS (1 µl Ligationsansatz oder 5 ng Plasmid-DNS) in eine Elektroporationsküvette (Bio-Rad, München) überführt. Die Transformation erfolgte bei 1,8 kV, 200 Ω und 25 µF (time constant > 4ms). Die Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium (2.3) aufgenommen und für 1,5 h bei 37 °C (*E. coli*) oder 27 °C (*Y. enterocolitica*) und 750 rpm in einem Thermoblock (Eppendorf, Hamburg) inkubiert.

100 µl, 200 µl und 500 µl der Bakteriensuspension wurden auf selektiven Agarplatten ausplattiert und bei 27 °C oder 37 °C bebrütet.

2.13.11.4 Transformation Ca²⁺-kompetenter Bakterien

Ca²⁺-kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und zusammen mit DNS (10 µl Ligationsansatz oder ca. 5 ng Plasmid-DNS) für 30 min auf Eis gekühlt und anschließend für 90 sek im Thermoblock (Eppendorf, Hamburg) bei 42 °C erwärmt. Die Zellen wurden sofort für weitere 60 sek auf Eis abgekühlt bevor die Zugabe von 1 ml SOC-Medium erfolgte. Die Zellen wurden für 1,5 h bei 37 °C oder 27 °C und 750 rpm in einem Thermoblock inkubiert

und 100 µl, 200 µl und 500 µl der Bakteriensuspension wurden auf selektiven Agarplatten ausplattiert und bei 27 °C oder 37 °C bebrütet.

2.13.12 Konjugation

Die Konjugation bezeichnet den horizontalen Transfer von DNS zwischen einem Donor- und einem Rezipienten-Stamm über Plasmabrücken. Die Grundlage der Konjugation bildet dabei das Vorhandensein eines Mobilitätselements („mob-site“) oder einer oriT-Seite („origin of transfer“) auf der zu transferierenden DNS. Zusätzlich werden bei der Konjugation Proteine benötigt, die in *tra*-Operons kodiert werden und die für die Ausbildung der Plasmabrücken essentiell sind. Für die Konjugation wurde das Suizidplasmid pGP704 verwendet, das zwar einen oriR6K besitzt, der jedoch für seine Funktion das Pi Protein benötigt welches vom *pir* Gen kodiert wird. Zusätzlich befindet sich auf dem Suizidplasmid eine Kopie des Mobilitätselements des Plasmids RP4, welches die Mobilisierung der DNS zum Rezipienten-Stamm ermöglicht. Für die Konjugation von pGP704 wurde der Helferstamm *E. coli* SM10 λ *pir* verwendet, da dieser eine Kopie des *pir* Gens besitzt und somit zur Aktivierung des oriR6K führt, was die Replikation des Plasmids ermöglicht. Als Donor-Stamm wurde *E. coli* SM10 λ *pir* mit dem Suizidplasmid pGP704 verwendet. Als Rezipient wurde *Y. enterocolitica* Stamm WA-314 Δ *yadA* verwendet. Für die Konjugation wurden Kulturen des Donor- und des Rezipienten-Stamms auf Blutagarplatten mit entsprechenden Antibiotika vorbereitet. Von diesen Platten wurden Kolonien des Donor- und des Rezipienten-Stamms im Verhältnis 1:3 entnommen und in 500 µl PBS vermischt. Diese Suspension wurde auf eine frische Blutagarplatte aufgetragen und bei der für den Donor-Stamm idealen Temperatur von 37 °C für 6 h inkubiert. Anschließend wurde ein Teil des „Konjugationsrasens“ in 1 ml PBS resuspendiert und auf selektiven Agarplatten für 36 h bei 27 °C ausplattiert um die Transkonjuganten zu isolieren.

2.13.13 Konstruktion von Plasmiden und Stämmen

2.13.13.1 Konstruktion von *E. coli* Stämmen mit pGPS-Plasmiden

Für die Herstellung verschiedener *nadA-yadA* und *nadA*-exprimierender Stämme wurden zunächst die Suizidplasmide pGPS:SS, pGPS-A-H und pGPS:HNSO hergestellt. pGPS:SS wurde durch Verwendung des Plasmids pUC-A-1 als Matritze für zwei PCRs mit den Oligonukleotiden A-Cla-f und A-87-r (PCR 1) und den Oligonukleotiden A-1270-f und A-

SphI-r (PCR 2) hergestellt. Das Ergebnis von PCR 1 war die Amplifizierung der *yadA* Signalsequenz sowie der *yadA*-Promotorregion, während die PCR 2 zur Amplifizierung der *yadA*-Terminatorregion führte. Nachdem pUC-A-1 mit den Restriktionsenzymen ClaI und SphI verdaut, und somit das enthaltene *yadA* entfernt wurde, erfolgte die Ligation von pUC-A-1 mit den PCR-Produkten aus PCR 1 und 2 wodurch der Vektor pUC:SS generiert wurde. Dieser besaß nur noch die *yadA* bp 1-87 sowie den *yadA*-Promotor- und Terminatorbereich. Dann wurde das EcoRI/SphI Fragment von pUC:SS in das EcoRI/SphI verdaute Plasmid pGP704 kloniert, was zur Generierung des Plasmids pGP:SS führte. Hieraus wurde schließlich durch Einbau der EcoRI/EcoRI-verdauten Spc-Kassette das Plasmid pGPS:SS hergestellt. Das Plasmid pGPS:SS wurde dann als Vektor für die Konstruktion des kompletten pGPS:*nadA* Plasmid verwendet. Dafür wurde das *nadA* vom *N. meningitidis* Stamm MC58 mit den Oligonukleotiden MC58-1-f und N-1089-r mittels PCR amplifiziert, mit SacI verdaut und in das Plasmid pGPS:SS kloniert was, zur Bildung des Plasmids pGPS:MC1089 führte (Abb. 7). Das *nadA* des Stamms Fam18 wurde auch mit den Oligonukleotiden Fam18-1f und N-1089-r amplifiziert, mit SacI verdaut und in den Vektor pGPS:SS kloniert wodurch das Plasmid pGPS:Fam1089 erhalten wurde (Abb. 7).

Für die Herstellung von *nadA-yadA*-Hybriden wurden zunächst zwei Plasmide pGPS-A-H und pGPS:HNSO konstruiert. Bei pGPS-A-H handelt es sich um das EcoRI/SphI Fragment von pUC-A-H welches in pGP704 eingebracht wurde und somit zum Plasmid pGP-A-H führte (Dissertation N. Ackermann). pGP-A-H wurde mit EcoRI verdaut und die EcoRI/EcoRI-verdaute Spc-Kassette wurde eingebracht (= pGPS-A-H). pGPS-A-H repräsentiert somit das Suizidplasmid mit *yadA* ohne bp 88-565 was der Kopfreion von YadA entspricht. Bei dem Plasmid pGPS-HNSO handelt es sich um das ClaI/SacI-verdaute Plasmid pGPS-A-N (Roggenkamp *et al.*, 2003), in welches das mit A-Cla-f und A-87-r amplifizierte PCR-Produkt von pUC-A-H über ClaI und SacI eingebracht wurde. Demnach enthält pGPS-HNSO *yadA* ohne die Basenpaare bp 88-645, was der Kopf- und Hals-Region von YadA entspricht. Diese Plasmide pGPS-A-H und pGPS:HNSO wurden schließlich für die Konstruktion unterschiedlicher *nadA-yadA*-Hybride verwendet. Dabei wurden zwei unterschiedlich lange *nadA*-Abschnitte der Stämme MC58 und Fam18 verwendet. Der kürzere *nadA*-Abschnitt, der der hypothetischen NadA-Kopfreion entspricht wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden MC-58-1f und N-270-r von dem *N. meningitidis* Stamm MC58 amplifiziert. Das somit entstandene PCR Produkt für *nadA* MC58 umfasste die bp 69-

270. Das *nadA* des *N. meningitidis* Stamms Fam18 wurde mit den Oligonukleotiden Fam18-1f und N-270-r amplifiziert (bp 69-270 *nadA* Fam18). Beide PCR-Produkte von *nadA* MC58 und Fam18 wurden mit *SacI* verdaut und jeweils in die Plasmide pGPS-A-H und pGPS:HNSO kloniert wodurch die Plasmide pGPS:M1, pGPS:M2, pGPS:F1, und pGPS:F2, entstanden (Abb. 7). Weitere *nadA-yadA*-Hybride die die NadA-Kopfregeion und die potentielle NadA-Halsregion besitzen wurden konstruiert, indem das *nadA* von MC58 mit den Oligonukleotiden MC58-1f und N-630-r amplifiziert wurde (entspricht *nadA* bp 69-630). Auch für Fam18 wurde *nadA* mit den Oligonukleotiden Fam18-1f und N-630-r amplifiziert (entspricht den bp 69-609). Beide PCR-Produkte wurden mit *SacI* verdaut und in die Plasmide pGPS-A-H und pGPS:HNSO eingebracht wodurch die Plasmide pGPS:M3, pGPS:M4, pGPS:F3, und pGPS:F4 entstanden sind (Abb. 7). Alle hier beschriebenen pGPS-Plasmide wurden schließlich in den *E. coli* Stamm SM10 *Apir* transformiert (2.13.11.4).

2.13.13.2 Konstruktion von *Y. enterocolitica* Stämmen mit modifizierten pYV-Plasmiden

Für die Herstellung von *nadA* und *nadA-yadA*-exprimierenden Yersinien wurden die unter 2.13.13.1 beschriebenen Suizidplasmide mittels Konjugation in den *Y. enterocolitica* Stamm WA-314 $\Delta yadA$ transferiert (2.13.12), wodurch die Plasmide pYVO8:M1, pYVO8:M2, pYVO8:M3, pYVO8:M4, pYVO8:MC1089, pYVO8:F1, pYVO8:F2, pYVO8:F3, pYVO8:F4, pYVO8:Fam1089 und pYV:SS generiert wurden.

2.13.13.3 Konstruktion von *Y. enterocolitica* Stämmen mit pACYC-Plasmiden

Um die Rolle von *nadA* und *nadA-yadA*-exprimierenden Yersinien ohne den Einfluss zusätzlicher Virulenzfaktoren, wie chromosomal kodiertes Invasin und auf dem Virulenzplasmid-kodierter Faktoren untersuchen zu können, wurden *nadA*, *yadA* und die *nadA-yadA*-Hybride in das Plasmid pACYC:*virF* (p) kloniert. pACYC:*virF* (p) besitzt das *virF*-Gen, das für den YadA-Transkriptionsaktivator VirF kodiert. Für die Herstellung von pACYC:*virF* wurde pACYC184 mit *SalI* und *SphI* verdaut. *virF* wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden *virF*-151f-*SphI* und *virF*-86r-*SalI* aus dem Plasmid pYVO8-A-1 amplifiziert, mit *SalI* und *SphI* verdaut und in den *SalI*/*SphI*-eröffneten Vektor pACYC184 eingebracht. Das so entstandene Plasmid pACYC:*virF* besitzt die *virF*-Promotorregion (151 bp vor dem *virF*), das komplette *virF*-Gen, sowie die Terminatorregion von *virF* (86 bp nach *virF*). Das *nadA* von *N. meningitidis* Stamm MC58, das *yadA* und die *nadA-yadA*-Hybride (von MC58 M1-M4) wurden aus den entsprechenden pGPS-Plasmiden mit den

Oligonukleotiden A-144f-XbaI und A-119r-BamHI amplifiziert und mit XbaI und BamHI verdaut. Diese Fragmente wurden in den mit BamHI und XbaI eröffneten Vektor pACYC:*virF* (p) ligiert und als pM1, pM2, pM3, pM4 und *pnadA* bezeichnet. Für die Konstruktion von *pyadA* und *pyadA*_{Δ88-564} wurde das *yadA* mit den Oligonukleotiden A-144f-XbaI und A-119r-BamHI aus den Plasmiden pGPS-A1 und pGPS-A-H amplifiziert und über XbaI und BamHI in pACYC:*virF* (p) ligiert. Alle Plasmide wurden erst in den elektrokompenten *E. coli* Stamm DH5α transformiert, bevor sie dann weiter in elektrokompente *Y. enterocolitica* WA-c Δ*inv* transformiert wurden.

2.13.13.4 Konstruktion von Expressionsplasmiden

Für die rekombinante Herstellung von *nadA* wurde das Expressionsplasmid pET21b:*nadA* (Tab. 4) konstruiert. pET21b:*nadA* entstand durch Amplifizierung von *nadA* aus pGPS:MC1089 mit den Oligonukleotidpaaren MC58-69f-NdeI und MC58-630r-XhoI (0). Das DNS-Fragment wurde mit NdeI und XhoI verdaut, in den linearisierten Expressionsvektor pET21b(+) ligiert, und in den Expressionsstamm BL21 (DE3) transformiert.

2.14 Methoden zum Arbeiten mit Proteinen

2.14.1 Präparation von *Y. enterocolitica* Ganzzelllysaten –*yadA*-Expression

Für die Induktion der *yadA*-, *nadA*- und *nadA-yadA*-Hybrid-Expression in *Y. enterocolitica* wurden die Yersinien zunächst bei 27 °C über Nacht in LB-Medium und entsprechender Antibiotika angezüchtet. Die Kulturen wurden am nächsten Tag 1:40 in RPMI-Medium mit entsprechenden Antibiotika verdünnt und bei 37 °C für 5 h inkubiert. 1 ml der Bakterienkultur wurde bei 8000 rpm für 2 min zentrifugiert und in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Lagerung der Proben für Westernblotanalysen erfolgte bei -20 °C.

2.14.2 Präparation von *Neisseria* Ganzzelllysaten

Für die Herstellung von *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* Ganzzelllysaten wurden die auf Schokoladenagarplatten kultivierten Neisserien (2.13.1) mit der Impföse von der Platte genommen und in 1 ml PBS resuspendiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für 2 min bei 4000 rpm wurden die Bakterien in SDS-Probenpuffer resuspendiert und für Westernblotanalysen bei -20 °C gelagert.

2.14.3 Präparation bakterieller Außenmembranproteine

Für den Nachweis der Produktion von NadA, YadA und NadA-YadA-Hybridproteinen und in ihre Integration in die äußere Membran von *Y. enterocolitica* wurden bakterielle Außenmembranproteine isoliert. Dabei handelt es sich um eine Methode bei der die Bakterien zunächst mit Lysozym behandelt werden, wodurch der Mureinsacculus degradiert wird. Durch die weitere Behandlung der Zellen mit EDTA und Sucrose wird die Membran durch Entzug der Ca^{2+} und Mg^{2+} -Ionen instabil, und es kommt zur Ausbildung von Sphärozyten. Diese können dann mittels Ultraschallbehandlung aufgebrochen werden, wodurch die Aufreinigung der Außenmembranproteine ermöglicht wird.

Für die Isolierung von Außenmembranproteinen wurden Yersinien Kulturen 1:40 in RPMI-Medium mit Antibiotika verdünnt und bei 37 °C kultiviert (2.14.1). Die bei 4000 g und 4 °C für 15 min zentrifugierten Bakterien wurden mit 50 mM Tris-1 mM MgCl_2 -Lösung zweimal gewaschen und in 500 µl 200 mM Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert. Die Zellyse erfolgte mit 1 ml Lyse-Puffer, 100 µl Lysozym-Lösung (2.10) und 3,2 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ für 30 min bei Raumtemperatur. Durch die anschließende Ultraschallbehandlung für 45 sec (3 x 15 sec mit 10 sec Pausen), wurden die Zellen aufgeschlossen und die Vesikel der Zytoplasmamembran und der äußeren Membran konnten durch Zentrifugation von den Zelldebris getrennt werden. Die Zellen wurden für 30 min bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde weitere 45 min bei 4 °C und 19000 rpm zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde in 5 ml Extraktionspuffer (2.10) aufgenommen und für 20 min bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert um die Zytoplasmamembran zu solubilisieren. Durch ein erneutes Zentrifugieren bei 19000 rpm für 45 min bei 4 °C, sowie das zweimalige Waschen des Pellets mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ für je 30 min bei 4 °C und 19000 rpm wurden die Außenmembranproteine von den restlichen solubilisierten Zytoplasmamembranproteinen getrennt. Das Sediment der Außenmembranproteine wurde in 200 µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ resuspendiert und zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Für Westernblotanalysen wurden 10 µg der Außenmembranproteine verwendet.

2.14.4 Autoaggregationsnachweis

Für den Nachweis der Autoaggregation/Autoagglutination wurden Vorkulturen von *Y. enterocolitica* in RPMI-Medium bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,1$ verdünnt, und dann für 7 h in Reagenzgläsern ohne Schütteln bei 37 °C inkubiert (Skurnik *et al.*, 1984). Yersinien welche

Autoaggregationsverhalten zeigen, können dabei als Bakteriensediment am Reagenzglasboden nachgewiesen werden. Zusätzlich wird der Überstand des RPMI-Mediums klar.

2.14.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.14.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Proteinbestimmungen nach Bradford wurden mit dem Bio-Rad Protein Assay Kit (2.8) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Standardprotein für die Erstellung von Eichgeraden wurde BSA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet. Die Absorptionsmessung erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Anhand der Eichgerade konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden. Die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgte für jede Probe im Doppelansatz und wurde als Mittelwert beider Werte bestimmt.

2.14.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration bakterieller Außenmembranproteine wurde das von Markwell *et al.*, 1978 modifizierte Lowry-Protokoll (Lowry *et al.*, 1951) verwendet. Die Lowry-Methode basiert auf zwei sequentiellen Reaktionen, durch die Proteinkonzentrationen von 0,1-1 µg löslicher und unlöslicher Proteine bestimmt werden können.

Bei der ersten Reaktion kommt es zur Ausbildung eines Komplexes zwischen den Cu(II)-Ionen in alkalischer Lösung und den Peptidbindungen, die dem Biuret-Komplex ähnelt. In einem zweiten Schritt erfolgt die Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) wodurch das gelbe Folin-Ciocalteu Reagenz zu Molybdänblau reduziert wird. Die resultierende Blaufärbung kann schließlich zur Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm verwendet werden. Als Standardprotein für die Erstellung von Eichgeraden wurde BSA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet. Jeweils 5 µl der Außenmembranproteine wurden in 995 µl H₂O_{dest.} verdünnt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 3 ml Reagenz C. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurden jeweils 300 µl einer 50 % Folin-Lösung zugegeben, vermischt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Messung der Absorption bei 750 nm sowie die Darstellung der ermittelten Absorptionen als Funktion der Konzentration der Standardproteinlösung konnten die Proteinkonzentrationen ermittelt werden.

2.14.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.14.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode, bei der Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Die SDS-Gele bestehen dabei aus einem 4 % Sammelgel und einem Trenngel, das je nach gewünschter Proteinauftrennung bzw. Molekulargewicht der Proteine einen Acrylamidgehalt von 8-12 % besitzen kann (Tab. 16). Die Proteine werden zunächst durch das Sammelgel an der Grenzfläche zum Trenngel konzentriert und dann im Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch den Probenpuffer und das im Gel vorhandene SDS kommt es zur Bildung negativ geladener Proteine, die im elektrischen Feld als Polyanionen zur Anode wandern können. Für die Herstellung der SDS-Gele wurde Acrylamid/Bis Lösung 29:1 von SERVA verwendet. Es wurden 0,75 mm dicke Gele der Größe 8 x 7 cm verwendet. Als Proteinstandard wurde der Standard "BenchMark Pre-Stained" oder „Seebblue prestained“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Vor dem Gellauf wurden die Proteinproben mit SDS-Probenpuffer (2.10) versetzt welcher β -Mercaptoethanol enthält, wodurch die Disulfidbrücken der Proteine reduziert werden. Zur vollständigen Denaturierung wurden die Proben vor dem Auftragen auf SDS-Gele bei 100 °C für 10 min aufgeköcht. Für den Nachweis von oligomerem YadA, NadA und den NadA-YadA-Hybriden wurden die Proben vor dem Auftragen bei 37 °C für 1,5 h in SDS-Probenpuffer inkubiert. Für den Nachweis von monomeren Proteinen, wurden Außenmembranproteine (2.14.3) zusätzlich mit 4 M Harnstoff in SDS-Probenpuffer für 10 min bei 100 °C inkubiert. Der Gellauf erfolgte in Mini-PROTEAN 3 Gelkammern (Bio-Rad, München) bei konstant 80 V für 20 min und anschließenden 180 V in 1 x SDS-Laufpuffer (2.10). Nach dem Gellauf wurden die Gele in Coomassie-Lösung (2.10) gefärbt und für Westernblotanalysen verwendet (2.14.8).

	10% Trenngel (10 ml)	11 % Trenngel (10 ml)	4% Sammelgel (2,5 ml)
1 M Tris/HCl, pH 8,0	3,75 ml	3,75 ml	-
0,25 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	1,25 ml
H ₂ O _{dest}	2,6 ml	2,2 ml	0,85 ml
30 % Acrylamid-Lösung	3,3 ml	3,7 ml	350 μ l
10 % SDS	200 μ l	200 μ l	50 μ l
10 % Ammoniumpersulfat	40 μ l	40 μ l	15 μ l
TEMED	20 μ l	20 μ l	15 μ l

Tab. 16 Verwendete Puffer und Lösungen, sowie Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamidgelen.

2.14.6.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der nativen PAGE werden Proteine ohne denaturierende Detergenzien wie SDS, DTT und β -Mercaptoethanol nach ihrem natürlichen Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennt. Für die Auftrennung der Proteine mittels nativer PAGE wurde das Tris-Puffer-basierte System verwendet, das einen pH-Wert von 8 hat, und somit ein Einwandern von Proteinen mit einem isoelektrischen Punkt $pI < 8$ ermöglicht. Die Herstellung von nativen Gelen erfolgte wie unter 2.14.6.1 beschrieben, allerdings wurde kein Sammelgel gegossen. Vor dem Gellauf wurden die Proteinproben mit Probenpuffer versetzt (2.10). Der Gellauf erfolgte bei 80 V für 3 h in Laufpuffer (2.10). Nach dem Gellauf wurden die Gele in Coomassie-Lösung (2.10) gefärbt und für Westernblotanalysen verwendet (2.14.8).

	Nativgel
1,5 M Tris pH 8,9	3,0 ml
40 % Acrylamid-Lösung	3,0 ml
TEMED	20 μ l
10 % Ammoniumpersulfat	160 μ l
H ₂ O _{dest.}	5,18 ml

Tab. 17 Verwendete Puffer und Lösungen für native Polyacrylamidgele.

2.14.7 Coomassie-Färbung

Nachdem Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden (2.14.6), erfolgte die Visualisierung der Proteine auf den SDS-Gelele mit Coomassie-Färbung (Weber und Osborn, 1969). Hierfür wurden die SDS-Gele für 30-60 min unter Schwenken in Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung (2.10), die mehrmals gewechselt wurde, entfärbt bis alle Proteinbanden deutlich zu erkennen waren.

2.14.8 Westernblot (Immunoblot)

Beim Westernblotverfahren werden Proteine, die mittels SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wurden, elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran übertragen und immobilisiert, wodurch ein Nachweis der Proteine mit spezifischen Antikörpern ermöglicht wird. Für Westernblotanalysen wurden SDS-Gele auf eine mit Methanol aktivierte PVDF- oder Nitrozellulose-Membran luftblasenfrei aufgebracht und zwischen Lagen von Filterpapier bedeckt. Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde in einer Mini Trans-Blot Kammer der Firma Bio-Rad (München) bei konstant 80 V für 60 min in 1 x Blotting-Puffer (2.10) durchgeführt. Freie Bindungsstellen der Membranen mit 20

% FCS in PBS-T oder 5 % Magermilchpulver in PBS-T (2.10) über Nacht bei 4 °C blockiert. Der Proteinnachweis erfolgte durch Inkubation der Membran mit spezifischen Primärantikörpern (Tab. 7) für 1-2 h bei Raumtemperatur unter Schwenken. Nachdem ungebundene Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS-T (jeweils 10 min) entfernt wurden, erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase- oder alkalischer Phosphatase-konjugierten Sekundärantikörper (Tab. 7) für 1-1,5 h bei Raumtemperatur. Ungebundene Antikörper wurden wieder durch dreimaliges Waschen mit PBS-T für je 10 min von der Membran entfernt. Die enzymatische Nachweisreaktion für Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper erfolgte mit dem „ECL Western Blotting System“ (GE Healthcare, München) nach Herstellerangaben und es wurde ein Röntgenfilm zur Belichtung aufgelegt. Bei Sekundärantikörpern, die mit alkalischer Phosphatase gekoppelt sind, wurde die Nachweisreaktion durch die Zugabe von 1 ml NBT-Lösung zu 9 ml Substratgebrauchslösung und 100 µl BCIP-Lösung durchgeführt (2.10). Die alkalische Phosphatase wandelt dabei das Nitroblautetrazolium in das rote Diformazan, und das 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in ein blaues Produkt um, so dass die Proteine als violette Banden auf der Membran erscheinen.

2.14.9 Far Westernblot

Zusätzlich zum Standard-Westernblotverfahren wurde in dieser Arbeit die Far Westernblot-Methode nach Wu *et al.* angewendet (Wu *et al.*, 2007). Dabei handelt es sich um eine etablierte Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro*. Für den Far-Westernblot werden „Beuteproteine“ („prey proteins“) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und wie bei dem Standard-Westernblotverfahren auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran transferiert (2.14.8). Die Proteine auf der Membran werden anschließend denaturiert und wieder renaturiert und mit Blockierungspuffer abgesättigt. In einem weiteren Schritte erfolgt die Inkubation der Membran mit dem sogenannten „Räuberprotein“ („bait protein“). Bilden das „Beuteproteine“ und das „Räuberprotein“ einen Komplex kann dies über den Nachweis des „Räuberproteins“ sichtbar gemacht werden. Der Far-Westernblot wurde in dieser Arbeit für den Nachweis der Interaktion von rekombinatem NadA Protein („bait protein“) mit aufgereinigtem humanem $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha \beta 3$ Integrin („prey protein“) (2.6) verwendet. 1 µg des $\alpha 5\beta 1$ und des $\alpha \beta 3$ Integrins wurden in SDS-Probenpuffer ohne Mercaptoethanol aufgenommen und mittels SDS-PAGE in ihre α - und β -Untereinheiten aufgetrennt (2.14.6). Nachdem die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen wurden (2.14.8), wurden die Integrinuntereinheiten durch Variation des Guanidin-HCl-Puffers schrittweise denaturiert und

renaturiert (Tab. 18). Die Absättigung der Membran erfolgte mit Blockierungspuffer über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden 5 µg des rekombinanten NadA Proteins auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Eine Komplexbildung von rekombinantem NadA Protein und der α5- bzw. β1-Untereinheit oder der αv- bzw. β3-Untereinheit wurde nach dreimaligem Waschen für 10 min mit PBS-T mittels anti-NadA Serum und Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat (Tab. 7) nachgewiesen. Um sicher zu stellen, dass die Integrine erfolgreich auf die PVDF-Membran übertragen wurden, wurde 1 µg des α5β1 und αvβ3 Integrins auf eine PVDF-Membran transferiert, denaturiert und renaturiert, jedoch ohne NadA-Protein inkubiert. Der Nachweis der β1 Integrinuntereinheit erfolgte dabei mit Maus anti-humanem Integrin β1 (MAB1981) Primärantikörper (1:1000) und Ziege anti-Maus IgG Peroxidase Konjugat (1:2000) (Tab. 7).

Guanidin-HCl Konzentration [M]	6	3	1	0,1	0
Glycerin	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
5 M NaCl	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
1 M Tris, pH 7,5	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
0,5 M EDTA	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
10 % Tween-20	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml
8 M Guanidin-HCl	18,75 ml	9,30 ml	3,13 ml	0,31 ml	0,0 ml
Milchpulver	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
1 M DTT	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
H ₂ O _{bdest.}	2,45 ml	12,82 ml	18,07 ml	20,89 ml	21,20 ml
totales Volumen	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml
Zeit/Temperatur	30 min, RT	30 min, RT	30 min, RT	30 min, 4 °C	über Nacht, 4 °C

Tab. 18 Zusammensetzung des Guanidin-HCl-Puffers, notwendige Inkubationszeit und Inkubationstemperatur für den FAR-Westernblot.

2.14.10 Proteinaufreinigung

2.14.10.1 Induktion der Proteinexpression in *E. coli*

Für die Herstellung von rekombinantem NadA Protein wurde das Expressionsplasmid pET-21b(+) verwendet, mit dem sechs Histidine an den C-Terminus des *nadA* Fragments angefügt wurden. Das *nadA* Fragment wurde über XbaI und NdeI hinter den T7-Φ10-Promotor in pET-21b(+) eingefügt (2.13.13.4). Die Transkription des T7-Φ10-Promotors erfolgt durch die T7-Polymerase die in dem Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) chromosomal kodiert ist und durch den *Ptaq*-Promotor reguliert wird. Daher erfolgt die Induktion der T7-Polymerase durch IPTG.

Für die Herstellung von rekombinantem NadA Protein wurde BL21 (DE3) pET-21b(+):*nadA* in LB-Medium und entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurde der Stamm 1:50 in 1000 ml LB-Medium mit Antibiotikum bis zu einer $OD_{600nm} \sim 0,6$ kultiviert, und die Proteinexpression wurde mit 1 mM IPTG für weitere 4-5 h bei 37 °C induziert. Die Zellen wurden bei 4000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet wurde bei -20 °C gelagert. Die Synthese von NadA wurde anschließend mittels SDS-PAGE (2.14.6) überprüft.

2.14.10.2 “Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography” (IMAC)

Die IMAC basiert auf der Interaktion zwischen Protein-Resten (Histidine, Cysteine und Tryptophane) und chelatbildenden Metallionen wie Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} oder Ni^{2+} und Cu^{2+} . Bei der IMAC wurde als stationäre Phase eine Agarosematrix verwendet, die über einen Chelator (NTA) an zweiwertige Metallionen (Ni^{2+}) gekoppelt ist. Durch die Zugabe des His₆-Tag Proteins auf die Matrix bindet dieses spezifisch an die zweiwertigen Metallionen. Durch einen Konzentrationsüberschuss an Imidazol dessen Struktur ähnlich der der Histidine ist, können die Proteine von der Matrix verdrängt, und dadurch eluiert werden.

Für Vortests wurden die His-, „Tag“-Proteine im kleinen Maßstab mit Nickel NTA-Beads der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Für die Affinitätschromatographie wurde das induzierte *E. coli* Pellet (2.14.10.1) in Puffer A aufgenommen und mit 4 mM PMSF und 250 U Benzonase resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch drei French Press-Zyklen (1000 psi). Im nächsten Schritt wurde die Suspension für 30 min bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand wurde auf eine HisTrap HP-Säule (GE Healthcare, München) aufgetragen. Durch Zugabe von Puffer A wurde die Ni^{2+} -Matrix gewaschen und das Zielprotein über einen Imidazolgradienten (0-500 mM in Puffer B) eluiert. Die native Aufreinigung des NadA Proteins wurde mittels SDS-PAGE und Westernblotanalysen überprüft.

2.14.10.3 Gelfiltration

Bei der Gelfiltration werden Proteine aufgrund ihrer Größenunterschiede in einer Matrix aufgereinigt. Große Moleküle können dabei nicht in die Poren der Polymere diffundieren und wandern innerhalb des Ausschlußvolumens als erste durch die Säule. Kleine Proteine diffundieren in die porösen Gelpartikel und eluieren entsprechend später.

Die Gelfiltration wurde mit einer Superdex 75 PC 3.2/30-Säule (GE Healthcare, München) durchgeführt. Zuerst wurde die Säule mit Phosphat-Puffer äquilibriert und die Proteinprobe aufgetragen. Die Eluate wurden fraktioniert und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.14.11 Markierung von Proteinen mit Alexa488

Die Fluoreszenzmarkierung von rekombinant hergestelltem NadA Protein erfolgte mit Alexa Fluor 488 Succinimidyl Ester (Invitrogen, Karlsruhe). Diese binden an freie primäre Amine und zeigen geringe Reaktivität mit aromatischen Aminosäuren. Für die Markierung von NadA wurde der Reaktionsansatz (Tab. 19) verwendet und bei Raumtemperatur unter Schwenken für 1,5 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Dialyse der Probe mit D-Tube Dialyze Midi Dialysesäulen (Novagen, Darmstadt) bei 4 °C über Nacht gegen 4 l PBS, sowie eine weitere Dialyse gegen 1 l PBS für 3 h.

Material	Volumen
NadA Protein 1,6 mg/ml	62,5 µl
Natriumhydrogencarbonat 1 M	67 µl
Alexa Fluor 488 Succinimidyl Ester in DMSO (5 mg/ml)	25 µl
1 x PBS	ad 670 µl

Tab. 19 Verwendeter Reaktionsansatz für die Fluoreszenzmarkierung von NadA mit Alexa488.

2.15 Methoden zum Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

2.15.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

2.15.1.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Die Kultivierung adhärenter Chang, Hek-293, GE-11, GE-11-β1, 2-4 und 2-4-8 Zellen (Tab. 10) erfolgte in Zellkulturflaschen (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) mit 15 ml 10 % FCS in Zellkulturmedium (Tab. 11) bei 37 °C und 5 % CO₂. GE-11-β1 Zellen wurden zusätzlich mit 220 µg Zeocin/ml Zellkulturmedium kultiviert, um die Selektion der β1 Integrin-exprimierenden Plasmide zu gewährleisten. Zur Aufteilung des konfluenten Zellrasens auf neue Zellkulturflaschen, oder zum Aussäen für Infektionsversuche wurden die adhärenen Zellen zunächst mit 10 ml 1 x PBS gewaschen und durch Zugabe von 0,25 % Trypsin/EDTA für 2-5 min bei 37 °C inkubiert, wodurch der Zellrasen vom Flaschenboden abgelöst wurde. Zur weiteren Subkultivierung wurden Chang Zellen im Verhältnis 1:4-1:10,

Hek-293 Zellen im Verhältnis 1:2-1:4, GE-11, GE-11-β1, 2-4 und 2-4-8 Zellen im Verhältnis 1:5-1:15 in frischem Medium verdünnt.

2.15.1.2 Kultivierung nicht-adhärenter Zellen

Die Kultivierung von nicht-adhärenten HL-60 Zellen (Tab. 10) erfolgte in Zellkulturflaschen mit 15 ml 10% FCS/RMPI-Medium (Tab. 11) bei 37 °C und 5% CO₂. Da es sich bei HL-60 Zellen um runde Einzelzellen in Suspension handelt, wurden diese zur Subkultivierung im Verhältnis 1:2-1:5 in frischem Medium alle 1-2 Tage aufgeteilt. Die Zelldichte sollte dabei zwischen 1,0 – 2,0 x 10⁶ Zellen/ml betragen.

2.15.2 Ausdifferenzierung von HL-60 zu dHL60 Zellen

Die humanen promyeloischen HL-60 Zellen können mittels DMSO zu neutrophilähnlichen Zellen (dHL-60) ausdifferenziert werden. Dafür wurden 1 x 10⁶ HL-60 Zellen in 15 ml 10 % FCS in RPMI-Medium mit 1,3 % DMSO für 5-6 Tage kultiviert. Während dieser Zeit kam es zur Ausdifferenzierung der HL-60 zu dHL-60 Zellen, die für weitere Infektionsversuche ausgezählt wurden (2.15.6).

2.15.3 Transfektion von Hek-293 Zellen

Für die Transfektion von Hek-293 Zellen mit pRc/CMV-CEACAM Plasmiden (Tab. 4) wurden 2,5 x 10⁵ Hek-293 Zellen in 2 ml Zellkulturmedium in 6-Well Platten (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit der jetPEI™ Lösung (Polyplus-transfection Inc, New York). Dafür wurden 6 µl jetPEI™ Lösung zu 95 µl 150 mM NaCl-Lösung gegeben, und vermischt. Anschließend wurden 3 µg der jeweiligen pRc/CMV-CEACAM Plasmid-DNS in einem Endvolumen von 100 µl 150 mM NaCl-Lösung verdünnt und vermischt. Nachdem die 100 µl DNS-Lösung und 100 µl jetPEI™ Lösung vermischt wurden, erfolgte die Inkubation der Lösung für 30 min bei Raumtemperatur. Für die Transfektion wurden 200 µl der jetPEI/DNS-Lösung tropfenweise auf die Zellen in 6-Well Platten gegeben und für 16-24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. 48 h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel und die Selektion der transfizierten Zellen wurde durch Zugabe von 1 mg/ml G418 in 10% FCS/DMEM durchgeführt. Alle 2-3 Tage wurde frisches Zellkulturmedium zugegeben und nach 7 Tagen wurde die Konzentration des G418 auf 0,4 – 0,5 mg/ml reduziert. 2-3 Wochen nach der Transfektion konnten G418-resistente Zellen

selektioniert werden, und durchflusszytometrisch (2.18.2) sowie mit Westernblotanalysen (2.14.8) auf die Produktion von CEACAM-Proteinen überprüft wurden. Positive Zellen wurden in flüssigem Stickstoff kryokonserviert (2.15.4)

2.15.4 Kryokonservierung von Zellen

Durch die Lagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff können diese über viele Jahre kryokonserviert werden. Konfluente Zellrasen von Chang Zellen wurden abgelöst (2.15.1.1) und in einer Konzentrationen von 5×10^5 Zellen in 1 ml Einfriermedium (Tab. 11) in Kryoröhrchen (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) konserviert. HL-60 Zellen wurden in einer Konzentration von $4-5 \times 10^6$ Zellen in 1 ml Einfriermedium (Tab. 11) konserviert. Konfluente Zellrasen von GE-11, GE-11- β 1, 2-4 und 2-4-8 Zellen wurden abgelöst (2.15.1.1) und in Konzentrationen von 5×10^5 Zellen in 1 ml Einfriermedium (Tab. 11) konserviert. Hek-293 Zellen wurden in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen in 1 ml Einfriermedium (Tab. 11) gelagert. Alle Kryoröhrchen wurden zunächst in einem mit Isopropanol befüllten Behälter bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ für 24 h eingefroren, wodurch eine kontrollierte Verringerung der Temperatur um 1°C/min ermöglicht wird. Danach wurden die Zellen in einen Stickstofftank überführt.

2.15.5 Auftauen von Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden für die Kultivierung bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ aufgetaut und sofort mit 10 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium versetzt, wodurch die im Einfriermedium enthaltene schädigende DMSO-Konzentration verdünnt wird. Aufgetaute Chang, Hek-293, GE-11, GE-11- β 1, 2-4, und 2-4-8 Zellen wurden bei 800 g für 5 min sedimentiert. HL-60 Zellen wurden nach dem Auftauen dreimal mit 10-20 ml Zellkulturmedium für 5 min bei 500 g gewaschen, da Restmengen von DMSO sonst zu einer Aktivierung der Zellen führen können. Alle Zellsedimente wurden mit Zellkulturmedium versetzt und in entsprechenden Zellkulturflaschen bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert.

2.15.6 Zellzahlbestimmung

Das Aussäen von definierten Zellkonzentrationen erforderte die genaue Bestimmung der Zellanzahl in Suspension. Dazu wurden 10 μl einer Zellsuspension mit 90 μl Tryphanblau-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verdünnt. Von dieser Lösung wurden 10 μl in eine Neubauer-Zellkammer gegeben. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurde die Anzahl der

Zellen pro Großquadrat ausgezählt. Die absolute Zellzahl/ml Suspension wurde unter Berücksichtigung des Kammerfaktors wie folgt bestimmt:

Anzahl der Zellen pro Großquadrat $\times 10 \times 10^4 =$ Zellzahl/ml

$10^4 =$ (Volumen des Großquadrates entspricht 10^{-4} ml)

10 = Verdünnungsfaktor

2.16 Methoden zur Untersuchung der Interaktion von Yersinien mit eukaryotischen Zellen

2.16.1 Kultivierung von *Y. enterocolitica* für Infektionsversuche

Yersinien wurden für Infektionsversuche mit Chang Zellen mit einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 100 eingesetzt. Für Infektionsversuche mit GE-11, GE-11- β 1 und dHL-60 Zellen wurden Yersinien mit einer MOI von 50 eingesetzt. Die MOI berechnet sich dabei aus dem Verhältnis der eingesetzten Yersinien-Konzentration in Suspension und der Zellzahl pro Infektionsansatz. Yersinien wurden wie unter 2.13.1 beschrieben angezüchtet, 1:40 in RPMI-Medium verdünnt und bis zu einer $OD_{600} \sim 0,3-0,4$ bei 37 °C kultiviert. Die Bakterien wurden bei 8000 rpm für 3 min sedimentiert, mit PBS gewaschen und in 1 ml Infektionsmedium (RPMI 1640 Superior, oder DMEM) resuspendiert. Die Bakterienanzahl von 100 μ l dieser Suspension wurde photometrisch bestimmt. Dabei entspricht ein OD_{600} von 1 empirischen $1,7 \times 10^8$ Bakterien/ml. Die gewünschte Konzentration an Yersinien wurde in Zellkulturmedium eingestellt und für Infektionsversuche verwendet.

2.16.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen für Infektionsversuche

Chang, GE-11, GE-11- β 1, und dHL60 wurden wie unter 2.15.1 beschrieben kultiviert. Nach Bestimmung der Zellzahl (2.15.6) wurden die Chang, GE-11 und GE-11- β 1 Zellen einen Tag vor dem Infektionsversuch in 24-Well-Platten (Greiner, Frickenhausen) ausgesät. Für mikroskopische Versuche wurden die nicht-adhärenenten dHL-60 Zellen am Infektionstag auf Glasplättchen in 24-Well Platten ausgesät. Folgende Zellkonzentrationen wurden in verschiedenen Infektionsversuchen verwendet.

Zellen	Zelleinsatz pro 24-Well	
	1 d	0 d
Chang	$1,0 \times 10^5$	-
GE-11	$1,0-2,5 \times 10^5$	-
GE-11- β 1	$1,0-2,5 \times 10^5$	-
dHL-60	-	$1,0 \times 10^6$

Tab. 20 Anzahl ausgesäter Zellen einen Tag (1 d) vor der Infektion bzw. am Tag (0 d) der Infektion.

2.16.2.1 Vorbehandlung von HL-60 und dHL-60 Zellen mit Fc-Block

Da es sich bei HL-60 und dHL-60 Zellen um phagozytierende Zellen handelt, wurde die Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytose von HL-60 und dHL-60 Zellen durch Behandlung der Zellen mit FcR Blocking Reagent (Miltenyt Biotec, Bergisch Gladbach) blockiert. Hierfür wurden 3×10^5 Zellen mit 10 μ l human FcR Blocking Reagent und 90 μ l 1 x PBS vermischt und bei 4 °C für 20 min inkubiert. Diese Behandlung erfolgte immer vor Durchführung von Infektionsversuchen und vor durchflusszytometrischen Analysen.

2.16.2.2 Oberflächenmodifikation von dHL-60 Zellen

Für Infektionsversuche wurden dHL-60 Zellen enzymatisch vorbehandelt. Um oberflächen-exponierte Proteinstrukturen zu modifizieren wurden 1×10^6 dHL-60 Zellen mit 100 μ g/ml Proteinase K für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (Laarmann and Schmidt, 2003), und anschließend mit 15 ml Proteinase Inhibitor Cocktail Complete blockiert. Die Zellen wurden zweimal bei 500 g für 5 min mit 10 ml 1 x PBS gewaschen. Um den Lipidgehalt der Zellmembran zu modifizieren, wurden 1×10^6 dHL-60 Zellen mit 800 μ g/ml Phospholipase A2 für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden nach der Phospholipase-Behandlung dreimal mit 10 ml 1 x PBS bei 500 g für 5 min gewaschen. Alle Zellen wurden in 1-5 ml 1 x PBS resuspendiert und die Zellzahl/Zellvitalität wurde neu bestimmt (2.15.6).

2.16.2.3 Vorbehandlung von GE-11 und GE-11- β 1 Zellen mit anti- β 1 Antikörper

Für Infektionsversuche mit Yersinien wurden die GE-11 und GE-11- β 1 Zellen mit dem Ratte anti-human β 1 Integrin Antikörper AIIB2 (Tab. 7) vorbehandelt. Dafür wurden in 24-Well Platten ausgesäte GE-11 und GE-11- β 1 Zellen (Tab. 20) mit AIIB2 (1:40 in Zellkulturmedium) für 45 min bei 37 °C und 5 % CO₂ behandelt. Vor der Verwendung der Zellen für Infektionsversuche wurde der Antikörper durch zweimaliges Waschen mit 500 μ l PBS von den Zellen entfernt.

2.16.3 Infektionsversuche mit Chang, GE-11 und GE-11- β 1 Zellen

2.16.3.1 Adhärenz- und Invasionsversuche

Für Adhärenz- und Invasionsversuche wurden ausgesäte humane Chang Zellen (2.16.2) mit Yersinien (MOI 100) in einem Infektionsvolumen von 500 μ l infiziert. Zur Synchronisierung wurden die Bakterien für 3 min bei 800 rpm auf die Zellen zentrifugiert, und für 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nicht-adhärenente Bakterien wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zelllyse erfolgte mit 1 % TritonX-100 in PBS für 2 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden Verdünnungsreihen der lysierten Zellüberstände hergestellt und auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert. Für die Quantifizierung intrazellulärer Bakterien wurden die Chang Zellen wie oben beschrieben infiziert, und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nachdem die nicht-adhärenente Bakterien durch dreimaliges Waschen entfernt wurden, erfolgte die Zugabe von 50 μ g/ml Gentamicin für weitere 1,5 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach dem dreimaligen Waschen der Zellen wurden diese mit 1 % TritonX-100 in PBS für 2 min bei Raumtemperatur lysiert, und entsprechende Verdünnungsreihen auf Agarplatten ausplattiert.

Für Adhärenz- und Invasionsversuche mit GE-11 und GE-11- β 1 Zellen wurden diese wie unter 2.16.2 beschrieben kultiviert oder zusätzlich mit anti- β 1 Integrin Antikörper vorbehandelt (2.16.2.3). Die Durchführung der Adhärenzversuche erfolgte dabei wie für Chang Zellen beschrieben, allerdings wurde für die Infektion eine MOI 50 für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ verwendet. Die Anzahl der intrazellulären Bakterien wurde mit 50 μ g/ml Gentamicin für 1,5 h bestimmt.

2.16.3.2 Kolokalisierung von β 1 Integrinen und *Y. enterocolitica*

Zur Kolokalisierung *nadA*-exprimierender *Y. enterocolitica* und humaner β 1 Integrin-positiver und -negativer Zellen, wurden $2,5 \times 10^5$ GE-11 und GE-11- β 1 über Nacht auf Glasplättchen in 24-Well Platten ausgesät. Die Infektion der Zellen mit Yersinien erfolgte mit einer MOI 50 für 30 min bei 37 °C. Nachdem nicht-adhärenente Bakterien durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt wurden, wurden die Infektionsansätze mit 4 % PFA-Lösung für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Das PFA wurde durch Waschen der Zellen mit PBS entfernt, und die Zellen wurden mit 10 % FCS in PBS 1 h bei 37 °C blockiert. Die Fluoreszenzmarkierung der β 1-Integrinstrukturen erfolgte mit dem Primärantikörper AIIB2 (1:4) (Tab. 7) für 45 min bei 37 °C. Die Präparate wurden dreimal mit PBS gewaschen und

mit dem Sekundärantikörper Ziege anti-Ratte PE (1:100) (Tab. 7) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nachdem die ungebundenen Antikörper durch Waschen mit PBS entfernt wurden, erfolgte das Einbetten der Glasplättchen mit einem Tropfen Vectashield DAPI mounting medium (Reactolab, Servion) auf einem Objektträger. Die mikroskopische Auswertung erfolgte am konfokalen Mikroskop Leica SP5 bei 100-facher Vergrößerung.

2.16.4 Infektionsversuche mit dHL60 Zellen

dHL-60 Zellen wurden für Infektionsversuche mit FcR-Blocking Reagenz (2.16.2.1), oder zusätzlich mit Proteinase K oder Phospholipase A2 vorbehandelt (2.16.2.2). 1×10^6 dHL-60 Zellen wurden auf Glasplättchen in 24-Well Platten ausgesät und mit Yersinien (MOI 50) infiziert, bei 500 rpm synchronisiert und für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Infektionsansätze wurden in Eppendorfgefäße überführt und mit PBS bei 500 rpm und 4 °C dreimal gewaschen, wodurch nicht-adhärente Bakterien entfernt wurden. Die Zellen wurden schließlich in 100 µl PBS resuspendiert und mittels Cytospin-Zentrifuge für 3 min bei 500 rpm auf Objektträger zentrifugiert. Durch Inkubation der Präparate in Methanol für 10 min bei -20 °C erfolgte die Fixierung der Infektionsansätze. Diese wurden getrocknet und für weitere 20 min bei Raumtemperatur im Dunklen mit 500 µl GiemsaLösung (1:20 in PBS) gefärbt, mit H₂O_{dest.} gespült und getrocknet. Die Objektträger wurden für die mikroskopische Auswertung mit einem Tropfen Mowiol (2.10) unter einem Deckglas eingebettet und mit Nagellack luftdicht verschlossen. Die mikroskopische Auswertung erfolgte am Leitz DMDR Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung. Dabei wurden die adhärenenten Bakterien pro Zelle in 50 Gesichtsfeldern (ca. 500 Zellen) ausgezählt und in Relation zur MOI 50 = 100 % gesetzt.

2.17 Methoden zur Untersuchung der Interaktion von Neisserien mit eukaryotischen Zellen

2.17.1 Kultivierung von *N. meningitidis* für Infektionsversuche

Neisserien wurden für Infektionsversuche mit einer MOI von 100 eingesetzt. Die Neisserien wurden wie unter 2.13.1 beschrieben angezüchtet, von den Platten genommen, bei 5000 rpm mit PBS gewaschen und in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm, erfolgte die Berechnung der Bakterienkonzentration. Ein OD₆₀₀ von 1 entspricht dabei empirischen 1×10^9 Bakterien/ml. Die gewünschte Konzentration an

Neisserien wurde in Infektionsmedium (1% FCS in DMEM) eingestellt und für Infektionsversuche verwendet.

2.17.2 Infektionsversuche mit GE-11 und GE-11- β 1 Zellen

Für Adhärenz und Invasionsversuche wurden die ausgesäten GE-11 und GE-11- β 1 Zellen (2.16.2) mit Neisserien (MOI 100) in einem Infektionsvolumen von 500 μ l infiziert. Zur Synchronisierung wurden die Bakterien für 3 min bei 400 rpm auf die Zellen zentrifugiert und für 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nicht-adhärenente Bakterien wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen wurden durch Zugabe von 1 % Saponin in PBS für 15 min bei 37 °C lysiert. Anschließend wurden Verdünnungsreihen der lysierten Zellüberstände hergestellt und auf Schokoladenagarplatten ausplattiert. Für die Quantifizierung intrazellulärer Bakterien wurden die GE-11 und GE-11- β 1 Zellen wie oben beschrieben infiziert, und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nachdem die nicht-adhärenente Bakterien durch dreimaliges Waschen entfernt wurden, erfolgte die Zugabe von 100 μ g/ml Gentamicin für weitere 60 min bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese mit 1 % Saponin in PBS für 15 min bei 37 °C lysiert und in entsprechenden Verdünnungsreihen auf Schokoladenagarplatten ausplattiert.

2.18 Immunologische Methoden

2.18.1 Nachweis von β Integrinen auf eukaryotischen Zellen

Der Nachweis von β Integrinen auf GE-11, GE-11- β 1, 2-4, 2-4-8, HL-60, dHL-60 und Chang Zellen erfolgte durch Antikörperfärbungen, die durchflusszytometrisch ausgewertet wurden. Für den Nachweis von β 1 Integrinen wurden 3 x 10⁵ GE-11, GE-11- β 1, 2-4 und 2-4-8 Zellen mit Hamster anti-Ratte CD29 FITC Konjugat (1:200) für 1 h bei 4 °C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS für 5 min bei 800 rpm entfernt. Für den Nachweis von β 1 und β 2 Integrinen auf HL-60 und dHL-60 Zellen wurden 5 x 10⁵ Zellen mit Hamster anti-Ratte CD29 FITC Konjugat (1:200) oder Maus anti-human CD18 PE Konjugat (1:40) für 1 h bei 4 °C inkubiert und bei lediglich 500 rpm für 5 min dreimal mit PBS gewaschen. Für Chang Zellen (3 x 10⁵) erfolgte der Nachweis von β 1, β 2, β 3, β 4 und β 5 Integrinen mit dem Maus anti-human β 1 Integrin, dem Maus anti-human β 2 Integrin, dem Maus anti-human β 3 Integrin, dem Maus anti-human β 4 Integrin und dem Kaninchen anti-human β 5 Integrin Antikörper (1 μ g/10⁶ Zellen) (Tab. 7). Zur Aktivierung der extrazellulären

Integrinstrukturen auf der Zelloberfläche von Chang, GE-11 und GE-11-β1 Zellen wurde in einem zusätzlichen Ansatz 2 mM MnCl₂ zugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 5 min bei 800 rpm erfolgte die Inkubation der Zellen mit den entsprechenden fluorochromkonjugierten Sekundärantikörpern Ziege anti-Kaninchen IgG FITC Konjugat (1:1000) oder Ziege anti-Maus Ig(G, A, M) FITC Konjugat (1:1000) für 1 h bei 4 °C. Alle Zellen wurden in einem Endvolumen von 200 µl PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch ausgewertet.

2.18.2 Nachweis von CEACAMs auf eukaryotischen Zellen

Die unter 2.15.3 beschriebenen mit CEACAM-Plasmiden transfizierten Hek-293 Zellen wurden auf Expression von CEACAM1 und CEACAM5 überprüft. Hierfür wurden 3 x 10⁵ der mit CEACAM1 und CEACAM5 transfizierten Hek-293 Zellen und untransfizierte Hek-293 Zellen mit Maus anti-human CEACAM1 oder Maus anti-human CEACAM5 (jeweils 1,2 µg/10⁶ Zellen) für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS bei 800 rpm für 5 min erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers Ziege anti-Maus Ig(G, A, M) FITC Konjugat (1:1000) für 1 h bei 4 °C. Die Zellen wurden erneut gewaschen und schließlich in einem Volumen von 200 µl PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch ausgewertet.

2.18.3 Nachweis von YadA und NadA auf der Oberfläche von *Y. enterocolitica*

Zum Nachweis der Oberflächenlokalisierung von YadA, NadA und NadA-YadA-Hybridproteinen in *Y. enterocolitica* wurden die entsprechenden Yersinien Stämme für 6 h bei 37 °C in RPMI-Medium angezogen. Die Zellernte erfolgte bei einer OD₆₀₀ ~ 0,3 und die Kultur wurde auf eine OD₆₀₀ ~ 0,1 eingestellt. 100 µl der auf OD₆₀₀ ~ 0,1 eingestellten Bakterienkultur wurden mit dem anti-YadA Antikörper 8D1 (1:100), oder mit anti-NadA Serum (1:50) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden mit PBS für 2 min bei 8000 rpm gewaschen und in 50 µl PBS aufgenommen. Von dieser Lösung wurden 5 µl auf das Well eines Objektträgers gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Hitzefixierung wurden die Objektträger kurz durch eine Flamme gezogen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 µl des Sekundärantikörpers anti-Kaninchen IgG FITC Konjugat (1:128) oder Ziege anti-Maus Ig(G, A, M) FITC Konjugat (1:128) für 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Die Objektträger wurden zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und mit H₂O_{dest.} gespült. Die getrockneten Objektträger wurden mit einem Tropfen Mowiol unter

einem Deckglas eingebettet und mit Nagellack verschlossen. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte am Leica DMDR bei 100-facher Vergrößerung.

2.18.4 Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Zur Visualisierung adhärenter und intrazellulärer Yersinien wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (Heesemann und Laufs, 1985). Dabei können mit Hilfe von Primärantikörpern und an Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper extra- und intrazelluläre Bakterien voneinander unterschieden werden. Für die Färbung wurden die mit Yersinien infizierten dHL-60 Zellen (2.16.4) mit dem Primärantikörper WA-Vital (1:5000) oder anti-NadA Serum (1:50) für 20 min bei 20 °C inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS bei 500 rpm gewaschen und mit Ziege anti-Kaninchen IgG Cy3 (1:50) für weitere 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS bei 500 rpm wurden die Zellen mittels Cytospin auf Objektträger zentrifugiert (3 min, 500 rpm). Nach dem Trocknen der Präparate erfolgte die Fixierung der Zellen mit Methanol bei -20 °C für 10 min, wodurch die Zellen permeabilisiert wurden und eine Färbung der intrazellulären Bakterien ermöglicht wurde. Die Bakterien wurden mit WA-Wital (1:5000) oder anti-NadA Serum (1:50) für 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Ungebundene Primärantikörper wurden durch Waschen der Objektträger mit PBS entfernt. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte schließlich mit Ziege anti-Kaninchen IgG FITC (1:128) für 20 min bei 37 °C. Nach der Immunfärbung wurden die Präparate mit einem Tropfen Mowiol unter einem Deckglas eingebettet und mit Nagellack luftdicht verschlossen. Die Visualisierung adhärenter und intrazellulärer Yersinien erfolgte am konfokalen Mikroskop bei 60-facher Vergrößerung. Extrazelluläre Bakterien konnten im Doppelfilter als gelbe Signale erkannt werden, wohingegen intrazelluläre Bakterien grün erschienen.

2.18.5 Bindungsnachweis isolierter Proteine an eukaryotische Zellen oder Yersinien

2.18.5.1 Bindung von rekombinantem NadA Protein an eukaryotische Zellen

Für den Bindungsnachweis von rekombinantem NadA Protein an GE-11, GE-11-β1, 2-4, 2-4-8, HL-60, dHL-60 und Chang Zellen wurden $3-5 \times 10^5$ Zellen verwendet. Diese wurden mit 1 µg Alexa-488 markierten NadA Protein (2.14.11) in einem Volumen von 200 µl PBS für 1 h bei 4 °C inkubiert. Durch das anschließende dreimalige Waschen der Zellen mit PBS für jeweils 5 min bei 800 rpm, oder 500 rpm für HL-60 und dHL-60 Zellen wurde ungebundenes

NadA Protein entfernt. Für den Bindungsnachweis von NadA Protein an CEACAM-transfizierte Hek-293 Zellen wurden 3×10^5 Zellen mit 2, 4, 8 und 20 $\mu\text{g/ml}$ unmarkiertem NadA Protein für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nachdem ungebundenes NadA Protein durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt wurde, erfolgte die Inkubation mit anti-NadA Serum (1:500) für 1 h bei 4 °C. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und mit anti-Kaninchen IgG FITC Konjugat (1:1000) für 1 h bei 4 °C inkubiert. Alle Proben wurden für die durchflusszytometrische Auswertung in 200 μl PBS aufgenommen.

2.18.5.2 Blockierung der Bindung von NadA Protein an eukaryotische Zellen

Um die Bindung von NadA Proteinen an $\beta 1$ Integrin-positive Zellen zu blockieren, wurden GE-11 und GE-11- $\beta 1$ Zellen mit $\beta 1$ Integrin blockierenden Antikörpern vorbehandelt. Hierfür wurde der Antikörper AIIB2 (1:40) für 45 min bei 4 °C, sowie der Antikörper LM534 (1:1000) (Tab. 7) für 1 h bei 4 °C verwendet. Die Blockierung der $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ und $\beta 5$ Integrine auf Chang Zellen erfolgte mit den Antikörper AIIB2 (1:40) für 45 min, P4H9 (anti- $\beta 1$), 25E11 (anti- $\beta 3$), ASC-9 (anti- $\beta 4$), AB1926 (anti- $\beta 5$), AIIB2 und 25E11, oder einer Mischung aller Antikörper (jeweils 1 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen) für 1 h bei 4 °C. Für Konkurrenzexperimente wurden Chang, GE-11 und GE-11- $\beta 1$ Zellen mit 5 μg unmarkiertem rekombinanten NadA Protein für 1 h bei 4 °C vorbehandelt. Nach der Behandlung der Zellen mit Antikörpern oder Proteinen wurden die Zellen jeweils dreimal mit PBS für 5 min bei 800 rpm gewaschen bevor die Zugabe von Alexa-488 markiertem NadA Protein erfolgte (2.18.5.1).

2.18.5.3 Bindung von *Y. enterocolitica* an extrazelluläre Matrixproteine

Für den Bindungsnachweis von Yersinien an verschiedene extrazelluläre Matrixproteine wurde die ELISA-Methode („enzyme-linked immunosorbent assay“) verwendet. Dabei können Yersinien, welche an immobilisierte Proteine gebunden sind, durch eine enzymgekoppelte Antikörperreaktion nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde die Bindungsfähigkeit von Yersinien an Kollagen Typ I, Fibronectin und Matrigel getestet. Hierfür wurden 96-Well Platten Typ Microlon 600 (Greiner, Frickenhausen) mit je 50 μl Kollagen Typ I-Lösung (20 $\mu\text{g/ml}$ PBS), Fibronectin-Lösung (10 $\mu\text{g/ml}$ PBS), und Matrigel-Lösung (10 $\mu\text{g/ml}$ PBS) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Als Negativkontrolle wurden unbeschichtete Wells verwendet. Am nächsten Tag wurden die Lösungen entfernt und die immobilisierten Proteine wurden mit je 200 μl einer 0,5 % BSA-PBS Lösung pro Well für 1 h

bei 37 °C blockiert. Nach fünfmaligem Waschen der Platten mit 0,1 % PBS-Tween erfolgte die Zugabe von 100 µl entsprechender Yersinien-Kulturen, die bei 37 °C angezüchtet und auf eine $OD_{600} \sim 0,5$ eingestellt wurden. Die Bindung erfolgte für 1 h bei 37 °C. Durch weiter fünf Waschschriffe mit 0,1 % PBS-Tween wurden die ungebunden Bakterien entfernt. Der Bindungsnachweis erfolgte durch Inkubation mit 100 µl des Primärantikörpers WA-Vital (1:10000) für 1 h bei 37 °C. Nach weiteren fünf Waschschriffen mit 0,1 % PBS-Tween wurden 100 µl des Sekundärantikörpers Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat (1:5000) für 1 h bei 37 °C zugegeben. Nach weiteren fünf Waschschriffen mit 0,1 % PBS-Tween erfolgte der Bindungsnachweis mit einer enzymatischen Farbstoffreaktion. Hierfür wurden 100 µl der Detektionslösung (2.10) in die Wells pipettiert und für 15 min im Dunkeln inkubiert, bis es zu einer Gelbfärbung der Lösung kommt. Die Reaktion wurde durch 100 µl 0,5 M Schwefelsäure abgestoppt. Die Platten wurden in einem Mikrotiterplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 491 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm vermessen.

2.18.5.4 Bindung von Yersinien an CEACAM-Überstände

Um die Interaktion von Yersinien mit CEACAM-Überständen nachzuweisen, wurde das Bindungsprotokoll nach Kuespert *et al.*, verwendet (Kuespert und Hauck, 2009). Hierfür wurden 4×10^6 *Y. enterocolitica* oder *N. gonorrhoeae* Stämme mit 250 µl CEACAM-Zellkulturüberstand für 30 min bei 20 °C in einem Rotationsmischer inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden von C. Hauck (Lehrstuhl Zellbiologie Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt und enthalten GFP-markierte lösliche CEACAM1, 3, 5, 6 oder 8 Konstrukte. Die Bakterien wurden zweimal mit PBS bei 5000 rpm für 5 min gewaschen, in 200 µl PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

2.18.6 Interaktion von Yersinien mit humanem Serum

2.18.6.1 Serumresistenz

Die Serumresistenz bezeichnet im Wesentlichen die Resistenz von Bakterien gegen die komplementvermittelte bakterielle Lyse. Hierfür wurden Yersinien in RPMI-Medium bei 37 °C angezüchtet und mit PBS-5mM $MgCl_2$ -Puffer bei 10000 rpm für 2 min gewaschen. Die Bakterien wurden auf eine $OD_{600} \sim 0,3$ eingestellt (entspricht einer Zellzahl von 5×10^7 Bakterien pro ml). Die Kulturen wurden 1:50 in PBS-5mM $MgCl_2$ -Puffer verdünnt und 100 µl der Kultur wurden mit 100 µl humanem Serum vermischt. Bei dem Serum handelte es sich

um Blut freiwilliger Spender, welches vermischt wurde und durch Zentrifugation bei 3000 rpm bei 4 °C für 10 min als Überstand abgenommen werden konnte. 100 µl der Bakterien-Serumsuspension wurden direkt in Verdünnungen von 1:10 und 1:1000 auf LB-Agarplatten ausplattiert (= Zeitpunkt 0), während die restlichen 100 µl für 90 min bei 37 °C inkubiert wurden, bevor sie ausplattiert wurden (= Zeitpunkt 90). Nach zwei Tagen konnte die Anzahl der Kolonien zum Zeitpunkt 90 bestimmt werden und in Relation zur Kolonienzahl zum Zeitpunkt 0 gesetzt werden, wodurch die Überlebensrate bestimmt werden konnte. Die Überlebensrate des YadA-positiven Stamms wurde als Faktor 1 (=100 %) festgelegt und in Bezug zur Überlebensrate der NadA- und NadA-YadA-positiven Stämme gesetzt.

2.18.6.2 Serumabsorptionsexperiment

Bei Serumkreuzabsorptionsversuchen werden Proteine aus hitzeinaktiviertem Serum (56 °C, 10 min), die mit Yersinien-spezifischen Oberflächenproteinen interagieren können, eluiert und mit Hilfe von Westernblot-Analysen nachgewiesen. Hierfür wurden 1×10^9 Yersinien mit 100 µl hitzeinaktiviertem Serum in 10 mM EDTA und 100 µl Bindungspuffer für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fünfmal mit 1 ml Bindungspuffer gewaschen. Serumproteine wie C4BP oder Faktor H, welche möglicherweise an die Zelloberfläche der Bakterien gebunden haben, wurden mit 150 µl 2 M NaCl eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden 1:3 in PBS verdünnt und in SDS-Probenpuffer für 10 min bei 100 °C aufgekocht. 15 µl der eluierten Fraktionen sowie der nach Elution mit NaCl verbleibenden Zellsedimente wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen für Westernblotanalysen transferiert (2.14.8). Als Negativkontrolle wurden 15 µl unbehandelter Bakterienganzzelllysate für Westernblotanalysen verwendet (2.14.1). Die auf eine Nitrozellulosemembran oder PVDF-Membran transferierten Lysate und Überstände wurden auf Bindung von C4bBp und Faktor H überprüft. Der Nachweis der C4BP-Bindung erfolgte mit dem Schaf anti-human C4BP Antikörper (1:1000) für 2 h bei 37 °C, und Kaninchen anti-Schaf IgG Peroxidase Konjugat (1:2000) für 1 h bei Raumtemperatur. Der Nachweis der Faktor H Bindung erfolgte mit Ziege anti-human Faktor H Antikörper (1:1000) für 2 h bei Raumtemperatur und Kaninchen anti-Ziege IgG Peroxidase Konjugat (1:10000) für 1 h bei Raumtemperatur.

2.18.7 Herstellung von anti-NadA Kaninchen Serum

Für die Herstellung von anti-NadA Serum wurden 500 µg des rekombinanten NadA₂₄₋₂₁₀ Proteins (2.14.10) für die Immunisierung von zwei Kaninchen verwendet. Die Immunisierung wurde durch den Pineda Antikörper-Service (Berlin) durchgeführt. Dabei wurden 500 µg des NadA₂₄₋₂₁₀ Proteine zusammen mit „Freund's complete adjuvant“ am Tag 1 intradermal verabreicht. Am Tag 20, 30, 35, 61 und 75 erfolgte ein subkutaner „Boost“ mit Freudschem inkomplettem Adjuvans. Die Blutentnahme erfolgte am Tag 90 und das Serum wurde mittels SDS-PAGE (2.14.6) und Westernblot (2.14.8) auf seine Reaktivität getestet.

2.19 Tierversuche

2.19.1 Mäuse

Für Tierversuche wurden 6-8 Wochen alte weibliche Balb-c Mäuse verwendet (Janvier Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich). Die Mäuse wurden in Gruppen von fünf Tieren in individuell belüfteten Käfigen (Tecniplast, Buguggiate, Italien) im Tierstall des Max von Pettenkofer-Institut gehalten. Tierversuche wurden gemäß der geltenden Rechtsgrundlage (Tierversuchsantrag: 55.2-1-54-2531-153-07) durchgeführt.

2.19.2 Infektion von Mäusen mit *Y. enterocolitica*

Für Mausinfektionsversuche wurden zunächst 20 µl einer in PBS gewaschen Yersinien-Kultur intraperitoneal in eine Maus injiziert und nach 24 h durch eine Peritoneallavage mit PBS wieder entnommen. Die so passagierten Bakterien wurden in 100 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C kultiviert und bei 5000 g für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml 10 % Glycerin-LB aufgenommen und in Aliquots von 1 ml bei -80 °C gelagert. Für Infektionsversuche wurden die Glycerinkulturen aufgetaut, mit PBS gewaschen und in entsprechenden Konzentrationen in PBS verdünnt. Für perorale Infektionen wurden 1×10^9 Yersinien pro Maus verwendet, bei intraperitonealen (i.p.) Infektionen wurden 5×10^4 Bakterien pro Maus injiziert.

2.19.3 Erfassung von *Y. enterocolitica* in Mausorganen

Die peroral infizierten Mäuse wurden nach einer Infektionsdauer von 5 Tagen, und die i.p.-infizierten Mäuse wurden nach einer Infektionsdauer von 2 und 4 Tagen mit CO₂ getötet. Zur Bestimmung der Keimzahl in verschiedenen Organen, wurden Milz, Leber und Peyer'schen

Plaques entnommen, sowie der Darminhalt mit PBS ausgespült. Die Organe wurden homogenisiert und in entsprechenden Verdünnungsstufen auf CIN-Agarplatten ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h erfolgte die Bestimmung der CFU in Relation zum Gewicht des entsprechenden Organs.

2.19.4 Erfassung von *Y. enterocolitica* in Mäusen mit dem Lux-System

Für den Nachweis von WA-314-lux Yersinien in oral infizierten Mäusen wurden diese nach 5 Tagen intraperitoneal mit 120 mg L-Arabinose in PBS behandelt, wodurch eine Induktion des unter dem P_{BAD} stehenden *luxCDABE* Operons stattfindet. 2,5 h nach der Luciferase-Induktion erfolgt die Messung der Lumineszenz mit dem IVIS Lumina System (Xenogen). Hierfür wurden die Mäuse mit Isofluran und dem Anästhesiesystem XGI-8 (Xenogen) betäubt. Die Software Living image 2.5 (Xenogen) wurde für die Quantifizierung der Emissionsintensität verwendet.

2.20 Auswertung durchflusszytometrischer Analysen

Für durchflusszytometrische Analysen wurden 10000 Ereignisse (in der Regel Einzelzellen) jeder Probe im FACS Canto II gemessen und ausgewertet. Zunächst wurde die Hauptpopulation mit Hilfe des Größen- (FCS) und des Granularitätsparameters (SSC) im Punktwolkendiagramm festgelegt. Die Fluoreszenzsignale wurden so eingestellt, dass die mittlere Fluoreszenzintensität der ungefärbten Zellpopulation oder Bakterienpopulation ungefähr bei einem Wert von 100 lag. Zur Ermittlung der Gesamtfluoreszenz transfizierter Zellen wurde das Produkt aus dem ermittelten Prozentsatz der positiv fluoreszierenden Ereignisse und deren mittlere Fluoreszenzintensität gebildet. Für den Bindungsnachweis von Proteinen an Zellen oder Bakterien wurde die gemessene mittlere Fluoreszenzintensität („mean fluorescence intensity,“) der Probe in Relation zur ungefärbten Probe gesetzt.

2.21 Statistische Auswertung

Infektionsversuche mit eukaryotischen Zellen wurden mindestens dreimal in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Bindungsversuche isolierter Proteine an eukaryotische Zellen sowie ELISA-Experimente, Serumresistenzversuche und durchflusszytometrische Analysen wurden in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Von den Ergebnissen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt, sowie die Signifikanz der Ergebnisse durch den Student T-Test berechnet. Der T-Test wurde ungepaart und zweiseitig

durchgeführt. Signifikanz-Werte von $(p) \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 *nadA*- und *nadA-yadA*-exprimierende *Y. enterocolitica* Stämme

Für die funktionelle Untersuchung des *Neisseria meningitidis* Adhäsins NadA wurde das *nadA* Gen des *N. meningitidis* Stamms MC58 (Serogruppe B:15:P1.7, 16b, Allel 1) sowie das *nadA* Gen des Stamms Fam18 (Serogruppe C:2a:P1.5,2, Allel 2) verwendet. Zusätzlich wurden verschiedene *nadA-yadA* Fusionsgene hergestellt, welche unterschiedlich lange Bereiche der NadA Kopf- und Halsdomäne besitzen. Sequenzvergleiche konnten zeigen, dass das NadA Protein (*nmb* 1994, Stamm MC58 Allel 1) eine Sequenzidentität von 32-34 % zu den Oca-Proteinen UspA2 von *M. catarrhalis* sowie dem YadA Protein von *Yersinia* spp. aufweist (Comanducci *et al.*, 2002). Basierend auf Sequenzvergleichen verschiedener Proteine der Oca-Protein Familie (Hoicyk *et al.*, 2000) wurde das NadA Protein des Stamms Fam18 und MC58 in verschiedene Domänen unterteilt (Abb. 6). Das NadA Allel 1 (MC58) besitzt eine Signalsequenz von 23 Aminosäuren. Die Kopfdomäne umfasst die Aminosäuren 24-90 und die potentielle Halsdomäne (Konnektor) befindet sich vermutlich im Bereich der Aminosäuren 91-210. Die Aminosäuren 211-310 umfassen die Stieldomäne („coiled-coil“ Strukturen) und die Aminosäuren 311-362 den hochkonservierten C-terminalen Membranankerbereich. Der Vergleich der Aminosäuresequenz des NadA Allel 1 (MC58) mit dem NadA Allel 2 (Fam18) zeigte eine Sequenzidentität beider Proteine von 83,46 %, und ermöglichte die Unterteilung des NadA Allel 2 (Fam18) in die Bereiche Signalsequenz (AS 1-23), Kopfdomäne (24-90), Halsdomäne (91-203), Stieldomäne (204-364) und Membrananker (365-397) (Abb. 6).

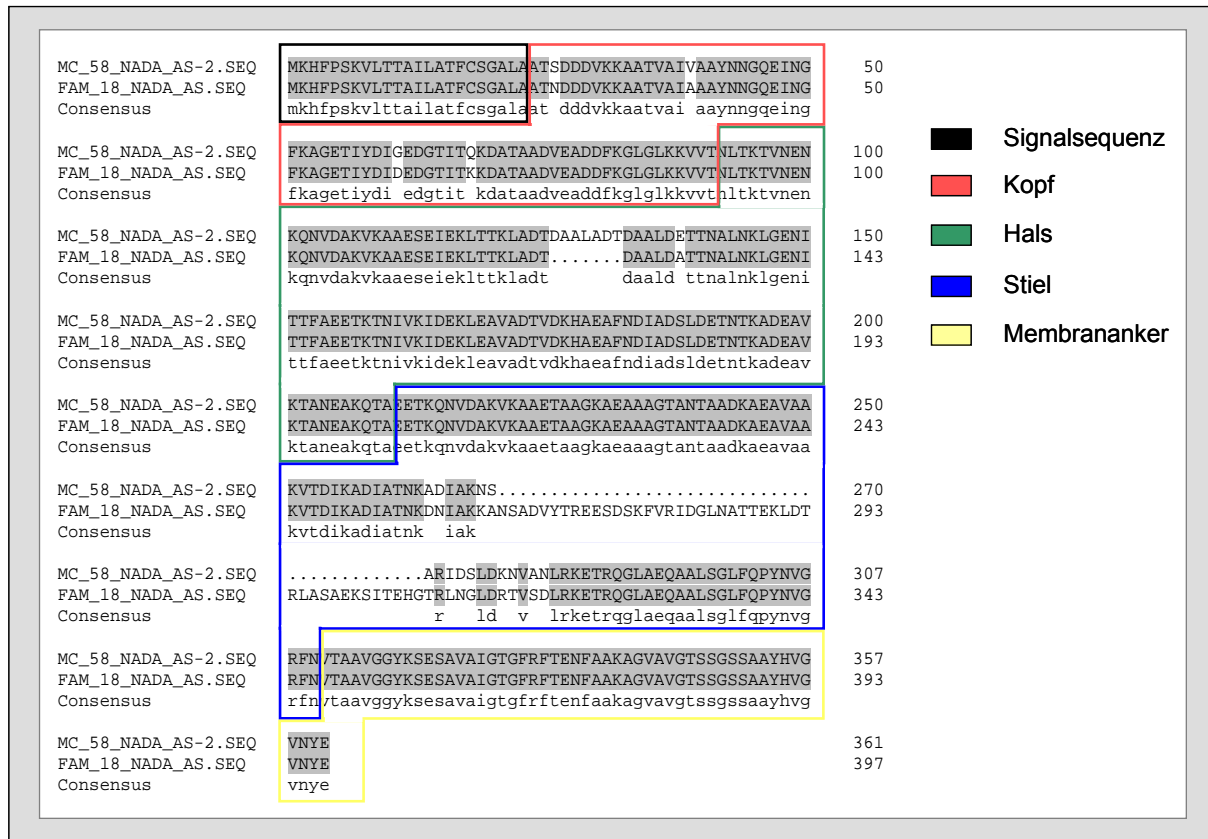


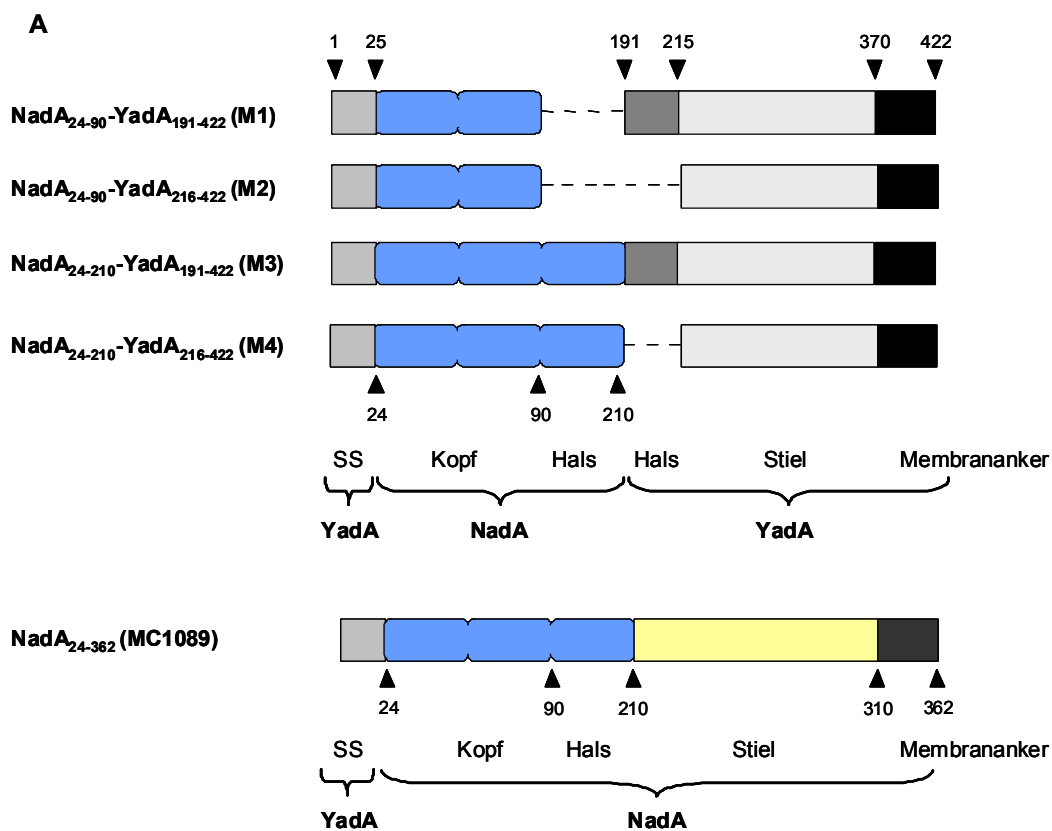
Abb. 6 Aminosäuresequenzvergleich des NadA Protein von *N. meningitidis* MC58 (Allel 1) und Fam18 (Allel 2). Die farblich markierten Sequenzabschnitte geben die einzelnen Domänen der Proteine an. schwarz: Signalsequenz; rot: Kopfdomäne; grün: Halsdomäne (Konnektor); blau: Stieldomäne; gelb: Membrananker.

3.1.1 Herstellung von *nada*- und *nada-yada*-Fusionsgenen

Zur Herstellung *nada* und *nada-yada* exprimierender Invasin- und pYV Plasmid-positiver *Y. enterocolitica* wurden das *nada* von MC58 und Fam18 mittels PCR amplifiziert und über *SacI* in die Suizidplasmide pGPS:HNSO, pGPS-A-H oder pGPS:SS kloniert. Durch dieses Verfahren wurden das *nada* von MC58 (AS 23-362) und Fam18 (AS 23-397) (pGPS:MC1089 und pGPS:Fam1089), und jeweils vier verschiedene *nada-yada* Fusionsgene für MC58 und Fam18 hergestellt (pGPS:M1, pGPS:M2, pGPS:M3, pGPS:M4, pGPS:F1, pGPS:F2, pGPS:F3, pGPS:F4). Das Plasmid pGPS:M1 trägt die Kodons für die NadA-Kopfdomäne von MC58 (AS 24-90) und die Yada-Aminosäuren 1-29 und 191-422, während pGPS:M2 die Kodons für dieselbe MC58-Kopfdomäne und die Yada-Aminosäuren 1-29 und 216-422 besitzt. pGPS:M3 und pGPS:M4 besitzen beide die gleiche NadA Kopf- und -Halsdomäne von MC58 (AS 24-210) während pGPS:M3 die Yada-Aminosäuren 1-29 und

191-422, und pGPS:M4, die YadA-Aminosäuren 1-29 und 216-422 besitzt (Abb. 7.A). Das Plasmid pGPS:F1 trägt die Kodons für die NadA-Kopfdomäne von Fam18 (AS 24-90) und die YadA-Aminosäuren 1-29 und 191-422, während pGPS:F2 die gleiche Fam18-Kopfdomäne, aber die YadA-Aminosäuren 1-29 und 216-422 besitzt. pGPS:F3 und pGPS:F4 besitzen die NadA-Kopfdomäne von Fam18 (AS 24-203) und die YadA-Aminosäuren 1-29 und 191-422, oder 1-29 und 216-422 (Abb. 7.B). Die Suizidplasmide wurden in *E. coli* SM10 λ pir transformiert (2.13.13.1) und mit dem *yadA*-negativen *Y. enterocolitica* Stamm WA-314 Δ *yadA* konjugiert (2.13.12). *nadA*-positive Transkonjuganten wurden mittels PCR und Sequenzierung auf Integration der Suizidplasmide überprüft.

Für die Herstellung Invasin-negativer *Y. enterocolitica* Konstrukte ohne Virulenzplasmid wurde nur das *nadA* und die *nadA-yadA* Fusionsgene des Stamms MC58 verwendet. *nadA*, *yadA* und die *nadA-yadA* Fusionsgene wurden mittels PCR amplifiziert und in das Plasmid pACYC:*virF* kloniert (2.13.13.3). Positive Plasmide wurden zunächst in *E. coli* DH5 α transformiert, bevor sie in *Y. enterocolitica* WA-c Δ *inv* eingebracht wurden.



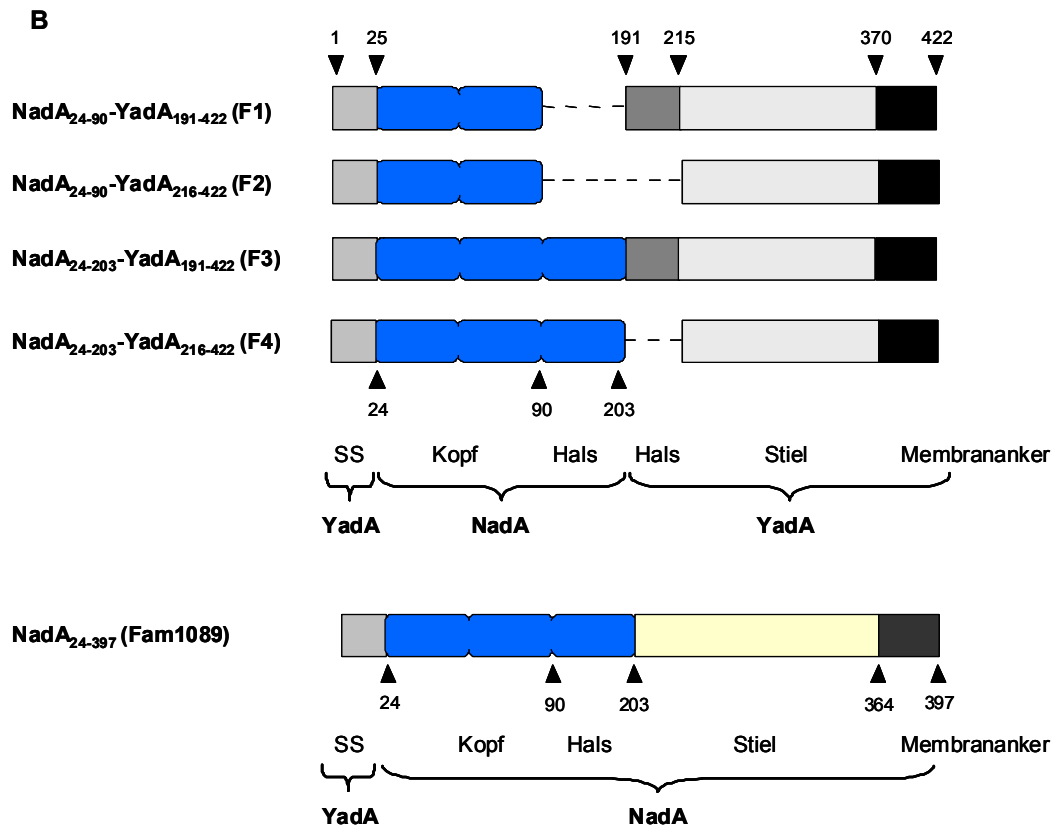


Abb. 7 Schematische Darstellung der NadA und NadA-YadA-Hybride in *Y. enterocolitica*. A: NadA von *N. meningitidis* MC58 (Allel 1). B: NadA von *N. meningitidis* Fam18 (Allel 2). Die Pfeile geben die Aminosäureposition der NadA- bzw. YadA-Domänen an. Für das NadA (MC1089 und Fam1089) sind die YadA-Signalsequenz (SS), die NadA-Kopfdomäne, die NadA-Hals (Konnektor)- und Stieldomäne, sowie der NadA-Membrananker dargestellt. Für die Hybride M1-M4 und F1-F4 ist die YadA-Signalsequenz (SS), die NadA-Kopfdomäne und/oder die NadA Halsdomäne (Konnektor), sowie die YadA-Hals- und/oder -Stieldomäne und der YadA-Membrananker dargestellt.

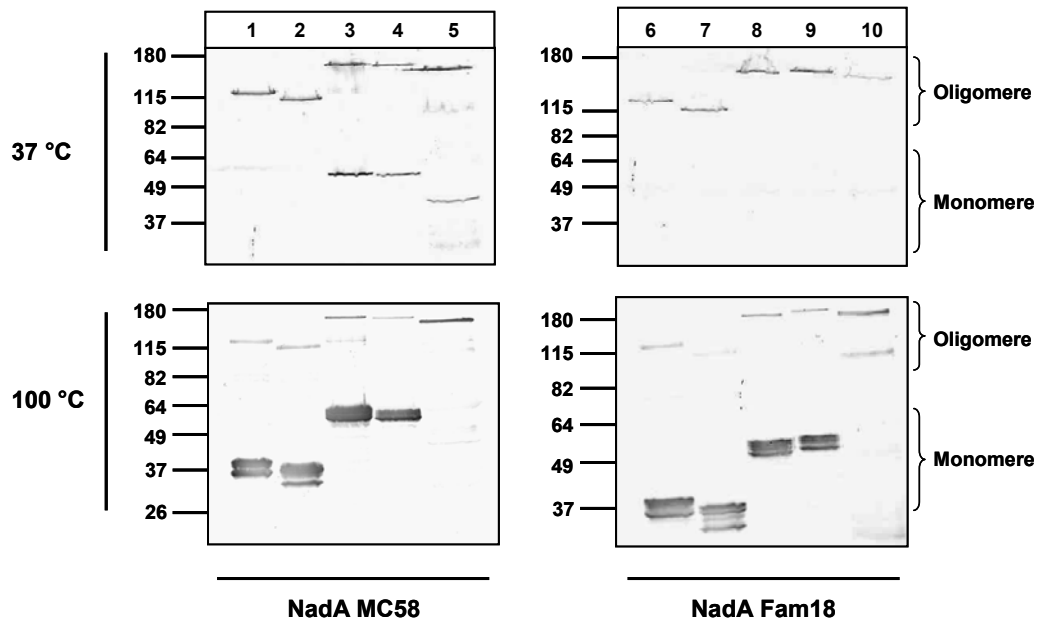
3.1.2 Synthese der NadA, YadA und NadA-YadA Proteine in *Y. enterocolitica*

Für den Synthesenachweis verschiedenen NadA und NadA-YadA-Hybridproteine in *Y. enterocolitica* nachzuweisen, wurden Ganzzelllysate der WA-314 $\Delta yadA$ und WA-c $\Delta inv(p)$ Konstrukte mittels SDS-PAGE (2.14.6) und Westernblotanalysen (2.14.8) untersucht. Da es sich bei YadA und NadA um Oca-Proteine handelt, die in SDS-Gelen hitzestabile hochmolekulare Oligomere bilden (Hoiczky *et al.*, 2000) wurde die Stabilität der synthetisierten Proteine durch Inkubation der Lysate bei 37 °C für 1,5 h, und 100 °C für 10 min untersucht. Westernblotanalysen der Stämme WA-314 $\Delta yadA$:M1 (Abb. 8.A, Spur 1), WA-314 $\Delta yadA$:M2 (Abb. 8.A, Spur 2), WA-314 $\Delta yadA$:M3 (Abb. 8.A, Spur 3), WA-314 $\Delta yadA$:M4 (Abb. 8.A, Spur 4), und WA-314 $\Delta yadA$:MC1089 (Abb. 8.A, Spur 5) zeigten die Synthese aller NadA-YadA Hybridproteine und des vollständig prozessierten NadA Proteins

(MC58) als hochmolekulare Oligomere in *Y. enterocolitica* WA-314 $\Delta yadA$. Auch Westernblotanalysen der Stämme WA-314 $\Delta yadA:F1$ (Abb. 8.A, Spur 6), WA-314 $\Delta yadA:F2$ (Abb. 8.A, Spur 7), WA-314 $\Delta yadA:F3$ (Abb. 8.A, Spur 8), WA-314 $\Delta yadA:F4$ (Abb. 8.A, Spur 9), und WA-314 $\Delta yadA:Fam1089$ (Abb. 8.A, Spur 10)) zeigten, dass alle Proteine in *Y. enterocolitica* WA-314 $\Delta yadA$ als hitzestabile Oligomere (wahrscheinliche Trimere) synthetisiert wurden. Die Molekulargewichte der monomeren Proteine wurden anhand der Aminosäuresequenz berechnet und können Tabelle 21 entnommen werden. Die NadA-YadA Hybridproteine und das NadA beider *N. meningitidis* Stämme MC58 und Fam18 zeigten nach Inkubation der Ganzzelllysate bei 37 °C hauptsächlich oligomere Strukturen, während die Inkubation bei 100 °C zur Dissoziation der Oligomere in die Monomere führte. Die Effizienz der Bildung von oligomerem und monomeren NadA und NadA-YadA war bei beiden Stämmen vergleichbar. Allerdings zeigten sich bei den Konstrukten WA-314 $\Delta yadA:M3$, WA-314 $\Delta yadA:M4$ und WA-314 $\Delta yadA:MC1089$ bereits nach Inkubation bei 37 °C sowohl Oligomere als auch Monomere (Abb. 8.A, Spur 3, 4, 5). Bei den vergleichbaren Konstrukten des Stamms Fam18, WA-314 $\Delta yadA:F3$, WA-314 $\Delta yadA:F4$ und WA-314 $\Delta yadA:Fam1089$ (Abb. 8.A, Spur 8, 9, 10) wurden bei 37 °C dagegen lediglich oligomere Strukturen nachgewiesen.

Um die Syntheseeffizienz der NadA und NadA-YadA-Hybridproteine in *Y. enterocolitica* mit der Synthese von YadA vergleichen zu können wurden zusätzlich Ganzzelllysate der Stämme WA-314 $\Delta yadA$, WA-314 $\Delta yadA:yadA$ und WA-314 $\Delta yadA:yadA_{\Delta 88-564}$ in Westernblotanalysen mit dem anti-YadA Antikörper 8D1 untersucht. Die YadA-Deletionsmutante WA-314 $\Delta yadA$ zeigte wie erwartet keine YadA-Synthese (Abb. 8.B, Spur 1 und 4), während der YadA-positive Stamm WA-314 $\Delta yadA:yadA$ oligomeres YadA bei 37 °C, und oligomeres sowie monomeres YadA bei 100 °C aufwies (Abb. 8.B, Spur 2 und 5). Bei der kopflosen YadA-Mutante WA-314 $\Delta yadA:yadA_{\Delta 88-564}$ konnte die verkürzte Form des YadA Proteins als Oligomer bei 37 °C (Abb. 8.B, Spur 3), sowie als Oligomer und Monomer bei 100 °C nachgewiesen werden (Abb. 8.B, Spur 6).

A



B

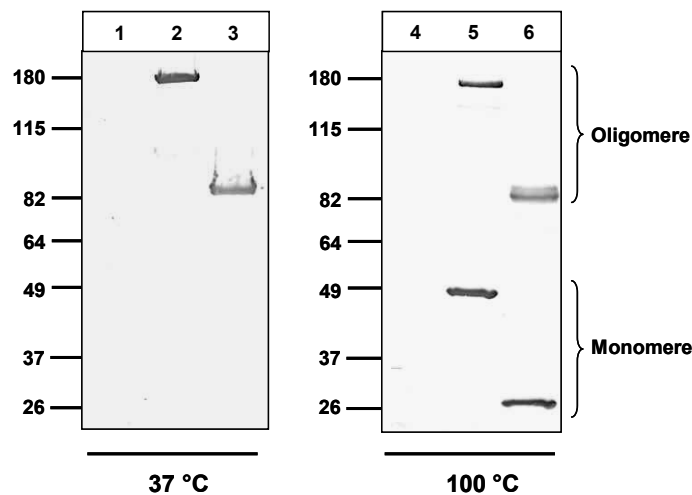


Abb. 8 Immunoblot zum Nachweis der Synthese von NadA, YadA und NadA-YadA Proteinen in Ganzzelllysaten von *Y. enterocolitica* WA-314 $\Delta yadA$. Ganzzelllysate (10 μ l) wurden mittels SDS-PAGE (11 %) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. A: Immunoblot *nadA* und *nadA-yadA*-positiver WA-314 Stämme mit anti-NadA Serum (1:500) und Ziege anti-Kaninchen IgG alkalische Phosphatase Konjugat (1:2000). 1: WA-314 $\Delta yadA$:M1; 2: WA-314 $\Delta yadA$:M2; 3: WA-314 $\Delta yadA$:M3; 4: WA-314 $\Delta yadA$:M4; 5: WA-314 $\Delta yadA$:MC1089; 6: WA-314 $\Delta yadA$:F1; 7: WA-314 $\Delta yadA$:F2; 8: WA-314 $\Delta yadA$:F3; 9: WA-314 $\Delta yadA$:F4; 10: WA-314 $\Delta yadA$:Fam1089. B: Immunoblot *yadA*-positiver und *yadA*-negativer WA-314 Stämme mit monoklonalem anti-YadA Antikörper 8D1 (1:1000) und Ziege anti-Maus IgG alkalische Phosphatase Konjugat (1:2000). 1 und 4: WA-314 $\Delta yadA$; 2 und 5: WA-314 $\Delta yadA:yadA$; 3 und 6: WA-314 $\Delta yadA:yadA_{\Delta 88-564}$. Die Ganzzelllysate wurden jeweils für 1,5 h bei 37 °C oder 10 min bei 100 °C vorbehandelt.

Plasmid	Molekulargewicht Monomer [kDa]
pYVO8:M1 (<i>ΔyadA</i> :M1)	35,6
pYVO8:M2 (<i>ΔyadA</i> :M2)	32,7
pYVO8:M3 (<i>ΔyadA</i> :M3)	48,4
pYVO8:M4 (<i>ΔyadA</i> :M4)	45,6
pYVO8:MC1089 (<i>ΔyadA</i> :MC1089)	37,7
pYVO8:F1 (<i>ΔyadA</i> :F1)	35,6
pYVO8:F2 (<i>ΔyadA</i> :F2)	32,7
pYVO8:F3 (<i>ΔyadA</i> :F3)	47,8
pYVO8:F4 (<i>ΔyadA</i> :F4)	44,9
pYVO8:Fam1089 (<i>ΔyadA</i> :Fam1089)	41,8
pYVO8-A-1 (<i>ΔyadA</i> : <i>yadA</i>)	44,1
pYVO8-A-H (<i>yadA</i> ₄₈₈₋₅₆₄)	25,3
pACYC184: <i>virF</i> : <i>yadA</i> (<i>pyadA</i>)	44,1
pACYC184: <i>virF</i> : <i>yadA</i> ₄₈₈₋₅₆₄ (<i>pyadA</i> ₄₈₈₋₅₆₄)	25,3
pACYC184: <i>virF</i> :M1 (pM1)	35,6
pACYC184: <i>virF</i> :M2 (pM2)	32,7
pACYC184: <i>virF</i> :M3 (pM3)	48,4
pACYC184: <i>virF</i> :M4 (pM4)	45,6
pACYC184: <i>virF</i> :MC1089 (<i>pnadA</i>)	37,7

Tab. 21 Liste der berechneten Molekulargewichte der in *Y. enterocolitica* synthetisierten monomeren NadA, YadA und NadA-YadA-Proteine. Das Molekulargewicht wurde anhand der Aminosäuresequenz mittels DNAMAN Software berechnet.

Des Weiteren wurde die Synthese der NadA und NadA-YadA-Hybridproteine des Stammes MC58 und die Synthese des YadA und YadA_{Δ29-188} in dem Invasin-negativen, plasmidlosen Stamm WA-c *Δinv* mittels Immunoblot untersucht. Da Ganzzelllysate der WA-c *Δinv*(p) Stämme bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C unlöslich waren, wodurch kein sauberes Auftragen der Proben auf SDS-Gele möglich war, wurden die Ganzzelllysate nur nach Inkubation bei 100 °C für 10 min analysiert. Die Westernblotanalysen mit anti-NadA Serum (Abb. 9) zeigte, dass sowohl die NadA-YadA-Hybridproteine pM1 (Spur 1), pM2 (Spur 2), pM3 (Spur 3), und pM4 (Spur 4), und das vollständige NadA Protein *pnadA* (Spur 5) bei 100 °C in ihrer oligomeren und monomeren Form vorlagen. Der immunologische Nachweis der YadA Synthese des YadA-positiven Stamm *pyadA*, der YadA-Kopfmutante *pyadA*₄₈₈₋₅₆₄, und der YadA-Mutante (p) erfolgte mit dem anti-YadA Antikörper 8D1. Abbildung 9 zeigt, dass die Konstrukte *pyadA*₄₈₈₋₅₆₄ (Spur 7), und *pyadA* (Spur 8), bei 100 °C oligomeres sowie monomeres YadA synthetisierten. Im Gegensatz dazu zeigte die Negativkontrolle pACYC184:*virF* (p) keine YadA-Synthese (Abb. 9, Spur 6). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass alle NadA und NadA-YadA-Hybridproteine in *Y. enterocolitica* WA-314 *ΔyadA* und WA-c *Δinv* als hitzestabile hochmolekulare Oligomere synthetisiert werden.

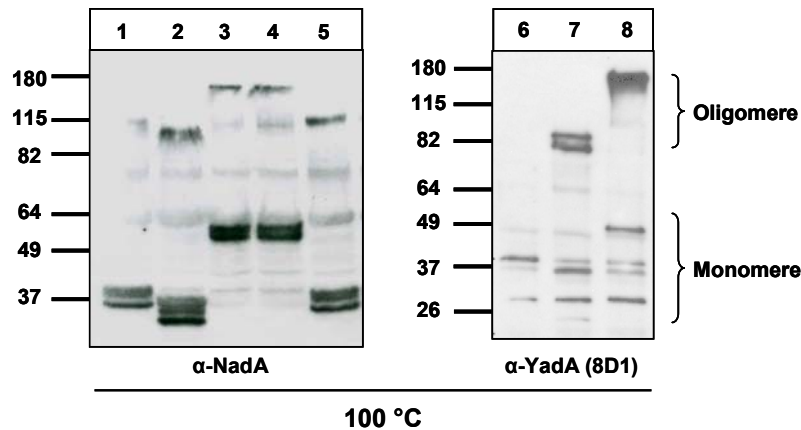


Abb. 9 Immunoblot zum Nachweis der Synthese von NadA, YadA und NadA-YadA-Proteinen in Ganzzelllysaten von *Y. enterocolitica* WA-c Δinv . Ganzzelllysate (10 μ l) wurden mittels SDS-PAGE (11 %) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. 1-5: Immunoblot *nadA* und *nadA-yadA*-positiver WA-c Δinv (p) Stämme mit anti-NadA Serum (1:500) und Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase (1:2000). 1: pM1; 2: pM2; 3: pM3; 4: pM4; 5: *pnadA*. 6-8: Immunoblot *yadA*-positiver und *yadA*-negativer WA-c Δinv (p) Stämme mit anti-YadA Antikörper 8D1 (1:1000) und Ziege anti-Maus IgG Peroxidase (1:2000). 6: pACYC184:*virF* (p) (YadA-negativ) 7: *pyadA*₁₈₈₋₅₆₄ (kopfloses YadA); 8: *pyadA* (YadA-positiv). Die Ganzzelllysate wurden jeweils 10 min bei 100 °C aufgekocht.

3.2 Oberflächenlokalisierung der NadA und NadA-YadA Hybridproteine in *Y. enterocolitica*

Da Westernblotanalysen mit Ganzzelllysaten zwar Aussagen über die Synthese der NadA und NadA-YadA-Proteine in *Y. enterocolitica* geben, jedoch nicht über ihre korrekte Lokalisierung in der bakteriellen Membran, wurden zusätzlich Westernblotanalysen mit Außenmembranpräparationen durchgeführt. Des Weiteren wurde die Oberflächenlokalisierung der Proteine mittels Immunofluoreszenzfärbung mikroskopisch untersucht.

3.2.1 Immunoblots mit Außenmembranproteinen

Die Lokalisierung der NadA und NadA-YadA Hybridproteine in der äußeren Membran von *Y. enterocolitica* erfolgte mittels Westernblotanalysen von Außenmembranpräparationen. Hierfür wurden die äußeren Membranen der WA-314 $\Delta yadA$ und WA-c Δinv (p) Konstrukte isoliert (2.14.3). Jeweils 10 μ g der Außenmembranpräparationen wurden bei 37 °C für 1,5 h, 100 °C für 10 min, oder 100 °C für 10 min mit 4 M Harnstoff inkubiert, bevor die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden (2.14.6). Die Konzentration der aufgetrennten Proteine wurde mittels Coomassie-Färbung überprüft (2.14.7). Der immunologische Nachweis der NadA Proteine erfolgte mit anti-NadA Serum (1:500), während NadA-YadA

und YadA Proteine mit dem anti-YadA Antikörper 8D1 nachgewiesen wurden. Die Westernblotanalysen nach Inkubation der Außenmembranproteine für 1,5 h bei 37 °C zeigten, dass alle NadA-YadA-Hybride als hochmolekulare Proteinbanden synthetisiert wurden (Abb. 10.1B, Spur 1-8). Die Proteinmenge war dabei vergleichbar mit der YadA-Synthese des Wildtypstamms WA-314 $\Delta yadA:yadA$ (Abb. 10.1B, Spur 10). Die Inkubation der Außenmembranproteine bei 100 °C zeigte dagegen alle Proteine in ihrer oligomeren und monomeren Form (Abb. 10.2B), während die Auftrennung der Außenmembranproteine zusammen mit 4 M Harnstoff zur vollständigen Dissoziation der Oligomere in die Monomere führte (Abb. 10.3B). Die Proteinkonzentration der Außenmembranpräparationen wurde mittels Coomassie-Färbung überprüft und zeigte vergleichbare Proteinmengen aller aufgetragenen Proteine (Abb. 10. 1A, B, C).

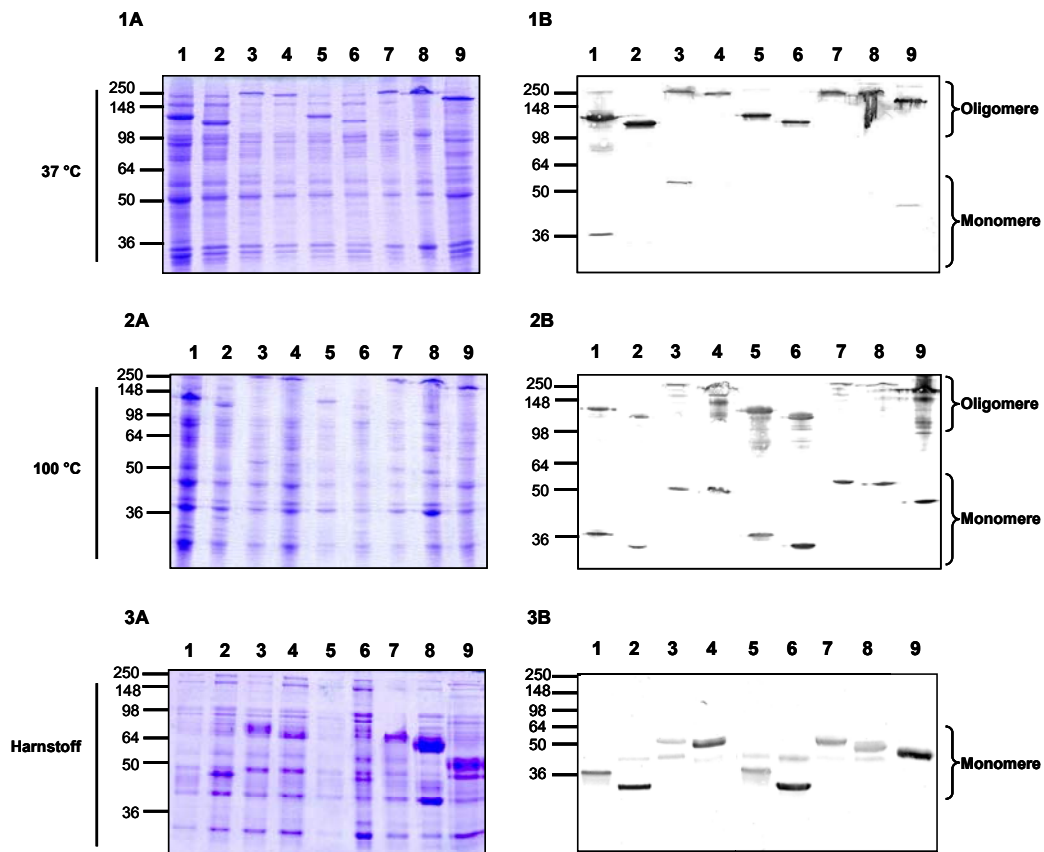


Abb. 10 Nachweis von YadA und NadA-YadA in OMP-Präparationen von *Y. enterocolitica* WA-314 $\Delta yadA$. 10 μ g Außenmembranpräparation wurden mittels SDS-PAGE (11 %) aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. A: Coomassie-gefärbte SDS-Gele B: Immunoblot mit monoklonalem anti-YadA Antikörper 8D1 (1:1000) und Ziege anti-Kaninchen IgG alkalische Phosphatase Konjugat (1:2000). 1: Inkubation der Proteine für 1,5 h bei 37 °C; 2: Inkubation der Proteine für 10 min bei 100 °C, 3: Inkubation der Proteine für 10 min bei 100 °C mit 4 M Harnstoff. Spur 1: $\Delta yadA$:M1; Spur 2: $\Delta yadA$:M2; Spur 3: $\Delta yadA$:M3; Spur 4: $\Delta yadA$:M4; Spur 5: $\Delta yadA$:F1; Spur 6: $\Delta yadA$:F2; Spur 7: $\Delta yadA$:F3; Spur 8: $\Delta yadA$:F4; Spur 9: $\Delta yadA$:yadA.

Immunoblotanalysen der Außenmembranproteine der Stämme WA-314 $\Delta yadA$:MC1089 und WA-314 $\Delta yadA$:Fam1089 zeigten sowohl nach Inkubation bei 37 °C (Abb. 11.1B, Spur 1 und 2), als auch bei 100 °C (Abb. 11.2B, Spur 1 und 2) eine deutliche Bande bei ungefähr 160 kDa und 90 kDa. Daher kann angenommen werden, dass NadA oligomere und dimere Strukturen im Probenpuffer ausbildet. Monomere NadA-Banden konnten weder bei 37 °C, noch bei 100 °C detektiert werden.

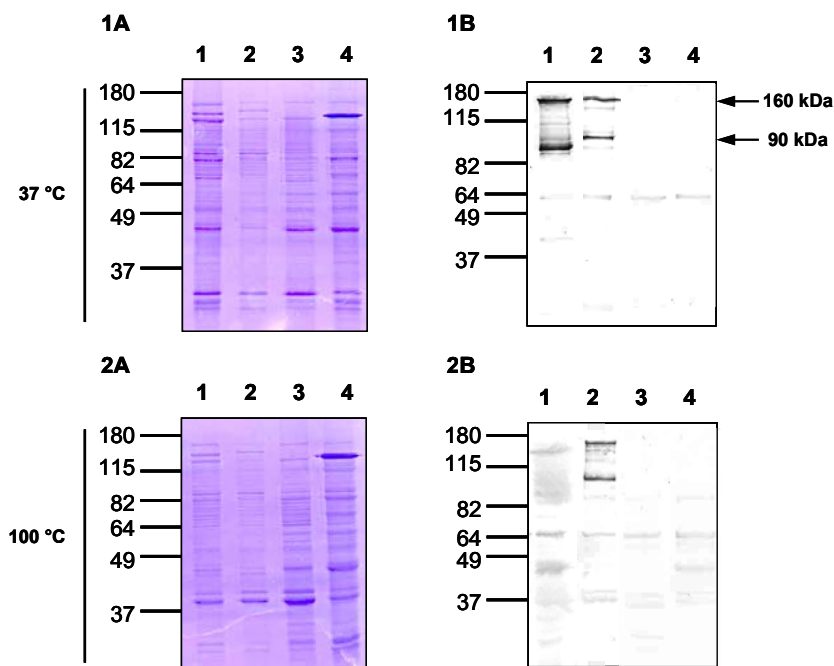


Abb. 11 Nachweis von NadA in OMP-Präparationen von *Y. enterocolitica* WA-314 $\Delta yadA$. Außenmembranpräparation (10 µg) wurden mittels SDS-PAGE (11 %) aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. A: Coomassie-gefärbte SDS-Gele. B: Immunoblot mit anti-NadA Serum (1:500) und Ziege anti-Kaninchen IgG alkalische Phosphatase Konjugat (1:2000). 1: Inkubation der Proteine für 1,5 h bei 37 °C; 2: Inkubation der Proteine für 10 min bei 100 °C, Spur 1: $\Delta yadA$:MC1089; Spur 2: $\Delta yadA$:Fam1089; Spur 3: $\Delta yadA$; Spur 4: $\Delta yadA$:yadA.

Der Nachweis der NadA und NadA-YadA Lokalisierung in Außenmembranpräparationen der WA-c $\Delta inv(p)$ Konstrukte erfolgte mit anti-NadA Serum und anti-Kaninchen Peroxidase Konjugat (Abb. 12.1B. und 12.2B). Bereits nach Inkubation der Proteine bei 37 °C kam es bei den NadA-YadA-Hybriden zur Ausbildung von Oligomeren und Monomeren (Abb. 12.1B, Spur 1-4). Die Inkubation der Außenmembranproteine bei 100 °C ermöglichte den Nachweis oligomerer und monomerer Formen der Hybridproteine (Abb. 12.2B, Spur 1-4).

Das vollständig prozessierte NadA konnte sowohl bei 37 °C als auch bei 100 °C in Form einer oligomeren Bande bei 160 kDa nachgewiesen werden (Abb. 12.1B und 12.2B, Spur 5), allerdings war die Synthese im Vergleich zu den NadA-YadA-Hybriden deutlich schwächer.

Der Vergleich der Proteinkonzentration in den Coomassie-gefärbten SDS-Gelen zeigte allerdings, dass die NadA-Proteinkonzentration des Konstrukts *pnadA* geringer war als die der anderen Hybrid-Konstrukte (Abb. 12.2.A. und 12.1.A, Spur 5).

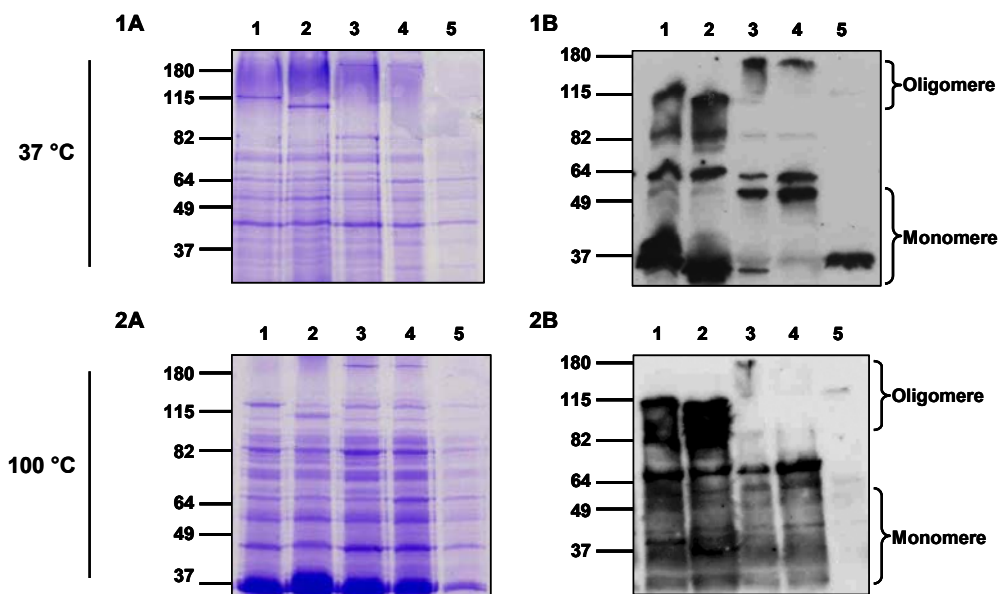


Abb. 12 Nachweis von NadA und NadA-YadA in OMP-Präparationen von *Y. enterocolitica* WA-c $\Delta inv(p)$. Außenmembranpräparation (10 μ g) wurden mittels SDS-PAGE (11 %) aufgetrennt und auf PVDF Membranen transferiert. A: Coomassie-gefärbte SDS-Gele. B: Immunoblot mit anti-NadA Serum (1:500) und Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat (1:2000). 1: Inkubation der Proteine für 1,5 h bei 37 °C; 2: Inkubation der Proteine für 10 min bei 100 °C, Spur 1: WA-c $\Delta inv(pM1)$; Spur 2: WA-c $\Delta inv(pM2)$; Spur 3: WA-c $\Delta inv(pM3)$; Spur 4: WA-c $\Delta inv(pM4)$; Spur 5: WA-c $\Delta inv(pnadA)$.

Zusammenfassend zeigen die Immunoblotanalysen der Außenmembranproteine, dass alle NadA-YadA-Hybridproteine, sowie das NadA und YadA als Oligomere in der äußeren Membran von *Y. enterocolitica* detektiert werden konnten. Die Syntheseeffizienz der NadA Proteine in WA-314 $\Delta yadA$ Konstrukten war vergleichbar mit der Synthese von oligomeren YadA in WA-314 $\Delta yadA:yadA$. Des Weiteren konnte oligomeres NadA und die NadA-YadA Hybridproteine auch in *Y. enterocolitica* WA-c $\Delta inv(p)$ nachgewiesen werden, allerdings war die Synthese der Proteine in WA-c Δinv schwächer als in WA-314 $\Delta yadA$.

3.2.2 Immunofluoreszenznachweis von NadA, YadA und NadA-YadA Proteinen auf der Zelloberfläche von *Y. enterocolitica*

Für den weiteren Nachweis der Oberflächenlokalisierung von NadA und NadA-YadA-Hybridproteinen in *Y. enterocolitica* wurden Immunofluoreszenzfärbungen unfixierter WA-c $\Delta inv(p)$ und WA-314 $\Delta yadA$ Konstrukte durchgeführt (2.18.3). Abbildung 13. zeigt, dass alle

NadA-YadA-Hybride ($\Delta yadA:M1$, $\Delta yadA:M2$, $\Delta yadA:M3$, $\Delta yadA:M4$, $\Delta yadA:F1$, $\Delta yadA:F2$, $\Delta yadA:F3$, $\Delta yadA:F4$), sowie das NadA von MC58 und Fam18 ($\Delta yadA:MC1089$, $\Delta yadA:Fam1089$) an der Zelloberfläche von *Y. enterocolitica* WA-314 $\Delta yadA$ in Form von grün fluoreszierenden Signalen lokalisiert werden konnten. Als Negativkontrolle wurden der YadA-positive Stamm WA-314 $\Delta yadA:yadA$ und der YadA-negative Stamm WA-314 $\Delta yadA$ mit anti-NadA Serum und Ziege anti-Kaninchen IgG FITC Konjugat inkubiert. Diese Stämme zeigten keine positiven Fluoreszenzsignale, so dass die NadA-Spezifität des anti-NadA Serum gewährleistet war (Abb. 13).

Die Oberflächenlokalisierung des YadA-positiven Stamm WA-314 $\Delta yadA:yadA$ wurde mit dem anti-YadA Antikörper 8D1 und Ziege anti-Maus IgG FITC Konjugat nachgewiesen. Der YadA-positive Stamm WA-314 $\Delta yadA:yadA$ war in der Immunfluoreszenz positive, während der YadA-negativen Stamm WA-314 $\Delta yadA$ wie erwartet negativ war (Abb. 13).

Die Oberflächenexposition der NadA und NadA-YadA-Hybridproteine konnte auch in dem Stamm WA-c Δinv nachgewiesen werden. Abbildung 14 zeigt grün fluoreszierende Yersinien für pM1, pM2, pM3, pM4 und *pnadA* mit anti-NadA Serum und Ziege anti-Kaninchen IgG FITC Konjugat. Die Oberflächenlokalisierung von YadA in *pyadA* konnte mit anti-YadA Antikörper 8D1 und Ziege anti-Maus IgG FITC Konjugat gezeigt werden (Abb. 14). Auch *pyadA*₈₈₋₅₆₄ konnte auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

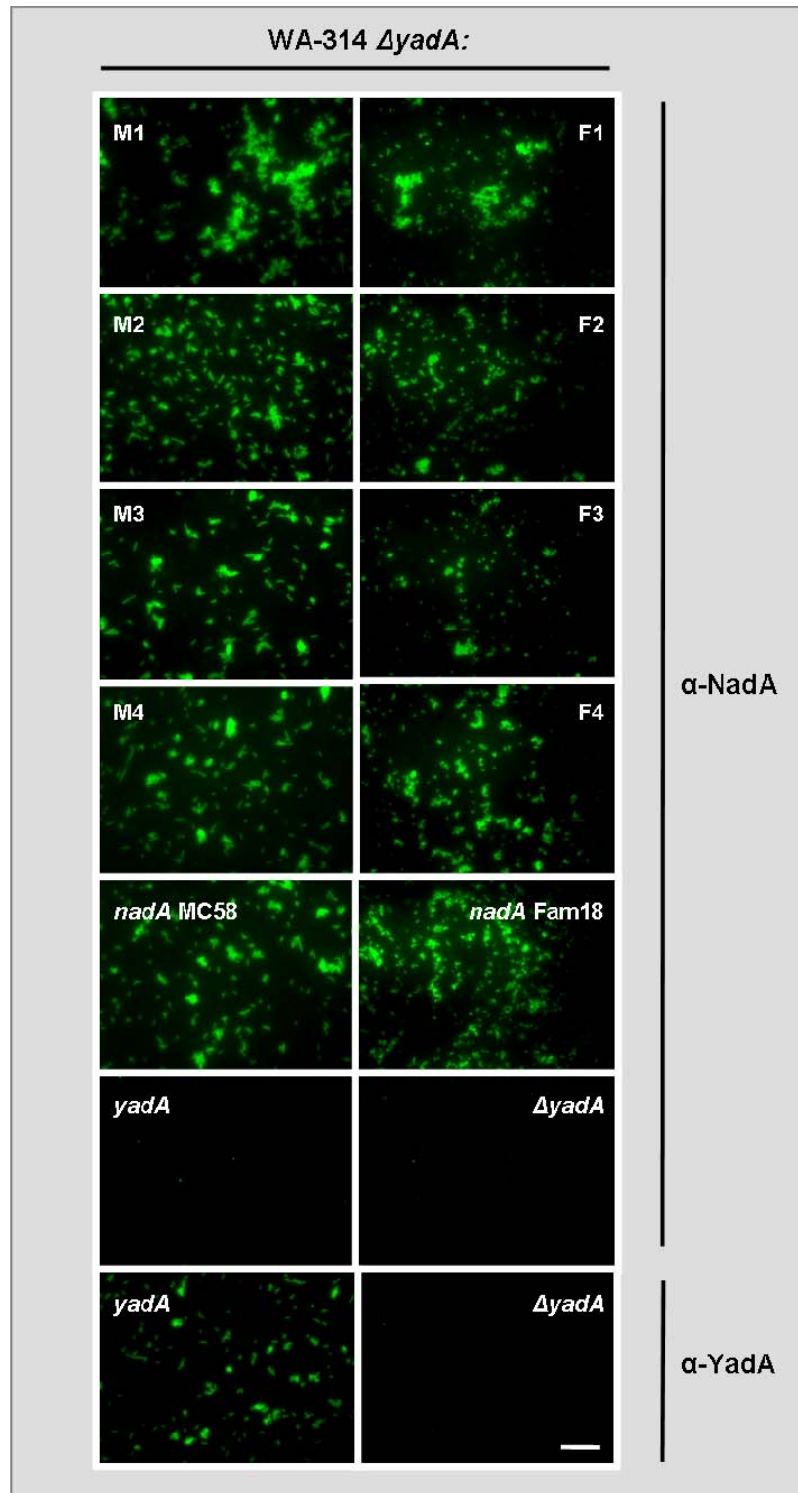


Abb. 13 Immunfluoreszenzmikroskopie *nadA*-, *nadA-yadA* und *yadA*-exprimierender *Y. enterocolitica* WA-314 $\Delta yadA$. Unfixierte WA-314 $\Delta yadA$ Konstrukte wurden mit anti-NadA Serum (1:50) oder anti-YadA Antikörper 8D1 (1:100) und anti-Kaninchen IgG, oder anti-Maus IgG FITC Konjugat (1:128) inkubiert. NadA-YadA-Hybride: $\Delta yadA$:M1, M2, M3, M4, F1, F2, F3, F4; NadA MC58: $\Delta yadA$:MC1089; NadA Fam18: $\Delta yadA$: Fam1089; YadA-positiv: $\Delta yadA$:*yadA*; YadA-negativ: $\Delta yadA$. Der Größenbalken entspricht 20 μm .

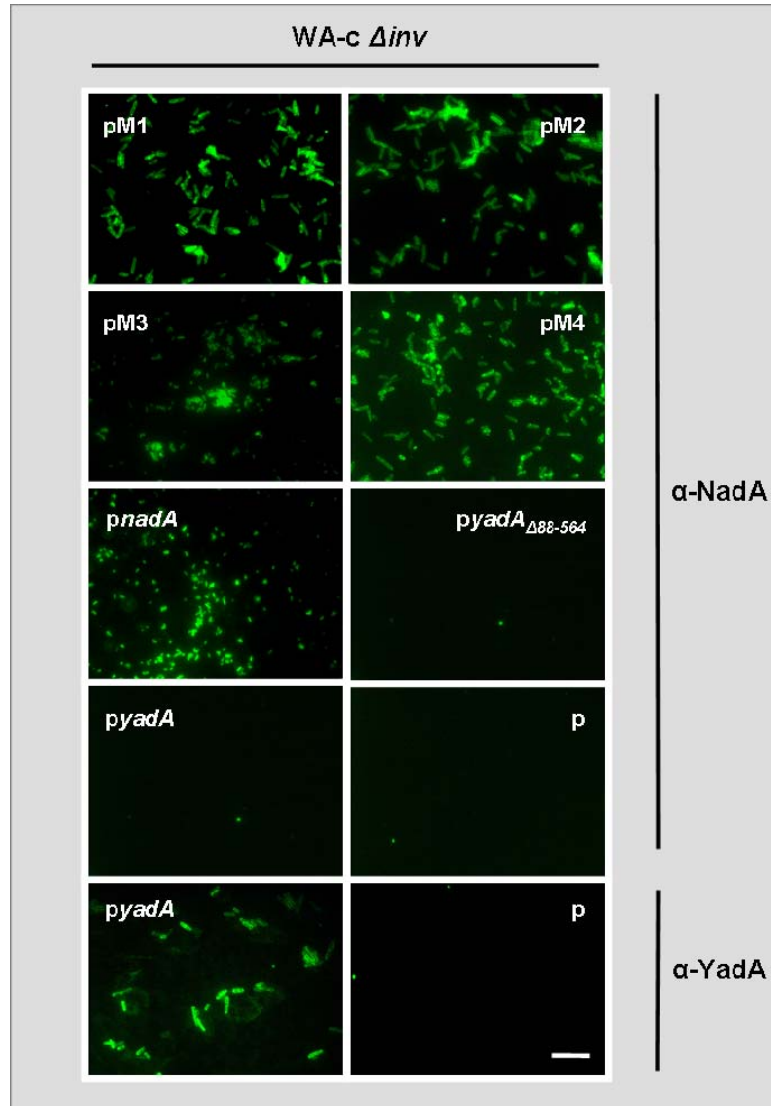


Abb. 14 Immunfluoreszenzmikroskopie *nadA*-, *nadA-yadA* und *yadA*-exprimierender *Y. enterocolitica* WA-c $\Delta inv(p)$. Unfixierte WA-c $\Delta inv(p)$ Konstrukte wurden mit anti-NadA Serum (1:50) oder anti-YadA Antikörper 8D1 (1:100) und anti-Kaninchen IgG, oder anti-Maus IgG FITC Konjugat (1:128) inkubiert. NadA-YadA-Hybride: pM1, pM2, pM3, pM4; *pnadA*: NadA-positiv; *pyadA*: YadA-positiv; p: YadA-negativ. *pyadA*₈₈₋₅₆₄: YadA kopflos. Der Größenbalken entspricht 20 μm .

3.3 *nadA*-exprimierende *N. meningitidis* Stämme

Für die Untersuchung der NadA Synthese in *N. meningitidis* wurden verschiedene *N. meningitidis* MC58 Stämme (Serogruppe B, Serotyp 74, klinisches Isolat des ST-32 Komplex) verwendet. Der NadA-positive bekapselte Wildtypstamm MC58 wurde von Prof. Mathias Frosch (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Die isogene NadA-Mutante MC58 $\Delta nadA$, die unbekapselte SiaD-Mutante MC58 $\Delta siaD$ und die isogene unbekapselte

NadA-Mutante MC58 $\Delta siaD \Delta nadA$ wurden von Prof. Oliver Kurzai (Universität Jena) zur Verfügung gestellt.

3.3.1 Synthesenachweis von NadA in *N. meningitidis*

Für den Expressionsnachweis von *nadA* in *N. meningitidis* wurden Ganzzelllysate hergestellt (2.14.2), bei 37 °C für 1,5 h und 100 °C für 10 min inkubiert, und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die auf PVDF-Membranen transferierten Proteine wurden mit anti-NadA Serum und Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat detektiert.

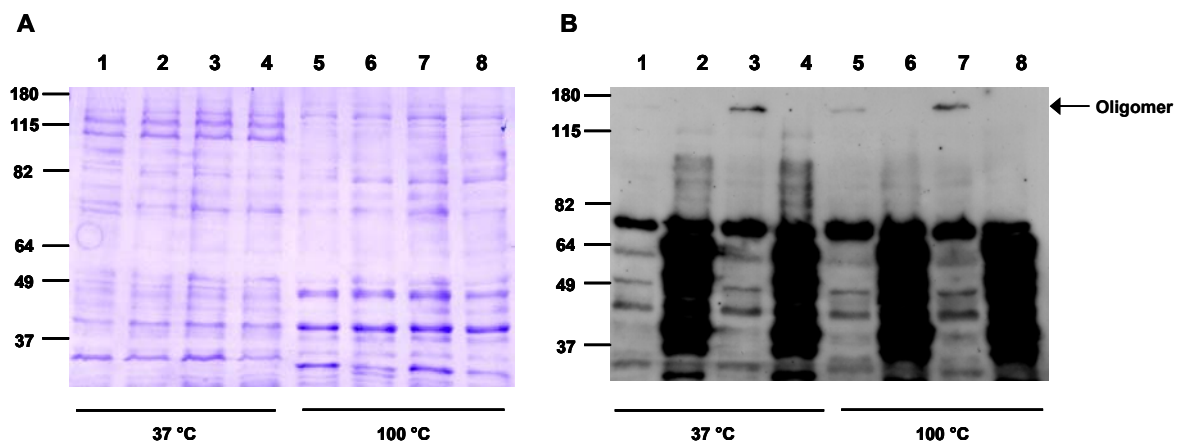


Abb. 15 Nachweis von NadA in *N. meningitidis* Ganzzelllysaten. Ganzzelllysate (10 μ l) *nadA*-positiver und *nadA*-negativer *N. meningitidis* Stämme wurden mittels SDS-PAGE (11 %) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. A: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE. B: Immunoblot mit anti-NadA Serum (1:500) und Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat (1:2000). Die Inkubation der Lysate erfolgte für 1,5 h bei 37 °C und 10 min bei 100 °C, Spur 1: MC58 (37 °C); Spur 2: MC58 $\Delta nadA$ (37 °C); Spur 3: MC58 $\Delta siaD$ (37 °C); Spur 4: MC58 $\Delta siaD \Delta nadA$ (37 °C); Spur 5: MC58 (100 °C); Spur 6: MC58 $\Delta nadA$ (100 °C); Spur 7: MC58 $\Delta siaD$ (100 °C); Spur 8: MC58 $\Delta siaD \Delta nadA$ (100 °C).

Die Westernblotanalysen der bei 37 °C vorbehandelten Neisserien Ganzzelllysate zeigten für den NadA-positiven unbekapselten Stamm MC58 $\Delta siaD$ eine Bande bei ungefähr 160 kDa, die der oligomeren Form des NadA Proteins entspricht (Abb. 15.B, Spur 3). Im Gegensatz dazu, zeigte der bekapselte Stamm MC58 nur eine sehr schwache Bande bei 160 kDa (Abb. 15.B, Spur 1). Westernblotanalysen der bei 100 °C behandelten Ganzzelllysate, zeigten sowohl bei dem Stamm MC58 (Abb. 15.B, Spur 5), als auch bei dem Stamm MC58 $\Delta siaD$ (Abb. 15.B, Spur 7) eine Bande bei 160 kDa. Die NadA Synthese in MC58 war jedoch schwächer als in dem unbekapselten Stamm MC58 $\Delta siaD$. Die NadA-negativen Stämme MC58 $\Delta nadA$ (Abb. 15.B, Spur 2 und 6) und MC58 $\Delta siaD \Delta nadA$ (Abb. 15.B, Spur 4 und 8) zeigten weder bei 37 °C, noch bei 100 °C die Synthese von oligomerem NadA Protein.

Auffallend war allerdings, dass vor allem die NadA-negativen Stämme starke unspezifische Banden im Bereich von 37-82 kDa aufzeigten. Da jedoch die Coomassie-gefärbtes SDS-Gele vergleichbare Proteinmengen und vergleichbare Proteinmuster der Ganzzelllysate bei allen Stämmen aufwiesen (Abb. 15.A), können die starken Banden nicht durch Unterschiede in der Proteinkonzentration erklärt werden, sondern deuten eher darauf hin, dass in den NadA-Mutanten andere Epitope überexprimiert werden, die stark mit dem anti-NadA Serum reagieren.

3.4 rekombinantes NadA Protein

3.4.1 Herstellung von NadA₂₄₋₂₁₀

Für die Herstellung von rekombinantem NadA Protein wurden die Aminosäuren 24-210 des NadA MC58 verwendet. Diese Aminosäuren entsprechen der NadA-Kopfdomäne und der potentiellen Halsdomäne des NadA Proteins. Das *nadA* wurde mittels PCR aus dem Suizidplasmid pGPS:MC1089 amplifiziert und wie unter 2.13.13.4 beschrieben in das Expressionsplasmid pET21b (+) kloniert. Die Korrektheit des daraus resultierenden Plasmids pET21b:*nadA* wurde mittels Sequenzierung überprüft (2.13.10). Die Transformation von pET21b:*nadA* erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3).

3.4.2 Synthese und Reinigung von NadA₂₄₋₂₁₀

Die Induktion der NadA Synthese in *E. coli* BL21 (DE3) erfolgte bei 37 °C mittels IPTG (2.14.10.1). Die Reinigung von NadA₂₄₋₂₁₀ erfolgte über Affinitätschromatographie (HisTrap HP Säule) in 40 mM NaPO₄, 0,3 M NaCl, und 5 mM Imidazol bei pH 7,9 (2.14.10.2). Die endgültige Reinigung des Proteins erfolgte mittels Gelfiltration in 40 mM NaPO₄, und 100 mM NaCl bei pH 8,0 (2.14.10.3). Die Synthese von NadA₂₄₋₂₁₀ wurde mittels SDS-PAGE und Westernblot mit anti-NadA Serum überprüft (Abb. 16). Das rekombinante NadA Protein konnte dabei nach Inkubation bei 37 °C für 1,5 h sowohl im Coomassie-gefärbten SDS-Gel (Abb. 16.A1), als auch im Immunoblot (Abb. 16.B1) bei ca. 20 kDa nachgewiesen werden, was der monomeren Form des NadA Proteins entspricht. Zusätzlich konnte nach Inkubation bei 37 °C eine weitere Bande bei ungefähr 75 kDa detektiert werden (Abb. 16.B1), die auf eine Oligomerisierung des rekombinanten NadA Proteins hindeutet. Das Coomassie-gefärbte SDS-Gel mit rekombinantem NadA Protein, welches bei 100 °C aufgeköcht wurde (Abb. 16.A2), zeigte ein verschmiertes Proteinmuster, allerdings konnte auch hier eine monomere

Bande bei ungefähr 20 kDa detektiert werden. Die entsprechende Immunoblotanalyse mit anti-NadA Serum (Abb. 16.B2) zeigte wieder eine verschmierte Proteinspur, aber auch eine schwache Bande bei ungefähr 20 und 75 kDa. Dies zeigt, dass das NadA₂₄₋₂₁₀ bei 37 °C deutlich als Monomer synthetisiert wird, wobei eine Oligomerisierung des Proteins wahrscheinlich ist. Das Molekulargewicht des im Immunoblot nachgewiesenen NadA₂₄₋₂₁₀ entspricht dem anhand der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewicht von 19,7 kDa. Die Inkubation von NadA₂₄₋₂₁₀ bei 100 °C, scheint dagegen zu einem Proteinabbau zu führen, wodurch eventuelle Oligomere unterschiedlich stark degradiert werden und als verschmiertes Proteinmuster auftreten.

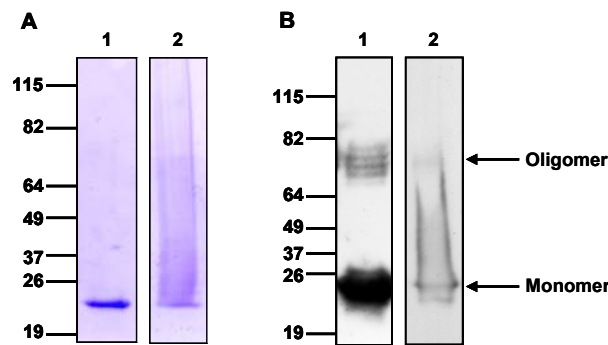


Abb. 16 SDS-PAGE und Immunoblot mit rekombinantem NadA₂₄₋₂₁₀ Protein. NadA₂₄₋₂₁₀ wurde in *E. coli* BL21 (DE3) überexprimiert und 10 µg des Proteins wurden mittels SDS-PAGE (11 %) aufgetrennt. A: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel. B: Immunoblot mit anti-NadA Serum (1:500) und Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat (1:2000). 1: Die Inkubation des Proteins erfolgte für 1,5 h bei 37 °C. 2: Die Inkubation des Proteins erfolgte bei 100 °C für 10 min. Die Pfeile geben die monomere und oligomere Form des NadA₂₄₋₂₁₀ an.

3.4.3 Native PAGE mit NadA₂₄₋₂₁₀

Um eine mögliche Oligomerisierung des NadA₂₄₋₂₁₀ Proteins zu untersuchen wurden 5 µg und 10 µg des NadA₂₄₋₂₁₀ Proteins durch eine nicht-denaturierende native PAGE aufgetrennt (2.14.6.2) und im Immunoblot mit anti-NadA Serum untersucht (2.14.8). Das Coomassie-gefärbte native Gel (Abb. 17.A) zeigte sowohl bei 5 µg (Spur 1), als auch bei 10 µg (Spur 2) NadA Protein zwei verschiedene Bandenmuster. Der Immunoblot mit anti-NadA Serum zeigte deutlich, dass NadA₂₄₋₂₁₀ Proteine monomere und oligomere Strukturen ausbildet, da zwei verschiedene Banden detektiert werden konnten (Abb. 17.B).

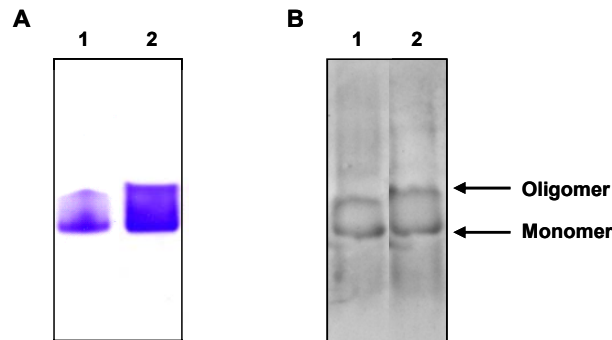


Abb. 17 Native PAGE und Immunoblot mit rekombinantem NadA₂₄₋₂₁₀ Protein. 5 µg und 10 µg des NadA₂₄₋₂₁₀ Proteins wurden mittels nativer PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. A: Coomassie-gefärbtes natives Gel. B: Immunoblot mit anti-NadA Serum (1:500) und Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase Konjugat (1:2000). 1: 5 µg NadA₂₄₋₂₁₀. 2: 10 µg NadA₂₄₋₂₁₀. Die Pfeile geben die monomere und oligomere Form des Proteins an.

3.4.4 Herstellung und Synthese von anti-NadA Serum

Das gereinigte rekombinante NadA₂₄₋₂₁₀ Protein (2.14.10) wurde für die Gewinnung von anti-NadA Serum verwendet. Die Immunisierung von zwei Kaninchen erfolgte für 90 Tage nach dem Standardimmunisierungsprotokoll (Pineda Antikörper-Service, Berlin) (2.18.7). Die Reaktivität des anti-NadA Serum wurde anschließend mittels Westernblot untersucht. Hierfür wurden 10 µl der Ganzzelllysate der Stämme WA-314 $\Delta yadA:yadA$ (Spezifitätskontrolle), WA-314 $\Delta yadA$ (Negativkontrolle), WA-314 $\Delta yadA:nadA$ (Positivkontrolle), sowie 10 µg rekombinantes NadA₂₄₋₂₁₀ Protein bei 100 °C für 10 min aufgekocht, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit anti-NadA Serum in einer Verdünnung von 1:500 und Ziege anti-Kaninchen IgG alkalische Phosphatase Konjugat zeigte, dass lediglich bei dem Konstrukt WA-314 $\Delta yadA:nadA$ eine Bande bei ungefähr 160 kDa auftrat, die der oligomeren Form des NadA entsprach (Abb. 18, Spur 3). Bei dem YadA-positiven Konstrukt WA-314 $\Delta yadA:yadA$ (Abb. 18, Spur 2) und dem YadA-negativen Konstrukt WA-314 $\Delta yadA$ (Abb. 18, Spur 1) wurden nur einige sehr schwache unspezifische Banden im Bereich von 80-120 kDa nachgewiesen. Auch das rekombinante NadA₂₄₋₂₁₀ Protein zeigte eine Reaktivität mit dem anti-NadA Serum in Form einer Bande bei ca. 20 kDa. Als weitere Kontrolle wurden 10 µg des aufgereinigten NadA₂₄₋₂₁₀ Protein mit einer 1:500 Verdünnung des Präimmunserums als Primärantikörper inkubiert, welches keine Reaktivität zeigte (Abb. 18, Spur 6). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das anti-NadA Serum für alle Westernblotanalysen im Verhältnis 1:500 eingesetzt.

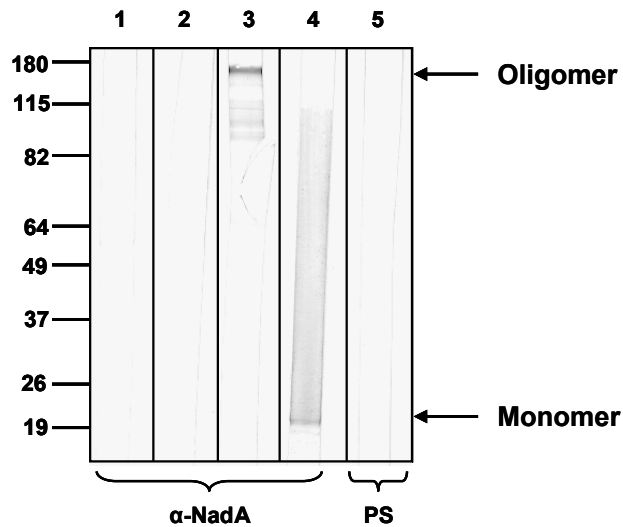


Abb. 18 Immunoblot zum Nachweis der Reaktivität des anti-NadA Serum. Ganzzellysate (10 μ l) der WA-314 $\Delta yadA$ Konstrukte und rekombinantes NadA₂₄₋₂₁₀ Protein (10 μ g) wurden bei 100 °C für 10 min denaturiert und mittels SDS-PAGE (11 %) aufgetrennt. Die auf eine Nitrozellulosemembran transferierten Proteine wurden mit anti-NadA Serum (1:500) oder NadA Prämumserum (PS) (1:500) und Ziege anti-Kaninchen IgG alkalische Phosphatase Konjugat (1:2000) inkubiert. 1: WA-314 $\Delta yadA$; 2: WA-314 $\Delta yadA:yadA$; 3: WA-314 $\Delta yadA:nadA$; 4: NadA₂₄₋₂₁₀; 5: NadA₂₄₋₂₁₀.

3.5 Bindung von *nadA*- und *nadA-yadA*-exprimierenden Yersinien an extrazelluläre Matrixproteine

Um die Bindung von NadA an extrazelluläre Matrixproteine zu untersuchen, wurden *nadA*-exprimierende *Y. enterocolitica* Konstrukte mittels ELISA-Technik auf ihre Bindungsfähigkeit an Kollagen Typ I, Fibronectin und Matrigel getestet (2.18.5.3). Bei Matrigel handelt es sich um eine Mischung verschiedener extrazellulärer Matrixproteine, wobei die Hauptkomponenten Laminin (56 %), Kollagen Typ IV (31 %) und Entaktin (8 %) sind. Abbildung 19 zeigt, dass die NadA-YadA-Hybride (WA-314 $\Delta yadA$:M1-M4 und WA-314 $\Delta yadA$:F1-F4), sowie der NadA-positive Stamm (WA-314 $\Delta yadA$:MC1089 und Fam1089) beider *N. meningitidis* Stämme MC58 und Fam18 und der YadA-negative Stamm (WA-314 $\Delta yadA$) weder mit Kollagen Typ I, noch mit Fibronectin und Matrigel interagierten. Im Vergleich dazu zeigten YadA-positive Yersinien (WA-314 $\Delta yadA:yadA$) die bekannte Bindung an Kollagen Typ I, Matrigel und Fibronectin (Abb. 19).

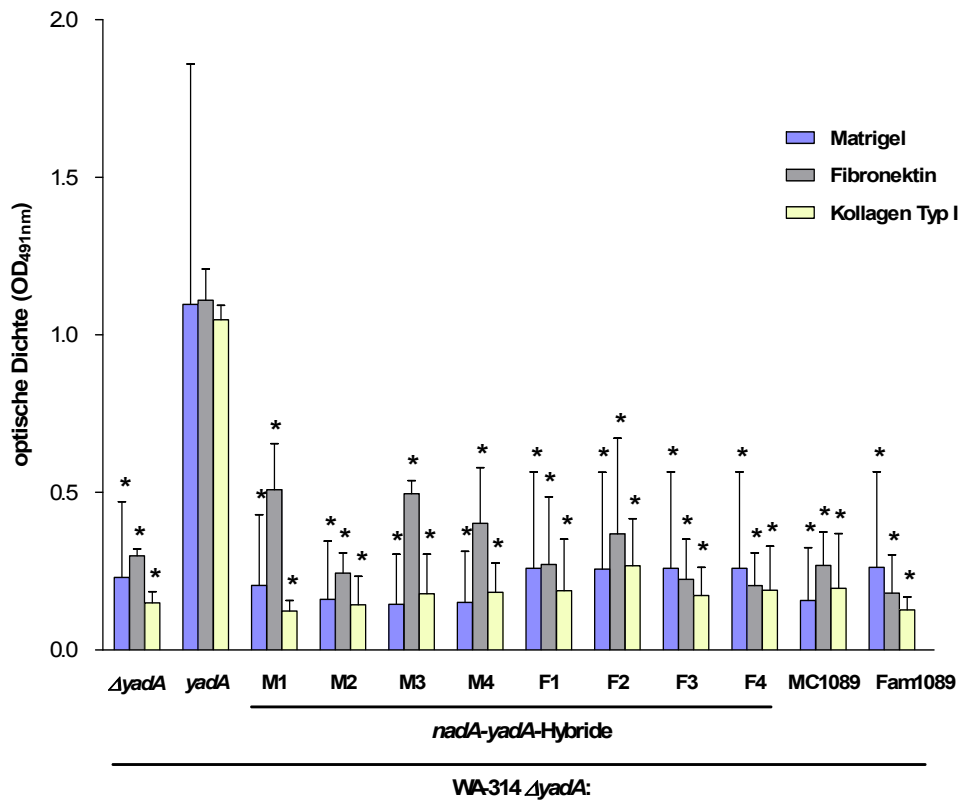


Abb. 19 Bindung *nadA*, *yadA* und *nadA-yadA*-exprimierender *Y. enterocolitica* an extrazelluläre Matrixproteine. Die Bindungsfähigkeit verschiedener WA-314 $\Delta yadA$ Konstrukte an Matrigel (10 $\mu\text{g/ml}$), Fibronectin (10 $\mu\text{g/ml}$) und Kollagen Typ I (20 $\mu\text{g/ml}$) wurde mittels ELISA-Technik bei einer optischen Dichte von 491 nm bestimmt. *yadA*: Positivkontrolle (YadA-positiv); $\Delta yadA$ Negativkontrolle (YadA-negativ). *nadA-yadA*-Hybride: M1-M4 und F1-F4; *nadA* MC58: MC1089; *nadA* Fam18: Fam1089. Die Ergebnisse sind als Mittelwert dreier unabhängiger Experimente, welche in dreifacher Ausführung durchgeführt wurden, dargestellt. * $p < 0,02$ versus WA-314 $\Delta yadA$ Werte.

3.6 Autoagglutination *nadA*- und *nadA-yadA*-exprimierender Yersinien

YadA-exprimierende Yersinien zeigen in der stationären Wachstumsphase die Fähigkeit der Autoagglutination/Autoaggregation, die durch die N-terminale YadA-Kopfdomäne vermittelt wird (Skurnik *et al.*, 1984; Tamm *et al.*, 1993). Für die Analyse des Autoaggregationsverhaltens *nadA*- und *nadA-yadA*-exprimierender *Y. enterocolitica* wurden die WA-314 $\Delta yadA$ Konstrukte wie unter 2.14.1 kultiviert. Die NadA-YadA-Hybride (WA-314 $\Delta yadA$:M1-M4 und F1-F4) sowie die NadA-positiven Konstrukte (WA-314 $\Delta yadA$:MC1089 und Fam1089) zeigten nach 7-stündiger Inkubation in Zellkulturmedium (RPMI-1640) weder eine Sedimentierung der Bakterien, noch eine partielle Autoagglutination. Im Vergleich dazu zeigten YadA-positive Yersinien eine deutliche Sedimentierung am Boden des Reagenzglases, und die Trübung der Kultur war stark reduziert.

3.7 Interaktion von Yersinien mit Serumkomponenten

3.7.1 Serumresistenz

Um eine mögliche Beteiligung des NadA bei der Vermittlung der Serumresistenz zu untersuchen, wurden *nadA*-, *yadA*- und *nadA-yadA*-exprimierende *Y. enterocolitica* angezüchtet, mit humanem Serum inkubiert, und nach 90 min die Anzahl der serumresistenten Bakterien bestimmt (2.18.6.1). Die Ergebnisse der Serumresistenzversuche sind in Abbildung 20 dargestellt. Die Anzahl der in humanem Serum überlebenden YadA-positiven Yersinien (WA-314 $\Delta yadA:yadA$) wurde als Serumresistenzfaktor 1 (100 %) festgelegt. Im Vergleich dazu zeigten YadA-negative Yersinien (WA-314 $\Delta yadA$) einen serumsensitiven Phänotyp (Abb. 20). Auch NadA-positive Yersinien (WA-314 $\Delta yadA:MC1089$ und Fam1089) zeigten nach Inkubation in humanem Serum lediglich eine geringe Anzahl lebender Bakterien. Im Gegensatz dazu wiesen alle NadA-YadA-Hybride eine deutliche Serumresistenz auf (Abb. 20). Die Überlebensrate der Hybride WA-314 $\Delta yadA:M2$, M3, M4, F3, und F4 entsprach der des YadA-positiven Stamms WA-314 $\Delta yadA:yadA$ (Serumresistenzfaktor 1). Besonders auffallend waren jedoch die Hybride WA-314 $\Delta yadA:M1$, F1, und F2, welche eine signifikant höhere Überlebensrate (~ 2,5 -fach) im Vergleich zum YadA-positiven Wildtypstamm aufwiesen (Abb. 20).

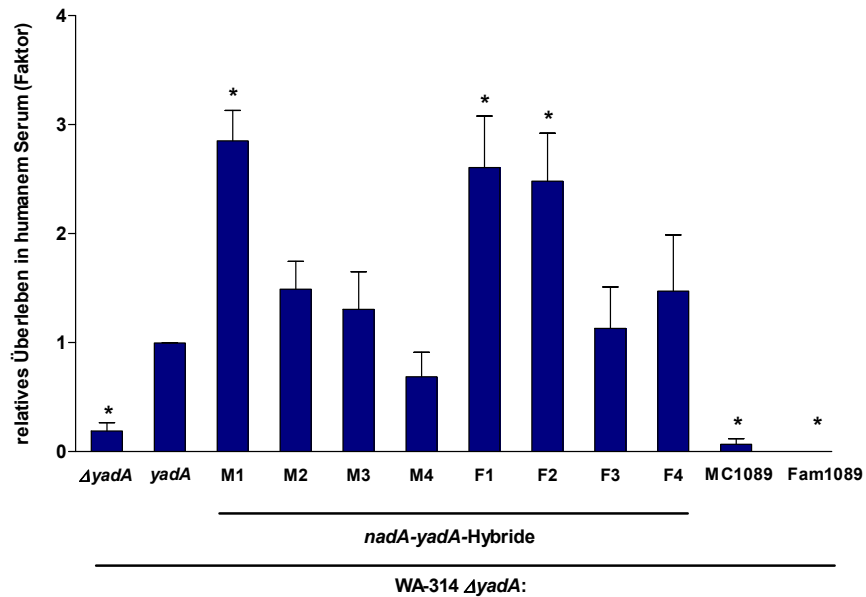


Abb. 20 Überleben *nadA*, *yadA* und *nadA-yadA*-exprimierender *Y. enterocolitica* in humanem Serum. Die Serumresistenz der WA-314 $\Delta yadA$ Stämme wurde durch Inkubation in 100 μ l 50 % humanem Serum für 90 min bei 37 °C bestimmt. Die Überlebensrate entspricht dem Verhältnis der nach 90 min bestimmten Keimzahl und der Ausgangskeimzahl. Die Überlebensrate des Wildtyp WA-314 $\Delta yadA:yadA$ wurde als Serumresistenzfaktor 1 (100 %) festgelegt und in Relation zu den Überlebensraten der NadA und NadA-YadA-Hybride gesetzt. *yadA*: YadA-positiv; $\Delta yadA$: YadA-negativ; M1-M4 und F1-F4: NadA-YadA-Hybride; MC1089: NadA MC58; Fam1089: NadA Fam18. Die Ergebnisse sind als Mittelwert dreier unabhängiger Experimente dargestellt. * $p < 0,0286$ versus WA-314 $\Delta yadA:yadA$ Werte.

Die bisherigen phänotypischen Analysen wie der Synthesenachweis (3.1.2), die Oberflächenlokalisierung (3.2) der NadA-YadA-Hybride und des NadA in *Y. enterocolitica*, zeigten für das NadA beider Stämme (MC58 und Fam18) vergleichbare Ergebnisse. Auch das Autoagglutinations- und Serumresistenzverhalten der NadA Proteine beider Meningokokken Stämme war vergleichbar (3.6, 3.7). Da das NadA von MC58 und Fam18 keine funktionalen Unterschiede aufwies, wurden die folgenden Untersuchungen lediglich für das NadA und die NadA-YadA-Hybride des Stamms MC58 durchgeführt.

3.7.2 Bindung von komplementinhibitierenden Faktoren C4BP und Faktor H an *nadA*-exprimierende Yersinien

Um eine Beteiligung von NadA an der Bindung von Komplementinhibitoren wie Faktor H, oder C4BP zu untersuchen wurden Serumabsorptionsexperimente durchgeführt (2.18.6.2.). Hierfür wurden NadA-, YadA- und NadA-YadA-positiv *Y. enterocolitica* mit hitzeinaktiviertem humanem Serum inkubiert und gebundene Komplementinhibitoren aus dem

Bakteriensediment eluiert. Die Bakteriensedimente sowie deren eluierte Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Der Nachweis der C4BP-Bindung erfolgte mit anti-human C4BP Antikörper, während die Bindung von Faktor H mit anti-human Faktor H Antikörper erfolgte. Der Nachweis von C4BP in verschiedenen Fraktionen ist in Abb. 21 dargestellt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Ganzzelllysate der WA-314 $\Delta yadA$ Konstrukte verwendet. In unbehandelten Zelllysaten (Abb. 21.A) konnte kein C4BP nachgewiesen werden (Spur 1-8). Lediglich die Positivkontrolle, hitzeinaktiviertes Serum, zeigte eine Bande bei ca. 75 kDa die der Größe des C4BP Proteins entspricht (Abb. 21.A „+“). Im Gegensatz dazu zeigten die mit hitzeinaktiviertem Serum vorbehandelten Zellsedimente (Abb.21.B) der Stämme WA-314 $\Delta yadA:yadA$ (Spur 2), WA-314 $\Delta yadA:yadA_{88-564}$ (Spur 3), WA-314 $\Delta yadA:M1$ (Spur 4), WA-314 $\Delta yadA:M2$ (Spur 5), WA-314 $\Delta yadA:M3$ (Spur 6), WA-314 $\Delta yadA:M4$ (Spur 7), und WA-314 $\Delta yadA:MC1089$ (Spur 8) eine deutliche Bande bei ca. 75 kDa, die der Größe des C4BP Proteins entspricht. Bei dem YadA-negativen Stamm WA-314 $\Delta yadA$ (Abb. 21.B, Spur 1) konnte nur eine sehr schwache C4BP-Bindung detektiert werden. Analysen der eluierten Fraktionen zeigten lediglich sehr schwache Banden im Bereich von 75 kDa (Abb. 21.C), was darauf hinweist, dass das C4BP nicht vollständig aus den Zellsedimenten eluiert werden konnte. Insgesamt erfolgte ein Bindungsnachweis von C4BP für die NadA-YadA-Hybride, den NadA-, und YadA-positiven Stamm sowie für die kopflose YadA-Mutante.

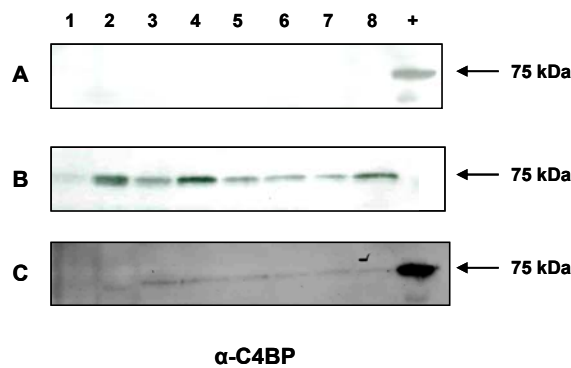


Abb. 21 Bindung von C4BP aus humanem Serum an *Y. enterocolitica*. WA-314 $\Delta yadA$ Konstrukte wurden mit 100 μ l hitzeinaktiviertem humanem Serum für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Elution gebundener Serumproteine erfolgte mit 2 M NaCl. Die verschiedenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (11 %) aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Der immunologische Nachweis für die Bindung von C4BP erfolgte mit Schaf anti-human C4BP Antikörper (1:1000) und Ziege anti-Schaf Peroxidase Konjugat (1:2000). A: unbehandelte Ganzzelllysate. B: mit Serum behandelte Zellsedimente. C: eluierte Fraktionen der mit Serum behandelten Zellsedimente. 1: WA-314 $\Delta yadA$. 2: WA-314 $\Delta yadA:yadA$, 3: WA-314 $\Delta yadA:yadA_{88-564}$. 4: WA-314 $\Delta yadA:M1$. 5: WA-314 $\Delta yadA:M2$. 6: WA-314 $\Delta yadA:M3$. 7: WA-314 $\Delta yadA:M4$. 8: WA-314 $\Delta yadA:MC1089$. +: hitzeinaktiviertes Serum.

Für den Nachweis der Faktor H-Bindung durch *nadA* und *nadA-yadA*-exprimierende *Y. enterocolitica* wurden sowohl die unbehandelten Ganzzelllysate, als auch die mit Serum behandelten Zellsedimente und daraus eluierten Fraktionen mittels Immunoblot analysiert. In unbehandelten Ganzzelllysaten konnte kein Faktor H nachgewiesen werden (Abb.22.A). Im Gegensatz dazu zeigte hitzeinaktiviertes Serum allein eine deutliche Bande bei ca. 160 kDa, die dem Molekulargewicht von Faktor H entspricht. Die mit Serum behandelten Zellsedimente (Abb. 22.B) zeigten lediglich für die Stämme WA-314 $\Delta yadA:yadA_{88-564}$ (Spur 3) und WA-314 $\Delta yadA:M2$ (Spur 5) eine deutliche Bande bei 160 kDa, die eine Bindung von Faktor H nachwies. Bei den Konstrukten WA-314 $\Delta yadA:yadA$ (Spur 2), WA-314 $\Delta yadA:M1$ (Spur4), WA-314 $\Delta yadA:M3$ (Spur 6), WA-314 $\Delta yadA:M4$ (Spur 7) und WA-314 $\Delta yadA:MC1089$ (Spur 8) hingegen konnte nur eine sehr schwache Bande bei 160 kDa detektiert werden. Daher ist anzunehmen, dass diese Stämme Faktor H weniger gebunden haben. Bei der Negativkontrolle WA-314 $\Delta yadA:yadA$ (Spur 1) konnte keine Bindung von Faktor H nachgewiesen werden. Die eluierten Fraktionen der Zellsediment (Abb. 22.C) zeigten keinen deutlichen Nachweis der Faktor H Bindung. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass eine Bindung von Faktor H nur an das NadA-YadA-Hybrid M2 und die kopflosen YadA-Mutante eindeutig nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der starken Unspezifität des anti-human Faktor H Antikörpers konnte bei dem NadA-, dem YadA-positiven Konstrukt sowie den anderen NadA-YadA-Hybriden keine eindeutige Bindung von Faktor H nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigt Abb. 22.C, dass die Elution der gebundenen Serumproteine aus den Zellsedimenten nicht erfolgreich war.

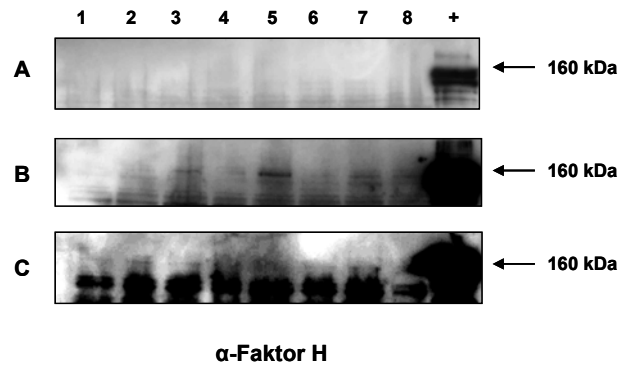


Abb. 22 Bindung von Faktor H aus humanem Serum an *Y. enterocolitica*. WA-314 $\Delta yadA$ Yersinien wurden mit 100 μ l hitzeinaktiviertem humanem Serum für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Elution gebundener Serumproteine erfolgte mit 2 M NaCl. Die verschiedenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (11 %) aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Der immunologische Nachweis für die Bindung von Faktor H erfolgte mit Ziege anti-human Faktor H Antikörper (1:1000) und Kaninchen anti-Ziege IgG (1:10000) Peroxidase Konjugat. A: unbehandelte Ganzzelllysate. B: mit Serum behandelte Zellsedimente. C: eluierte Fraktionen der mit Serum behandelten Zellsedimente. 1: WA-314 $\Delta yadA$. 2: WA-314 $\Delta yadA:yadA$, 3: WA-314 $\Delta yadA:yadA_{88-564}$. 4: WA-314 $\Delta yadA:M1$. 5: WA-314 $\Delta yadA:M2$. 6: WA-314 $\Delta yadA:M3$. 7: WA-314 $\Delta yadA:M4$. 8: WA-314 $\Delta yadA:MC1089$. +: hitzeinaktiviertes Serum.

3.8 Interaktion von NadA mit eukaryotischen Zellen

3.8.1 Interaktion *nadA*-exprimierender Yersinien mit Chang Zellen

Um die Zelladhäsion der in *Y. enterocolitica* synthetisierten NadA und NadA-YadA-Hybridproteine zu überprüfen, wurden Infektionsversuche mit *nadA*- und *nadA-yadA*-exprimierenden Yersinien und Chang Zellen durchgeführt. Für diese Versuche wurden die pYV-Plasmid-negativen und Invasin-negativen WA-c $\Delta inv(p)$ Konstrukte verwendet, um die alleinige Rolle von NadA und YadA in Interaktion mit Chang Zellen untersuchen zu können. Für Adhärenzversuche wurden die Chang Zellen mit einer MOI 100 infiziert und für 3 h inkubiert, bevor die Anzahl der zellassoziierten Bakterien bestimmt wurde (2.16.3). Für die Bestimmung der intrazellulären Bakterien wurde zusätzlich Gentamicin eingesetzt (2.16.3). Die Quantifizierung der zellassoziierten Bakterienzahl zeigte eine signifikant höhere Anzahl zellassoziierter Bakterien NadA-, YadA-, und NadA-YadA-positiver Yersinien im Vergleich zum YadA-negativen Stamm (Abb. 23.A). Die Zahl adhärenter YadA-positiver Yersinien (*pyadA*) war im Vergleich zur YadA-Mutante (p) um das ~ 300-fache erhöht. Auch die Hybride pM1 (~ 8,5-fach), pM2 (~ 3,4-fach), pM3 (~ 8,9-fach), pM4 (~ 0,6-fach), und *pnadA* (~ 10,7-fach) zeigen eine signifikant höhere Anzahl zellassoziierter Bakterien im Vergleich zur YadA-Mutante (p). Die Adhärenz der YadA kopflosen Mutante *pyadA_{88-564}* ist vergleichbar mit der des YadA-negativen Stamm (p) (Abb.23.A). Die Anzahl intrazellulärer

Bakterien war für *pyadA* ~ 100-fach, pM1 ~ 6,6-fach, pM2~ 3,9-fach, pM3 ~ 22,4-fach, pM4 ~ 23,0-fach und *pnadA* ~ 14,9-fach höher als die Anzahl YadA-negativer Yersinien (p) (Abb. 23.B). Somit konnte gezeigt werden, dass die NadA Kopfdomäne (AS 24-90) für die Bindung und Internalisierung in Chang Zellen verantwortlich ist.

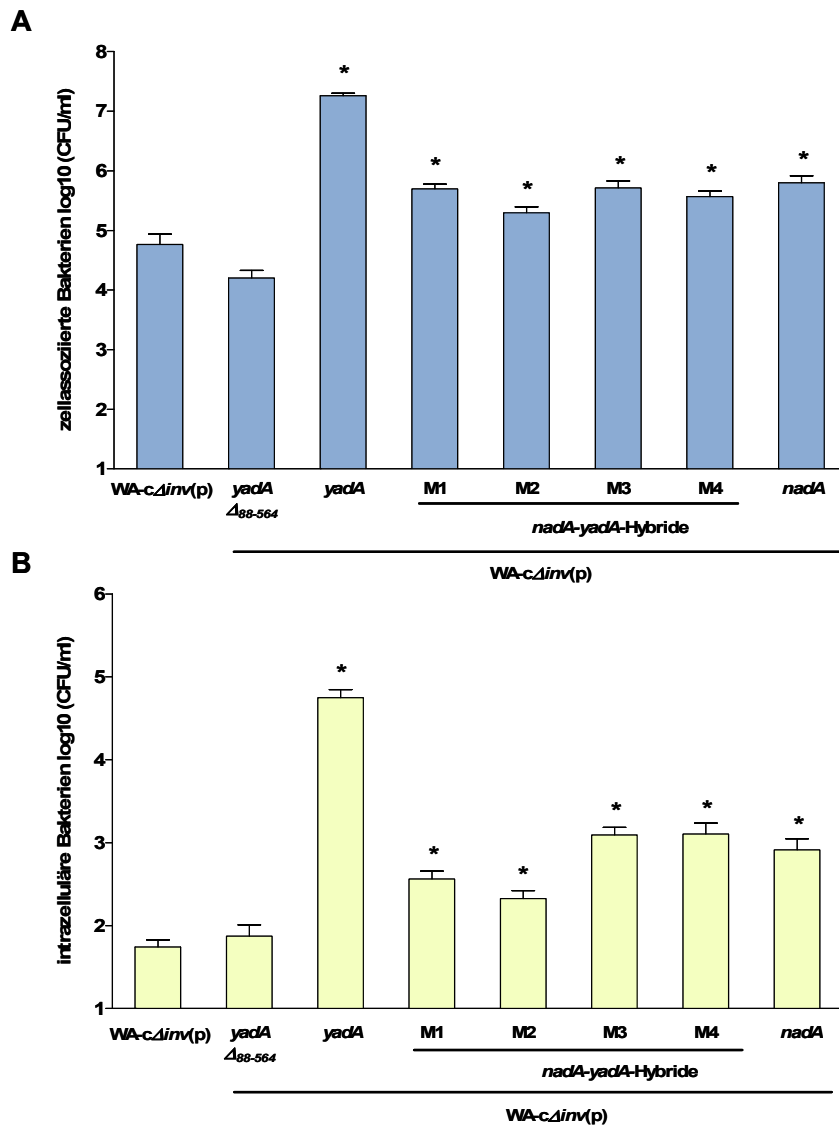


Abb. 23 Adhärenz und Invasion *nadA*-, *yadA*- und *nadA-yadA*-exprimierender *Y. enterocolitica* durch Chang Zellen. 2×10^5 Chang Zellen wurden mit WA-c $\Delta inv(p)$ (Negativkontrolle), WA-c $\Delta inv(pyadA)$ (YadA-positiv), WA-c $\Delta inv(pyadA_{\Delta 88-564})$ (YadA-kopflös), WA-c $\Delta inv(pnadA)$ (NadA-positiv), und WA-c $\Delta inv(pM1-M4)$ (NadA-YadA-Hybride) mit einer MOI 100 für 3h bei 37 °C inkubiert. **A:** zellossoziierte Bakterien (intra- und extrazellulär). **B:** intrazelluläre Bakterien nach zusätzlicher Gentamicinbehandlung (50µg/ml) für 90 min. Die Zahl der zellossoziierten und intrazellulären Bakterien ist als log₁₀ „colony forming units“ pro ml (CFU/ml) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwert drei unabhängiger Experimente, welche in dreifacher Ausführung durchgeführt wurden, dargestellt. * $p < 0,0406$ versus WA-c $\Delta inv(p)$ Werte.

3.8.2 Interaktion *nadA*-exprimierender Yersinien mit dHL-60 Zellen

3.8.2.1 Bindung an dHL-60 Zellen

Eine mögliche Beteiligung von NadA an der Interaktion mit neutrophilähnlichen dHL-60 Zellen wurde mittels Adhärenzversuchen bestimmt (2.16.4). Für die Infektionsversuche mit WA-c $\Delta inv(p)$ Konstrukten wurden sowohl unbehandelte dHL-60 Zellen, als auch dHL-60 Zellen, die zur Modifizierung ihrer Zelloberfläche mit Phospholipase oder Proteinase vorbehandelt wurden, verwendet (2.16.2.2).

Infektionsversuche mit unbehandelten dHL-60 Zellen zeigten eine Yersinien-Bindung von ~15 % der eingesetzten NadA-YadA-positiven Stämme (pM1-pM4) sowie des NadA- und YadA-positiven Stamm an dHL-60 Zellen (Abb. 24). Die Zahl der adhärenenten Bakterien war im Vergleich zur YadA-Mutante (p) bei pM1 ~5,5-fach, pM2 ~6,4-fach, pM3 ~5,6-fach, pM4 ~5,1-fach, *pnadA* ~5,2-fach und bei *pyadA* ~4,2-fach erhöht. Die Bindungseffizienz der kopflosen YadA-Mutante (*pyadA*₈₈₋₅₆₄) lag dagegen bei ca. 3,3 % und war vergleichbar mit der Adhärenz der YadA-Mutante (Abb. 24).

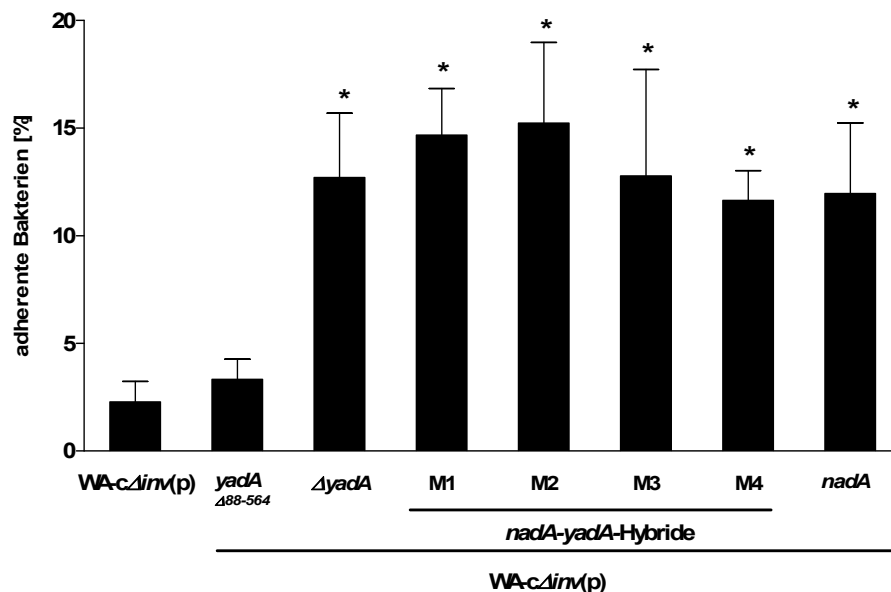


Abb. 24 Bindung *nadA*-, *yadA*- und *nadA-yadA*-exprimierender *Y. enterocolitica* an dHL-60 Zellen. 1×10^6 dHL-60 Zellen wurden mit WA-c $\Delta inv(p)$ (Negativkontrolle), WA-c $\Delta inv(pyadA)$ (YadA-positiv), WA-c $\Delta inv(pyadA_{\Delta 88-564})$ (YadA-kopflos), WA-c $\Delta inv(pnadA)$ (NadA-positiv), und WA-c $\Delta inv(pM1-M4)$ (NadA-YadA-Hybride) mit einer MOI 50 für 30 min bei 37 °C infiziert. Die Anzahl adhärenenten Bakterien wurde mikroskopisch bestimmt. Die Zahl adhärenenten Bakterien in 50 Gesichtsfeldern wurde in Bezug zur Ausgangskeimzahl (MOI 50 = 100 %) gesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert drei unabhängiger Experimente dargestellt. * $p < 0,0419$ versus WA-c $\Delta inv(p)$.

Infektionsversuche, die nach der Oberflächenmodifizierung von dHL-60 Zellen durchgeführt wurden, zeigten dass lediglich die Behandlung der Zellen mit Proteinase K zu einer signifikanten Reduktion der Bindung von pM1, pM2, pM3, pM4, *pnadA*, und *pyadA* um ca. 12 % führte (Abb. 25, gelbe Säulen). Die Behandlung der Zellen mit Phospholipase A2 dagegen führte bei den NadA-YadA-Hybriden und dem NadA Konstrukt zu keiner Reduktion der Adhärenz, wobei die Bindung des Konstrukt *pyadA* um ca. 5 % reduziert war (Abb. 25, graue Säulen). Somit konnte gezeigt werden, dass die NadA Kopfdomäne (AS 24-90) an der Interaktion mit neutrophilähnlichen dHL-60 Zellen beteiligt ist. Diese Interaktion scheint durch oberflächenexponierte Rezeptoren vermittelt zu werden, die eine Proteinstruktur aufweisen.

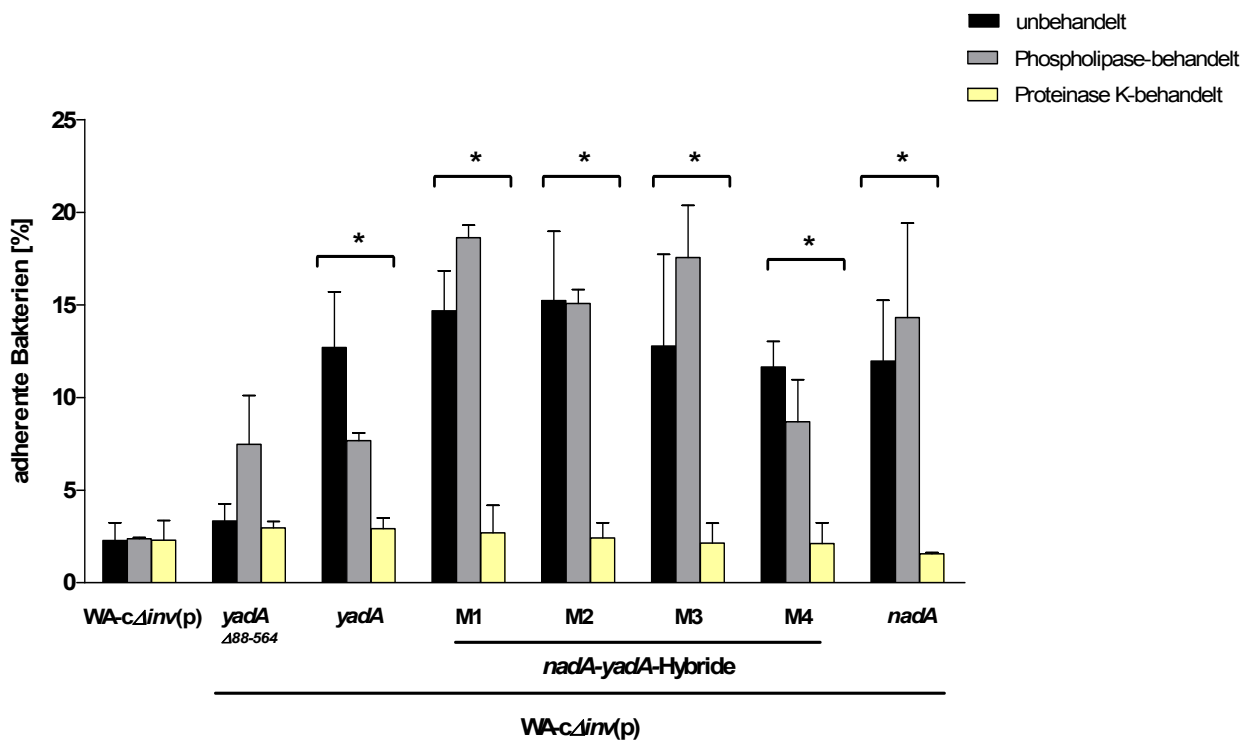


Abb. 25 Einfluss der Oberflächenmodifizierung von dHL-60 Zellen auf die Bindung *nadA*-, *yadA*- und *nadA-yadA*-exprimierender *Y. enterocolitica*. 1×10^6 unbehandelte, mit Phospholipase A2-behandelte oder mit Proteinase K behandelte dHL-60 Zellen wurden mit WA-c $\Delta inv(p)$ (Negativkontrolle), WA-c $\Delta inv(pyadA)$ (YadA-positiv), WA-c $\Delta inv(pyadA_{\Delta 88-564})$ (YadA-kopflos), WA-c $\Delta inv(pnadA)$ (NadA-positiv), und WA-c $\Delta inv(pM1-M4)$ (NadA-YadA-Hybride) mit einer MOI 50 für 30 min bei 37 °C infiziert. Die Anzahl adhärenter Bakterien wurde mikroskopisch bestimmt. Die Zahl adhärenter Bakterien in 50 Gesichtsfeldern wurde in Bezug zur Ausgangskeimzahl (MOI 50=100 %) gesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert drei unabhängiger Experimente dargestellt. * $p < 0,0408$ versus Werte der unbehandelten dHL60 Zellen.

3.8.2.2 Internalisierung durch dHL-60 Zellen

Um eine Beteiligung der NadA-Kopfdomäne an einer Internalisierung *nadA*-exprimierender Yersinien durch dHL-60 Zellen zu untersuchen, wurden die mit WA-c $\Delta inv(p)$ Konstrukten infizierten dHL-60 Zellen (2.16.4) einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung unterzogen (2.18.4) (Abb. 26).

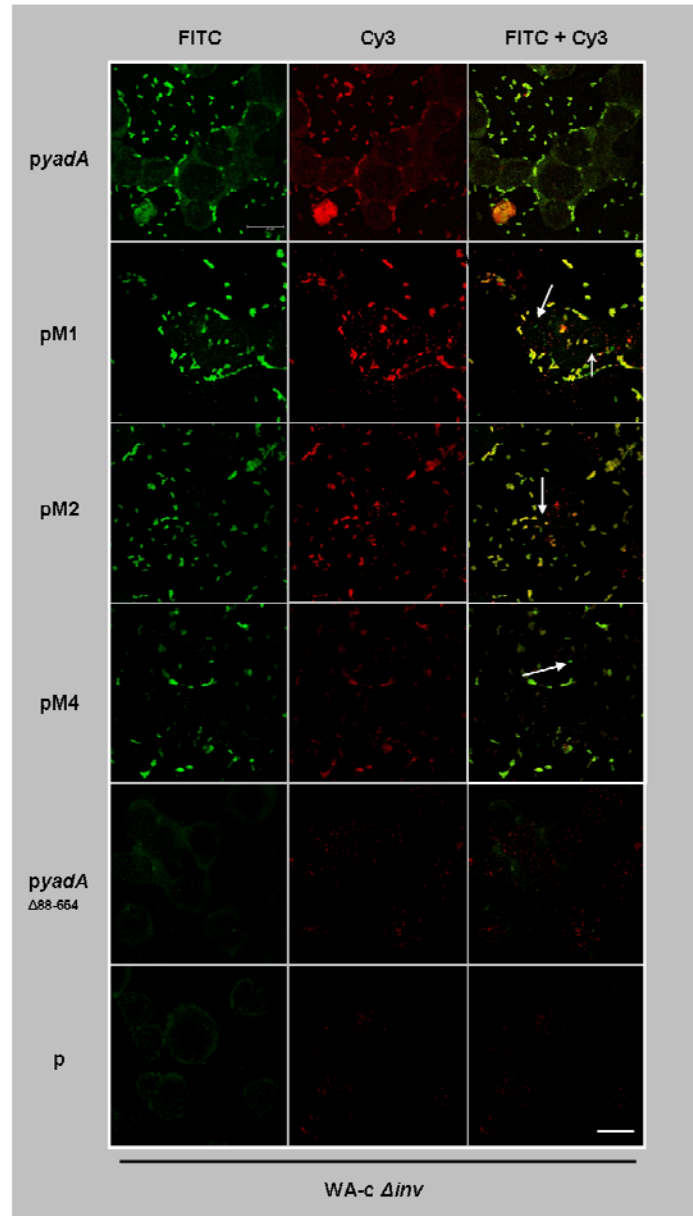


Abb. 26 Doppelimmunfluoreszenzfärbung WA-c $\Delta inv(p)$ infizierter dHL-60 Zellen. 1×10^6 dHL-60 Zellen wurden mit WA-c $\Delta inv(p)$ (Negativkontrolle), WA-c $\Delta inv(pyadA)$ (YadA-positiv), WA-c $\Delta inv(pyadA_{\Delta 88-564})$ (YadA-kopflös), und WA-c $\Delta inv(pM1, pM2, pM4)$ (NadA-YadA-Hybride) mit einer MOI 50 für 30 min bei 37 °C infiziert. Adhärenente Bakterien wurde mit anti-NadA Serum (1:50) oder WA-Wital Serum (1:5000) und Ziege anti-Kaninchen IgG Cy3 (1:50) gefärbt. Nach der Zellpermeabilisierung wurden intrazelluläre Bakterien mit anti-NadA Serum (1:50) oder WA-Vital Serum (1:5000) und Ziege anti-Kaninchen IgG FITC (1:128) dargestellt. Die Pfeile weisen auf intrazelluläre Bakterien hin. Der Größenbalken entspricht 20 µm.

Die Immunfluoreszenzdarstellung intra- und extrazellulärer Bakterien zeigte eine deutliche Anlagerung der NadA-YadA-Hybride pM1, pM2 und pM4 um die dHL-60 Zellen (Abb. 26). Zusätzlich konnten die Hybride pM1, pM2 und pM4 als internalisierte Bakterien innerhalb der dHL-60 Zellen lokalisiert werden. Diese waren in der Überlagerung des FITC und Cy3 Kanal, als grün fluoreszierende Bakterien sichtbar. Im Vergleich dazu zeigte der YadA-positive Stamm *pyadA* eine deutliche Bindung an dHL-60 Zellen, jedoch keine intrazelluläre Lokalisierung. Bei der YadA-Mutante p und der kopflosen YadA-Mutante *pyadA*₈₈₋₅₆₄ konnten weder extra- noch intrazellulär lokalisierte Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 26). Diese Ergebnisse zeigen, dass die NadA Kopfdomäne nicht nur an der Bindung an dHL-60 Zellen beteiligt ist, sondern auch eine Aufnahme in die Zellen induziert, während YadA lediglich eine Adhärenz an dHL-60 Zellen vermittelt.

3.9 Die Rolle von NadA im Mausinfektionsmodell

Da *N. meningitidis* nicht mauspathogen ist, wurde die Rolle von NadA mit Hilfe des *Y. enterocolitica* Systems im Mausinfektionsmodell untersucht. Hierfür wurden jeweils 5 Mäuse peroral für 5 Tage und intraperitoneal für 2 und 4 Tage mit pVY-Plasmid-positiven WA-314 $\Delta yadA$ Stämmen infiziert (2.19.2). Für i.p.-Infektionen wurde die Anzahl der Bakterien in der Milz und Leber bestimmt, während nach peroraler Infektion die Bakterienzahl in Milz, Leber, Peyer'schen Plaques und im Darminhalt bestimmt wurde (2.19.3). Zusätzlich erfolgte der Nachweis von WA-314-lux Yersinien in peroral infizierten Mäusen durch Messung der Chemolumineszenz (2.19.4).

Die nach peroraler Infektion quantifizierten Bakterien zeigten für den YadA-positiven Stamm WA-314 $\Delta yadA:yadA$ eine deutliche Kolonisierung des Dünndarms, der Peyer'schen Plaques, der Milz und Leber (Abb. 27). Im Vergleich dazu konnten nur eine geringe Anzahl YadA-negativer (WA-314 $\Delta yadA$) und YadA-kopflöser (WA-314 $\Delta yadA_{\Delta 88-564}$) Yersinien im Dünndarm nachgewiesen werden, und die Anzahl der Bakterien in der Milz, der Leber und den Peyer'schen Plaques war stark reduziert (Abb. 27). Bei dem NadA-YadA-Hybrid WA-314 $\Delta yadA:M1$ konnte eine mit der kopflosen YadA-Mutante vergleichbare Anzahl an Bakterien im Dünndarm, der Leber, Milz und in den Peyer'schen Plaques nachgewiesen werden. NadA-positive Yersinien (WA-314 $\Delta yadA:nadA$) wurden nur in sehr geringer Anzahl im Dünndarm lokalisiert, und zeigten keine Kolonisierung von Milz, Leber und den Peyer'schen Plaques.

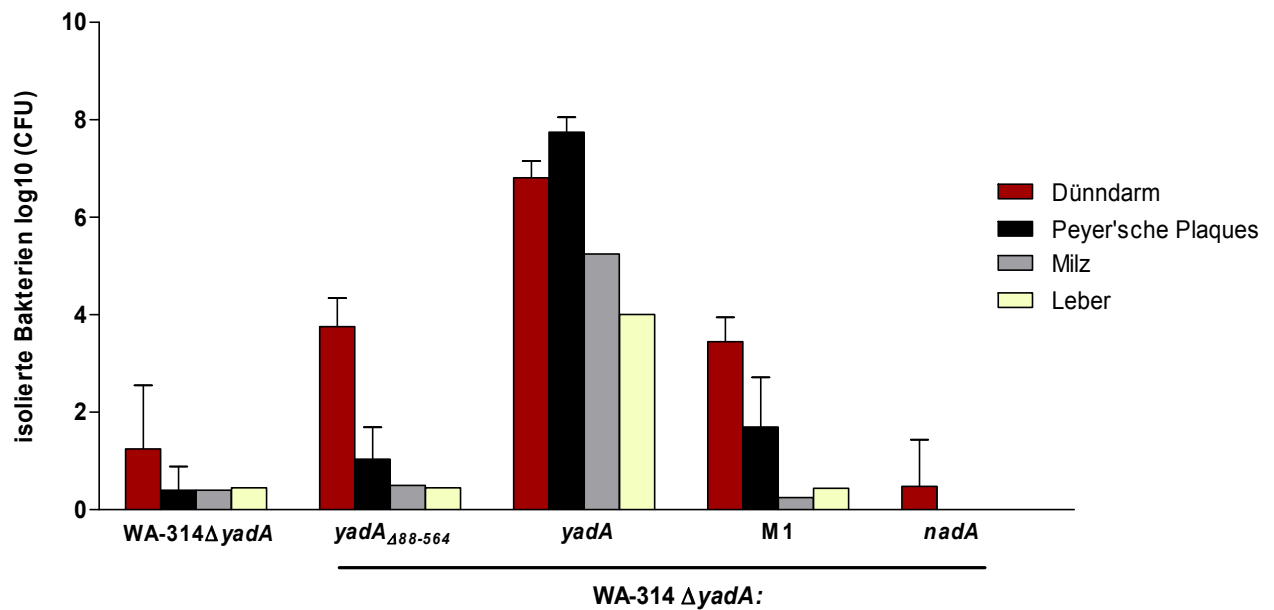


Abb. 27 Quantifizierung *nadA*-, *nadA-yadA*- und *yadA*-exprimierender *Y. enterocolitica* nach peroraler Infektion in Mausorganen. 5 Balb-c Mäuse wurden peroral mit 1×10^9 WA-314 $\Delta yadA$ (YadA-negativ), WA-314 $\Delta yadA_{88-564}$ (YadA-kopflös), WA-314 $\Delta yadA:yadA$ (YadA-positiv), WA-314 $\Delta yadA:M1$ (NadA-YadA-Hybrid) und WA-314 $\Delta yadA:nadA$ (NadA-positiv) infiziert. 5 Tage nach Infektion erfolgte die Bestimmung der Bakterienzahl (CFU) im Dünndarm, den Peyer'schen Plaques, der Milz und in der Leber.

Die Quantifizierung der Lumineszenz von WA-314-lux Yersinien in peroral infizierten Mäusen mit dem Lumina System zeigte lediglich bei Mäusen, die mit dem Wildtypstamm WA-314-lux $\Delta yadA:yadA$ infiziert wurden eine starke Lumineszenz, die auf die Besiedelung des Darms hindeutet (Abb. 28). Mäuse die mit dem Stamm WA-314-lux $\Delta yadA_{88-564}$ infiziert wurden, wiesen lediglich im Bereich des Darms geringe Fluoreszenzbereiche auf, die eine sehr schwache Kolonisierung darstellen. Mit den Stämmen WA-314-lux $\Delta yadA:nadA$ oder WA-314-lux $\Delta yadA$ infizierte Mäuse zeigten keinerlei Kolonisierung, da keine Chemolumineszenzintensität detektiert werden konnten (Abb. 28).

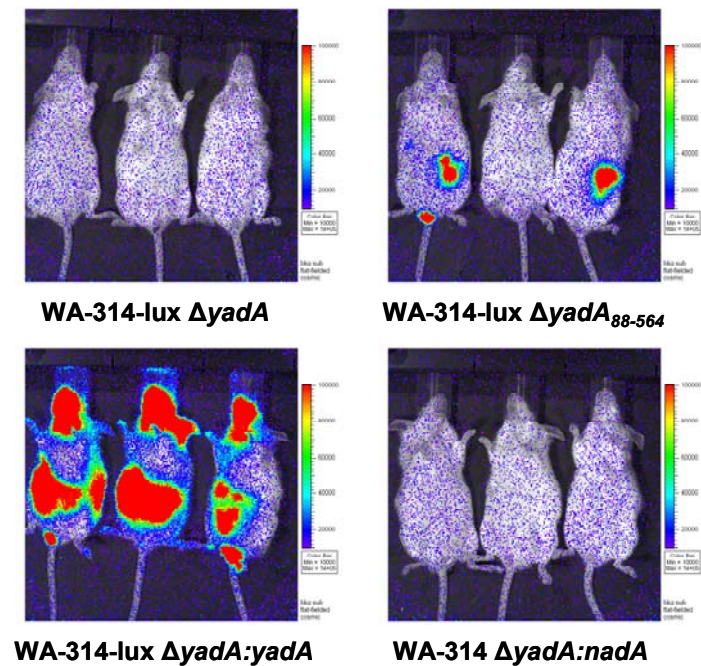


Abb. 28 Chemolumineszenznachweis *nadA*- und *yadA*-exprimierender *Y. enterocolitica* in perorale infizierten Mäusen. 3 Balb-c Mäuse wurden peroral mit 1×10^9 WA-314-lux $\Delta yadA$ (YadA-negativ), WA-314-lux $\Delta yadA_{88-564}$ (YadA-kopflös), WA-314-lux $\Delta yadA:yadA$ (YadA-positiv) und WA-314 $\Delta yadA:nadA$ (NadA-positiv) infiziert. 5 Tage nach der Infektion erfolgte die Induktion des *luxCDABE* Operons mit 120 mg Arabinose in PBS und anschließender Messung der Lumineszenz mit dem IVIS Lumina System.

Die nach i.p.-Infektion nachgewiesenen Yersinien in der Milz und Leber sind in Abbildung 29 dargestellt. Der YadA-positive Stamm zeigte 2 Tage nach der Infektion eine starke Kolonisierung der Milz und Leber (Abb. 29.A). Die Anzahl der YadA-negativen und YadA-kopflösen Yersinien war im Vergleich dazu, sowohl in der Milz als auch in der Leber deutlich reduziert. Auch die NadA-YadA Hybride (WA-314 $\Delta yadA:M1-M4$) und der NadA-positive Stamm WA-314 $\Delta yadA:nadA$ waren im Vergleich zum YadA-positiven Stamm in geringer Anzahl in der Milz und der Leber lokalisiert, zeigten aber eine vergleichbare Kolonisierung zum Stamm WA-314 $\Delta yadA_{\Delta 88-564}$ (Abb. 29.A). 4 Tage nach der Infektion wurde eine höhere Anzahl YadA-positiver Yersinien in der Milz und Leber nachgewiesen als 2 Tage nach der Infektion ($\sim 1,5$ -fach) (Abb. 29.B). Die YadA-kopflöse Mutante zeigte nach 4 Tagen keine signifikant reduzierte oder erhöhte Kolonisierung der Leber und Milz. Die NadA-YadA-Hybride WA-314 $\Delta yadA:M1-M4$ und der NadA-positive Stamm WA-314 $\Delta yadA:nadA$ hingegen wiesen 4 Tage nach Infektion eine signifikante Reduktion der Bakterienanzahl in der Milz und Leber im Vergleich zur Anzahl, die nach 2 Tagen bestimmt werden konnte, auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass lediglich der YadA-positive Stamm WA-314 $\Delta yadA:yadA$

sowohl nach peroraler als auch nach i.p.-Infektion zur Mausvirulenz beiträgt, und auch vier Tage nach Infektion noch in erhöhter Anzahl in der Milz und Leber nachgewiesen werden kann. Der YadA-kopflöse Stamm, die NadA-YadA-Hybride und der NadA-positive Stamm waren im peroralen und i.p.-Modell stark attenuiert. Somit kann eine YadA-entsprechende Rolle für NadA im Yersinia-Mausinfektionsmodell ausgeschlossen werden.

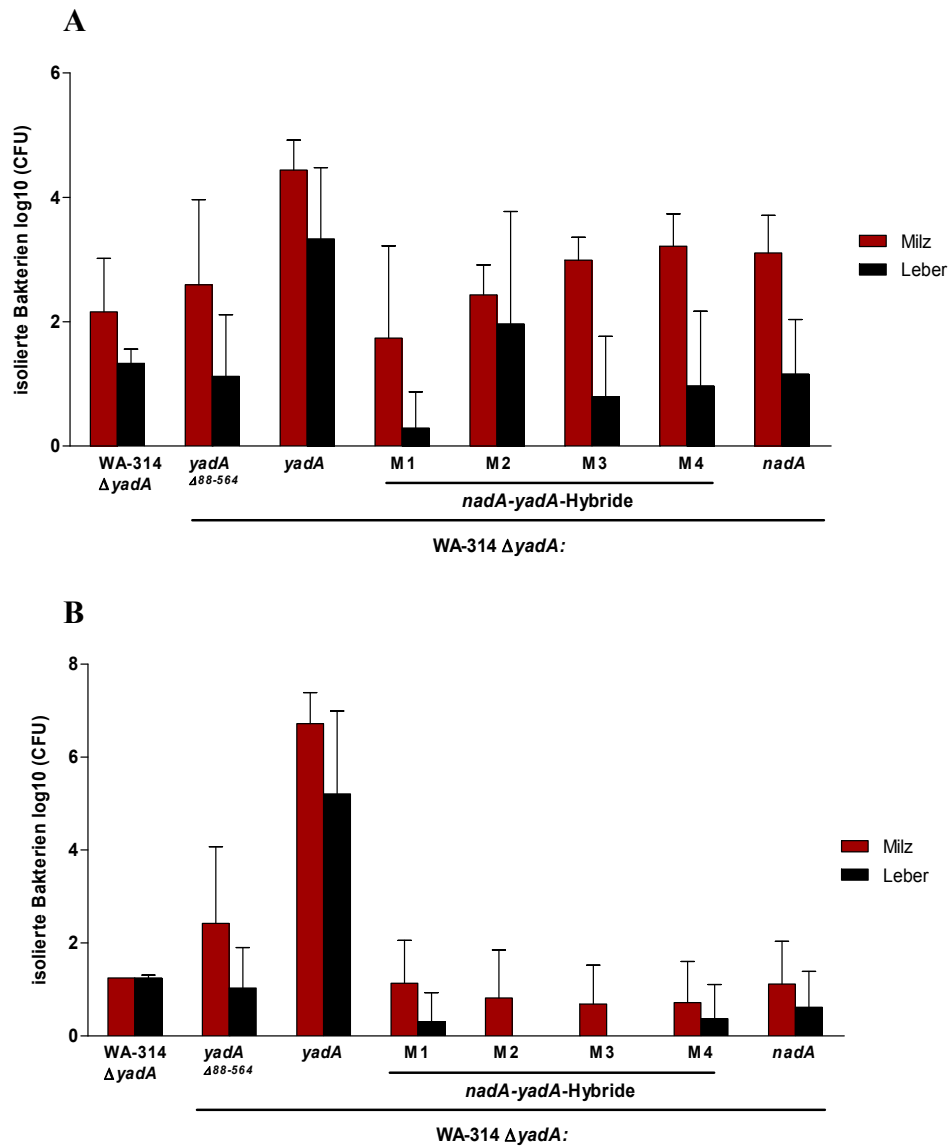


Abb. 29 Quantifizierung *nadA*-, *nadA-yadA*- und *yadA*-exprimierender *Y. enterocolitica* nach intraperitonealer Infektion in Mausorganen. 5 Balb-c Mäuse wurden intraperitoneal mit 5×10^4 WA-314 $\Delta yadA$ (YadA-negativ), WA-314 $\Delta yadA_{88-564}$ (YadA-kopflös), WA-314 $\Delta yadA:yadA$ (YadA-positiv), WA-314 $\Delta yadA:M1, M2, M3, M4$ (NadA-YadA-Hybride) und WA-314 $\Delta yadA:nadA$ (NadA-positiv) infiziert. 2 (A) und 4 (B) Tage nach der Infektion erfolgte die Bestimmung der Bakterienzahl (CFU) der Milz und in der Leber.

3.10 Identifizierung NadA-spezifischer Wirtszellrezeptoren

Die Identifizierung NadA-spezifischer Wirtszellrezeptoren ist ausschlaggebend für ein verbessertes Verständnis der Rolle von NadA in der Pathogenese von *N. meningitidis*. Da bisher keine NadA-spezifischen Rezeptoren identifiziert werden konnten, wurden im Laufe dieser Arbeit verschiedene für bakterielle Adhäsine bekannte Rezeptoren in Interaktion mit NadA untersucht.

3.10.1 CEACAMs als potentielle Wirtszellrezeptoren für NadA

3.10.1.1 Herstellung und Synthesenachweis CEACAM-transfizierter Hek-293 Zellen

Für den Bindungsnachweis von NadA an CEACAMs wurden zunächst stabile CEACAM1, 3, 4, 5, 6, und 8 transfizierte Hek-293 Zelllinien hergestellt (2.15.3), die mit Westernblotanalysen auf die Synthese der verschiedenen CEACAM Proteine überprüft wurden. Der immunologische Nachweis der CEACAM Synthese in Hek-293 Zellen erfolgte mit dem monoklonalen Antikörpern D14HD11 (CEACAM1, 3, 4, 5, 6), BAC2 (CEACAM7), und GM2H6 (CEACAM8) (Tab. 7). Lediglich die mit CEACAM 1 (Abb. 30.A, Spur 1) und CEACAM5 (Abb. 30.A, Spur 4) transfizierten Hek-293 Zellen zeigten eine Bande bei ca. 75 kDa und 100 kDa, die dem Molekulargewicht von CEACAM 1 (65 kDa) und CEACAM5 (90 kDa) entsprachen. Die mit CEACAM3 (Abb. 30.A, Spur 2), CEACAM4 (Abb. 30.A, Spur 3), und CEACAM6 (Abb. 30.A, Spur 5) transfizierten Hek-293 Zellen produzierten die entsprechenden CEACAM-Proteine nicht. Der Nachweis mit BAC2 zeigte keine Synthese von CEACAM7 für die mit CEACAM7 transfizierte Zelllinie (Abb. 30.B, Spur 6). Auch die mit CEACAM8 transfizierten Hek-293 Zellen konnten nicht erfolgreich transfiziert werden, da die Synthese von CEACAM8 nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 30.C, Spur 7). Somit konnten lediglich CEACAM 1 und 5 produzierende Hek-293 Zellen hergestellt werden.

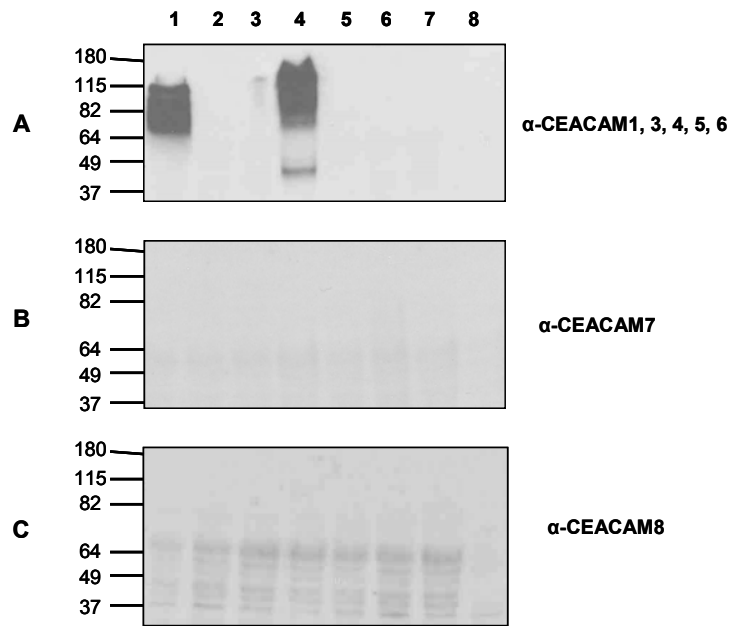


Abb. 30 Nachweis der CEACAM Produktion in transfizierten Hek-293 Zellen. Lysate (10 μ l) der CEACAM1, 3, 4, 5, 6, 7, und 8 transfizierter Hek-293 Zellen wurden mittels SDS-PAGE (11 %) aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. A: Immunologischer Nachweis mit Maus anti-human CEACAM1, 3, 4, 5, 6 (D14HD11) (4 μ g/ml) und Ziege anti-Maus IgG Peroxidase Konjugat (1:2000). B: Immunologischer Nachweis mit Maus anti-human CEACAM7 (BAC2) (4 μ g/ml) und Ziege anti-Maus IgG Peroxidase Konjugat (1:2000). C: Immunologischer Nachweis mit Maus anti-human CEACAM8 (GM2H6) (4 μ g/ml) und Ziege anti-Maus IgG Peroxidase Konjugat (1:2000). Spur 1: CEACAM1-Hek-293, Spur 2: CEACAM3-Hek-293, Spur 3: CEACAM4-Hek-293, Spur 4: CEACAM5-Hek-293, Spur 5: CEACAM6-Hek-293, Spur 6: CEACAM7-Hek-293, Spur 7: CEACAM8-Hek-293, Spur 8: Hek-293.

Die Transfektionseffizienz der mit CEACAM1 und 5 transfizierten Hek2-293 Zellen wurde zusätzlich durch Fluoreszenzmarkierung der Proteine (2.18.2) durchflusszytometrisch bestimmt. Die durchflusszytometrische Darstellung der Fluoreszenzintensität der gemessenen Ereignisse zeigte eine deutliche Fluoreszenzverschiebung der mit CEACAM1 und 5 transfizierten Hek-293 Zellen im Vergleich zu untransfizierten Zellen Hek-293 Zellen (Abb. 31). Die Transfektionseffizienz der mit CEACAM1 transfizierten Zellen lag bei 84,2 %, und die der mit CEACAM5 transfizierten Zellen bei 88,5 %.

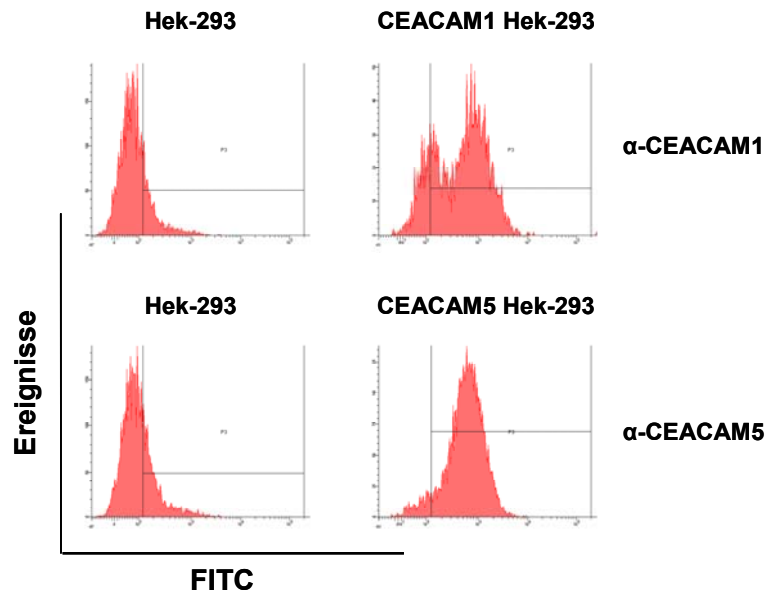


Abb. 31 Bestimmung der Transfektionseffizienz CEACAM1- und CEACAM5-transfizierter Hek-293 Zellen. 3×10^5 CEACAM1 Hek-293, CEACAM5 Hek-293 und Hek-293 Zellen wurden mit Maus anti-human CEACAM1 oder Maus anti-human CEACAM5 ($1,2 \mu\text{g}/10^6$ Zellen) und Ziege anti-Maus Ig(G, A, M) FITC Konjugat (1:1000) markiert. Die Fluoreszenzintensität wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

3.10.1.2 Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀ an CEACAM-transfizierte Hek-293 Zellen

Der Bindungsnachweis von 2, 4, 8 und 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rekombinantem NadA₂₄₋₂₁₀ Protein an CEACAM1- und CEACAM5-positive Hek-293 Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dabei konnte gezeigt werden, dass NadA₂₄₋₂₁₀ in Konzentrationen von 2, 4, 8 und 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ weder mit CEACAM1- noch mit CEACAM5-positiven Hek-293 Zellen interagiert, da keine Verschiebung der Fluoreszenzintensität von unbehandelten Zellen zu NadA-behandelten Zellen gemessen werden konnte (Abb. 32).

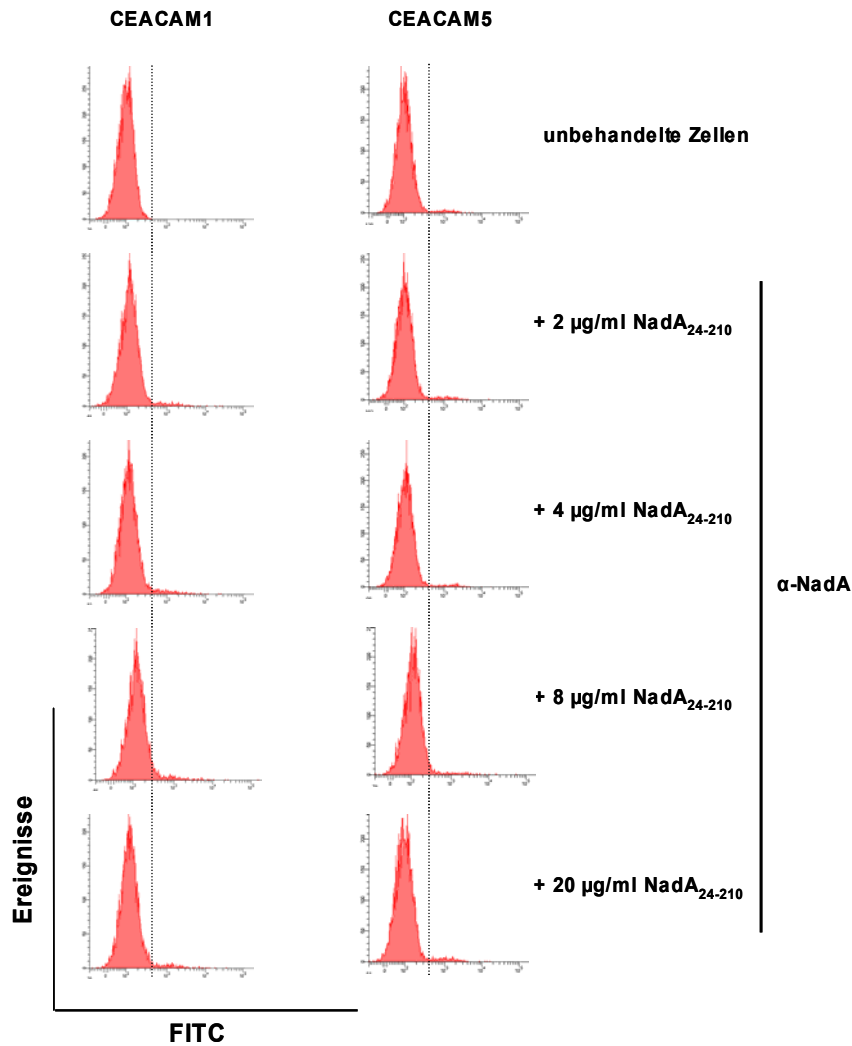


Abb. 32 Durchflusszytometrische Bestimmung der Bindung von NadA_{24-210} an CEACAM1- und CEACAM5-transfizierte Hek-293 Zellen. 3×10^5 CEACAM1 Hek-293, CEACAM5 Hek-293 und Hek-293 Zellen wurden mit 2, 4, 8 und 20 $\mu\text{g/ml}$ NadA_{24-210} Protein für 1h bei 4 °C inkubiert und mit anti-NadA Serum (1:500) und Ziege anti-Kaninchen IgG FITC Konjugat (1:1000) markiert. Die Fluoreszenzintensität wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

3.10.1.3 Bindung *nadA*-exprimierender Yersinien an rekombinante CEACAM-EGFP-Fusionsproteine

Da in dieser Arbeit lediglich CEACAM1- und 5-positive Hek-293 Zellen hergestellt werden konnten, wurde die Interaktion *nadA*- und *yadA*-exprimierender Yersinien (WA-c Δinv) mit löslichen, rekombinanten EGFP-CEACAM1, 3, 4, 5, 6, und 8 Fusionsproteinen untersucht (Kuespert und Hauck, 2009) (2.18.5.4). Abbildung 33 zeigt, dass lediglich der Opa_{CEA} -positive *N. gonorrhoeae* Stamm N309 mit CEACAM1, 3, 5 und 6 interagiert. Der *opa*-negative *N. gonorrhoeae* Stamm N302 und die *nadA*- und *yadA*-exprimierenden WA-c $\Delta inv(p)$ Stämme wiesen dagegen keine Interaktion mit CEACAM1, 3, 5, 6, und 8

Überständen auf. Somit spielen CEACAM1, 3, 5, 6, und 8 als potentielle Rezeptoren für NadA, und YadA wahrscheinlich keine Rolle.

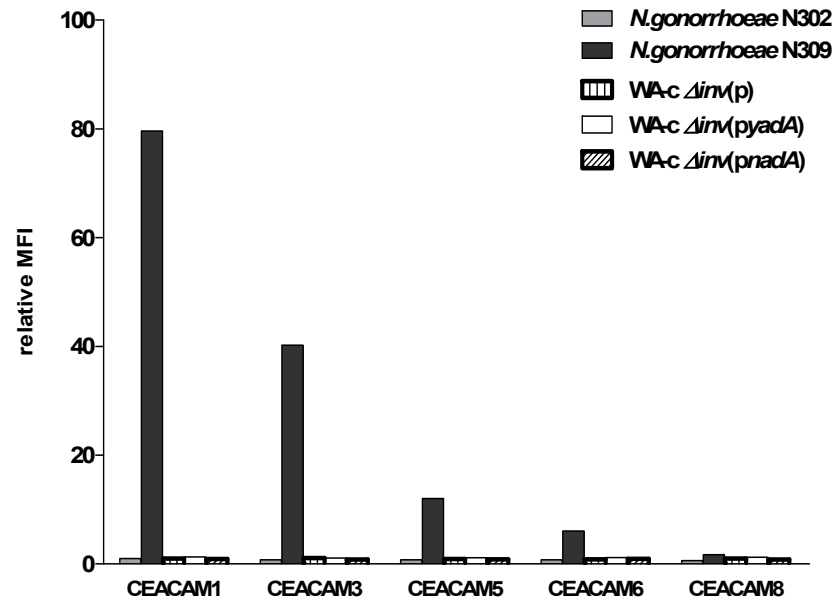


Abb. 33 Durchflusszytometrische Bestimmung der Interaktion *nadA*- und *yadA*-exprimierender *Y. enterocolitica* mit rekombinanten EGPF-CEACAM Fusionsproteinen (Kulturüberstand). 4×10^6 *Y. enterocolitica* oder *N. gonorrhoeae* Stämme wurden mit 250 μ l GFP-markiertem CEACAM-Zellkulturüberstand für 30 min bei 20 °C inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) wurde in Bezug zu unbehandelten Zellen gesetzt. *N. gonorrhoeae* N302: Opa-negativ (Negativkontrolle). *N. gonorrhoeae* N309: Opa_{CEA}-positiv (Positivkontrolle), WA-c Δ inv(p): YadA, NadA-negativ, WA-c Δ inv(pyadA): YadA-positiv, WA-c Δ inv(pnadA): NadA-positiv.

3.10.2 β 1 Integrine als Wirtszellrezeptoren für NadA

Integrine sind Heterodimere (Typ I Membranglykoproteine), die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen, welche nicht-kovalent miteinander verbunden sind (Berman *et al.*, 2003; Humphries, 2000; Takada *et al.*, 2007). Mit ihrer extrazellulären Domäne interagieren Integrine mit ihren Liganden, den extrazellulären Matrixproteinen, wodurch wichtige zelluläre Prozesse wie die Zellreparatur, Immunabwehr und Verankerung vermittelt werden. Diese Prozesse basieren auf der Verknüpfung des zytoplasmatischen Teils der Integrine mit dem intrazellulären Zytoskelett („inside-out signalling“). Neben der Beteiligung bei der Zellverankerung, leiten Integrine chemische Signale in die Zelle („outside-in signalling“), wodurch Prozesse wie die Beweglichkeit, und Zelldifferenzierung induziert werden (Harburger und Calderwood, 2009; Kinashi, 2005; Pribila *et al.*, 2004). Zusätzlich werden Integrine von Bakterien und Viren als Rezeptoren verwendet. Das *Yersinia* Invasin interagiert

beispielweise direkt mit der $\beta 1$ Integrin-Untereinheit, während die Opa_{HS}-Proteine von Neisserien über Vitronektin an $\alpha v\beta 3$ Integrine binden (Brückenmechanismus) (de Vries *et al.*, 1998; Isberg und Leong, 1990).

3.10.2.1 Bindungsnachweis von NadA₂₄₋₂₁₀ an HL-60 und dHL-60 Zellen

Im Laufe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *nadA*-exprimierende *Y. enterocolitica* über einen oberflächen-exponierten Proteinrezeptor mit neutrophilähnlichen dHL-60 Zellen interagieren (3.8.2.1). Um potentielle Zellrezeptoren für NadA identifizieren zu können, wurde das Bindungsverhalten von rekombinantem Alexa488-markiertem NadA₂₄₋₂₁₀ Protein an dHL-60 mit dem Bindungsverhalten an undifferenzierte HL-60 Zellen verglichen. Der Bindungsnachweis von Alexa488-markiertem NadA₂₄₋₂₁₀ an HL-60 und dHL-60 Zellen erfolgte durchflusszytometrisch (2.18.5.1). Dabei konnte gezeigt werden, dass das Alexa488-markierte NadA₂₄₋₂₁₀ Protein mit 2-fach höherer Effizienz an undifferenzierte HL-60 Zellen band, als an differenzierte dHL-60 Zellen (Abb. 34).

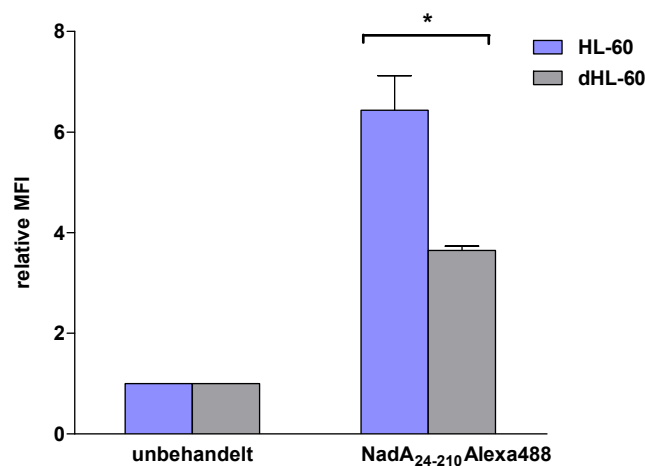


Abb. 34 Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀ an HL-60 und dHL-60 Zellen. 5×10^5 HL-60 bzw. dHL-60 Zellen wurden mit Alexa488-markiertem NadA₂₄₋₂₁₀ Protein (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 1 h bei 4 °C inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die gemittelte Fluoreszenzintensität (MFI) wurde in Bezug zu unbehandelten Zellen gesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert drei unabhängiger Experimente dargestellt. * $p < 0,0049$ versus Werte der unbehandelten Zellen.

Es ist bekannt, dass dHL-60 Zellen $\beta 2$ Integrine (CD18) synthetisieren, während HL-60 Zellen $\beta 2$ Integrin-negativ sind (Collins *et al.*, 1979; Itoh *et al.*, 1998). Die Expression anderer Integrine wie $\beta 1$ Integrine (CD29) wurde bisher nicht untersucht. Daher wurde zunächst die Synthese von $\beta 1$ und $\beta 2$ Integrienen durch HL-60 und dHL-60 Zellen analysiert. Die durchflusszytometrische Auswertung (Abb. 35) zeigte, dass HL-60 Zellen mehr $\beta 1$ Integrine synthetisierten (~ 1,2-fach) als dHL-60 Zellen. Im Gegensatz dazu konnten bei dHL-60 Zellen

mehr $\beta 2$ Integrine nachgewiesen werden ($\sim 5,6$ -fach). Dennoch zeigten auch HL-60 Zellen eine geringe Synthese von $\beta 2$ Integrinen.

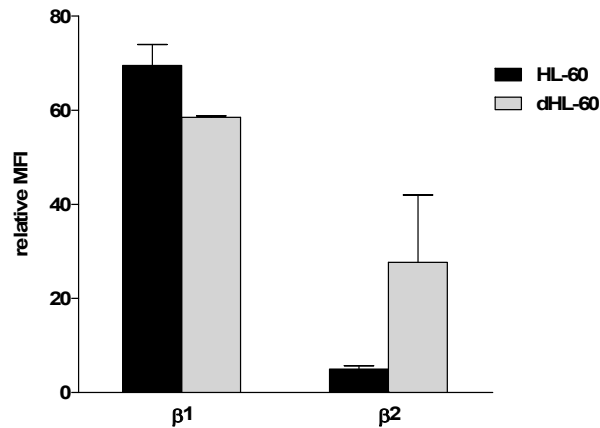


Abb. 35 Expression von $\beta 1$ und $\beta 2$ Integrinen auf dHL-60 und HL-60 Zellen. 5×10^5 HL-60 und dHL-60 Zellen wurden mit Hamster anti-Ratte CD29 FITC Konjugat (1:200) und Maus anti-human CD18 PE Konjugat (1:40) für 1h bei 4 °C inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) wurde in Bezug zu unbehandelten Zellen gesetzt.

3.10.2.2 Bindungsnachweis von NadA₂₄₋₂₁₀ an $\beta 1$ Integrin-exprimierende Zellen

Um eine Beteiligung von $\beta 1$ Integrinen als Wirtszellreptoren für NadA zu untersuchen, wurden Bindungsstudien mit murinen $\beta 1$ Integrin-positiven und –negativen Zellen und rekombinantem NadA₂₄₋₂₁₀ Protein durchgeführt. Zunächst wurde die Expression von $\beta 1$ Integrinen auf GE-11, GE-11- $\beta 1$, 2-4 und 2-4-8 Zellen überprüft (2.18.1). Die durchflusszytometrische Auswertung ist in Tabelle 22 dargestellt. GE-11- $\beta 1$ Zelle waren im Vergleich zu GE-11 Zellen deutlich $\beta 1$ Integrin-positiv. Auch 2-4-8 Zellen zeigten im Vergleich zu 2-4 Zellen eine deutlich höhere durchschnittliche Fluoreszenzintensität. Somit waren die GE-11- $\beta 1$ und 2-4-8 Zellen $\beta 1$ Integrin-positiv. Bei den $\beta 1$ Integrin-negativen GE-11 und 2-4 Zellen konnte ebenfalls eine schwache Expression von $\beta 1$ Integrinen nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass der anti- $\beta 1$ Integrin Antikörper unspezifisch mit anderen Zellkomponenten interagiert, und nicht nur ausschließlich $\beta 1$ Integrine detektiert.

Zellen	Durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI)
GE-11	4,04 \pm 1,29
GE-11- $\beta 1$	50,03 \pm 16,16
2-4	3,77 \pm 1,93
2-4-8	110,83 \pm 8,27

Tab. 22 Durchflusszytometrischer Nachweis der Oberflächenexpression von $\beta 1$ Integrinen auf GE-11, GE-11- $\beta 1$, 2-4 und 2-4-8 Zellen.

Die Bindung von Alexa-488 markiertem NadA₂₄₋₂₁₀ an Epithelzell-ähnliche GE-11 (human β 1 Integrin-negativ) und GE-11- β 1 (human β 1 Integrin-positiv) Zellen, sowie Fibroblasten-ähnliche 2-4 (Maus β 1 Integrin-negativ) und 2-4-8 (Maus β 1 Integrin-positiv) Zellen wurde durchflusszytometrisch analysiert (2.18.5.1). Die Bindung von NadA₂₄₋₂₁₂ an GE-11- β 1 Zellen war im Vergleich zu GE-11 Zellen um das 3,5-fache erhöht (Abb. 36). Auch die Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀ an 2-4-8 Zellen war um das 3,5-fache höher als and 2-4 Zellen (Abb. 36). Somit wird deutlich, dass NadA₂₄₋₂₁₀ mit humanen und murinen β 1 Integrin-exprimierenden Zellen interagiert. Da allerdings auch eine geringe Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀ an die β 1 Integrin-negativen GE-11 und 2-4 Zellen nachweisbar war (\sim 4-fach im Vergleich zu unbehandelten Zellen) (Abb. 36), kann eine Beteiligung anderer Rezeptoren nicht ausgeschlossen werden.

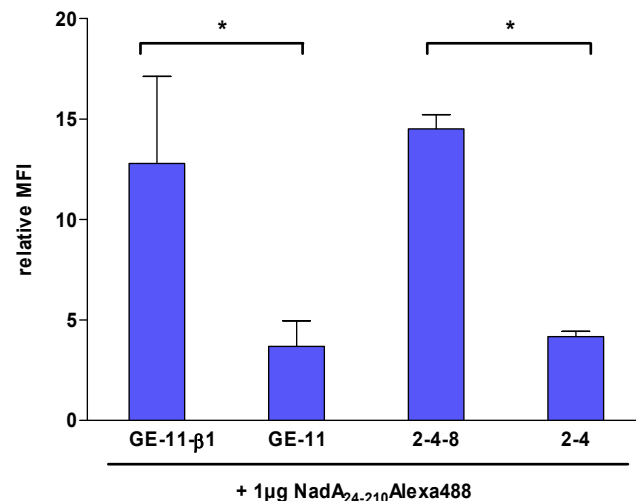


Abb. 36 Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀ an β 1 Integrin-exprimierende Zellen. 3×10^5 GE-11 (human β 1 Integrin-negativ), GE-11- β 1 (human β 1 Integrin-positiv), 2-4 (murin β 1 Integrin-negativ) und 2-4-8 (murin β 1 Integrin-positiv) wurden mit Alexa488-markiertem NadA₂₄₋₂₁₀ Protein (1 μ g/ 3×10^5 = 5 μ g/ml) für 1 h bei 4 °C inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die gemittelte Fluoreszenzintensität (MFI) wurde in Bezug zu unbehandelten Zellen gesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert drei unabhängiger Experimente dargestellt.* $p < 0,0054$.

3.10.2.3 Einfluss des Aktivierungszustandes von β 1 Integrinen auf die Bindung von NadA

Integrine können in verschiedenen Aktivierungszuständen auf der Zelloberfläche vorliegen. Dabei werden drei Konformationszustände unterschieden. Der inaktive Zustand, in dem Integrine eine geringe Bindeaffinität aufweisen, wird als die „bent conformation“ bezeichnet. In dieser Konformation ist der „ β -Propeller“ der α -Untereinheit, die β -I-Domäne der β -

Untereinheit und die α -I-Domäne (distale Bereiche nur bei $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$, $\alpha L\beta 2$, $\alpha M\beta 2$, $\alpha X\beta 2$ vorhanden) an den proximalen Bereich der α - und β -Untereinheit geknickt, so dass eine v-ähnliche Struktur entsteht. Erst durch die Aktivierung der Integrine über intra- und extrazelluläre Signale kommt es zu einer Konformationsveränderung, bei der sich die proximalen Bereiche der α - und β -Untereinheit zunächst leicht aus der gebogenen Form lösen (= „closed extended“) und dann die gestreckte Konformation einnehmen. Der Zustand in dem die Integrine vollständig gestreckt sind wird als „open extended conformation“ bezeichnet. In dieser Konformation haben Integrine die höchste Affinität zu ihrem Liganden (Luo *et al.*, 2007). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Zugabe von Mn^{2+} und das Entfernen von Ca^{2+} die Ligandenbindeaffinität und Adhäsivität aller Integrine erhöht. Dieser Effekt wird durch die Bindung von Metallionen an die ADMIDAS („adjacent to metal ion dependant adhesion site“), welche Mg^{2+} bindet, und die LIMBS (ligand-induced metal ion binding site) Seite, welche Ca^{2+} bindet, vermittelt (Askari *et al.*, 2009; Leitinger *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2007). Um den Einfluss von Mn^{2+} Ionen auf die Bindung von $NadA_{24-212}$ zu untersuchen wurde die Bindung von $NadA_{24-210}$ an GE-11 und GE- $\beta 1$ Zellen in Anwesenheit von 2 mM $MnCl_2$ untersucht.

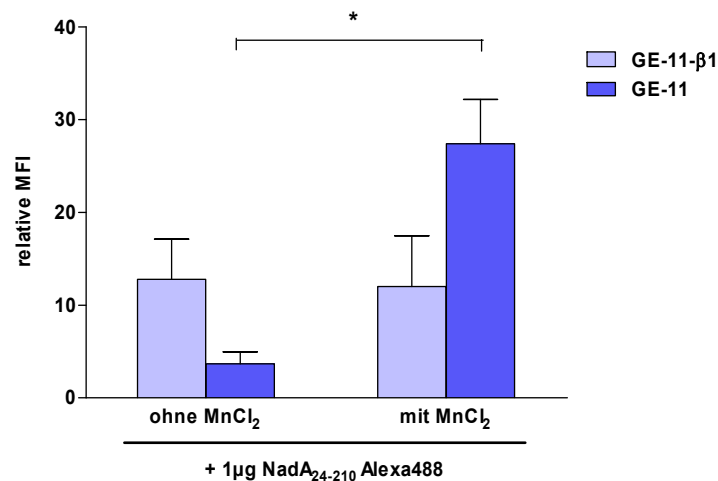


Abb. 37 Einfluss von $MnCl_2$ auf die Bindung von $NadA_{24-210}$ an $\beta 1$ Integrin-exprimierende Zellen. 3×10^5 GE-11 (human $\beta 1$ Integrin-negativ) und GE-11- $\beta 1$ (human $\beta 1$ Integrin-positiv) wurden mit Alexa488-markiertem $NadA_{24-210}$ Protein ($1 \mu g / 3 \times 10^5$ Zellen) ($5 \mu g / ml$) in An- und Abwesenheit von 2 mM $MnCl_2$ für 1 h bei $4^\circ C$ inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die gemittelte Fluoreszenzintensität (MFI) wurde in Bezug zu unbehandelten Zellen gesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert drei unabhängiger Experimente dargestellt. * $p < 0,0001$.

Die Aktivierung der Integrine durch 2 mM $MnCl_2$ hatte einen deutlichen Einfluss auf die Bindung von $NadA_{24-210}$ an GE-11 Zellen (Abb. 37). Die Bindung von $NadA_{24-210}$ an GE-11 Zellen erhöhte sich durch Zugabe von 2 mM $MnCl_2$ um das 7,4 fache im Vergleich zu

unbehandelten GE-11 Zellen. Im Gegensatz dazu hatte die Zugabe von 2 mM MnCl_2 zu GE-11- $\beta 1$ Zellen keinen Einfluss auf die Bindung von NadA_{24-210} (Abb. 37).

Um Aussagen über den Aktivierungszustand der $\beta 1$ Integrine auf den GE-11- $\beta 1$ Zellen treffen zu können, wurde die Zellen mit dem $\beta 1$ Integrin-spezifischen Antikörper 9EG7 inkubiert, der den Nachweis der Liganden-gebundene Form von $\beta 1$ Integrinen ermöglicht (Lenter *et al.*, 1993). Die Bindung von 9EG7 an die $\beta 1$ Integrine der GE-11- $\beta 1$ Zellen erfolgte ohne und mit Zugabe von 2 mM MnCl_2 und wurde durchflusszytometrisch bestimmt (2.18.1). Dabei zeigten sowohl ungefärbte, als auch MnCl_2 -behandelte GE-11- $\beta 1$ Zellen, vergleichbare Fluoreszenzintensitäten (Abb. 38). Würden die $\beta 1$ Integrine erst durch MnCl_2 aktiviert, müsste die Fluoreszenzintensität in Anwesenheit von MnCl_2 erhöht sein. Somit ist anzunehmen, dass die $\beta 1$ Integrine auf GE-11- $\beta 1$ Zellen bereits in aktiviertem Zustand vorliegen.

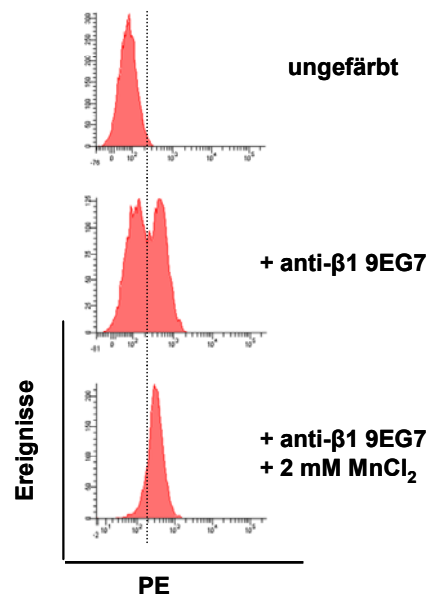


Abb. 38 Aktivierungszustand der $\beta 1$ Integrine auf GE-11- $\beta 1$ Zellen. 3×10^5 GE-11- $\beta 1$ Zellen (human $\beta 1$ Integrin-positiv) wurden mit Ratte anti-Maus CD29 (9EG7) ($4 \mu\text{l}/10^6$ Zellen) und Ziege anti-Ratte IgG PE Konjugat (1:200) in An- und Abwesenheit von 2 mM MnCl_2 für je 1 h bei 4°C inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3.10.2.4 Bindungsspezifität von NadA_{24-210} an $\beta 1$ Integrin-exprimierende Zellen

Um die Spezifität der Interaktion von NadA_{24-210} und GE-11- $\beta 1$ Zellen zu untersuchen wurden Blockierungsexperimente mit $\beta 1$ Integrin-spezifischen Antikörpern durchgeführt, und unmarkiertes NadA_{24-210} in Konkurrenz mit Alexa488-markiertem NadA_{24-210} verwendet (2.18.5.2).

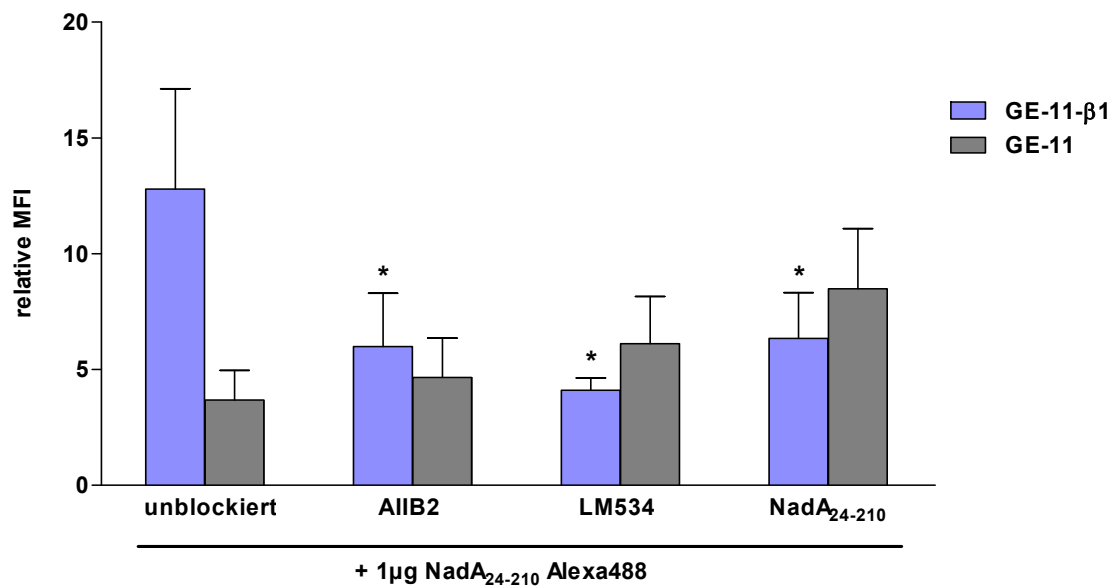


Abb. 39 Blockierung der Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀ an β1 Integrin-exprimierende Zellen. 3×10^5 GE-11 (human β1 Integrin-negativ) und GE-11-β1 (human β1 Integrin-positiv) wurden mit den β1 blockierenden Antikörpern AIIB2 (1:40) oder LM534 (1:200) und unmarkiertem NadA₂₄₋₂₁₀ ($5 \mu\text{g}/3 \times 10^5$ Zellen) vorbehandelt. Nach Inkubation mit Alexa488-markiertem NadA₂₄₋₂₁₀ Protein ($1 \mu\text{g}/3 \times 10^5$ Zellen) für 1 h bei 4 °C erfolgte die durchflusszytometrische Auswertung. Die gemittelte Fluoreszenzintensität (MFI) wurde in Bezug zu unbehandelten Zellen gesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert drei unabhängiger Experimente dargestellt. * $p < 0,0462$ versus GE-11-β1 unblockiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung von GE-11-β1 Zellen mit den β1 Integrin blockierenden Antikörpern AIIB2 und LM534 die Bindung von Alexa488-markiertem NadA₂₄₋₂₁₀ signifikant um ca. 50 % reduziert (Abb. 39). Um auszuschließen, dass die Antikörper AIIB2 und LM534 mit NadA₂₄₋₂₁₀ interagieren und so zur reduzierten Bindung von NadA an die GE-11-β1 Zellen führen, wurden auch die GE-11 Zellen mit AIIB2 und LM534 vorbehandelt. Die Behandlung der GE-11 Zellen zeigte jedoch keinen Effekt für die NadA-Bindung (Abb. 39), wodurch eine Interaktion von NadA₂₄₋₂₁₀ mit den Antikörpern AIIB2 und LM534 ausgeschlossen werden kann. Die Spezifität der NadA₂₄₋₂₁₀–GE-11-β1 Interaktion wurde zusätzlich durch Konkurrenzexperimente mit unmarkiertem NadA₂₄₋₂₁₀ analysiert. Die Bindung von Alexa488-markiertem NadA₂₄₋₂₁₀ an die mit unmarkiertem NadA₂₄₋₂₁₀ vorbehandelten GE-11-β1 Zellen war signifikant reduziert (Abb. 39). Diese Ergebnisse zeigen, dass NadA spezifisch an β1 Integrin-exprimierende Zellen bindet.

3.10.2.5 Nachweis der direkten Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀ an die β 1 und β 3 Integrin-Untereinheit

Für den direkten Bindungsnachweis von rekombinantem NadA₂₄₋₂₁₀ Protein an humane β 1 und β 3 Integrine wurden Far Westernblotanalysen durchgeführt (2.14.9). Hierfür wurde humanes α 5 β 1 und α v β 3 mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen übertragen, und mit NadA₂₄₋₂₁₀ inkubiert. Der Nachweis der Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀ an α 5 β 1 und α v β 3 erfolgte mit anti-NadA Serum im Immunoblot und zeigte eine Bande bei ca. 120 kDa für α 5 β 1 und bei ca. 90 kDa für α v β 3 Integrin (Abb. 40.C). Der Vergleich mit einem Far Westernblot ohne Zugabe von NadA₂₄₋₂₁₀, welcher mit dem anti- β 1 Integrin spezifischen Antikörper MAB1981 detektiert wurde, zeigte eine einzelne Bande bei ca. 120 kDa (Abb. 40.A). Diese stellt die β 1 Integrin Untereinheit des α 5 β 1 Heterodimers dar. Ein Nachweis der β 3 Integrin Untereinheit war nicht möglich, da zu diesem Zeitpunkt kein anti- β 3 Integrin Antikörper zur Verfügung stand. Zusätzlich wurden ein Far Westernblot ohne Zugabe von NadA₂₄₋₂₁₀ mit anti-NadA Serum inkubiert um eine unspezifische Reaktion des Serums mit Integrinen ausschließen zu können (Abb. 40.B). Dabei konnte keine Reaktivität des NadA Serum mit Integrinen nachgewiesen werden.

Die nach Inkubation von aufgetrennten α 5 β 1 Integrinen mit NadA₂₄₋₂₁₀ detektierte Bande bei 120 kDa entspricht somit der Größe der β 1 Integrin Untereinheit des α 5 β 1 Heterodimers. Dies zeigte, dass NadA₂₄₋₂₁₀ direkt mit der β 1 Untereinheit von humanem α 5 β 1 interagiert. Auch der Far Westernblot mit α v β 3 und NadA₂₄₋₂₁₀ zeigte eine Bande bei 90 kDa, die der β 3 Integrin-Untereinheit entspricht. Somit interagiert NadA₂₄₋₂₁₀ nicht nur direkt mit der β 1 Integrin-Untereinheit, sondern auch mit der β 3 Integrin-Untereinheit.

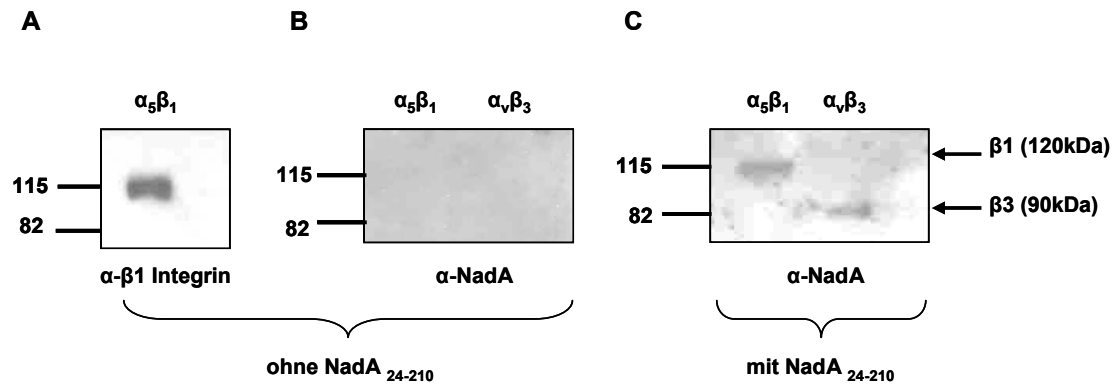


Abb. 40 Far Westernblot zum Nachweis der direkten Interaktion von NadA₂₄₋₂₁₀ mit β_1/β_3 Integrinen. Humanes $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_V\beta_3$ wurde mittels SDS-PAGE (11 %) aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Die übertragenen Proteine wurden renaturiert bevor sie mit NadA₂₄₋₂₁₀ inkubiert wurden, oder direkt detektiert wurden. A: Immunoblot ohne NadA₂₄₋₂₁₀ und anti- β_1 Integrin Antikörper MAB1981 (1:1000) und Ziege anti-Maus IgG Peroxidase Konjugat (1:2000). B: Immunoblot ohne NadA₂₄₋₂₁₀ und anti-NadA Serum (1:500) und Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase (1:2000). C: Immunoblot mit NadA₂₄₋₂₁₀ (5 μ g) und anti-NadA Serum (1:500) und Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase (1:2000). Die Pfeile geben die Größe der β_1 und β_3 Untereinheit an.

3.10.2.6 Die Rolle von β_1 Integrinen in der Interaktion von NadA₂₄₋₂₁₀ mit Chang Zellen

3.10.2.6.1 Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀ an Chang Zellen

Frühere Studien konnten zeigen, das rekombinantes NadA _{Δ 351-405} Protein über einen bisher unbekanntem Proteinrezeptor spezifisch an Chang Zellen bindet (Capecchi *et al.*, 2005). Basierend auf der Tatsache, dass NadA₂₄₋₂₁₀ mit humanen $\alpha\beta_1$ Integrinen interagiert, wurde die Bedeutung von β_1 Integrinen in der Interaktion von NadA mit Chang Zellen untersucht. Hierfür wurde zunächst die Bindung von Alexa488-markiertem NadA₂₄₋₂₁₀ Protein an Chang Zellen in An- und Abwesenheit von 2 mM MnCl₂ untersucht (2.18.5.1). Die durchflusszytometrische Auswertung zeigte, dass NadA₂₄₋₂₁₀ ohne Zugabe von MnCl₂ mit ~ 8,7-fach höherer Effizienz mit Chang Zellen interagiert, im Vergleich zu Zellen ohne Zugabe von NadA₂₄₋₂₁₀ (unbehandelt) (Abb. 41). Durch Zugabe von 2 mM MnCl₂ stieg die Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀ auf das ~ 71,0-fache im Vergleich zu Zellen ohne NadA₂₄₋₂₁₀ (Abb. 41). Somit führte die Zugabe von 2 mM MnCl₂ zu einer Erhöhung der Interaktion (~ 8,0-fach) von NadA₂₄₋₂₁₀ mit Chang Zellen.

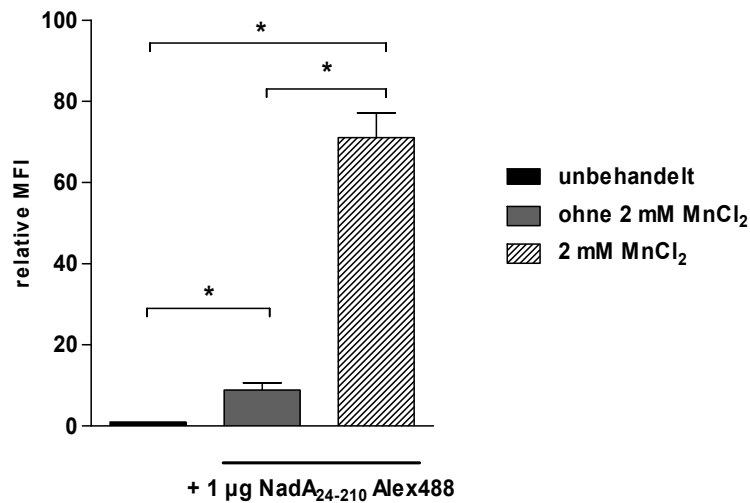


Abb. 41 Einfluss von MnCl₂ auf die Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀ an Chang Zellen. 3×10^5 Chang Zellen wurden mit Alexa488-markiertem NadA₂₄₋₂₁₀ Protein ($1 \mu\text{g}/3 \times 10^5$ Zellen) in An- und Abwesenheit von 2mM MnCl₂ für 1 h bei 4 °C inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die gemittelte Fluoreszenzintensität (MFI) wurde in Bezug zu unbehandelten Zellen gesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert fünf unabhängiger Experimente dargestellt. * $p < 0,0069$.

3.10.2.6.2 Nachweis von β Integrinen auf Chang Zellen

Um den möglichen Einfluss von β Integrinen an der Interaktion von NadA₂₄₋₂₁₀ mit Chang Zellen zu untersuchen wurde die Expression von β Integrinen auf der Zelloberfläche von Chang Zellen in Abhängigkeit von MnCl₂ analysiert (2.18.1). Der Nachweis von Integrinen erfolgte mit anti- β 1, β 2, β 3, β 4 und β 5 Integrin-spezifischen Antikörpern und FITC-konjugierten Sekundärantikörpern (Tab. 7). Chang Zellen zeigten ohne Zugabe von MnCl₂ eine schwache Expression von β 1, β 3 und β 4 Integrinen, während eine starke Expression von β 2 und β 5 Integrine nachgewiesen werden konnte (Abb. 42). Die Zugabe von 2 mM MnCl₂ führte zu einer deutlichen Aktivierung aller β Integrine auf den Chang Zellen, so dass eine erhöhte Oberflächendichte bzw. Antikörperreaktivität von β 1, β 2, β 3, β 4 und β 5 Integrinen nachgewiesen werden konnte (Abb. 42). Diese Ergebnisse zeigen, dass Chang Zellen β 1, β 2, β 3, β 4 und β 5 Integrin-positiv sind. Zusätzlich kann angenommen werden, dass die β Integrine auf den Chang Zellen in einem Zustand geringer Bindeaffinität („bent conformation“) vorliegen.

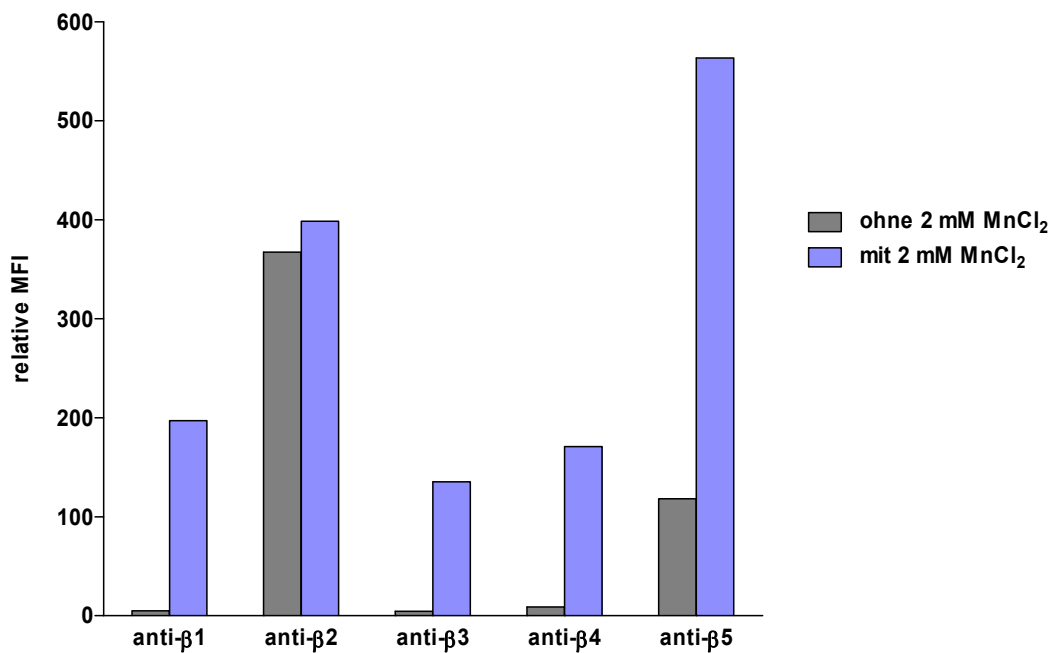


Abb. 42 Nachweis der Synthese von β Integrinen auf Chang Zellen. 3×10^5 Chang Zellen wurden mit den Antikörpern P4G11 (anti- β 1), P4H9 (anti- β 2), 25E11 (anti- β 3), ASC-9 (anti- β 4), AB1926 (anti- β 5) (je $1 \mu/10^6$ Zellen) und anti-Kaninchen oder anti-Maus FITC Konjugat (1:1000) für 1 h bei 4°C inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) wurde in Bezug zu unbehandelten Zellen gesetzt.

3.10.2.6.3 Aktivierungszustand von β 1 Integrinen auf Chang Zellen

Um Aussagen über den Aktivierungszustand von β 1 Integrinen auf der Zelloberfläche von Chang Zellen treffen zu können, wurde die Bindung des anti- β 1 Integrin Antikörpers 9EG7 an Chang Zellen unter Einfluss von 2 mM MnCl₂ durchflusszytometrisch analysiert (2.18.1). Dabei konnte eine deutliche Fluoreszenzverschiebung in Gegenwart von 2 mM MnCl₂ im Vergleich zur Bindung von 9EG7 ohne MnCl₂ nachgewiesen werden (Abb. 43). Basierend auf der Tatsache, dass der Antikörper 9EG7 mit höherer Affinität an aktivierte β 1 Integrine bindet, und die Bindung von 9EG7 durch 2 mM MnCl₂ deutlich erhöht wurde, erfolgte eine Aktivierung der β 1 Integrine von der inaktiven in die aktive Form.

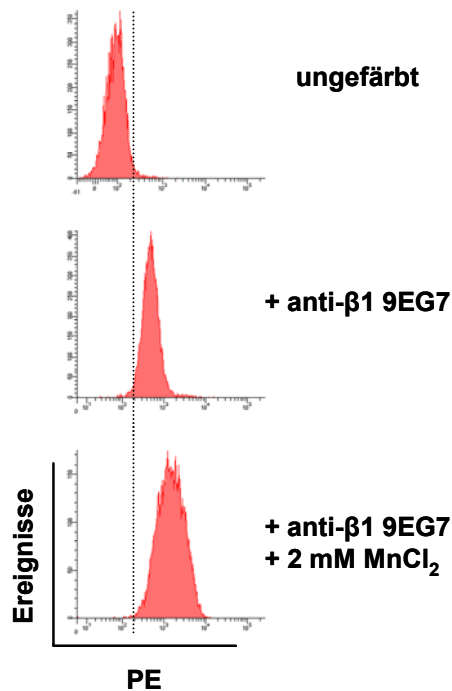


Abb. 43 Aktivierungszustand der $\beta 1$ Integrine auf Chang Zellen. 3×10^5 Chang Zellen wurden mit Ratte anti-Maus CD29 (9EG7) ($4 \mu\text{l}/10^6$ Zellen) und Ziege anti-Ratte IgG PE Konjugat (1:200) in An- und Abwesenheit von 2 mM MnCl_2 für je 1h bei 4 °C inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3.10.2.6.4 Blockierung der Interaktion von NadA_{24-210} mit Chang Zellen

Um eine Beteiligung von β Integrinen in der Interaktion von NadA_{24-210} mit Chang Zellen untersuchen zu können, wurden die Chang Zellen vor der Inkubation mit Alexa488-markiertem NadA_{24-210} Protein mit β Integrin-blockierenden Antikörpern in An- und Abwesenheit von 2 mM MnCl_2 vorbehandelt. Die Vorbehandlung der Chang Zellen mit den anti- $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ und $\beta 5$ Antikörpern führte zu keiner Reduktion der Bindung von NadA_{24-210} im Vergleich zu unbehandelten Zellen, sondern erhöht sogar die NadA_{24-210} Bindung (Abb. 44). Auch die Vorbehandlung der Zellen mit einer Kombination aller β Integrin blockierenden Antikörpern und der Kombination aus anti- $\beta 1$ und anti- $\beta 3$ Antikörpern hatte keinen Einfluss auf die Bindung von NadA_{24-210} . Die Blockierung der β Integrine in Gegenwart von 2 mM MnCl_2 hatte hingegen einen Einfluss auf die Bindung von NadA_{24-210} . Die Blockierung mit anti- $\beta 1$, anti- $\beta 3$, anti- $\beta 4$ und anti- $\beta 5$ Antikörpern führte zu keiner signifikanten Reduktion in der Bindung von NadA_{24-210} (Abb. 44). Im Gegensatz dazu führte die Vorbehandlung der Chang Zellen mit dem $\beta 2$ Integrin-blockierenden Antikörper und einer Kombination aus anti- $\beta 1$ und anti- $\beta 3$, sowie einer Kombination anti- $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ und $\beta 5$ zur signifikanten Reduktion der NadA Interaktion in Gegenwart von MnCl_2 (Abb. 44).

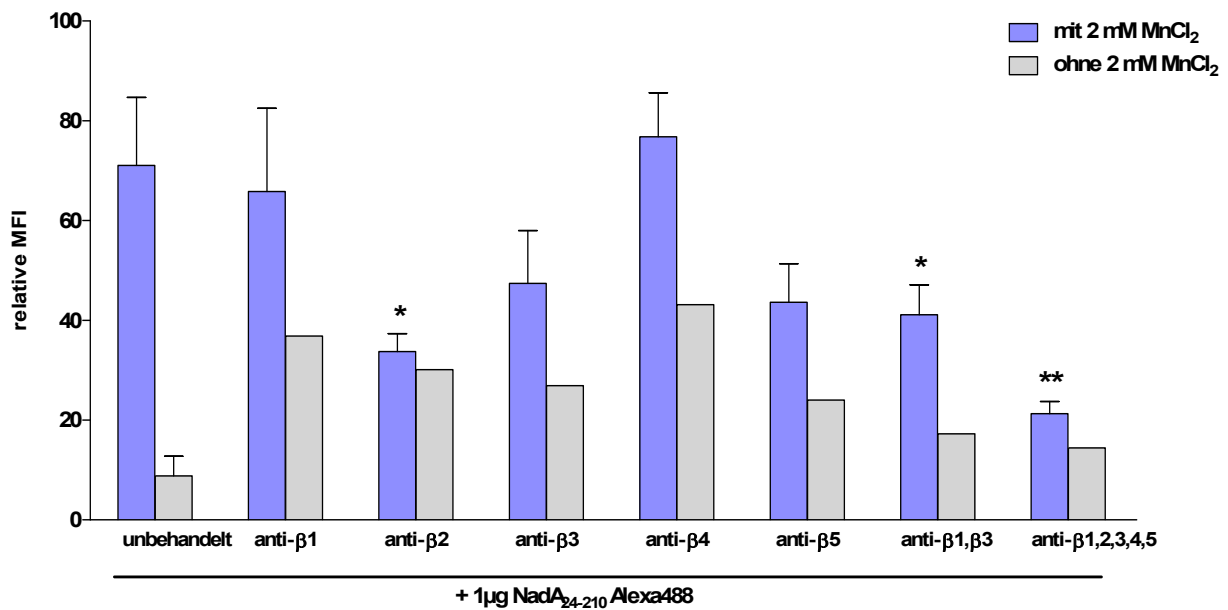


Abb. 44 Blockierung der Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀ an Chang Zellen. 3×10^5 Chang Zellen wurden mit den β -blockierenden Antikörpern AIIB2 (1:40), P4H9 (anti- β 2), 25E11 (anti- β 3), ASC-9 (anti- β 4), AB1926 (anti- β 5), AIIB2 und 25E11, oder einer Mischung aller Antikörper (je $1 \mu/10^6$ Zellen) mit und ohne 2 mM MnCl₂ vorbehandelt. Nach Inkubation mit Alexa488-markiertem NadA₂₄₋₂₁₀ Protein ($1 \mu\text{g}/3 \times 10^5$ Zellen) für 1 h bei 4 °C erfolgte die durchflusszytometrische Auswertung. Die gemittelte Fluoreszenzintensität (MFI) wurde in Bezug zu unbehandelten Zellen gesetzt. Die Ergebnisse der Bindung unter Zugabe von 2 mM MnCl₂ sind als Mittelwert zwei unabhängiger Experimente dargestellt. * $p < 0,0429$; ** $p < 0,0045$.

3.10.2.7 Die Rolle *nadA*-exprimierender Yersinien in Interaktion mit β 1 Integrin-exprimierenden Zellen

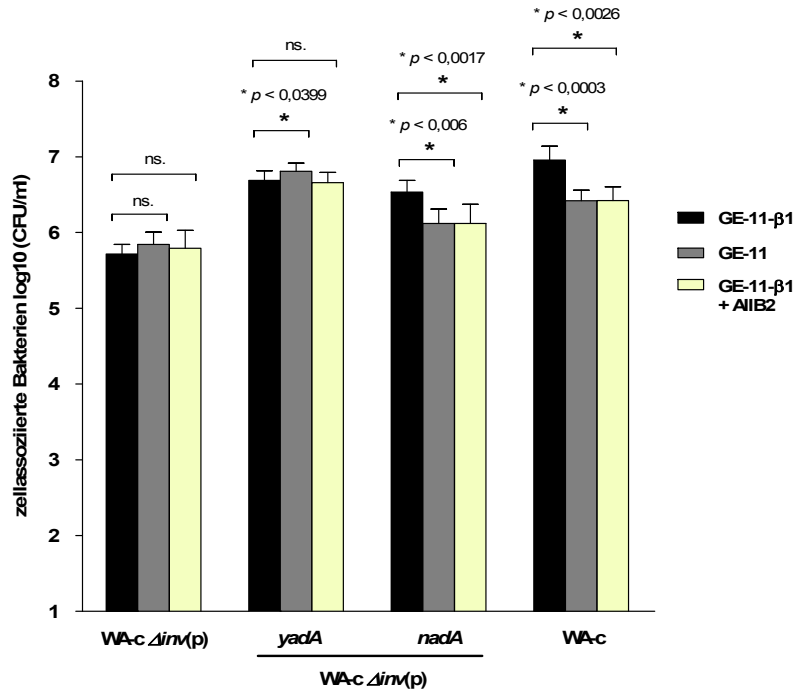
3.10.2.7.1 Adhärenz und Internalisierung in Abhängigkeit von β 1 Integrinen

Um eine Beteiligung von β 1 Integrinen an der Bindung und Aufnahme *nadA*- und *yadA*-exprimierender Yersinien durch GE-11 und GE-11- β 1 Zellen zu untersuchen, wurde die Anzahl der zellassoziierten und intrazellulären Bakterien nach Infektion un behandelter GE-11 und GE-11- β 1 und mit AIIB2-vorbehandelter GE-11- β 1 Zellen quantifiziert (2.16.3). Die Quantifizierung der zellassoziierten Bakterien (Abb. 45.A) zeigte für den NadA-positiven Stamm WA-c $\Delta inv(pnadA)$ eine signifikant höhere Anzahl ($\sim 2,6$ -fach) an zellassoziierten Bakterien in Gegenwart von β 1 Integrinen (GE-11- β 1 Zellen) im Vergleich zu β 1 Integrin-negativen GE-11 Zellen. Auch die Inaktivierung der β 1 Integrine der GE-11- β 1 Zellen durch die Behandlung mit dem blockierenden Antikörper AIIB2 führte zu einer signifikanten Reduktion ($\sim 2,6$ -fach) zellassoziiierter NadA-positiver Yersinien im Vergleich zu un behandelten GE-11- β 1 Zellen (Abb. 45.A). Der als Positivkontrolle verwendete Invasin-

positive Stamm WA-c zeigte eine vergleichbare Anzahl zellassoziierter Bakterien in Anwesenheit von $\beta 1$ Integrinen (GE-11- $\beta 1$ Zellen), die bei GE-11 Zellen und mit AIIB2-behandelten GE-11- $\beta 1$ Zellen jeweils um das 3,4-fache reduziert war (Abb. 45.A). Der YadA-positive Stamm WA-c $\Delta inv:(pyadA)$ zeigte hingegen keine Reduktion der Adhärenz in Abhängigkeit von $\beta 1$ Integrinen, da die Anzahl der zellassozierten Bakterien bei GE-11- $\beta 1$ und mit AIIB2-behandelten GE-11- $\beta 1$ Zellen gleich blieb, und bei GE-11 Zellen sogar schwach signifikant erhöht war. Der Kontrollstamm WA-c $\Delta inv(p)$ zeigte eine geringe Interaktion mit GE-11 und GE-11- $\beta 1$ Zellen im Vergleich zu WA-c $\Delta inv(pyadA)$, WA-c $\Delta inv(pnadA)$ und WA-c (Abb. 45.A). Dabei ist allerdings auffallend, dass der Stamm WA-c mit GE-11 Zellen eine 5,3-fach höhere Anzahl zellassoziierter Bakterien im Vergleich zu dem Kontrollstamm WA-c $\Delta inv(p)$ aufweist.

Die Quantifizierung der intrazellulären Bakterien (Abb. 45.B) zeigte für WA-c $\Delta inv(pnadA)$ eine signifikant höhere Anzahl (17,7-fach zu GE-11 und 6,8-fach zu GE-11- $\beta 1$ + AIIB2) intrazellulär lokalisierter Bakterien in Gegenwart von $\beta 1$ Integrinen, im Vergleich zu $\beta 1$ Integrin-negativen, und mit AIIB-blockierten GE-11- $\beta 1$ Zellen. Auch der Invasin-positive Stamm WA-c zeigt eine signifikant höhere Anzahl internalisierter Bakterien in Anwesenheit von $\beta 1$ Integrinen im Vergleich zu GE-11 Zellen (28,3-fach), allerdings führte die Blockierung der $\beta 1$ Integrine durch AIIB2 zu keiner Reduktion der Internalisierung, sondern zu einer schwach signifikanten Erhöhung der Anzahl intrazellulärer Bakterien (Abb. 45.B). Die Anzahl der internalisierten YadA-positiven Yersinien war in Anwesenheit von $\beta 1$ Integrinen im Vergleich zu GE-11 Zellen um das 5,9-fache, und im Vergleich zu mit AIIB2-vorbehandelten GE-11- $\beta 1$ Zellen um das 21,9-fache erhöht. Die Internalisierung des Kontrollstamms WA-c $\Delta inv(p)$ zeigte keine signifikanten Unterschiede für GE-11- $\beta 1$ und GE-11 Zellen, während die Behandlung der GE-11- $\beta 1$ Zellen mit AIIB2 zu einer schwach signifikanten Reduktion der Anzahl internalisierter Bakterien führt. Diese Ergebnisse zeigen, dass $\beta 1$ Integrine als Rezeptoren für NadA fungieren und eine $\beta 1$ Integrin-abhängige Aufnahme und Zellassoziation *nadA*-exprimierender Yersinien durch GE-11- $\beta 1$ Zellen vermitteln.

A



B

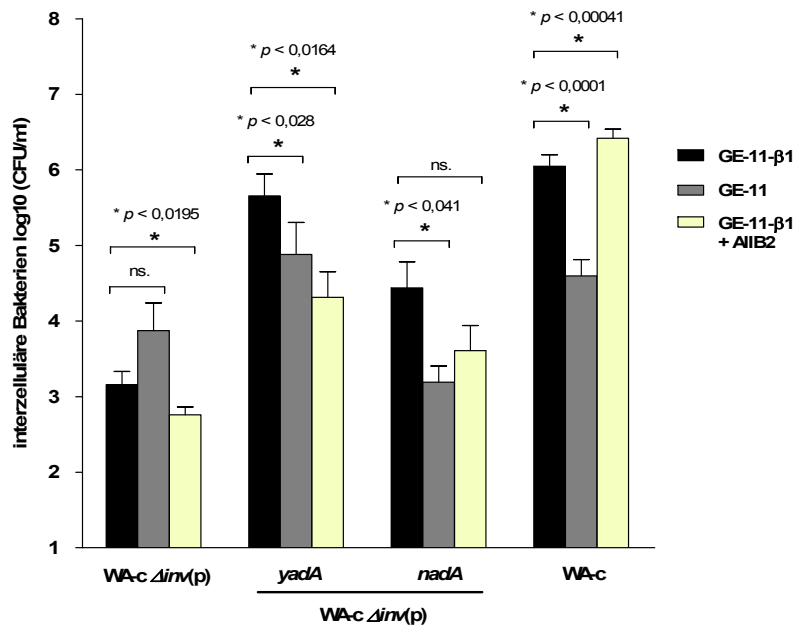


Abb. 45 Adhärenz und Invasion *nadA*-, *yadA*- und *inv*-exprimierender *Y. enterocolitica* und GE-11 und GE-11-β1 Zellen. 2×10^5 unbehandelte GE-11 und GE-11-β1, sowie mit AIIB vorbehandelte GE-11-β1 Zellen wurden mit WA-c $\Delta inv(p)$ (Negativkontrolle), WA-c $\Delta inv(pyadA)$ (YadA-positiv), WA-c $\Delta inv(pnadA)$ (NadA-positiv), und WA-c (Inv-positiv) mit einer MOI 50 für 1 h bei 37 °C inkubiert. **A:** zellassozierte Bakterien (intra- und extrazelluläre). **B:** intrazelluläre Bakterien nach zusätzlicher Gentamicinbehandlung (50 µg/ml) für 90 min. Die Zahl der zellassozierten und intrazellulären Bakterien ist als log₁₀ „colony forming units“ pro ml (CFU/ml) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwert drei unabhängiger Experimente, welche in dreifacher Ausführung durchgeführt wurden, dargestellt.

3.10.2.7.2 Kolokalisierung *nadA*-exprimierender Yersinien mit $\beta 1$ Integrinen

Die Lokalisierung *nadA*-, *yadA*- und *inv*-positiver Yersinien mit $\beta 1$ Integrinen auf GE-11- $\beta 1$ Zellen wurde mittels Immunofluoreszenzfärbung untersucht. Hierfür wurden GE-11 und GE-11- $\beta 1$ Zellen mit den Konstrukten WA-c $\Delta inv(pnadA)$, WA-c $\Delta inv(pyadA)$, WA-c $\Delta inv(p)$, und WA-c infiziert. Der Nachweis von $\beta 1$ Integrinen erfolgte mit dem Primärantikörper AIIB2 und anti-Ratte PE Konjugat, und die Bakterien wurden mittels DAPI-Färbung visualisiert (2.16.3.2). Die mikroskopische Auswertung der Präparate zeigte lediglich für GE-11- $\beta 1$ Zellen den Nachweis von $\beta 1$ Integrinstrukturen, während GE-11 Zellen keine $\beta 1$ Integrine aufweisen (Abb. 46.1 und 2, PE-Kanal). *YadA*- und *NadA*-positive Yersinien zeigten eine deutliche Bindung an GE-11- $\beta 1$ Zellen, und die Bakterien konnten innerhalb der $\beta 1$ Integrinstrukturen lokalisiert werden (Abb. 46.1.B und 1.C). Bei GE-11 Zellen hingegen, konnten nur wenige *YadA*- und *NadA*-positive Yersinien am Zellrand lokalisiert werden (Abb. 46.2.B und 2.C). Der Invasin-positiven Stamm WA-c zeigte nur eine geringe Anzahl adhärenter Bakterien mit den GE-11- $\beta 1$ Zellen (Abb. 46.1.D), allerdings waren diese auch innerhalb der $\beta 1$ Integrinstrukturen lokalisiert. Die Negativkontrolle WA-c $\Delta inv(p)$ zeigte sowohl mit GE-11, als auch mit GE-11- $\beta 1$ Zellen eine geringe Zelladhärenz im Vergleich zu WA-c $\Delta inv(pnadA)$, WA-c $\Delta inv(pyadA)$ und WA-c (Abb. 46.1.A und 2.A).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl *NadA*, *YadA* und Invasin produzierende *Y. enterocolitica* mit GE-11- $\beta 1$ Zellen interagieren und innerhalb der $\beta 1$ Integrinstrukturen lokalisiert werden können.

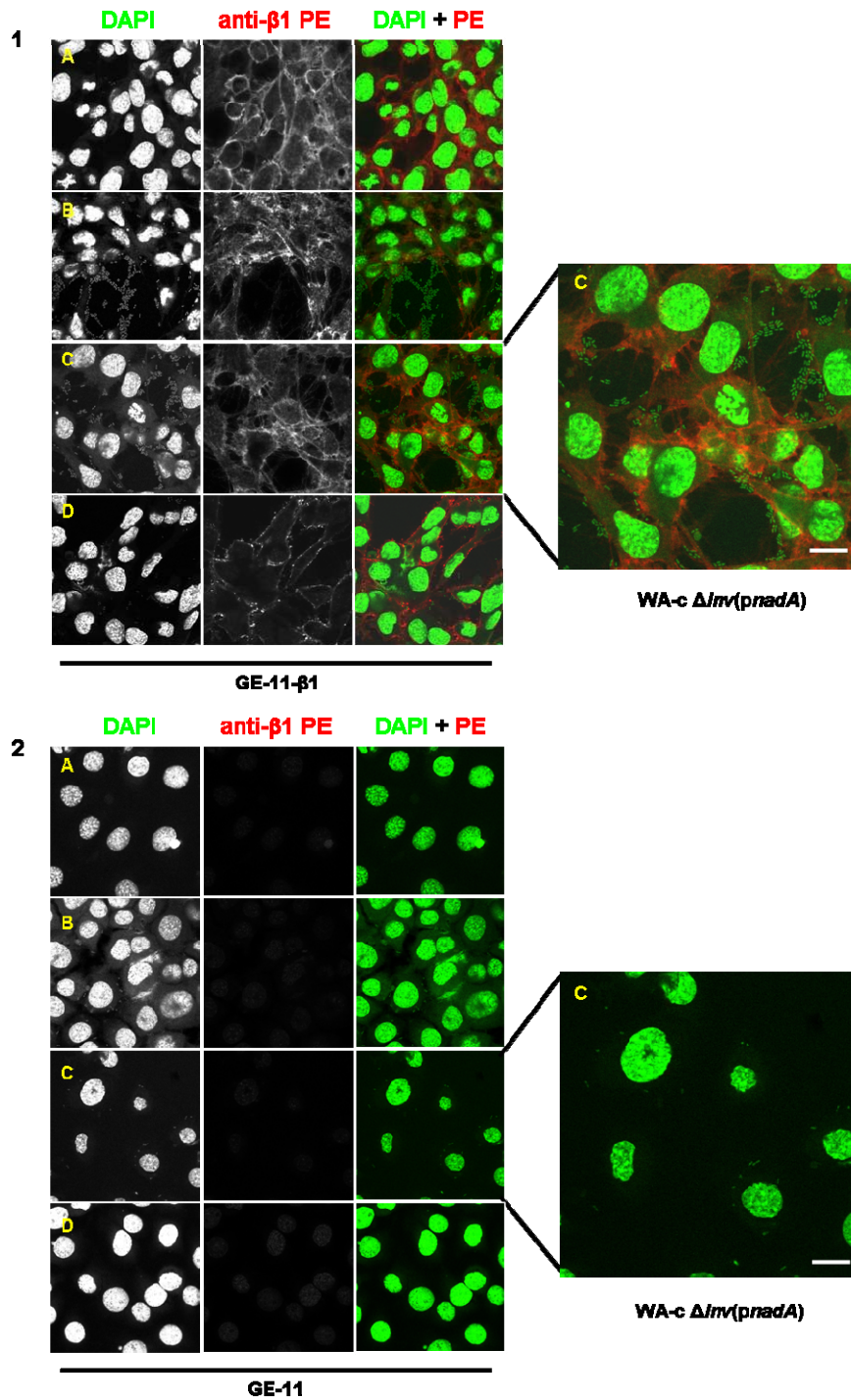


Abb. 46 Kolokalisierung *nadA*-, *yadA*- und *inv*-exprimierender *Y. enterocolitica* mit $\beta 1$ Integrinen. $2,5 \times 10^5$ GE-11- $\beta 1$ (1) und GE-11 (2) Zellen wurden mit WA-c $\Delta inv(p)$ (Negativkontrolle) (A), WA-c $\Delta inv(pyadA)$ (YadA-positiv) (B), WA-c $\Delta inv(pnadA)$ (NadA-positiv) (C), und WA-c (Inv-positiv) (D) infiziert und fixiert. Die Präparate wurden mit Ratte anti- $\beta 1$ Integrin Antikörper AIB2 (1:4) und Ziege anti-Ratte IgG PE Konjugat (1:100) gefärbt. Bakterien wurden mittels DAPI-Einbettmedium visualisiert. Zur Vereinfachung wurden der DAPI- und PE-Kanal weiß dargestellt, während die Überlagerung von DAPI (grün) und PE (rot) farbig dargestellt wurde. Der Größenbalken entspricht 10 μm .

3.10.2.8 Die Rolle *nadA*-exprimierender Neisserien in Interaktion mit β 1 Integrin-exprimierenden Zellen

Um die Beteiligung von NadA und β 1 Integrinen in der Adhärenz und Invasion von *N. meningitidis* zu untersuchen, wurden der bekapselte *N. meningitidis* Wildtypstamm MC58 und die isogene NadA Mutante MC58 Δ *nadA* für Infektionsversuche mit GE-11 und GE-11- β 1 Zellen verwendet (2.17.2). Dabei konnte gezeigt werden, dass der Wildtypstamm MC58 und die isogene NadA-Mutante MC58 Δ *nadA* eine signifikant höhere Anzahl an zellassozierten Bakterien in Gegenwart von β 1 Integrin-exprimierenden GE-11- β 1 Zellen im Vergleich zu GE-11 Zellen aufwies (\sim 6,5-fach für MC58 und \sim 16,6-fach für MC58 Δ *nadA*) (Abb. 47). Auffallend war jedoch, dass sowohl der Wildtypstamm MC58 und die NadA Mutante MC58 Δ *nadA* eine vergleichbare Interaktion mit β 1 Integrin-positiven GE-11- β 1 Zellen aufwies, so dass dieser Effekt unabhängig von NadA zu sein scheint. Dies zeigt, dass beide Stämme eine höhere Bindeaffinität mit β 1 Integrin-positiven Zellen haben, und dass der NadA- β 1 Integrin Effekt wahrscheinlich durch andere Integrinbindefaktoren maskiert wird.

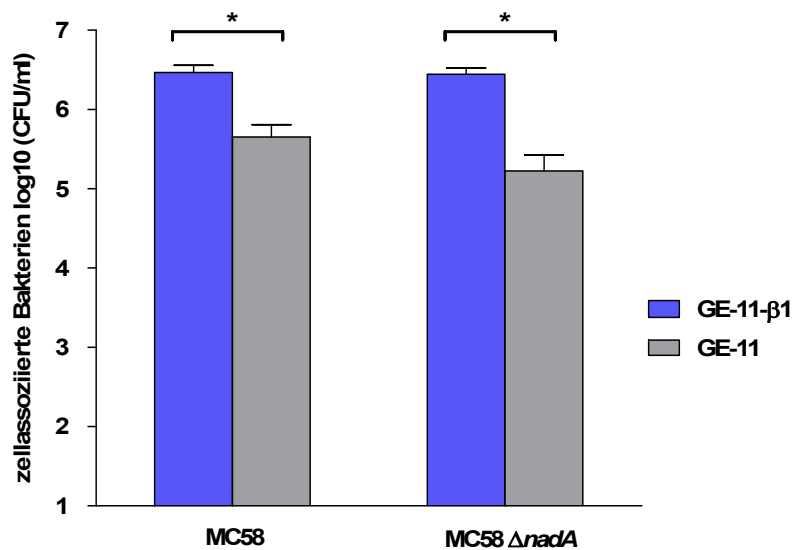
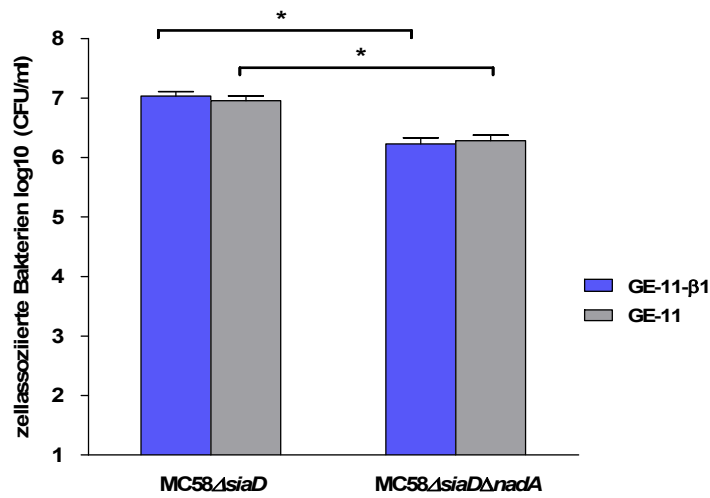


Abb. 47 Bindung bekapselter *N. meningitidis* an GE-11 und GE-11- β 1 Zellen. 2×10^5 GE-11 und GE-11- β 1 Zellen wurden mit dem bekapselten *N. meningitidis* Stamm MC58 (NadA-positiv) und MC58 Δ *nadA* (NadA-negativ) mit einer MOI 100 für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Zahl der zellassozierten Bakterien ist als log₁₀ „colony forming units“ pro ml (CFU/ml) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwert drei unabhängiger Experimente, welche in dreifacher Ausführung durchgeführt wurden, dargestellt. * $p < 0,0001$.

Es ist bekannt, dass bekapselte Neisserien im Vergleich zu unbekapselten Varianten eine geringer Invasion in eukaryotische Zellen induzieren (Unkmeir *et al.*, 2002a). Daher wurden der unbekapselte *N. meningitidis* Stamm MC58 $\Delta siaD$ und die isogene NadA Mutante MC58 $\Delta siaD \Delta nadA$ für die Infektion von GE-11 und GE-11- $\beta 1$ Zellen verwendet und die Anzahl zellassoziierter und interzellulärer Bakterien nach der Infektion bestimmt (2.17.2). Die Quantifizierung der zellassozierten Bakterien zeigte für den NadA-positiven Stamm MC58 $\Delta siaD$ eine signifikant höhere Anzahl zellassoziierter Bakterien für GE-11 (4,7-fach) und GE-11- $\beta 1$ Zellen (6,4-fach), während die Interaktion der NadA Mutante MC58 $\Delta siaD \Delta nadA$ mit beiden Zelllinien reduziert war (Abb. 48.A). Nichts desto trotz adhärierte der Stamm MC58 $\Delta siaD$ und die Mutante MC58 $\Delta siaD \Delta nadA$ jeweils mit vergleichbarer Effizienz sowohl an GE-11 als auch an GE-11- $\beta 1$ Zellen (Abb. 48.A). Diese Ergebnisse zeigen, dass NadA essentiell für die Bindung an GE-11 und GE-11- $\beta 1$ Zellen ist, allerdings konnte dabei keine Beteiligung von $\beta 1$ Integrinen nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde die Rolle von NadA in der Invasion von GE-11 und GE-11- $\beta 1$ Zellen untersucht. Die Quantifizierung der Anzahl interzellulärer Bakterien zeigte für beide Stämme MC58 $\Delta siaD$ und MC58 $\Delta siaD \Delta nadA$ eine signifikant erhöhte Anzahl intrazellulärer Bakterien für $\beta 1$ Integrin-negative GE-11 Zellen (je $\sim 7,5$ -fach) (Abb. 48.B). Dies lässt vermuten, dass nicht nur $\beta 1$ Integrine von Neisserien als Rezeptoren verwendet werden, sondern zusätzlich Rezeptoren, die in höheren Mengen auf GE-11 Zellen vorkommen. Des Weiteren konnte keine Beteiligung von NadA bei der Invasion von GE-11 und GE-11- $\beta 1$ Zellen nachgewiesen werden, da beide Stämme mit vergleichbarer Effizienz in GE-11 und GE-11- $\beta 1$ Zellen lokalisiert werden konnten (Abb. 48.B). Diese Ergebnisse zeigen, dass weder mit bekapselten Neisserien, noch mit unbekapselten Neisserien die Rolle von NadA in der $\beta 1$ Integrin-abhängigen Bindung und Internalisierung von *N. meningitidis* geklärt werden konnte.

A



B

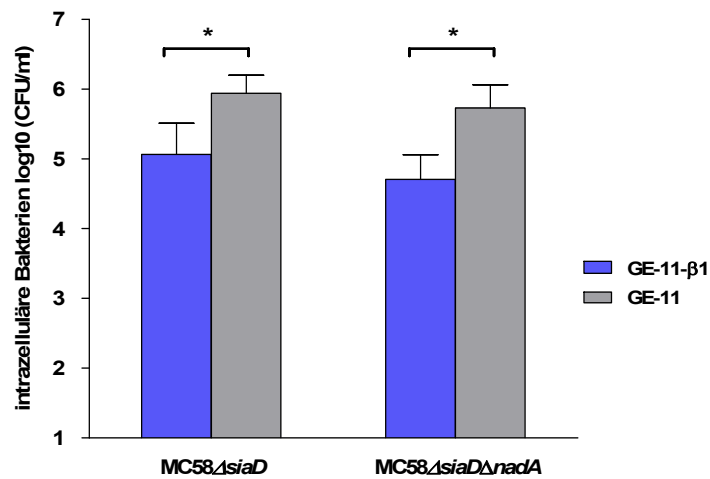


Abb. 48 Bindung und Internalisierung ungekapselter *N. meningitidis* an GE-11 und GE-11- β 1 Zellen. 2×10^5 GE-11 und GE-11- β 1 Zellen wurden mit dem ungekapselten *N. meningitidis* Stamm MC58 Δ siaD (NadA-positiv) und MC58 Δ siaD Δ nadA (NadA-negativ) mit einer MOI 100 für 3 h bei 37 °C inkubiert. **A:** zellassozierte Bakterien (intra- und extrazelluläre). **B:** intrazelluläre Bakterien nach zusätzlicher Gentamicinbehandlung (100 μ g/ml) für 90 min. Die Zahl der zellassozierten und intrazellulären Bakterien ist als log₁₀ „colony forming units“ pro ml (CFU/ml) angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwert drei unabhängiger Experimente, welche in dreifacher Ausführung durchgeführt wurden, dargestellt. * $p < 0,0001$.

4 Diskussion

N. meningitidis ist ein fakultativ humanpathogenes Bakterium, das die Schleimhäute der oberen Atemwege von 3-30 % aller Menschen asymptomatisch kolonisiert, und vor allem bei Immunsupprimierten zur Ausbildung von invasiven Meningokokkenerkrankungen führen kann, die sich in Form einer schweren Meningitis oder Sepsis äußern. Die Kolonisierung und Invasion der Schleimhäute wird dabei durch eine Vielzahl verschiedener Virulenzfaktoren, wie den Typ IV-Pili, den Nicht-Pilus-Proteinen Opa und Opc, sowie verschiedenen Autotransporterproteinen wie App, Nhh und NadA vermittelt (Virji, 2009). Die Typ IV-Pili sind für die Adhärenz bekapselter Meningokokken essentiell, während die Nicht-Pilus-Adhäsine vor allem eine Kolonisierung der Schleimhäute durch unbekapselte Meningokokken ermöglichen (de Vries *et al.*, 1996; Deghmane *et al.*, 2002; Unkmeir *et al.*, 2002a). Neben den bereits gut untersuchten Typ IV-Pili, den Opa- und Opc-Proteinen ist die Rolle des in lediglich 50 % aller Meningokokken vorkommenden *Neisseria meningitidis* Adhäsins NadA (Comanducci *et al.*, 2002; Comanducci *et al.*, 2004) bei der Pathogenese und Virulenz von Meningokokken noch weitgehend ungeklärt. Weiterhin besitzen Meningokokken eine Polysaccharidkapsel und Lipooligosaccharide, die eine Resistenz gegen die komplementvermittelte Lyse induzieren, und so ein Überleben der Bakterien in der Blutbahn und im Liquor ermöglichen (Geoffroy *et al.*, 2003; Vogel und Frosch, 1999). Die Produktion der Polysaccharidkapsel und der Adhäsine wird durch komplexe Transkriptions- und Rekombinationsereignisse reguliert (Schielke *et al.*, 2009; Swartley *et al.*, 1996; Von Loewenich *et al.*, 2001). Diese genetischen Variationsmechanismen ermöglichen eine Anpassung der Bakterien an verschiedene Umweltbedingungen, sowie die Besiedelung unterschiedlicher Nischen, erschweren jedoch auch die Untersuchung einzelner Virulenzfaktoren.

Zur Vakzinierung werden für A-, C-, Y- und W135-Meningokokken erfolgreich auf der Polysaccharidkapsel basierende Impfstoffe eingesetzt (Miller *et al.*, 2001; Trotter *et al.*, 2004). Da die Kapsel von B-Meningokokken jedoch eine ähnliche Struktur zu humanen Glykoproteinen hat, wurde für B-Meningokokken in den letzten Jahren das Prinzip der reversen Vakzinierung zur Identifizierung neuer oberflächenexponierter Antigene eingesetzt (Finne *et al.*, 1983; Magagnoli *et al.*, 2009; Rappuoli, 2000; Rappuoli und Covacci, 2003; Tettelin *et al.*, 2000). Daher ist die Identifizierung und Charakterisierung von Adhäsinen und konservierten Strukturen bei Meningokokken für die Impfstoffentwicklung von großem

Interesse. Zusätzlich ermöglicht die Charakterisierung von Adhäsinen wie dem NadA neue Erkenntnisse in die Rolle des NadA bei der Interaktion mit Wirtszellen und Blockierung der komplementvermittelten Lyse zu erhalten. Des Weiteren ist die Identifizierung von potentiellen NadA-spezifischen Wirtszellrezeptoren essentiell für das Verständnis der Rolle von NadA bei der Pathogenität und Virulenz von Meningokokken.

4.1 *Y. enterocolitica* als Modellsystem für die Synthese von NadA und NadA-YadA-Hybridproteinen

Da *N. meningitidis* eine Vielzahl verschiedener oberflächenexponierter Adhäsine und eine Polysaccharidkapsel besitzt, die Nicht-Pilus-Adhäsine maskiert, ist eine funktionelle Untersuchung des NadA Proteins im Meningokokkenmodell erschwert. *Yersinia enterocolitica* hingegen ermöglicht die Untersuchung verschiedener Virulenzaspekte wie die bakterielle Interaktion mit Wirtszellen und Virulenz im Mausmodell, da Hauptvirulenzfaktoren wie das *Yersinia* pYV-Plasmid mit den Yop-Effektoren und dem YadA, das Invasin und die „high-pathogenicity island“ (HPI), sowie deren Rolle bei der Pathogenität gut untersucht sind (Cornelis, 2006; Heesemann *et al.*, 2006). Weiterhin stellt das *Yersinia* Adhäsins YadA den Prototyp der Oca-Proteinfamilie dar, und ermöglicht einen funktionellen Vergleich mit dem NadA Protein. Daher wurde im Verlauf dieser Arbeit *Y. enterocolitica* O:8 als Modellsystem für die Untersuchung des *Neisseria meningitidis* Adhäsins NadA verwendet. Hierfür wurde das auf dem pYV-Plasmid kodierte *yadA* Gen durch das *nadA* Gen des Stamms Fam18 und MC58 zusammen mit der N-terminalen Signalsequenz von *yadA* ausgetauscht, und die Translokation von NadA auf die bakterielle Oberfläche untersucht. Die Translokation von trimeren Autotransporterproteinen durch die innere Membran erfolgt zunächst durch Interaktion mit dem Sec-Apparat. Anschließend bilden die C-terminalen Membrananker von drei Monomeren ein „ β -barrel“ in der äußeren Membran, das die Translokation der Passengedomäne ermöglicht (Cotter *et al.*, 2005). Westernblotanalysen mit Außenmembranpräparationen zeigten, dass das vollständig prozessierte NadA Protein des Stamms MC58 und Fam18 in *Y. enterocolitica* WA-314 $\Delta yadA$, sowie das NadA von MC58 in dem Invasin- und pYV-Plasmid-negativen Stamm WA-c $\Delta inv(p)$ als hochmolekulare hitzestabile Oligomere produziert werden. Bereits frühere Studien demonstrierten, dass NadA als hitzestabile Oligomere in SDS-Gelen produziert wird (Comanducci *et al.*, 2002). Die Bildung trimerer Oligomere ist eine charakteristische

Eigenschaft von Oca-Proteinen und wird durch den hochkonservierten C-terminalen Membrananker der trimeren Autotransporter vermittelt (Henderson *et al.*, 2004). Der Vergleich der Syntheseeffizienz von NadA in dem unbekapselten *N. meningitidis* Stamm MC58 *AsiaD* mit der NadA-Produktion in *Y. enterocolitica* zeigte vergleichbare Mengen an synthetisiertem NadA Protein. Daher kann angenommen werden, dass *nadA* unter der Kontrolle eines *Yersinia*-spezifischen Promotors effizient exprimiert wird, und dass die *in vivo* Expression von *nadA* für *Y. enterocolitica* nicht letal ist. Im bekapselten Stamm MC58 zeigte sich hingegen eine schwächere Synthese des Proteins. Dies weist drauf hin, dass die Polysaccharidkapsel NadA auf der Zelloberfläche teilweise maskiert, was bereits 2002 von Comanducci *et al.* beschrieben wurde (Comanducci *et al.*, 2002). Die Oberflächenlokalisierung des NadA in *Y. enterocolitica* konnte zusätzlich mittels Immunofluoreszenzfärbung unfixierter Bakterien nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass das vollständig prozessierte NadA in *Y. enterocolitica* produziert, durch die äußere Membran transloziert, und in oligomerer Form auf der bakteriellen Oberfläche von *Y. enterocolitica* exponiert sind. Dies ist bemerkenswert, da die Gattung *Neisseria* zur Familie der β -Proteobakterien gehört, während *Yersinia* zur Familie der γ -Proteobakterien gehört, und Oca-Proteine somit autonom hinsichtlich ihrer Autotransporterfunktion sind. Für das Meningokokken-Außenmembranprotein PorA wurde in einer früheren Studie gezeigt, dass es in *E. coli* unvollständig in der äußeren Membran lokalisiert ist, da der richtige Einbau von „ β -barrel“ Proteinen das Omp85 Helferprotein mit N-terminaler POTRA-Domäne zu benötigen scheint, das sein Außenmembransubstrat durch ein Spezies-spezifisches C-terminales Motiv erkennt (Clantin *et al.*, 2007; Robert *et al.*, 2006). Dennoch zeigen unsere Ergebnisse, dass die Translokation des NadA über die äußere Membran von *Y. enterocolitica* wahrscheinlich keine Spezies-spezifische C-terminale Erkennungssequenz für die Interaktion mit der POTRA-Domäne benötigt. Ähnliche Ergebnisse konnten für chimere YadA-Proteine erhalten werden, die die C-Termini der Oca-Familien Mitglieder UspA1, EibA oder Hia besaßen, und erfolgreich an die bakterielle Oberfläche von *Y. enterocolitica* transloziert wurden (Ackermann *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse verstärken die Annahme, dass die C-terminale Spezifität für die Translokation von Oca-Proteinen nicht notwendig ist, oder aber dass der korrekte Einbau von Oca-Proteinen in der äußeren Membran auch ohne Omp85 möglich ist. Die Aminosäuresequenz des NadA Proteins zeigt eine hohe Sequenzhomologie zum *Yersinia* Adhäsın YadA, das eine trimere Struktur aus einer N-terminalen Kopfdomäne, einer

Stieldomäne aus „coiled-coils“ und einem C-terminalen Membrananker besteht, der für die Translokation der Kopf/Halsdomäne und Trimerisierung des Adhäsins verantwortlich ist (Hoiczkyk *et al.*, 2000; Koretke *et al.*, 2006; Nummelin *et al.*, 2004). Basierend auf Aminosäuresequenzvergleichen wurde NadA in die Familie der Oca-Proteine eingeordnet, in der YadA das am besten untersuchte Mitglied darstellt (Hoiczkyk *et al.*, 2000). Im Verlauf dieser Arbeit wurde untersucht, ob der YadA-Stiel- und Membrananker als Translokator für den Transport der NadA-Kopfdomäne auf die bakterielle Membran verwendet werden kann, und somit eine Präsentation funktioneller Oca-Protein epitope auf der Zelloberfläche ermöglicht. Hierfür wurden verschiedene NadA-YadA-Hybride hergestellt, die den C-terminalen YadA-Membrananker und die YadA-Stieldomäne, oder zusätzlich noch die YadA-Halsdomäne besaßen, da frühere Studien zeigten, dass die YadA-Halsdomäne für die Kollagenbindung der YadA-Kopfdomäne essentiell ist, und somit die Funktionalität der Kopfdomäne gewährleistet (Roggenkamp *et al.*, 2003). Westernblotanalysen von Außenmembranpräparation der NadA-YadA-Hybride zeigten, dass die NadA-YadA-Hybride in dem *Yersinia*-Stamm WA-314 Δ yadA als hitzestabile Oligomere synthetisiert wurden. Die Behandlung der Außenmembranproteine bei 37 °C zeigte die NadA-YadA-Hybride in ihrer oligomeren Form. Die Inkubation bei 100 °C führte zu einer Dissoziation der Oligomere in ihre monomere Form, während die Behandlung mit Harnstoff nur noch zu Monomeren der Hybridproteine führte. Die Syntheseeffizienz aller NadA-YadA-Hybride war dabei vergleichbar mit der Synthese des Wildtyp YadA. Daher kann ein Einfluss der YadA-Halsdomäne und der potentiellen NadA-Halsdomäne auf die korrekte Präsentation der NadA-Kopfdomäne ausgeschlossen werden. Des Weiteren zeigten die YadA-NadA-Hybride eine vergleichbare Hitzestabilität zu YadA. Auch die Translokation der NadA-YadA-Hybride auf die Zelloberfläche des Invasin- und pYV-Plasmid-negativen Stamms WA-c Δ inv(p) konnte erfolgreich nachgewiesen werden. Die Syntheseeffizienz der Hybride in WA-c Δ inv(p) schien im Vergleich zum pYV-Plasmid-positiven Stamm WA-314 Δ yadA jedoch leicht reduziert zu sein. Da die NadA-YadA-Hybride in dem Stamm WA-c Δ inv(p) nur unter Kontrolle des Transkriptionsaktivators VirF stehen, während bei den Hybriden im Stamm WA-314 Δ yadA noch das vollständige pYV-Plasmid vorhanden ist, kann angenommen werden, dass nicht VirF alleine, sondern auch andere plasmidkodierte Faktoren an der Regulation der yadA-Expression und somit auch an der nadA-yadA-Expression beteiligt sind. Die Oberflächenlokalisierung der Hybride in den Stamm WA-c Δ inv(p) wurde zusätzlich mittels

Immunofluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass alle NadA-YadA-Hybride sowohl in WA-314 Δ yadA als auch in WA-c Δ inv(p) als hitzestabile Oligomere synthetisiert, durch die Membran transloziert, und auf der Zelloberfläche von *Y. enterocolitica* präsentiert wurden. Somit ließ sich das *Yersinia* Adhäsins YadA als Translokator für die NadA-Kopfdomäne verwenden, was eine funktionelle Untersuchung YadA-homologer Oca-Proteine ermöglichte.

4.2 Funktionelle Charakterisierung des NadA

Das *Yersinia* Adhäsins YadA ist ein multifunktionales Protein, dessen Funktionen durch verschiedene Bereiche des Proteins vermittelt werden. Typische YadA-vermittelte Funktionen sind die bakterielle Autoaggregation, Bindung an extrazelluläre Matrix (EZM)-Proteine, die Inhibition der komplementvermittelten Lyse und die Vermittlung von Zelladhärenz an verschiedene Zelltypen (Biedzka-Sarek *et al.*, 2005; Biedzka-Sarek *et al.*, 2008; Bukholm *et al.*, 1990; Roggenkamp *et al.*, 1995; Roggenkamp *et al.*, 2003; Skurnik *et al.*, 1984). Für das *Neisseria meningitidis* Adhäsins NadA konnten bisher gezeigt werden, dass es eine Bindung an eine begrenzte Zahl verschiedener Zelltypen wie Chang, Hep-2 oder humane Monozyten/Makrophagen vermittelt, allerdings keine Interaktion mit diversen EZM-Proteinen, HUVEC, Hec-1B Zellen und HeLa Zellen induziert (Capecchi *et al.*, 2005; Franzoso *et al.*, 2008; Mazzon *et al.*, 2007). Eine weitergehende funktionelle Charakterisierung des NadA Proteins ist vor allem für das Verständnis seiner Rolle in der Pathogenese von Meningokokken von großem Interesse. Durch den Vergleich vom YadA mit NadA sollten unter anderem neue Einblicke in die Beteiligung des NadA bzw. der NadA-Kopfdomäne bei der Blockierung der komplementvermittelten Lyse und der Interaktion mit humanen Wirtszellen gewonnen werden.

Trimere Autotransporterproteine wie HadA (*Haemophilus influenzae* Adhäsins A), BadA (*Bartonella henselae* Adhäsins A), YadA und UspA1/USpA2 (*Moraxella catarrhalis* „ubiquitous surface protein“ 1 und 2) können mit EZM-Proteinen interagieren und so eine initiale Kolonisierung von Wirtszellen induzieren (Ackermann *et al.*, 2008; McMichael *et al.*, 1998; Riess *et al.*, 2004; Schulze-Koops *et al.*, 1992; Serruto *et al.*, 2009). Diese Interaktion wird beim YadA durch die YadA-Kopf/Halsdomäne vermittelt (Heise und Dersch, 2006; Roggenkamp *et al.*, 1995; Roggenkamp *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu vermittelt rekombinantes NadA Δ 351-405 Protein weder eine Interaktion mit Fibronectin, Laminin,

Kollagen Typ IV, noch mit Heperansulfaten (Capecchi *et al.*, 2005). Um einen ersten Vergleich des NadA mit dem YadA Protein zu erzielen, wurde im Verlauf dieser Arbeit die Bindung der NadA-YadA-Hybride und des NadA-positiven Stamms an die EZM-Proteine Fibronektin, Kollagen Typ I und Matrigel getestet. Dabei zeigte sich, dass weder die NadA-YadA-Hybride, noch der NadA-positive Stamm mit den EZM-Proteinen interagierten, während der YadA-positive Stamm eine deutliche Bindung an alle getesteten EZM-Proteine aufwies. Eine weitere YadA-vermittelte Funktion, die bakterielle Autoaggregation, wird durch die YadA-Kopfdomäne vermittelt (Skurnik *et al.*, 1984; Tamm *et al.*, 1993) und scheint für die Mausvirulenz von Bedeutung zu sein. Im Gegensatz zum YadA-positiven Stamm zeigten weder der NadA-positive Stamm noch die NadA-YadA-Hybride die Fähigkeit eine bakterielle Autoaggregation zu induzieren. Die Unterschiede zwischen YadA und NadA bei der Autoaggregation und Bindung von EZM-Proteinen sind erste Hinweise darauf, dass die beiden Oca-Proteine vermutlich unterschiedliche Rollen im Infektionsprozess haben.

Eine wichtige Virulenzeigenschaft pathogener Mikroorganismen für das Überleben innerhalb ihres Wirtes ist das Umgehen des Immunsystems. Das Komplementsystem stellt die erste Angriffslinie gegen Pathogene dar, und wird durch verschiedene Enzyme, Proteinkomplexe und Rezeptoren reguliert, die eine schnelle Beseitigung pathogener Strukturen ermöglichen. Dennoch bietet das Komplementsystem viele Angriffspunkte für Pathogene, die verschiedene Mechanismen entwickelt haben, um sich an das Komplementsystem anzupassen, oder aber dieses zu umgehen (Lambris *et al.*, 2008). Der effizienteste komplementvermittelte Mechanismus zur Eliminierung von Erregern ist die bakterizide Aktivität des humanen Serums, die bei *N. meningitidis* vor allem durch die Synthese einer Polysaccharidkapsel reduziert wird (Geoffroy *et al.*, 2003; Vogel und Frosch, 1999). Zusätzlich rekrutiert *N. meningitidis* mit den Pilusproteinen, Porinen und einem Faktor-H-Bindeproteine Komplementsystemfaktoren, wodurch die komplementvermittelte Phagozytose blockiert wird (Ram *et al.*, 1999; Ram *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2006). Eine Beteiligung des NadA Proteins bei der Vermittlung eines serumresistenten Phänotyps oder bei der Bindung von Komplementfaktoren wurde bisher nicht untersucht. Für das YadA Protein ist bekannt, dass es durch seinen C-terminalen Membrananker ein Überleben der Yersinien in humanem Serum ermöglicht (Ackermann *et al.*, 2008; Roggenkamp *et al.*, 2003). Daher wurde das Serumresistenzverhalten der NadA-YadA-Hybride und des NadA-positiven Stamms mit dem YadA-positiven Stamm WA-314 *ΔyadA:yadA* verglichen. Dabei zeigte sich, dass alle NadA-

YadA-Hybride serumresistent waren. Die Hybride WA-314 *ΔyadA*:M1, :F1, und :F2, die lediglich die NadA-Kopfdomäne und nicht die NadA-Halsdomäne besitzen zeigten im Vergleich zum YadA-positiven Stamm erstaunlicherweise eine verstärkte Serumresistenz. Dies könnte bedeuten, dass die NadA-Kopfdomäne die Zelloberfläche von *Y. enterocolitica* besser maskiert als YadA alleine. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass bei diesen Hybriden die NadA-Kopfdomäne anders präsentiert wird als bei den Hybriden mit der zusätzlichen Halsdomäne, und so beispielsweise Komplementkomponenten besser binden könnten. Im Gegensatz dazu zeigte der NadA-positive Stamm einen vollständigen serumsensitiven Phänotyp. Dies deutet darauf hin, dass NadA in Yersinien keine Rolle bei der Serumresistenz hat, oder aber dass die Dichte exponierter NadA-Epitope auf der Zelloberfläche von *Y. enterocolitica* nicht ausreichend für die Vermittlung einer Serumresistenz in 50 % humanem Serum sind. Zusätzlich wurde die Bindung der NadA-YadA-Hybride und NadA an die Komplementregulatoren C4BP und Faktor H aus hitzeinaktiviertem Serum untersucht. Dabei wiesen alle NadA-YadA-Hybride und das vollständige NadA eine Bindung von C4BP auf. Die Bindung der NadA-YadA-Hybride an C4BP wurde vermutlich durch die YadA-Stiel- und/oder Membranankerdomäne vermittelt, da auch der YadA-kopflose Stamm C4BP bindet. Für YadA konnte gezeigt werden, dass es zusammen mit dem chromosomal kodierten Ail eine Bindung an C4BP vermittelt (Biedzka-Sarek *et al.*, 2005). Da allerdings der YadA-negative Stamm lediglich eine sehr schwache C4BP-Bindung zeigte, kann eine ausschlaggebende Beteiligung von Ail an der C4BP-Bindung ausgeschlossen werden. Für den NadA-positiven Stamm konnte ebenfalls eine deutliche Bindung an C4BP nachgewiesen werden, dennoch konnte die NadA-Bindestelle mit den vorhandenen NadA-YadA-Hybriden nicht weiter eingegrenzt werden. Bezüglich der Bindung von Faktor H erfolgte lediglich eine Bindungsnachweis für das NadA-YadA-Hybrid WA-314 *ΔyadA*:M2 und der kopflosen YadA-Mutante. Die Bindung von Faktor H durch die anderen NadA-YadA-Hybride und den NadA-positiven Stamm konnte nicht eindeutig geklärt werden, da der verwendete Faktor H-spezifische Antikörper eine starke Unspezifität aufwies und eine eindeutige Zuordnung der Banden im Immunoblot daher nicht möglich war. Insgesamt konnte allerdings eine Beteiligung von NadA bei der Bindung von C4BP nachgewiesen werden, wodurch anzunehmen wäre, dass NadA auch einen serumresistenten Phänotyp vermittelt. Dennoch konnte keine Korrelation zwischen der Bindung von C4BP und der Vermittlung eines serumresistenten Phänotyps gezeigt werden. Um genauere Aussagen

über die Rolle von NadA in der Interaktion mit dem Komplementsystem treffen zu können, sind daher weitere Untersuchungen von erforderlich.

Um die Funktionalität der in *Y. enterocolitica* synthetisierten NadA-YadA-Hybride und NadA gewährleisten zu können, wurden Adhärenz- und Invasionsversuche mit Invasin- und pYV-Plasmid-negativen *nadA*- und *nadA-yadA*-exprimierenden Yersinien und Chang-Zellen durchgeführt, da Cappecci *et al.* zeigten, dass NadA_{Δ351-405} auf der Zelloberfläche von *E. coli* eine Bindung und Internalisierung in Chang Zellen induziert (Capecci *et al.*, 2005). Die Verwendung von pYV-Plasmid- und Invasin-negativen Stämmen ermöglichte die Untersuchung von YadA und NadA ohne zusätzliche Virulenzfaktoren. Weiterhin ist die Verwendung von plamidlosen Stämmen entscheidend, da andernfalls die Injektion der auf dem pYV-Plasmid kodierten Yops zur Schädigung der Wirtszellen führen, und das Ergebnis von Adhärenzstudien verfälschen kann. Die Quantifizierung der Anzahl zellassoziierter und internalisierter Bakterien zeigte, dass die NadA-YadA-Hybride des Serotyps MC58 sowie der NadA-positive Stamm eine verstärkte Bindung und Internalisierung in Chang Zellen induzieren. Somit ist die NadA-Kopfdomäne für die Bindung und Aufnahme von *Y. enterocolitica* durch Chang Zellen verantwortlich. Auch für den YadA-positiven Stamm konnte eine Bindung und Aufnahme durch Chang Zellen nachgewiesen werden, die sogar höher war als die NadA-vermittelte. Dies lässt vermuten, dass YadA im Vergleich zum NadA an andere, oder zusätzliche Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Chang-Zellen bindet. Eher anzunehmen ist allerdings, dass die erhöhte Bindung durch die YadA-vermittelte Interaktion mit EZM-Proteinen induziert wird, die bei NadA ja nicht stattfindet. Das YadA Protein bindet neben einer Vielzahl von humanen Epithelzellen mit seiner N-terminalen Kopfdomäne auch an humane Neutrophile (Roggenkamp *et al.*, 1996). Der daraus resultierende Kontakt zwischen Bakterien und Phagozyten scheint essentiell für die Injektion der Effektorproteine zu sein (Cornelis, 2002a) und unterdrückt somit die Phagozytose und die durch Neutrophile vermittelte Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (Grosdent *et al.*, 2002; Ruckdeschel *et al.*, 1996). Auch Meningokokken können Phagozyten rekrutieren und so die Epithelschranke überwinden (Virji, 2009). Daher wurde die Interaktion *nadA*- und *nadA-yadA*-exprimierender Yersinien mit den neutrophilähnlichen dHL-60 Zellen untersucht. Adhärenzversuche zeigten eine deutliche NadA-abhängige Bindung der Yersinien an dHL-60 Zellen, die vergleichbar mit der durch YadA induzierten Bindung war und durch die NadA-Kopfdomäne vermittelt wurde. Die Modifizierung oberflächenexponierter Proteinstrukturen

auf dHL-60 Zellen mit Proteinase K führte zu einer Reduktion der Bindung der NadA-YadA-Hybride und des NadA- sowie des YadA-positiven Stamms. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung der Zellen mit Phospholipase nur bei dem YadA-positiven Stamm zu einer Reduktion der Interaktion. Dies lässt annehmen, dass die Interaktion zwischen der NadA-Kopfdomäne und den dHL-60 Zellen durch einen oberflächenexponierten Rezeptor vermittelt wird, der eine Proteinstruktur aufweist. Da die Phospholipase-Behandlung der Zellen keine Reduktion der Bindung des NadA-positiven Stamms und NadA-YadA-Hybride zur Folge hatte, kann davon ausgegangen werden, dass die Interaktion der *nadA*-exprimierenden Yersinien mit den dHL60-Zellen Protein-spezifisch ist, und nicht wie bei YadA durch verschiedene Faktoren vermittelt wird. Für NadA wurde bereits früher gezeigt, dass es spezifisch mit Monozoyten und Monozyten/Makrohagen interagiert, während eine unspezifische Bindung an PMNs, NK-Zellen und Lymphozyten beschrieben wurde (Franzoso *et al.*, 2008). Obwohl die Bindung von NadA an PMNs als unspezifische Interaktion beschrieben wurde, muss dies nicht zwingend für die Interaktion von NadA und dHL-60 Zellen gelten, da diese Zellen zwar neutrophilähnlich sind aber dennoch auch andere Oberflächenrezeptoren besitzen als PMNs. Um die Spezifität der Interaktion von NadA mit dHL-60 eindeutig klären zu können, bedarf es dennoch weiterer Untersuchungen wie beispielsweise Konkurrenzexperimente. Eine Beteiligung der NadA-Kopfdomäne bei der Internalisierung *nadA-yadA*-exprimierender Yersinien durch dHL-60 Zellen konnte mittels Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Die NadA-Kopfdomäne scheint dabei die Aufnahme der Yersinien in dHL-60 Zellen zu induzieren, während YadA nur an der Bindung an dHL-60 Zellen beteiligt zu sein scheint. Dies weist darauf hin, dass das NadA Protein eher als Invasin fungiert und über den Rezeptor ein Internalisierungssignal induziert, während YadA nicht an signaltransduzierende Strukturen bindet. Da Meningokokken fakultativ intrazelluläre Erreger sind, könnte eine NadA-abhängige Internalisierung für das intrazellulären Überleben der Bakterien in Immunzellen von Bedeutung sein, oder aber eine Besiedelung anderer Nischen des Wirtes über Neutrophile ermöglichen. Dennoch bleibt die Bedeutung der NadA-abhängigen Internalisierung durch dHL-60 Zellen für die Pathogenese von Meningokokken unklar.

4.3 Die Rolle von NadA im *in vivo* Mausmodell

Das Verständnis der Pathogenese von Meningokokkenerkrankungen ist durch das Fehlen eines ausreichend effizienten Tiermodells limitiert. Die Verwendung des Mausmodells für die Untersuchung von *N. meningitidis* ist dabei vor allem durch die Eisenbindeproteine von Meningokokken limitiert, die spezifisch humanes Transferrin binden (Gorringe *et al.*, 2005; Zarantonelli *et al.*, 2007). Da Yersinien über eine eigene Eisenversorgung über das Yersinibactin verfügen, wurde das *Yersinia* Modellsystem für die Untersuchung einer potentiellen Beteiligung des NadA bei der Virulenz im Mausinfektionsmodell verwendet.

Die nach peroraler Infektion quantifizierte Bakterienzahl zeigte lediglich für den YadA-positiven Stamm eine Kolonisierung des Dünndarms, der Peyer'schen Plaques, der Milz und Leber, während das NadA-YadA-Hybrid WA-314 $\Delta yadA:M1$ und der NadA-positive Stamm stark attenuiert waren. Dieser Effekt konnte durch den Chemolumineszenznachweis *nadA*- und *yadA*-exprimierender lux-positiver Yersinien bestätigt werden. Auch die intraperitoneale Applikation *nadA*- und *nadA-yadA*-exprimierender Yersinien führte lediglich zu einer geringen Kolonisierung der Milz und Leber im Vergleich zum YadA-positiven Stamm. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass das NadA die YadA-vermittelten Virulenzeigenschaften im Mausmodell nicht übernehmen kann. Dies könnte zum einen dadurch erklärt werden, dass NadA die Fähigkeit zur Autoaggregation fehlt, und somit keine Mikrokolonien ausgebildet werden können, die einen größeren Schutz vor der Eliminierung durch das Immunsystem bieten würden. Des Weiteren könnte die fehlende Bindung von NadA an EZM-Proteinen zu einer reduzierten Kolonisierung des intestinalen Gewebes führen, wohingegen YadA durch Interaktion mit EZM-Proteinen mit verschiedenen Wirtszellrezeptoren interagieren kann. Die fehlende Serumresistenz *nadA*-exprimierender Yersinien könnte die Ausbildung einer Infektion im Mausmodell ebenfalls beeinträchtigen, da Studien mit YadA-Chimären bereits zeigten, dass die YadA-vermittelte Serumresistenz mit der Mausvirulenz korreliert (Ackermann *et al.*, 2008). Daher kann vermutet werden, dass *nadA*-exprimierende Yersinien leichter durch das Immunsystem beseitigt werden, als serumresistente *yadA*-exprimierende Yersinien. Zusätzlich könnte die Expression von *nadA* auf der Zelloberfläche von Yersinien mit der T3SS-abhängigen Injektion der Effektorproteine interferieren, wodurch die Modulierung intrazellulärer Prozesse, wie die Blockierung der Phagozytose nicht mehr unterdrückt werden kann. Des Weiteren ist die Analyse des NadA im Mausinfektionsmodell mittels peroraler und intraperitonealer Infektionsroute begrenzt, da Meningokokken in der

Regel über Tröpfcheninfektion auf die Schleimhäute des Nasopharynx gelangen, und NadA vermutlich bei der initialen Kolonisierung der Mukosa beteiligt ist. Daher könnte sich die intranasale Applikation NadA-positiver Yersinien für die Untersuchung der Rolle von NadA im Mausmodell von Vorteil erweisen. Allerdings kann auch eine Beteiligung anderer *N. meningitidis* Virulenzfaktoren an einer möglichen NadA-abhängigen Kolonisierung im Mausinfektionsmodell nicht ausgeschlossen werden.

4.4 Identifizierung NadA-spezifischer Wirtszellrezeptoren

N. meningitidis zeichnet sich durch eine Vielzahl verschiedener Adhäsine und Virulenzfaktoren aus, die durch Interaktion mit diversen Wirtszellrezeptoren die Kolonisierung des Wirtes ermöglichen. Daher ist die Identifizierung NadA-spezifischer Wirtszellrezeptoren für die Analyse der Beteiligung von NadA an der Pathogenese von Meningokokken von großem Interesse.

4.4.1 Die Rolle von CEACAMs als potentielle NadA-Wirtszellrezeptoren

Die von *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* produzierten Proteine der Opa-Familie, induzieren die Interaktion mit verschiedenen Zelltypen. Opa_{HS}-Proteine vermitteln die Bindung und Invasion in verschiedene Epithelzellen mittels Heparansulfat (Hauck und Meyer, 2003), während Opa_{CEA}-Proteine mit Wirtszellrezeptoren der CEACAM-Familie interagieren (Virji *et al.*, 1996a). *Neisseria spp.* binden dabei mit den Opa_{CEA}-Proteinen an CEACAM 1, 3, 5, und 6 und induzieren die Transzytose ins Epithelium (Bos *et al.*, 1997; Chen und Gotschlich, 1996; Gray-Owen *et al.*, 1997; Virji *et al.*, 1996b). Da auch Oca-Proteine wie das *M. catarrhalis* UspA1 Protein mit CEACAM1 interagieren können (Conners *et al.*, 2008; Hill und Virji, 2003), wurden CEACAMs als potentielle Rezeptoren für NadA untersucht. Interaktionsstudien mit CEACAM1- und CEACAM5-transfizierten Hek-293 Zellen und rekombinantem NadA₂₄₋₂₁₀ Protein zeigten keine Interaktion von NadA mit CEACAM1 und CEACAM5. Auch Bindungsstudien mit GFP-markierten CEACAM-Überständen und *nadA*-, sowie *yadA*-exprimierenden Yersinien führten zu keiner Interaktion mit CEACAM1, 3, 5, 6, oder 8. Dies weist darauf hin, dass weder YadA, noch NadA CEACAMs während der Infektionsprozesses als Rezeptoren verwenden, und somit funktionale Unterschiede zum UspA1 Protein von Moraxellen bestehen.

4.4.2 β 1 Integrine als Wirtszellrezeptoren für NadA

Da während dieser Arbeit eine Interaktion *nadA*-exprimierender *Yersinien* mit neutrophilähnlichen dHL-60 Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde auch die Interaktion von NadA mit undifferenzierten HL-60 Zellen getestet, wodurch erste Hinweise auf mögliche Rezeptoren erhalten werden sollten. Bindungsstudien mit rekombinantem NadA₂₄₋₂₁₀ Protein und HL-60 sowie dHL-60 Zellen zeigten, dass NadA₂₄₋₂₁₀ mit höherer Effizienz an undifferenzierte HL-60 Zellen band. Daher ist anzunehmen, dass HL-60 Zellen Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche besitzen, die bei dHL-60 Zellen entweder nicht vorkommen, oder aber in geringerer Menge synthetisiert werden. Studien zur Charakterisierung der Genexpression in HL-60 und dHL-60 Zellen zeigten, dass die neutrophilähnlichen dHL-60 Zellen β 2 Integrine (CD18) exprimieren, während undifferenzierte HL-60 Zellen β 2 Integrin-negativ sind (Collins *et al.*, 1979; Itoh *et al.*, 1998). Generell exprimieren Immunzellen Integrine der β 1, β 2 und β 7 Familie, wobei β 2 und β 7 Integrine ausschließlich durch Leukozyten produziert werden. Im Vergleich dazu sind β 1 Integrine auf verschiedenen Zelltypen weit verbreitet (Luo *et al.*, 2007). Da dHL-60 Zellen neutrophilähnliche Zellen sind, produzieren diese Zellen vermutlich mehr β 2 als β 1 Integrine, während undifferenzierte HL-60 Zellen vermutlich mehr β 1 Integrine synthetisieren. Der Oberflächennachweis von β 1 und β 2 Integrinen zeigte, dass HL-60 Zellen mehr β 1 Integrin produzierten, während dHL-60-Zellen verstärkt β 2 Integrin positiv waren. Dennoch konnte eine geringe Synthese von β 2 Integrinen durch HL-60 Zellen nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass die HL-60 Zellen bereits in einem gering voraktivierten Zustand vorlagen, und nicht mehr vollständig undifferenziert waren.

NadA induziert die Produktion des Chemokins IL-8 durch verschiedene Zelltypen, und ähnelt damit dem *Yersinia* Invasin, das β 1 Integrine als Wirtszellrezeptoren verwendet (Franzoso *et al.*, 2008; Grassl *et al.*, 2003; Isberg und Leong, 1990; Kolb-Maurer *et al.*, 2001; Schulte *et al.*, 2000). Basierend auf diesem Hintergrund, sowie der verstärkten Bindung von NadA an β 1 Integrin-exprimierende HL-60 Zellen wurde eine mögliche Beteiligung von β 1 Integrinen als potentielle Wirtszellrezeptoren für NadA untersucht.

Für Bindungsstudien wurde rekombinantes NadA₂₄₋₂₁₀ Protein verwendet, das sowohl die NadA-Kopfdomäne als auch einen Teil der NadA-Stieldomäne besitzt. Durch die Untersuchung des NadA₂₄₋₂₁₀ in nativen SDS-Gelen und anschließenden Westernblotanalysen konnte gezeigt werden, dass das NadA₂₄₋₂₁₀ Protein als oligomeres Protein vorliegt, und somit

für Bindungsstudien besonders geeignet ist. Bindungsstudien mit NadA₂₄₋₂₁₀ und GE-11-β1 (Epithelzell-ähnlich, humanes β1 Integrin-positiv) und 2-4-8 Zellen (Fibroblasten-ähnlich, murines β1-Integrin-positiv) Zellen wiesen erstmals auf eine Beteiligung von β1 Integrinen in Interaktion mit NadA hin. Im Vergleich dazu war die Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀ an GE-11 (Epithelzell-ähnlich, humanes β1 Integrin-negativ) und 2-4 Zellen (Fibroblasten-ähnlich, murines β1-Integrin-negativ) signifikant reduziert. Insgesamt konnte eine deutliche Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀ sowohl an murine, als auch an humane β1 Integrine nachgewiesen werden. Da allerdings auch eine schwache Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀ an die β1 Integrin-negative Zellen GE-11 und 2-4 stattfand, kann eine Beteiligung zusätzlicher Rezeptoren nicht ausgeschlossen werden. Mögliche weitere potentielle NadA Rezeptoren auf der Zelloberfläche von GE-11 und 2-4 Zellen könnten β3 Integrine sein, da diese von beiden Zellen produziert werden (persönliche Absprache, R. Fässler, MPI Martinsried). Für eine Bindung von NadA an β1 Integrine kann auch der Aktivierungszustand der Integrine von Bedeutung sein. Integrine können auf der Zelloberfläche in drei Aktivierungszuständen vorliegen. In ihrem inaktiven Zustand, der „bent conformation“ sind der „β-Propeller“ der α-Untereinheit und die β-I-Domäne der β-Untereinheit an die membrannahen Domäne der α- und β-Untereinheit geklappt. Dieser Status stellt den Zustand der geringsten Bindeaffinität dar. Eine Aktivierung der Integrine durch intra- und extrazelluläre Signale induziert die „closed extended conformation“, in der die membrannahen Domänen der α- und β-Untereinheit leicht aufklappen, und dann in die „open extended conformation“ übergehen. In der „open extended conformation“ sind die Integrine vollständig gestreckt und haben ihre höchste Ligandenbindeaffinität (Askari *et al.*, 2009; Leitinger *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2007). Des Weiteren kann durch die Zugabe von Mn²⁺ die Ligandenbindungsaffinität von Integrinen erhöht werden, da Mn²⁺ eine hohe Affinität hat und andere Ionen wie Ca²⁺ von der Metallionen-Bindeseite des Integrins verdrängt. Die Zugabe von 2 mM MnCl₂ zu GE-11-β1 Zellen zeigte keinen Einfluss auf die Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀, während die Zugabe von 2 mM MnCl₂ die Interaktion von NadA₂₄₋₂₁₀ mit den β1 Integrin-negativen GE-11-Zellen signifikant erhöhte. Dies lässt vermuten, dass die β1 Integrine auf den GE-11-β1 Zellen bereits in ihrem aktivierten Zustand vorliegen, während die Zugabe von MnCl₂ zu den GE-11 Zellen zur Aktivierung anderer Oberflächenrezeptoren führt. Da GE-11 Zellen auch β3 Integrine produzieren, könnte deren Aktivierung durch Mn²⁺ eine potentielle NadA-Bindung ermöglichen. Um festzustellen, ob die β1 Integrine auf den GE-11-β1 Zellen bereits in ihrem

aktivierten Zustand vorliegen, wurde die Bindeeffizienz des Antikörpers 9EG7 an GE-11- β 1 Zellen in An- und Abwesenheit von 2 mM MnCl_2 untersucht. Für α 4 β 1 Integrine konnte gezeigt werden, dass diese nur in ihrer aktivierten Form und nicht als inaktive Heterodimere mit dem Antikörper 9EG7 nachgewiesen werden können (Lenter *et al.*, 1993). Das Epitop für 9EG7 befindet sich in der β 1 Integrin-Untereinheit (AS 495-602) innerhalb der cysteinreichen Region und unterscheidet sich von allen bisher entdeckten humanen β 1 Integrin-Epitopen (Bazzoni *et al.*, 1995). Da unbehandelte und mit MnCl_2 -behandelte GE-11- β 1 Zellen eine vergleichbare Bindung von 9EG7 aufwiesen, liegen die β 1 Integrine auf den GE-11- β 1 Zellen vermutlich in ihrer aktivierten Form vor. Somit bindet NadA₂₄₋₂₁₀ wohl verstärkt an aktivierte humane β 1 Integrine. Dennoch kann eine Interaktion mit inaktivierten Integrinen nicht ausgeschlossen werden.

Die Spezifität der Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀ an β 1 Integrin-exprimierende Zellen wurde durch Blockierungsexperimente mit den anti- β 1 Integrin-blockierenden Antikörpern AIIB2 und LM534, und durch Konkurrenzexperimente mit unmarkiertem NadA₂₄₋₂₁₀ nachgewiesen. Der humane β 1 Integrin-blockierende Antikörper AIIB2 blockiert die Bindung von Chorionkarzinom JAR-Zellen an Fibronectin, Laminin und Kollagen und erkennt die β -I-ähnliche Domäne (AS 189-304) der β 1 Integrinkette (Hall *et al.*, 1990; Werb *et al.*, 1989). Der Antikörper LM534 erkennt hingegen die carboxyterminale Region (AS 587-708) der extrazellulären Domäne der β 1 Integrin-Untereinheit (Takada und Puzon, 1993). Da die Vorbehandlung der GE-11- β 1 Zellen mit AIIB2 und LM534 die Bindung von NadA₂₄₋₂₁₀ signifikant reduzierte, kann angenommen werden, dass die NadA-Bindung über die β -Untereinheit und nicht über die α -Untereinheit stattfindet. Die natürlichen Liganden von β 1 Integrinen, Fibronectin und Kollagen besitzen ein RGD (Arg-Gly-Asp)-Motiv das essentiell für die Rezeptorerkennung ist (Pytela *et al.*, 1987). Im Gegensatz dazu besitzt NadA kein RGD-Motiv. Dennoch scheint das Vorhandensein eines RGD-Motivs für die Bindung an Integrine nicht essentiell zu sein, da auch andere Proteine ohne RGD-Motiv wie das Invasin von *Y. pseudotuberculosis* eine Interaktion mit α 1 β 1, α 3 β 1, α 4 β 1, α 5 β 1 und α v β 1 vermittelten (Isberg und Leong, 1990; Leong *et al.*, 1990). Eine direkte Interaktion von NadA₂₄₋₂₁₂ mit der β -Untereinheit von humanem α 5 β 1 Integrin sowie mit der β -Untereinheit von humanem α v β 3 Integrin konnte zusätzlich mittels Far Westernblotanalysen nachgewiesen werden. Somit vermittelt NadA nicht nur eine direkte Interaktion mit β 1 Integrinen, sondern auch mit β 3 Integrinen. Diese Ergebnisse bekräftigen die Vermutung, dass die oben beschriebene

schwache Bindung von NadA₂₄₋₂₁₂ an GE-11 Zellen möglicherweise durch $\beta 3$ Integrine bewirkt wird. Der natürliche Ligand des $\alpha 5\beta 1$ Integrin Heterodimers ist Fibronectin, während Vitronectin an $\alpha v\beta 3$ bindet (Berman *et al.*, 2003). Eine Bindung von EZM-Proteinen beispielsweise durch die Opc-Proteine von *N. meningitidis*, ermöglicht eine Interaktion der Pathogene mit Integrinstrukturen (Unkmeir *et al.*, 2002b; Virji *et al.*, 1994). Dennoch zeigen die Far Westernblotanalysen und ELISA-Studien mit Fibronectin, dass die Interaktion zwischen NadA und $\beta 1$ Integriren direkt vermittelt wird, und nicht über EZM-Proteine stattfindet. Das NadA ist somit das erste Adhäsins der Oca-Proteinfamilie, das direkt von $\beta 1$ und $\beta 3$ Integrin-Untereinheiten erkannt wird.

Rekombinantes NadA _{$\Delta 351-405$} Protein induziert über einen bisher unbekanntem Proteinrezeptor die Bindung an Chang Zellen (Capecchi *et al.*, 2005). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass das NadA₂₄₋₂₁₀ eine Bindung an $\beta 1$ Integrine vermittelt, wurde eine mögliche Beteiligung von $\beta 1$ Integriren in der Interaktion mit Chang Zellen untersucht. Der Oberflächennachweis von β Integriren auf Chang Zellen zeigte, dass Chang Zellen Integrine exprimieren. Jedoch erst die Zugabe von MnCl₂ führte zu einem starken Nachweis von $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ und $\beta 5$ Integriren auf ihrer Zelloberfläche. Dies lässt vermuten, dass diese Integrine in einem Zustand geringer Bindeaffinität („bent conformation“) vorliegen, und erst durch die Zugabe von MnCl₂ aktiviert werden. Auffallend ist auch die Synthese von $\beta 2$ Integriren auf der Zelloberfläche der Chang Zellen, da diese eigentlich exklusiv von Leukozyten produziert werden. Daher kann angenommen werden, dass der verwendete $\beta 2$ Integrin Antikörper entweder unspezifisch mit anderen Integriren interagiert oder aber dass, die Tumorzelllinie tatsächlich $\beta 2$ Integrine synthetisiert. Da jedoch keine ausschließlich $\beta 2$ Integrin-produzierende Zelllinie zur Verfügung stand, konnte diese Vermutung nicht bestätigt werden. Der Aktivierungszustand der $\beta 1$ Integrine auf den Chang Zellen wurde zusätzlich durch Inkubation mit dem Antikörper 9EG7 untersucht. Die Zugabe von 9EG7 zu unbehandelten Chang Zellen führte zwar zum Nachweis von $\beta 1$ Integriren, allerdings war die Bindung von 9EG7 in Anwesenheit von MnCl₂ erhöht. Somit befinden sich die $\beta 1$ Integrine auf Chang Zellen tatsächlich in einem Bindezustand geringer Affinität und werden durch die Zugabe von MnCl₂ erst aktiviert. Bindungsstudien mit rekombinantem NadA₂₄₋₂₁₀ und Chang Zellen demonstrierten ein verstärkte Bindung von NadA an Chang Zellen in Gegenwart von MnCl₂.

Um eine Beteiligung von β Integrinen bei dieser Interaktion zu untersuchen, wurden die Chang Zellen mit β Integrin-blockierenden Antikörpern in An- und Abwesenheit von $MnCl_2$ vorbehandelt. In Abwesenheit von $MnCl_2$ führte die Blockierung der Integrine zu einer Erhöhung der NadA-Bindung was eine Beteiligung anderer Rezeptoren als Integrine vermuten lässt. Die Zugabe von $MnCl_2$ ermöglichte jedoch eine Blockierung der NadA₂₄₋₂₁₀-Bindung an Chang Zellen. Interessanterweise hatte die Blockierung der β_1 , β_3 , β_4 und β_5 Integrine alleine keinen Effekt auf die NadA-Bindung. Die Blockierung mit dem anti- β_2 spezifischen Antikörper hingegen reduzierte die Bindung signifikant, und bestätigte die Vermutung, dass der β_2 Integrin Antikörper unspezifisch an andere β Integrine bindet. Erst durch die Kombination verschiedener β Integrin-blockierender Antikörper konnte eine signifikante Reduktion der NadA-Bindung erzielt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass erst nach Aktivierung der Integrine auf den Chang Zellen auch eine Blockierung durch die Integrinantikörper ermöglicht wird. Zusätzlich wird deutlich, dass nur die gleichzeitige Blockierung aller β Integrine eine Reduktion der NadA-Bindung induziert. Daher kann angenommen werden, dass NadA entweder mit verschiedenen β Integrinen interagiert oder aber dass einzelne Integrine die Funktion anderer Integrine ersetzen, so dass die Blockierung einzelner Integrine keinen Effekt auf die NadA-Bindung hat. Insgesamt weisen diese Ergebnisse zwar auf eine Beteiligung von β Integrinen bei der Interaktion mit Chang Zellen hin, allerdings kann eine Beteiligung anderer Rezeptoren nicht ausgeschlossen werden. Die Bindung von NadA an verschiedene Integrine wäre dabei nicht verwunderlich, da der extrazelluläre Teil aller Integrine eine hohe Sequenzhomologie aufweist.

4.4.3 Die Bedeutung von β_1 Integrinen für die *nadA*-abhängige Kolonisierung von Wirtszellen

Da die Interaktion von NadA mit β_1 Integrinen zwar mit rekombinanten NadA₂₄₋₂₁₀ Protein gezeigt werden konnte, aber keine Aussage über die Bedeutung dieser Interaktion bei der Kolonisierung von Zellen lieferte, wurde das *Yersinia* Modellsystem für die Quantifizierung intrazellulärer und zellassoziierter NadA-positiver Invasin-negativer Yersinien verwendet. Dabei konnte eine verstärkte Bindung NadA-positiver Yersinien an GE-11- β_1 Zellen nachgewiesen werden, die durch die Vorbehandlung der Zellen mit dem blockierenden Antikörper AIIB2 blockiert werden konnte. Die Bindeeffizienz NadA-positiver Yersinien an GE-11- β_1 Zellen war vergleichbar mit der Bindung des Invasin-positiven Stamms, der eine direkte Bindung an die Integrine $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_v\beta_1$ induziert (Isberg und

Leong, 1990; Leong *et al.*, 1990). *yadA*-exprimierende Yersinien zeigten eine Bindung sowohl an GE-11- β 1 als auch an GE-11 Zellen. Dies zeigt, dass NadA an einer dem Invasin ähnlichen β 1 Integrin-abhängigen Bindung der Bakterien an die Zellen beteiligt ist, während die YadA-abhängige Interaktion mit beiden Zelllinien vermutlich durch andere Faktoren vermittelt wird. YadA bindet an verschiedene extrazelluläre Matrixproteine (Tamm *et al.*, 2003), die wiederum eine Bindung an β 3 Integrine auf der Zelloberfläche von GE-11 und GE-11- β 1 Zellen vermitteln könnten. Dennoch könnte die Bindung *yadA*-exprimierender Yersinien an GE-11 und GE-11- β 1 Zellen über weitere bisher unbekannte Rezeptoren stattfinden.

Zusätzlich wurde die Invasion *yadA*-, *nadA* oder *inv*-exprimierender Yersinien in GE-11 und GE-11- β 1 Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass NadA nicht nur eine Adhärenz sondern auch die Invasion in GE-11- β 1 Zellen vermittelt, die vergleichbar mit der durch Invasin vermittelten Internalisierung ist. Auch der YadA-positive Stamm zeigte eine leicht erhöhte β 1 Integrin-abhängige Internalisierung. Die durch YadA-vermittelte Invasion könnte, durch die Bindung von YadA an EZM-Proteine erklärt werden wodurch eine indirekte Aufnahme der Bakterien über β 1 Integrine in die GE-11- β 1 Zellen erfolgen könnte.

Das NadA fungiert somit als Adhäsine und Invasin, und vermittelt eine β 1 Integrin-abhängige Bindung und Aufnahme von *Y. enterocolitica* in GE-11- β 1 Zellen. Somit zeigt NadA vergleichbare Eigenschaften zum *Yersinia* Invasin, während YadA verstärkt als Adhäsine fungiert. Die Interaktion bakterieller Adhäsine mit β 1 Integrinen wurde bereits für verschiedene Erreger wie *Yersinia spp.* oder *E. coli* beschrieben, die eine Besiedelung und/oder Invasion des gastrointestinalen Epitheliums, oder der Atemwege ermöglicht (Frankel *et al.*, 1996; Isberg und Leong, 1990; Scibelli *et al.*, 2007). M-Zellen befinden sich nicht nur auf der Darmmukosa, sondern kommen auch auf der Mukosa des nasalen lymphoiden Gewebes vor. Die β 1 Integrine auf der Oberfläche von M-Zellen und Peyer'schen Plaques werden durch bakterielle Adhäsine erkannt, induzieren eine bakterielle Translokation durch die Schleimhäute und stimulieren die Freisetzung verschiedener Chemokine (Corr *et al.*, 2008; Hamzaoui *et al.*, 2004; Heritage *et al.*, 1997; Kiyono und Fukuyama, 2004; Park *et al.*, 2003). Neben dem lymphoiden Gewebe exprimieren auch antigenpräsentierende dendritische Zellen, Makrophagen und Neutrophile vermehrt α 4 β 1 und/oder α 5 β 1 Integrine. Daher ist denkbar, dass *N. meningitidis* durch das NadA mit α 4 β 1 Integrinen des nasalen lymphoiden Gewebes, Makrophagen, Neutrophilen und dendritischen Zellen interagieren

kann, und so eine Kolonisierung von Wirtszellen, oder ein Überleben innerhalb des Wirtes ermöglicht. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass *N. meningitidis* mit verschiedenen Zelltypen des Immunsystems interagiert (McNeil *et al.*, 1994). Unbekapselte Meningokokken interagieren mit dendritischen Zellen und induzieren die Freisetzung von Zytokinen (Kolb-Maurer *et al.*, 2001). Die Behandlung von Makrophagen und dendritischen Zellen mit *nadA*-exprimierenden *E. coli* induziert vor allem die Freisetzung von IL-8 and TNF- α (Franzoso *et al.*, 2008). Die durch NadA induzierte hohe IL-8 Antwort ähnelt der durch Inv-positive Yersinien induzierten IL-8 Produktion in HeLa-Zellen durch Interaktion mit $\beta 1$ Integrinen (Eitel *et al.*, 2005; Grassl *et al.*, 2003). Dies lässt vermuten, dass das NadA eine $\beta 1$ Integrin-abhängige Signalkaskade induziert, die zur Freisetzung von IL-8 führt, wodurch Phagozyten rekrutiert werden und zur Schädigung der Integrität der Schleimhäute beitragen und so eine Invasion der Bakterien ermöglicht.

Im Gegensatz zum *Yersinia* Modellsystem, das eine Rolle von NadA und $\beta 1$ Integrinen bei der Kolonisierung von GE-11- $\beta 1$ Zellen demonstrierte, konnten diese Effekte im Meningokokkenmodell nicht bestätigt werden. Bekapselte Wildtyp-Meningokokken sowie die isogene NadA-Mutante zeigten zwar eine verstärkte Bindung an $\beta 1$ Integrin-positive Zellen, allerdings konnte dabei keine Beteiligung des NadA nachgewiesen werden. Dies erweist sich als nicht sehr überraschend, da *N. meningitidis* verschiedenste Adhäsine, wie Typ IV-Pili, Opa und Opc-Proteine produziert die eine Bindung und Transzytose in Wirtszellen vermitteln. Das Opc-Protein ermöglicht durch die Bindung an Vitronektin eine Interaktion mit $\alpha \beta 3$ Integrinen und indirekt über Fibronektin an $\alpha 5 \beta 1$ Integrine binden (Dehio *et al.*, 1998b; Unkmeir *et al.*, 2002b). Auch die *Neisseria* Opa_{HS} Proteine, welche Heparansulfatproteoglykan binden, induzieren so eine Bindung an Integrine, wodurch eine Aufnahme der Bakterien in die Wirtszelle erfolgt (Dehio *et al.*, 1998a; Hauck und Meyer, 2003). Neben den Nicht-pilus-Adhäsinen limitieren die Typ IV-Pili die Untersuchung einzelner Adhäsine, da sie zusammen mit unsialysierten Lipooligosacchariden an der Bindung und Aufnahme der Meningokokken in nicht-phagozytierende Zellen beteiligt sind (Lambotin *et al.*, 2005). Ein weiteres Problem für die Untersuchung von NadA im Meningokokkenmodell stellt die Polysaccharidkapsel dar, da diese Nicht-Pilus-Adhäsine wie das NadA maskieren kann. Da bekapselte Meningokokken mit einer verringerten Invasion der Bakterien in eukaryotische Zellen assoziiert werden (Unkmeir *et al.*, 2002a), wurde die Rolle von NadA in Interaktion mit $\beta 1$ Integrin-exprimierenden Zellen mit unbekapselten

Meningokokken untersucht. Der unkapselte Wildtypstamm MC58 $\Delta siaD$ zeigte im Vergleich zur isogenen NadA-Mutante eine stärkere Bindung sowohl an GE-11, als auch an GE-11- $\beta 1$ Zellen. Dies zeigte, dass NadA über andere Rezeptoren als $\beta 1$ Integrine an GE-11 und GE-11- $\beta 1$ Zellen bindet. Da im Laufe dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass NadA neben $\beta 1$ Integrinen auch $\beta 3$ Integrine bindet, könnte die beobachtete Interaktion auf die Bindung von $\beta 3$ Integrinen zurückzuführen sein. Da jedoch keine isogenen $\beta 3$ Integrin-positiven und -negativen Zellen zur Verfügung standen, konnte eine Beteiligung von $\beta 3$ Integrinen bei der NadA-vermittelten Bindung nicht weiter untersucht werden. Der Vergleich der Invasion unkapselter NadA-positiver und NadA-negativer Meningokokken in GE-11 und GE-11- $\beta 1$ Zellen zeigte für beide Stämme eine erhöhte Invasion in $\beta 1$ -Integrin-negative GE-11 Zellen. Eine Beteiligung von NadA bei der Vermittlung der Invasion konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Eher anzunehmen ist, dass die *N. meningitidis* Adhäsine Opa und Opc über extrazelluläre Matrixproteine eine Interaktion mit $\beta 1$ Integrinen auf GE-11- $\beta 1$ und $\beta 3$ Integrinen auf GE-11 und GE-11- $\beta 1$ Zellen induzieren, und so die Aufnahme der Meningokokken in die Zellen ermöglichen. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse den Vorteil des *Yersinia* Modellsystems für die Untersuchung des *Neisseria meningitidis* Adhäsins NadA und seiner Beteiligung bei der Interaktion von *Neisseria* in Wirtszellinteraktionen. Dabei konnten zum ersten Mal funktionelle Ähnlichkeiten zwischen NadA und Invasin aufgedeckt werden, da beide Proteine eine $\beta 1$ Integrin-vermittelt Zellinvasion induzieren, wodurch die hohe Affinität von *N. meningitidis* und *Y. enterocolitica* für lymphoides Gewebe des Nasopharynx erklärt werden kann (Cover und Aber, 1989; Exley *et al.*, 2009; Sim *et al.*, 2000; Thibodeau *et al.*, 1999).

5 Zusammenfassung

N. meningitidis ist ein Gram-negatives fakultativ humanpathogenes Bakterium das mittels diverser Adhäsine eine Kolonisierung der menschlichen Atemwege ermöglicht. Das *Neisseria meningitidis* Adhäsine NadA zeigt eine hohe Sequenzähnlichkeit zum *Yersinia* Adhäsine YadA, das den Prototyp der Oca („oligomeric „coiled-coil“ adhesin“)-Proteinfamilie darstellt. Das YadA-homologe NadA Protein kommt in 50 % aller *N. meningitidis* Isolaten vor, ist an der Zelladhärenz und -invasion beteiligt, und induziert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Aufgrund der großen Diversität von Meningokokkenadhäsinen ist die Untersuchung der Rolle von NadA bei der Interaktion von Meningokokken mit Wirtszellen limitiert. Des Weiteren kann eine Beteiligung des NadA an der Pathogenese im Mausinfektionsmodell nicht ausreichend untersucht werden. Daher wurde in dieser Arbeit *Y. enterocolitica* O:8 als Modellsystem für die Untersuchung von NadA und NadA-YadA-Fusionshybriden verwendet, um neue Einblicke in die Interaktion von NadA mit Wirtszellen, in die NadA-vermittelte Mausvirulenz und Blockierung der komplementvermittelten Zellyse zu erhalten, sowie eine Identifizierung potentieller NadA-spezifischer Wirtszellrezeptoren zu ermöglichen. *Y. enterocolitica* produzierte das NadA Protein in seiner trimeren Form auf der bakteriellen Zelloberfläche, und auch die Verwendung der YadA-Stieldomäne und des YadA-Membranankers ermöglichte die Translokation der NadA-Kopfdomäne auf die Zelloberfläche von *Y. enterocolitica*. Im Vergleich zu YadA induzierte NadA keine bakterielle Autoaggregation und zeigte keine Interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen. In Serumresistenzversuchen wiesen *nadA*-exprimierende Yersinien einen serumsensitiven Phänotyp auf, während die NadA-YadA-Hybride die YadA-vermittelte Serumresistenz erhöhten. Darüber hinaus konnte eine NadA-abhängige Bindung des Komplementregulators C4BP nachgewiesen werden was eine Komplementinhibition von NadA vermuten lässt. Die Funktionalität der in *Y. enterocolitica* synthetisierten NadA-YadA-Hybride und des vollständigen NadA konnte durch Bindungsversuche mit Chang Zellen bestätigt werden und zeigte sowohl eine NadA-abhängige, als auch eine YadA-abhängige Bindung und Aufnahme von Yersinien in Chang-Zellen. Neben der Interaktion von NadA mit humanen Epithelzellen konnte eine NadA-abhängige Bindung an neutrophilähnliche dHL-60 nachgewiesen werden, die der durch YadA-vermittelten Bindung ähnelt, jedoch zusätzlich eine Internalisierung der Bakterien in dHL-60 Zellen induzierte. Die Untersuchung des in *Y. enterocolitica* synthetisierten NadA und der NadA-YadA-Hybride im Mausinfektionsmodell zeigte eine

Attenuierung der Bakterien nach intraperitonealer und oraler Infektion, so dass eine Beteiligung des NadA bei der Kolonisierung ausgeschlossen werden kann. Insgesamt ermöglichte das *Yersinia* Modellsystem die funktionelle Charakterisierung des *Neisseria meningitidis* Adhäsins NadA und eignet sich somit für die funktionale Präsentation bakterieller Oca-Proteinepitope und deren Untersuchung in *Y. enterocolitica* O:8. In einem zweiten Teil der Arbeit erfolgte die Identifizierung potentieller NadA-spezifischer Wirtszellrezeptoren. Durch die Verwendung von rekombinantem NadA₂₄₋₂₁₀ Protein und murinen $\beta 1$ Intergrin-exprimierenden Zellen konnte eine Beteiligung von humanen und murinen $\beta 1$ Integrinen als mögliche Rezeptoren für NadA nachgewiesen werden, während eine Beteiligung von CEACAMs als potentielle Rezeptoren ausgeschlossen werden konnten. Far Westernblotanalysen und Inhibitionsstudien demonstrierten die direkte Bindung von NadA an die β -Untereinheit von $\beta 1$ und $\beta 3$ Integrinen. Mit Hilfe des *Yersinia* Modellsystems konnte eine durch NadA-vermittelte $\beta 1$ Integrin-abhängige Bindung und Internalisierung von Yersinien in $\beta 1$ Integrin-positive Zellen nachgewiesen werden, die Ähnlichkeiten zum *Yersinia* Invasin aufweist. Das *Yersinia* Modellsystem lieferte somit neue Einblicke in die Interaktion von NadA mit Epithel- und Immunzellen, in die Interaktion mit Faktoren des Komplementsystems, sowie in die Rolle von NadA bei der Mausvirulenz. Zusätzlich konnte eine spezifische Interaktion von NadA mit $\beta 1$ und $\beta 3$ Integrinen nachgewiesen werden. Somit ist NadA das erste Oca-Proteinmitglied das mit $\beta 1$ und $\beta 3$ Integrinen interagiert, die vermutlich als Wirtszellrezeptoren für *nadA*-exprimierende Meningokokken fungieren.

6 Summary

Neisseria meningitidis is a facultative-pathogenic Gram-negative bacterium which is endowed with a set of adhesins allowing colonization of the human upper respiratory tract. The *Neisseria meningitidis* adhesin NadA is closely related to the *Yersinia* adhesin YadA, the prototype of the oligomeric coiled-coil adhesin (Oca) family. The YadA-homologous NadA is present in about 50 % of meningococci isolates and was shown to be involved in cell adhesion, invasion and induction of proinflammatory cytokines. Due to the enormous diversity of neisserial cell adhesins the analysis of the specific contribution of NadA in meningococcal host interactions is extremely complicated.

Therefore we used *Y. enterocolitica* as toolbox carrier to study the role of NadA in host cell interaction, prevention of complement lysis, pathogenesis in the mouse infection model as well as identification of potential NadA-specific host cell receptors. *Y. enterocolitica* produced NadA in its trimeric form on the bacterial surface and the YadA stalk and membrane anchor domain could successfully be used as translocator for the NadA head domain to the outer membrane of *Y. enterocolitica*. In contrast to YadA, NadA did not confer bacterial autoaggregation and serum resistance, as well as binding to extracellular matrix proteins, whereas the NadA-YadA-hybrids increased the YadA-mediated serum resistance significantly. Although full-length NadA showed a serum sensitive phenotype in human serum, it was shown to bind the complement regulatory protein C4BP and revealed therefore a potential involvement of NadA in the complement system. Proper presentation of functional NadA and NadA-YadA-hybrids in *Y. enterocolitica* could additionally be verified by adherence assays with human Chang cells, revealing a NadA- and YadA-mediated binding and internalization of bacteria into Chang cells. In addition to interaction of NadA with human epithelial cells, we could demonstrate a NadA-dependent binding of *Yersinia* and subsequent internalization of bacteria into dHL-60 cells, which is similar to the YadA-mediated binding to dHL-60 cells. Intraperitoneally and perorally infected mice were analyzed for bacterial colonization and demonstrated attenuated *nadA*- and *nadA-yadA*-expressing *Yersinia*, leading to the assumption that NadA is unlikely involved in mouse pathogenicity. Altogether the *Yersinia* toolbox system could successfully be applied for functional characterization of the *Neisseria meningitidis* adhesin NadA and is therefore useful for presentation of functional Oca-protein epitopes on the bacterial surface of *Y. enterocolitica* O:8. The second part of this work dealt with the identification of putative NadA-specific host

cell receptors. Using recombinant NadA₂₄₋₂₁₀ protein and human and murine β 1 integrin expressing cells we could demonstrate the role of the β 1 integrin subunit as putative receptor for NadA and exclude interaction with CEACAMs. Far Westernblots and inhibition assays demonstrated direct and specific interaction of NadA₂₄₋₂₁₀ with the beta subunit of human β 1 and β 3 integrins. By using the *Yersinia* toolbox system a NadA-mediated β 1 integrin dependent adherence with subsequent internalization of yersiniae by β 1 integrin-positive cells could be demonstrated which resembles the invasin-mediated interaction with β 1 integrins. Hence the *Yersinia* toolbox provided novel insights in interaction of NadA with epithelial and immune cells, with complement proteins, its role in mouse virulence and revealed for the first time that NadA interacts with β 1 and β 3 integrins. Thus, NadA is the first adhesin of the Oca-family which is recognized directly by the β 1 and β 3 integrin subunit. Therefore β 1 and β 3 integrins might function as host cell receptor for *N. meningitidis* expressing *nadA*.

7 Literaturverzeichnis

Abdallah, A. M., Gey van Pittius, N. C., Champion, P. A., Cox, J., Luirink, J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. *et al.* (2007) Type VII secretion--*mycobacteria* show the way. *Nat Rev Microbiol* **5**: 883-891.

Achtman, M., Zurth, K., Morelli, G., Torrea, G., Guiyoule, A., and Carniel, E. (1999) *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14043-14048.

Ackermann, N., Tiller, M., Anding, G., Roggenkamp, A., and Heesemann, J. (2008) Contribution of trimeric autotransporter C-terminal domains of oligomeric coiled-coil adhesin (Oca) family members YadA, UspA1, EibA, and Hia to translocation of the YadA passenger domain and virulence of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* **190**: 5031-5043.

Aili, M., Isaksson, E. L., Hallberg, B., Wolf-Watz, H., and Rosqvist, R. (2006) Functional analysis of the YopE GTPase-activating protein (GAP) activity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Cell Microbiol* **8**: 1020-1033.

Aleksic, S., Bockemuhl, J., and Wuthe, H. H. (1995) Epidemiology of *Y. pseudotuberculosis* in Germany, 1983-1993. *Contrib Microbiol Immunol* **13**: 55-58.

Andersson, K., Carballeira, N., Magnusson, K. E., Persson, C., Stendahl, O., Wolf-Watz, H. *et al.* (1996) YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signalling associated with phagocytosis. *Mol Microbiol* **20**: 1057-1069.

Andor, A., Trulzsch, K., Essler, M., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Heesemann, J. *et al.* (2001) YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol* **3**: 301-310.

Askari, J. A., Buckley, P. A., Mould, A. P., and Humphries, M. J. (2009) Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci* **122**: 165-170.

Balligand, G., Laroche, Y., and Cornelis, G. (1985) Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. *Infect Immun* **48**: 782-786.

Barenkamp, S. J. and St Geme JW (1996) Identification of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by non-typable *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* **19**: 1215-1223.

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**: 131-139.

Bazzoni, G., Shih, D. T., Buck, C. A., and Hemler, M. E. (1995) Monoclonal antibody 9EG7 defines a novel beta 1 integrin epitope induced by soluble ligand and manganese, but inhibited by calcium. *J Biol Chem* **270**: 25570-25577.

- Berman, A. E., Kozlova, N. I., and Morozevich, G. E. (2003) Integrins: structure and signaling. *Biochemistry (Mosc)* **68**: 1284-1299.
- Bernardini, G., Braconi, D., and Santucci, A. (2007) The analysis of *Neisseria meningitidis* proteomes: Reference maps and their applications. *Proteomics* **7**: 2933-2946.
- Bhattacharjee, A. K. and Jennings, H. J. (1976) Determination of the linkages in some methylated, sialic acid-containing, meningococcal polysaccharides by mass spectrometry. *Carbohydr Res* **51**: 253-261.
- Biedzka-Sarek, M., Jarva, H., Hyytiainen, H., Meri, S., and Skurnik, M. (2008) Characterization of complement factor H binding to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect Immun* **76**: 4100-4109.
- Biedzka-Sarek, M., Venho, R., and Skurnik, M. (2005) Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. *Infect Immun* **73**: 2232-2244.
- Bishop, N. A., Welch, T. R., and Beischel, L. S. (1990) C4B deficiency: a risk factor for bacteremia with encapsulated organisms. *J Infect Dis* **162**: 248-250.
- Black, D. S., Montagna, L. G., Zitsmann, S., and Bliska, J. B. (1998) Identification of an amino-terminal substrate-binding domain in the *Yersinia* tyrosine phosphatase that is required for efficient recognition of focal adhesion targets. *Mol Microbiol* **29**: 1263-1274.
- Black, R. E., Jackson, R. J., Tsai, T., Medvesky, M., Shayegani, M., Feeley, J. C. *et al.* (1978) Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *N Engl J Med* **298**: 76-79.
- Bliska, J. B. and Black, D. S. (1995) Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. *Infect Immun* **63**: 681-685.
- Bliska, J. B., Copass, M. C., and Falkow, S. (1993) The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells. *Infect Immun* **61**: 3914-3921.
- Bliska, J. B. and Falkow, S. (1992) Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3561-3565.
- Bockemuhl, J. and Roggentin, P. (2004) Intestinal yersiniosis. Clinical importance, epidemiology, diagnosis, and prevention. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **47**: 685-691.
- Bockemuhl, J., Wong, J. D., and . (2003) *Yersinia*. In *In Manual of Clinical Microbiology*. Murray P.R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, M. C., and Tenover, R. H. (ed.) pp. 672-683.

- Bolin, I., Norlander, L., and Wolf-Watz, H. (1982) Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun* **37**: 506-512.
- 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*. *Infect Immun* **65**: 2353-2361.
- Bottone, E. J. (1997) *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev* **10**: 257-276.
- Bukholm, G., Kapperud, G., and Skurnik, M. (1990) Genetic evidence that the *yopA* gene-encoded *Yersinia* outer membrane protein Yop1 mediates inhibition of the anti-invasive effect of interferon. *Infect Immun* **58**: 2245-2251.
- Capecchi, B., du-Bobie, J., Di, M. F., Ciucchi, L., Masignani, V., Taddei, A. *et al.* (2005) *Neisseria meningitidis* NadA is a new invasin which promotes bacterial adhesion to and penetration into human epithelial cells. *Mol Microbiol* **55**: 687-698.
- Caugant, D. A., Froholm, L. O., Bovre, K., Holten, E., Frasch, C. E., Mocca, L. F. *et al.* (1986) Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 4927-4931.
- Chang, A. C. and Cohen, S. N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**: 1141-1156.
- Chen, T. and Gotschlich, E. C. (1996) CGM1a antigen of neutrophils, a receptor of gonococcal opacity proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14851-14856.
- Clantin, B., Delattre, A. S., Rucktooa, P., Saint, N., Meli, A. C., Locht, C. *et al.* (2007) Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science* **317**: 957-961.
- Clark, M. A., Hirst, B. H., and Jepson, M. A. (1998) M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun* **66**: 1237-1243.
- Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E., and Gallo, R. C. (1979) Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *J Exp Med* **149**: 969-974.
- Comanducci, M., Bambini, S., Brunelli, B., du-Bobie, J., Arico, B., Capecchi, B. *et al.* (2002) NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* **195**: 1445-1454.
- Comanducci, M., Bambini, S., Caugant, D. A., Mora, M., Brunelli, B., Capecchi, B. *et al.* (2004) NadA diversity and carriage in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **72**: 4217-4223.

- Conners, R., Hill, D. J., Borodina, E., Agnew, C., Daniell, S. J., Burton, N. M. *et al.* (2008) The *Moraxella* adhesin UspA1 binds to its human CEACAM1 receptor by a deformable trimeric coiled-coil. *EMBO J* **27**: 1779-1789.
- Corbett, A., Exley, R., Bourdoulous, S., and Tang, C. M. (2004) Interactions between *Neisseria meningitidis* and human cells that promote colonisation and disease. *Expert Rev Mol Med* **6**: 1-14.
- Cornelis, G. R. (1998) The *Yersinia* deadly kiss. *J Bacteriol* **180**: 5495-5504.
- Cornelis, G. R. (2002a) The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 742-752.
- Cornelis, G. R. (2002b) The *Yersinia* Ysc-Yop virulence apparatus. *Int J Med Microbiol* **291**: 455-462.
- Cornelis, G. R. (2002c) *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol* **158**: 401-408.
- Cornelis, G. R. (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**: 811-825.
- Cornelis, G. R. and Wolf-Watz, H. (1997) The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **23**: 861-867.
- Corr, S. C., Gahan, C. C., and Hill, C. (2008) M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**: 2-12.
- Cossart, P. and Sansonetti, P. J. (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**: 242-248.
- Cotter, S. E., Surana, N. K., and St, G. J., III (2005) Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **13**: 199-205.
- Coureuil, M., Mikaty, G., Miller, F., Lecuyer, H., Bernard, C., Bourdoulous, S. *et al.* (2009) Meningococcal type IV pili recruit the polarity complex to cross the brain endothelium. *Science* **325**: 83-87.
- Cover, T. L. and Aber, R. C. (1989) *Yersinia enterocolitica*. *N Engl J Med* **321**: 16-24.
- Cunha, C. S., Griffiths, N. J., Murillo, I., and Virji, M. (2009) *Neisseria meningitidis* Opc invasin binds to the cytoskeletal protein alpha-actinin. *Cell Microbiol* **11**: 389-405.
- Dautin, N. and Bernstein, H. D. (2007) Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* **61**: 89-112.
- 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. *Mol Microbiol* **27**: 1203-1212.

- de Vries, F. P., van Der, E. A., van Putten, J. P., and Dankert, J. (1996) Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. *Infect Immun* **64**: 2998-3006.
- 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**: 1555-1564.
- Dehio, C., Gray-Owen, S. D., and Meyer, T. F. (1998a) The role of neisserial Opa proteins in interactions with host cells. *Trends Microbiol* **6**: 489-495.
- Dehio, M., Gomez-Duarte, O. G., Dehio, C., and Meyer, T. F. (1998b) Vitronectin-dependent invasion of epithelial cells by *Neisseria gonorrhoeae* involves alpha(v) integrin receptors. *FEBS Lett* **424**: 84-88.
- Delor, I. and Cornelis, G. R. (1992) Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect Immun* **60**: 4269-4277.
- Delor, I., Kaeckenbeeck, A., Wauters, G., and Cornelis, G. R. (1990) Nucleotide sequence of yst, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic *Yersinia*e. *Infect Immun* **58**: 2983-2988.
- Dersch, P. and Isberg, R. R. (2000) An immunoglobulin superfamily-like domain unique to the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein is required for stimulation of bacterial uptake via integrin receptors. *Infect Immun* **68**: 2930-2938.
- DeVoe, I. W. (1982) The meningococcus and mechanisms of pathogenicity. *Microbiol Rev* **46**: 162-190.
- Eitel, J. and Dersch, P. (2002) The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasin is repressed. *Infect Immun* **70**: 4880-4891.
- Eitel, J., Heise, T., Thiesen, U., and Dersch, P. (2005) Cell invasion and IL-8 production pathways initiated by YadA of *Yersinia pseudotuberculosis* require common signalling molecules (FAK, c-Src, Ras) and distinct cell factors. *Cell Microbiol* **7**: 63-77.
- El Tahir, Y. and Skurnik, M. (2001) YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int J Med Microbiol* **291**: 209-218.
- Elias, J. and Vogel, U. (2007) IS1301 fingerprint analysis of *Neisseria meningitidis* strains belonging to the ET-15 clone. *J Clin Microbiol* **45**: 159-167.
- Ellison, D. W. and Miller, V. L. (2006) H-NS represses inv transcription in *Yersinia enterocolitica* through competition with RovA and interaction with YmoA. *J Bacteriol* **188**: 5101-5112.
- Emody, L., Heesemann, J., Wolf-Watz, H., Skurnik, M., Kapperud, G., O'Toole, P. *et al.* (1989) Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*:

evidence for *yopA*-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J Bacteriol* **171**: 6674-6679.

Erfurth, S. E., Grobner, S., Kramer, U., Gunst, D. S., Soldanova, I., Schaller, M. *et al.* (2004) *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect Immun* **72**: 7045-7054.

Evdokimov, A. G., Anderson, D. E., Routzahn, K. M., and Waugh, D. S. (2001) Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit. *J Mol Biol* **312**: 807-821.

Exley, R. M., Sim, R., Goodwin, L., Winterbotham, M., Schneider, M. C., Read, R. C. *et al.* (2009) Identification of meningococcal genes necessary for colonization of human upper airway tissue. *Infect Immun* **77**: 45-51.

Finlay, B. B. and Cossart, P. (1997) Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* **276**: 718-725.

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**: 355-357.

Frankel, G., Lider, O., HersHKoviz, R., Mould, A. P., Kachalsky, S. G., Candy, D. C. *et al.* (1996) The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta1 integrins. *J Biol Chem* **271**: 20359-20364.

Franzoso, S., Mazzon, C., Sztukowska, M., Cecchini, P., Kasic, T., Capecchi, B. *et al.* (2008) Human monocytes/macrophages are a target of *Neisseria meningitidis* Adhesin A (NadA). *J Leukoc Biol* **83**: 1100-1110.

Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A., and Korkeala, H. (2006) Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**: 315-329.

Galan, J. E. and Wolf-Watz, H. (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567-573.

Galyov, E. E., Hakansson, S., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H. (1993) A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**: 730-732.

Garrity, G. M., Bell, J. A., and Lilburn, T. G. (2004) Taxonomic outline of the prokaryotes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

Geoffroy, M. C., Floquet, S., Metais, A., Nassif, X., and Pelicic, V. (2003) Large-scale analysis of the meningococcus genome by gene disruption: resistance to complement-mediated lysis. *Genome Res* **13**: 391-398.

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.

- Gigli, I., Fujita, T., and Nussenzweig, V. (1979) Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 6596-6600.
- Gimond, C., van Der, F. A., van, D. S., Brakebusch, C., Kuikman, I., Collard, J. G. *et al.* (1999) Induction of cell scattering by expression of beta1 integrins in beta1-deficient epithelial cells requires activation of members of the rho family of GTPases and downregulation of cadherin and catenin function. *J Cell Biol* **147**: 1325-1340.
- Giuliani, M. M., du-Bobie, J., Comanducci, M., Arico, B., Savino, S., Santini, L. *et al.* (2006) A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10834-10839.
- Gorringe, A. R., Reddin, K. M., Funnell, S. G., Johansson, L., Rytönen, A., and Jonsson, A. B. (2005) Experimental disease models for the assessment of meningococcal vaccines. *Vaccine* **23**: 2214-2217.
- Goure, J., Broz, P., Attree, O., Cornelis, G. R., and Attree, I. (2005) Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *J Infect Dis* **192**: 218-225.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59-74.
- Granfors, K. (1998) Host-microbe interaction in reactive arthritis: does HLA-B27 have a direct effect? *J Rheumatol* **25**: 1659-1661.
- Grassl, G. A., Kracht, M., Wiedemann, A., Hoffmann, E., Aepfelbacher, M., von Eichel-Streiber, C. *et al.* (2003) Activation of NF-kappaB and IL-8 by *Yersinia enterocolitica* invasin protein is conferred by engagement of Rac1 and MAP kinase cascades. *Cell Microbiol* **5**: 957-971.
- Gray-Owen, S. D., Dehio, C., Haude, A., Grunert, F., and Meyer, T. F. (1997) CD66 carcinoembryonic antigens mediate interactions between Opa-expressing *Neisseria gonorrhoeae* and human polymorphonuclear phagocytes. *EMBO J* **16**: 3435-3445.
- Gripenberg-Lerche, C., Skurnik, M., and Toivanen, P. (1995) Relation of YadA to arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica*: experimental studies in the rat. *Contrib Microbiol Immunol* **13**: 188-190.
- Grosdent, N., Maridonneau-Parini, I., Sory, M. P., and Cornelis, G. R. (2002) Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* **70**: 4165-4176.
- Grosskinsky, U., Schutz, M., Fritz, M., Schmid, Y., Lamparter, M. C., Szczesny, P. *et al.* (2007) A conserved glycine residue of trimeric autotransporter domains plays a key role in *Yersinia* adhesin A autotransport. *J Bacteriol* **189**: 9011-9019.

- Hadi, H. A., Wooldridge, K. G., Robinson, K., and a'Aldeen, D. A. (2001) Identification and characterization of App: an immunogenic autotransporter protein of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **41**: 611-623.
- Hall, D. E., Reichardt, L. F., Crowley, E., Holley, B., Moezzi, H., Sonnenberg, A. *et al.* (1990) The alpha 1/beta 1 and alpha 6/beta 1 integrin heterodimers mediate cell attachment to distinct sites on laminin. *J Cell Biol* **110**: 2175-2184.
- Hamburger, Z. A., Brown, M. S., Isberg, R. R., and Bjorkman, P. J. (1999) Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. *Science* **286**: 291-295.
- Hammerschmidt, S., Hilse, R., van Putten, J. P., Gerardy-Schahn, R., Unkmeir, A., and Frosch, M. (1996a) Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. *EMBO J* **15**: 192-198.
- Hammerschmidt, S., Muller, A., Sillmann, H., Muhlenhoff, M., Borrow, R., Fox, A. *et al.* (1996b) 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**: 1211-1220.
- Hamzaoui, N., Kerneis, S., Caliot, E., and Pringault, E. (2004) Expression and distribution of beta1 integrins in in vitro-induced M cells: implications for *Yersinia* adhesion to Peyer's patch epithelium. *Cell Microbiol* **6**: 817-828.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Handsfield, H. H. and Schwebke, J. (1990) Trends in sexually transmitted diseases in homosexually active men in King County, Washington, 1980-1990. *Sex Transm Dis* **17**: 211-215.
- Harburger, D. S. and Calderwood, D. A. (2009) Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci* **122**: 159-163.
- Hauck, C. R. and Meyer, T. F. (2003) 'Small' talk: Opa proteins as mediators of Neisseria-host-cell communication. *Curr Opin Microbiol* **6**: 43-49.
- Heesemann, J. and Gaede, K. (1989) Mechanisms involved in the pathogenesis of *Yersinia* infections. *Rheumatol Int* **9**: 213-217.
- Heesemann, J., Keller, C., Morawa, R., Schmidt, N., Siemens, H. J., and Laufs, R. (1983) Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J Infect Dis* **147**: 107-115.
- Heesemann, J. and Laufs, R. (1985) Double immunofluorescence microscopic technique for accurate differentiation of extracellularly and intracellularly located bacteria in cell culture. *J Clin Microbiol* **22**: 168-175.
- Heesemann, J., Sing, A., and Trulzsch, K. (2006) *Yersinia's* stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Curr Opin Microbiol* **9**: 55-61.

- Heise, T. and Dersch, P. (2006) Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3375-3380.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C., and a'Aldeen, D. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 692-744.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., and Nataro, J. P. (1998) The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **6**: 370-378.
- Heritage, P. L., Underdown, B. J., Arsenault, A. L., Snider, D. P., and McDermott, M. R. (1997) Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. *Am J Respir Crit Care Med* **156**: 1256-1262.
- Heroven, A. K. and Dersch, P. (2006) RovM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene *rovA*, controls cell invasion, virulence and motility of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **62**: 1469-1483.
- 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**: 117-129.
- Hoffmann, R., van, E. K., Trulzsch, K., and Heesemann, J. (2004) Transcriptional responses of murine macrophages to infection with *Yersinia enterocolitica*. *Cell Microbiol* **6**: 377-390.
- Hoiczky, E. and Blobel, G. (2001) Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4669-4674.
- 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**: 5989-5999.
- Holmgren, A., Kuehn, M. J., Branden, C. I., and Hultgren, S. J. (1992) Conserved immunoglobulin-like features in a family of periplasmic pilus chaperones in bacteria. *EMBO J* **11**: 1617-1622.
- Humphries, M. J. (2000) Integrin structure. *Biochem Soc Trans* **28**: 311-339.
- Iriarte, M., Vanooteghem, J. C., Delor, I., Diaz, R., Knutton, S., and Cornelis, G. R. (1993a) The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **9**: 507-520.
- Iriarte, M., Vanooteghem, J. C., Delor, I., Diaz, R., Knutton, S., and Cornelis, G. R. (1993b) The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **9**: 507-520.
- Isberg, R. R. and Barnes, P. (2000) Border patrols and secret passageways across the intestinal epithelium. *Trends Microbiol* **8**: 291-293.

- Isberg, R. R. and Leong, J. M. (1990) Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* **60**: 861-871.
- Itoh, K., Okubo, K., Utiyama, H., Hirano, T., Yoshii, J., and Matsubara, K. (1998) Expression profile of active genes in granulocytes. *Blood* **92**: 1432-1441.
- Jackson, M. W. and Plano, G. V. (2000) Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiol Lett* **186**: 85-90.
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R., and Coutte, L. (2004) Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 235-257.
- Juris, S. J., Rudolph, A. E., Huddler, D., Orth, K., and Dixon, J. E. (2000) A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9431-9436.
- 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*. *Mol Microbiol* **25**: 639-647.
- Kapperud, G., Namork, E., and Skarpeid, H. J. (1985) Temperature-inducible surface fibrillae associated with the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* **47**: 561-566.
- Kinashi, T. (2005) Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **5**: 546-559.
- Kirjavainen, V., Jarva, H., Biedzka-Sarek, M., Blom, A. M., Skurnik, M., and Meri, S. (2008) *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS Pathog* **4**: e1000140.
- Kiyono, H. and Fukuyama, S. (2004) NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* **4**: 699-710.
- Kolb-Maurer, A., Unkmeir, A., Kammerer, U., Hubner, C., Leimbach, T., Stade, A. *et al.* (2001) Interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. *Infect Immun* **69**: 6912-6922.
- Koretke, K. K., Szczesny, P., Gruber, M., and Lupas, A. N. (2006) Model structure of the prototypical non-fimbrial adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica*. *J Struct Biol* **155**: 154-161.
- Kuespert, K. and Hauck, C. R. (2009) Characterizing host receptor recognition by individual bacterial pathogens. *Methods Mol Biol* **470**: 57-65.
- 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. *EMBO J* **12**: 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**: 1319-1334.
- Laarmann, S. and Schmidt, M. A. (2003) The *Escherichia coli* AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. *Microbiology* **149**: 1871-1882.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lahesmaa-Rantala, R., Granfors, K., Kekomaki, R., and Toivanen, A. (1987) Circulating *Yersinia* specific immune complexes after acute yersiniosis: a follow up study of patients with and without reactive arthritis. *Ann Rheum Dis* **46**: 121-126.
- Lambotin, M., Hoffmann, I., Laran-Chich, M. P., Nassif, X., Couraud, P. O., and Bourdoulous, S. (2005) Invasion of endothelial cells by *Neisseria meningitidis* requires cortactin recruitment by a phosphoinositide-3-kinase/Rac1 signalling pathway triggered by the lipo-oligosaccharide. *J Cell Sci* **118**: 3805-3816.
- Lambris, J. D., Ricklin, D., and Geisbrecht, B. V. (2008) Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol* **6**: 132-142.
- Leitinger, B., McDowall, A., Stanley, P., and Hogg, N. (2000) The regulation of integrin function by Ca(2+). *Biochim Biophys Acta* **1498**: 91-98.
- Lenter, M., Uhlig, H., Hamann, A., Jenö, P., Imhof, B., and Vestweber, D. (1993) A monoclonal antibody against an activation epitope on mouse integrin chain beta 1 blocks adhesion of lymphocytes to the endothelial integrin alpha 6 beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 9051-9055.
- Leo, J. C., Elovaara, H., Brodsky, B., Skurnik, M., and Goldman, A. (2008) The *Yersinia* adhesin YadA binds to a collagenous triple-helical conformation but without sequence specificity. *Protein Eng Des Sel* **21**: 475-484.
- Leong, J. M., Fournier, R. S., and Isberg, R. R. (1990) Identification of the integrin binding domain of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. *EMBO J* **9**: 1979-1989.
- Leung, K. Y., Reisner, B. S., and Straley, S. C. (1990) YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect Immun* **58**: 3262-3271.
- Lindler, L. E. (2009) Typing methods for the plague pathogen, *Yersinia pestis*. *J AOAC Int* **92**: 1174-1183.
- Lindler, L. E., Klempner, M. S., and Straley, S. C. (1990) *Yersinia pestis* pH 6 antigen: genetic, biochemical, and virulence characterization of a protein involved in the pathogenesis of bubonic plague. *Infect Immun* **58**: 2569-2577.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.

- Luo, B. H., Carman, C. V., and Springer, T. A. (2007) Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* **25**: 619-647.
- Magagnoli, C., Bardotti, A., De, C. G., Galasso, R., Tomei, M., Campa, C. *et al.* (2009) Structural organization of NadADelta(351-405), a recombinant MenB vaccine component, by its physico-chemical characterization at drug substance level. *Vaccine* **27**: 2156-2170.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R. *et al.* (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3140-3145.
- Marmur, J. and Grossman, L. (1961) Ultraviolet light induced linking of deoxyribonucleic acid strands and its reversal by photoreactivating enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **47**: 778-787.
- Martin, P., Makepeace, K., Hill, S. A., Hood, D. W., and Moxon, E. R. (2005) Microsatellite instability regulates transcription factor binding and gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3800-3804.
- Martin, P., Sun, L., Hood, D. W., and Moxon, E. R. (2004) Involvement of genes of genome maintenance in the regulation of phase variation frequencies in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* **150**: 3001-3012.
- Martin, P., van, d., V, Mouchel, N., Jeffries, A. C., Hood, D. W., and Moxon, E. R. (2003) Experimentally revised repertoire of putative contingency loci in *Neisseria meningitidis* strain MC58: evidence for a novel mechanism of phase variation. *Mol Microbiol* **50**: 245-257.
- Mazzon, C., Baldani-Guerra, B., Cecchini, P., Kasic, T., Viola, A., de, B. M. *et al.* (2007) IFN-gamma and R-848 dependent activation of human monocyte-derived dendritic cells by *Neisseria meningitidis* adhesin A. *J Immunol* **179**: 3904-3916.
- McDonald, C., Vacratsis, P. O., Bliska, J. B., and Dixon, J. E. (2003) The *Yersinia* virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol Chem* **278**: 18514-18523.
- McMichael, J. C., Fiske, M. J., Fredenburg, R. A., Chakravarti, D. N., VanDerMeid, K. R., Barniak, V. *et al.* (1998) Isolation and characterization of two proteins from *Moraxella catarrhalis* that bear a common epitope. *Infect Immun* **66**: 4374-4381.
- McNally, A., Cheasty, T., Fearnley, C., Dalziel, R. W., Paiba, G. A., Manning, G. *et al.* (2004) Comparison of the biotypes of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs, cattle and sheep at slaughter and from humans with yersiniosis in Great Britain during 1999-2000. *Lett Appl Microbiol* **39**: 103-108.
- McNeil, G., Virji, M., and Moxon, E. R. (1994) Interactions of *Neisseria meningitidis* with human monocytes. *Microb Pathog* **16**: 153-163.
- 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**: 281-293.

Merz, A. J. and So, M. (2000) Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 423-457.

Mikulskis, A. V., Delor, I., Thi, V. H., and Cornelis, G. R. (1994) Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin Yst gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors. *Mol Microbiol* **14**: 905-915.

Miller, E., Salisbury, D., and Ramsay, M. (2001) Planning, registration, and implementation of an immunisation campaign against meningococcal serogroup C disease in the UK: a success story. *Vaccine* **20 Suppl 1**: S58-S67.

Miller, V. L. and Falkow, S. (1988) Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun* **56**: 1242-1248.

Miller, V. L., Farmer, J. J., III, Hill, W. E., and Falkow, S. (1989) The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect Immun* **57**: 121-131.

Miller, V. L. and Mekalanos, J. J. (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J Bacteriol* **170**: 2575-2583.

Mittal, R., Peak-Chew, S. Y., and McMahon, H. T. (2006) Acetylation of MEK2 and I kappa B kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 18574-18579.

Montagna, L. G., Ivanov, M. I., and Bliska, J. B. (2001) Identification of residues in the N-terminal domain of the *Yersinia* tyrosine phosphatase that are critical for substrate recognition. *J Biol Chem* **276**: 5005-5011.

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**: 3601-3607.

Mukherjee, S., Keitany, G., Li, Y., Wang, Y., Ball, H. L., Goldsmith, E. J. *et al.* (2006) *Yersinia* YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* **312**: 1211-1214.

Nagel, G., Lahrz, A., and Dersch, P. (2001) Environmental control of invasin expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family. *Mol Microbiol* **41**: 1249-1269.

Nassif, X., Beretti, J. L., Lowy, J., Stenberg, P., O'Gaora, P., Pfeifer, J. *et al.* (1994) Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 3769-3773.

Navarro, L., Koller, A., Nordfelth, R., Wolf-Watz, H., Taylor, S., and Dixon, J. E. (2007) Identification of a molecular target for the *Yersinia* protein kinase A. *Mol Cell* **26**: 465-477.

- Nummelin, H., Merckel, M. C., Leo, J. C., Lankinen, H., Skurnik, M., and Goldman, A. (2004) The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *EMBO J* **23**: 701-711.
- Oomen, C. J., van, U. P., Van, G. P., Feijen, M., Tommassen, J., and Gros, P. (2004) Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *EMBO J* **23**: 1257-1266.
- Park, H. S., Francis, K. P., Yu, J., and Cleary, P. P. (2003) Membranous cells in nasal-associated lymphoid tissue: a portal of entry for the respiratory mucosal pathogen group A streptococcus. *J Immunol* **171**: 2532-2537.
- Peak, I. R., Srikhanta, Y., Dieckelmann, M., Moxon, E. R., and Jennings, M. P. (2000) Identification and characterisation of a novel conserved outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **28**: 329-334.
- Pepe, J. C., Badger, J. L., and Miller, V. L. (1994) Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* inv gene. *Mol Microbiol* **11**: 123-135.
- Perry, R. D., Balbo, P. B., Jones, H. A., Fetherston, J. D., and DeMoll, E. (1999) Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiology* **145** (Pt 5): 1181-1190.
- Perry, R. D. and Fetherston, J. D. (1997) *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* **10**: 35-66.
- Persson, C., Carballeira, N., Wolf-Watz, H., and Fallman, M. (1997) The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J* **16**: 2307-2318.
- Pizza, M., Scarlato, V., Masignani, V., Giuliani, M. M., Arico, B., Comanducci, M. *et al.* (2000) Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* **287**: 1816-1820.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., and Meyer, T. F. (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**: 458-462.
- Portnoy, D. A. and Martinez, R. J. (1985) Role of a plasmid in the pathogenicity of *Yersinia* species. *Curr Top Microbiol Immunol* **118**: 29-51.
- Prehna, G., Ivanov, M. I., Bliska, J. B., and Stebbins, C. E. (2006) *Yersinia* virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors. *Cell* **126**: 869-880.
- Prentice, M. B., Cope, D., and Swann, R. A. (1991) The epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infection in the British Isles 1983-1988. *Contrib Microbiol Immunol* **12**: 17-25.
- Prentki, P. and Krisch, H. M. (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303-313.
- Pribila, J. T., Quale, A. C., Mueller, K. L., and Shimizu, Y. (2004) Integrins and T cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* **22**: 157-180.

- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C. *et al.* (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 1528-1533.
- Pytela, R., Pierschbacher, M. D., Argraves, S., Suzuki, S., and Ruoslahti, E. (1987) Arginine-glycine-aspartic acid adhesion receptors. *Methods Enzymol* **144**: 475-489.
- Ram, S., Cox, A. D., Wright, J. C., Vogel, U., Getzlaff, S., Boden, R. *et al.* (2003) Neisserial lipooligosaccharide is a target for complement component C4b. Inner core phosphoethanolamine residues define C4b linkage specificity. *J Biol Chem* **278**: 50853-50862.
- Ram, S., Mackinnon, F. G., Gulati, S., McQuillen, D. P., Vogel, U., Frosch, M. *et al.* (1999) The contrasting mechanisms of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*. *Mol Immunol* **36**: 915-928.
- Rappuoli, R. (2000) Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol* **3**: 445-450.
- Rappuoli, R. and Covacci, A. (2003) Reverse vaccinology and genomics. *Science* **302**: 602.
- Revell, P. A. and Miller, V. L. (2000) A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence. *Mol Microbiol* **35**: 677-685.
- Riess, T., Andersson, S. G., Lupas, A., Schaller, M., Schafer, A., Kyme, P. *et al.* (2004) *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med* **200**: 1267-1278.
- Robert Koch Institut (2009) Invasive Meningokokken-Erkrankungen im Jahr 2008. *Epidemiologisches Bulletin*.
- Robert, V., Volokhina, E. B., Senf, F., Bos, M. P., Van, G. P., and Tommassen, J. (2006) Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biol* **4**: e377.
- 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**: 3735-3744.
- Roggenkamp, A., Neuberger, H. R., Flugel, A., Schmoll, T., and Heesemann, J. (1995) Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol* **16**: 1207-1219.
- Roggenkamp, A., Ruckdeschel, K., Leitritz, L., Schmitt, R., and Heesemann, J. (1996) Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect Immun* **64**: 2506-2514.
- Rosqvist, R., Skurnik, M., and Wolf-Watz, H. (1988) Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. *Nature* **334**: 522-524.

- Ruckdeschel, K., Roggenkamp, A., Schubert, S., and Heesemann, J. (1996) Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun* **64**: 724-733.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Sauvonnet, N., Pradet-Balade, B., Garcia-Sanz, J. A., and Cornelis, G. R. (2002) Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors. *J Biol Chem* **277**: 25133-25142.
- Scarselli, M., Serruto, D., Montanari, P., Capecchi, B., du-Bobie, J., Veggi, D. *et al.* (2006) *Neisseria meningitidis* NhhA is a multifunctional trimeric autotransporter adhesin. *Mol Microbiol* **61**: 631-644.
- Schielke, S., Huebner, C., Spatz, C., Nagele, V., Ackermann, N., Frosch, M. *et al.* (2009) Expression of the meningococcal adhesin NadA is controlled by a transcriptional regulator of the MarR family. *Mol Microbiol* **72**: 1054-1067.
- Schneider, M. C., Exley, R. M., Chan, H., Feavers, I., Kang, Y. H., Sim, R. B. *et al.* (2006) Functional significance of factor H binding to *Neisseria meningitidis*. *J Immunol* **176**: 7566-7575.
- Schubert, S., Rakin, A., and Heesemann, J. (2004) The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol* **294**: 83-94.
- Schulte, R., Grassl, G. A., Preger, S., Fessele, S., Jacobi, C. A., Schaller, M. *et al.* (2000) *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J* **14**: 1471-1484.
- Schulze-Koops, H., Burkhardt, H., Heesemann, J., von der, M. K., and Emmrich, F. (1992) Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic yersiniae to various types of collagen. *Infect Immun* **60**: 2153-2159.
- Schulze-Koops, H., Burkhardt, H., Heesemann, J., von der, M. K., and Emmrich, F. (1995) Characterization of the binding region for the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA on types I and II collagen. *Arthritis Rheum* **38**: 1283-1289.
- Scibelli, A., Roperto, S., Manna, L., Pavone, L. M., Tafuri, S., Della, M. R. *et al.* (2007) Engagement of integrins as a cellular route of invasion by bacterial pathogens. *Vet J* **173**: 482-491.
- Serruto, D., du-Bobie, J., Scarselli, M., Veggi, D., Pizza, M., Rappuoli, R. *et al.* (2003) *Neisseria meningitidis* App, a new adhesin with autocatalytic serine protease activity. *Mol Microbiol* **48**: 323-334.
- Serruto, D., Spadafina, T., Scarselli, M., Bambini, S., Comanducci, M., Hohle, S. *et al.* (2009) HadA is an atypical new multifunctional trimeric coiled-coil adhesin of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius, which promotes entry into host cells. *Cell Microbiol* **11**: 1044-1063.

Shao, F. and Dixon, J. E. (2003) YopT is a cysteine protease cleaving Rho family GTPases. *Adv Exp Med Biol* **529**: 79-84.

Shao, F., Vacratsis, P. O., Bao, Z., Bowers, K. E., Fierke, C. A., and Dixon, J. E. (2003) Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 904-909.

Sim, E., Wood, A. B., Hsiung, L. M., and Sim, R. B. (1981) Pattern of degradation of human complement fragment, C3b. *FEBS Lett* **132**: 55-60.

Sim, R. J., Harrison, M. M., Moxon, E. R., and Tang, C. M. (2000) Underestimation of meningococci in tonsillar tissue by nasopharyngeal swabbing. *Lancet* **356**: 1653-1654.

Simonet, M., Riot, B., Fortineau, N., and Berche, P. (1996) Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. *Infect Immun* **64**: 375-379.

Sjolinder, H., Eriksson, J., Maudsdotter, L., Aro, H., and Jonsson, A. B. (2008) Meningococcal outer membrane protein NhhA is essential for colonization and disease by preventing phagocytosis and complement attack. *Infect Immun* **76**: 5412-5420.

Skurnik, M., Bolin, I., Heikkinen, H., Piha, S., and Wolf-Watz, H. (1984) Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J Bacteriol* **158**: 1033-1036.

Skurnik, M., el, T. Y., Saarinen, M., Jalkanen, S., and Toivanen, P. (1994) YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa. *Infect Immun* **62**: 1252-1261.

Skurnik, M., Peippo, A., and Ervela, E. (2000) Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol Microbiol* **37**: 316-330.

Skurnik, M. and Toivanen, P. (1992) LcrF is the temperature-regulated activator of the *yadA* gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* **174**: 2047-2051.

Skurnik, M. and Wolf-Watz, H. (1989) Analysis of the *yopA* gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol* **3**: 517-529.

St Geme JW, de la Morena, M. L., and Falkow, S. (1994) A *Haemophilus influenzae* IgA protease-like protein promotes intimate interaction with human epithelial cells. *Mol Microbiol* **14**: 217-233.

Stenhouse, M. A. and Milner, L. V. (1982) *Yersinia enterocolitica*. A hazard in blood transfusion. *Transfusion* **22**: 396-398.

Stephens, D. S., Hoffman, L. H., and McGee, Z. A. (1983) Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis* **148**: 369-376.

- Stephens, D. S., Whitney, A. M., Rothbard, J., and Schoolnik, G. K. (1985) Pili of *Neisseria meningitidis*. Analysis of structure and investigation of structural and antigenic relationships to gonococcal pili. *J Exp Med* **161**: 1539-1553.
- Straley, S. C., Plano, G. V., Skrzypek, E., Haddix, P. L., and Fields, K. A. (1993) Regulation by Ca^{2+} in the *Yersinia* low- Ca^{2+} response. *Mol Microbiol* **8**: 1005-1010.
- Suggs, S. V., Wallace, R. B., Hirose, T., Kawashima, E. H., and Itakura, K. (1981) Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 6613-6617.
- Surana, N. K., Cutter, D., Barenkamp, S. J., and St, G. J., III (2004) The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain. *J Biol Chem* **279**: 14679-14685.
- Swartley, J. S., Ahn, J. H., Liu, L. J., Kahler, C. M., and Stephens, D. S. (1996) Expression of sialic acid and polysialic acid in serogroup B *Neisseria meningitidis*: divergent transcription of biosynthesis and transport operons through a common promoter region. *J Bacteriol* **178**: 4052-4059.
- Szczesny, P. and Lupas, A. (2008) Domain annotation of trimeric autotransporter adhesins--daTAA. *Bioinformatics* **24**: 1251-1256.
- Tahir, Y. E., Kuusela, P., and Skurnik, M. (2000) Functional mapping of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. Identification Of eight NSV. *Mol Microbiol* **37**: 192-206.
- Takada, Y. and Puzon, W. (1993) Identification of a regulatory region of integrin beta 1 subunit using activating and inhibiting antibodies. *J Biol Chem* **268**: 17597-17601.
- Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. (2007) The integrins. *Genome Biol* **8**: 215.
- Takao, T., Tominaga, N., Shimonishi, Y., Hara, S., Inoue, T., and Miyama, A. (1984) Primary structure of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. *Biochem Biophys Res Commun* **125**: 845-851.
- Takao, T., Tominaga, N., Yoshimura, S., Shimonishi, Y., Hara, S., Inoue, T. *et al.* (1985) Isolation, primary structure and synthesis of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. *Eur J Biochem* **152**: 199-206.
- Tamm, A., Tarkkanen, A. M., Korhonen, T. K., Kuusela, P., Toivanen, P., and Skurnik, M. (1993) Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **10**: 995-1011.
- Tauxe, R. V., Vandepitte, J., Wauters, G., Martin, S. M., Goossens, V., De, M. P. *et al.* (1987) *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. *Lancet* **1**: 1129-1132.
- Tettelin, H., Saunders, N. J., Heidelberg, J., Jeffries, A. C., Nelson, K. E., Eisen, J. A. *et al.* (2000) Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* **287**: 1809-1815.

Thibodeau, V., Frost, E. H., Chenier, S., and Quessy, S. (1999) Presence of *Yersinia enterocolitica* in tissues of orally-inoculated pigs and the tonsils and feces of pigs at slaughter. *Can J Vet Res* **63**: 96-100.

Trotter, C. L., Andrews, N. J., Kaczmarek, E. B., Miller, E., and Ramsay, M. E. (2004) Effectiveness of meningococcal serogroup C conjugate vaccine 4 years after introduction. *Lancet* **364**: 365-367.

Tsubokura, M., Otsuki, K., Sato, K., Tanaka, M., Hongo, T., Fukushima, H. *et al.* (1989) Special features of distribution of *Yersinia pseudotuberculosis* in Japan. *J Clin Microbiol* **27**: 790-791.

Turner, D. P., Marietou, A. G., Johnston, L., Ho, K. K., Rogers, A. J., Wooldridge, K. G. *et al.* (2006) Characterization of MspA, an immunogenic autotransporter protein that mediates adhesion to epithelial and endothelial cells in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **74**: 2957-2964.

Tzeng, Y. L. and Stephens, D. S. (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microbes Infect* **2**: 687-700.

Unkmeir, A., Kammerer, U., Stade, A., Hubner, C., Haller, S., Kolb-Maurer, A. *et al.* (2002a) Lipooligosaccharide and polysaccharide capsule: virulence factors of *Neisseria meningitidis* that determine meningococcal interaction with human dendritic cells. *Infect Immun* **70**: 2454-2462.

Unkmeir, A., Latsch, K., Dietrich, G., Wintermeyer, E., Schinke, B., Schwender, S. *et al.* (2002b) Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol Microbiol* **46**: 933-946.

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. *Infect Immun* **59**: 2963-2971.

van Putten, J. P., Grassme, H. U., Robertson, B. D., and Schwan, E. T. (1995) Function of lipopolysaccharide in the invasion of *Neisseria gonorrhoeae* into human mucosal cells. *Prog Clin Biol Res* **392**: 49-58.

Veiga, E., Sugawara, E., Nikaido, H., De, L., V, and Fernandez, L. A. (2002) Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. *EMBO J* **21**: 2122-2131.

Viboud, G. I. and Bliska, J. B. (2005) *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **59**: 69-89.

Viboud, G. I., Mejia, E., and Bliska, J. B. (2006) Comparison of YopE and YopT activities in counteracting host signalling responses to *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Cell Microbiol* **8**: 1504-1515.

Virji, M. (2009) Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nat Rev Microbiol* **7**: 274-286.

- Virji, M., Evans, D., Hadfield, A., Grunert, F., Teixeira, A. M., and Watt, S. M. (1999) Critical determinants of host receptor targeting by *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: identification of Opa adhesin topes on the N-domain of CD66 molecules. *Mol Microbiol* **34**: 538-551.
- Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D. J., and Watt, S. M. (1996a) Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic neisseriae. *Mol Microbiol* **22**: 941-950.
- 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. *Mol Microbiol* **14**: 173-184.
- Virji, M., Saunders, J. R., Sims, G., Makepeace, K., Maskell, D., and Ferguson, D. J. (1993) Pilus-facilitated adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells: modulation of adherence phenotype occurs concurrently with changes in primary amino acid sequence and the glycosylation status of pilin. *Mol Microbiol* **10**: 1013-1028.
- Virji, M., Watt, S. M., Barker, S., Makepeace, K., and Doyonnas, R. (1996b) The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **22**: 929-939.
- Vogel, U. and Frosch, M. (1999) Mechanisms of neisserial serum resistance. *Mol Microbiol* **32**: 1133-1139.
- Von Loewenich, F. D., Wintermeyer, E., Dumig, M., and Frosch, M. (2001) Analysis of transcriptional control mechanisms of capsule expression in *Neisseria meningitidis*. *Int J Med Microbiol* **291**: 361-369.
- Voulhoux, R., Bos, M. P., Geurtsen, J., Mols, M., and Tommassen, J. (2003) Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* **299**: 262-265.
- Voulhoux, R. and Tommassen, J. (2004) Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly. *Res Microbiol* **155**: 129-135.
- Wachtel, M. R. and Miller, V. L. (1995) *In vitro* and *in vivo* characterization of an *ail* mutant of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **63**: 2541-2548.
- Wall, D. and Kaiser, D. (1999) Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* **32**: 1-10.
- Wattiau, P. and Cornelis, G. R. (1994) Identification of DNA sequences recognized by VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia yop* regulon. *J Bacteriol* **176**: 3878-3884.
- Wauters, G., Kandolo, K., and Janssens, M. (1987) Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **9**: 14-21.
- Weber, K. and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**: 4406-4412.

Werb, Z., Tremble, P. M., Behrendtsen, O., Crowley, E., and Damsky, C. H. (1989) Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J Cell Biol* **109**: 877-889.

Whaley, K. and Ruddy, S. (1976) Modulation of C3b hemolytic activity by a plasma protein distinct from C3b inactivator. *Science* **193**: 1011-1013.

Wollmann, P., Zeth, K., Lupas, A. N., and Linke, D. (2006) Purification of the YadA membrane anchor for secondary structure analysis and crystallization. *Int J Biol Macromol* **39**: 3-9.

Wong, K. W. and Isberg, R. R. (2005) Emerging views on integrin signaling via Rac1 during invasin-promoted bacterial uptake. *Curr Opin Microbiol* **8**: 4-9.

Wong, S. C. and Kilbourne, E. D. (1961) Changing viral susceptibility of a human cell line in continuous cultivation. I. Production of infective virus in a variant of the Chang conjunctival cell following infection with swine or N-WS influenza viruses. *J Exp Med* **113**: 95-110.

Wood, W. B. (1966) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J Mol Biol* **16**: 118-133.

Wren, B. W. (2003) The yersiniae--a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* **1**: 55-64.

Wu, Y., Li, Q., and Chen, X. Z. (2007) Detecting protein-protein interactions by Far western blotting. *Nat Protoc* **2**: 3278-3284.

Young, V. B., Miller, V. L., Falkow, S., and Schoolnik, G. K. (1990) Sequence, localization and function of the invasin protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **4**: 1119-1128.

Zarantonelli, M. L., Szatanik, M., Giorgini, D., Hong, E., Huerre, M., Guillou, F. *et al.* (2007) Transgenic mice expressing human transferrin as a model for meningococcal infection. *Infect Immun* **75**: 5609-5614.

Zumbihl, R., Aepfelbacher, M., Andor, A., Jacobi, C. A., Ruckdeschel, K., Rouot, B. *et al.* (1999) The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J Biol Chem* **274**: 29289-29293.

8 Anhang

8.1 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max von Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München im Zeitraum von März 2006 bis Dezember 2009 angefertigt.

Abschließend möchte ich mich bei all denen bedanken, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer danke ich für die Möglichkeit eine medizinisch-mikrobiologische Doktorarbeit unter seiner Obhut durchführen zu können, für die externe Betreuung und das große Interesse an meiner Arbeit.

Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Max von Pettenkofer-Institut durchzuführen, für die interessante Aufgabenstellung, die engagierte Betreuung, die stetige Diskussionsbereitschaft und für jede Menge Ideen und Anregungen.

Dr. med. Nikolaus Ackermann danke ich für die Betreuung, für die Offenheit gegenüber jeder neuen Idee und für die Diskussionen, die zum Vollenden dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei allen, die mir Forschungsmaterial zur Verfügung gestellt haben:

Prof. Dr. Christof Hauck danke ich für die Bereitstellung von Zellkulturüberständen GFP-markierter CEACAMs. Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann danke ich für verschiedener CEACAM-Plasmide. Prof. Dr. Reinhard Fässler danke ich für die Zelllinie GE-11, GE-11- β 1, 2-4, und 2-4-8. PD. Dr. Oliver Kurzai, Prof. Dr. Matthias Frosch und Prof. Dr. Ulrich Vogel danke ich für die Bereitstellung verschiedener *Neisseria* Stämme.

Ich bedanke mich insbesondere bei Gisela Anding für ihre Hilfsbereitschaft und Anregungen im Laboralltag.

Besonders danke ich meinen Kollegen aus dem „Büro 327“, Julia Niefnecker, Beate Czech, Christoph Guggenberger und Stefan Wölke für die herzliche Stimmung und Unterstützung jeder Art. Louisa Jimenez-Soto, Iris Barwig und Xaver Seewald für die vielen Tipps und

Tricks beim Arbeiten mit Integrinen. Nadja Noske für fachliche Diskussionen, moralische Unterstützung und viele lustige Abende.

Ich danke den „Murnauern“ und „(Ex)-Freisingern“ für viele schöne Stunden außerhalb des Labors.

Mein tiefer Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern, und natürlich Ralph, die mich immer bestärkt und mit voller Überzeugung unterstützt haben. Merci beaucoup!

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Virginie Nägele
Anschrift: Fraunhoferstraße 27
80469 München
Telefon: 089/37009842
0179/8295704
Email: v.naegle@gmx.net
Geburtsdaten: 28.11.1980 in Starnberg
Staatsangehörigkeit: deutsch und französisch

Hochschullaufbahn

Mär. 2006 - Dez. 2009 **Dissertation** am Max von Pettenkofer-Institut,
Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München
Betreuer Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann/
Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer
Titel: Funktionelle Charakterisierung trimerer
Autotransporteradhäsine von *Neisseria*
meningitidis (NadA) und *Yersinia*
enterocolitica (YadA)

Okt. 2005 **Diplom in Biologie** (DIPL.-BIOL. UNIV.)
Hauptfach Mikrobiologie, Nebenfach Virologie,
Zoologie

Jan. - Okt. 2005 **Diplomarbeit**
An der Technische Universität München (TUM),
Lehrstuhl für Mikrobiologie
Betreuer: Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer
Titel: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zur
Identifizierung von Vertretern des Phylums
Acidobacteria im Ökosystem Boden

Okt. 2000 – Okt. 2005 **Studiengang Diplom-Biologie**
Technische Universität München (TUM)

Schulbildung

Jul. 2000

Abitur

Sept. 1991 – Jul. 2000

St. Irmengard Gymnasium, Garmisch-Partenkirchen

Hilfswissenschaftliche Nebentätigkeiten

Sept. - Nov.2005

studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe Dr.
Wolfgang Ludwig am Lehrstuhl für Mikrobiologie der
TUM

Jul. 2003, Feb. 2004

Betreuung mehrerer mikrobiologischer Praktika für
Biologen

Lehraktivitäten

Betreuung mehrere Praktika für Studenten der
Mikrobiologie am Lehrstuhl für Mikrobiologie der
TUM; 4-wöchige Praktikumsbetreuung eines
Biologiestudenten am Max von Pettenkofer-Institut,
LMU

Sprachen

Deutsch (Muttersprache)

Englisch (sehr gut in Wort und Schrift)

Französisch (sehr gut in Wort und Schrift)

EDV-Kenntnisse

MS-Office (Word, Excel, Power Point)

digitale Bildbearbeitung (Adobe Photoshop)

sicherer Umgang mit biologischen/biochemischen

Datenbanken (BLAST, EMBL)

Interessen

Freunde und Familie

Literatur

Snowboarding

8.3 Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen bereits veröffentlicht:

Artikel

Schielke S, Huebner C, Spatz C, **Nägele V**, Ackermann N, Frosch M, Kurzai O, Schubert-Unkmeir A

Expression of the meningococcal adhesin NadA is controlled by a transcriptional regulator of the MarR family. *Mol Microbiol.* 2009 May;72(4):1054-67

Nägele V, Heesemann J, Schielke S., Jimenez-Soto L., Kurzai O., Ackermann N

Neisseria meningitidis adhesin NadA targets $\beta 1$ integrins: functional similarity to *Yersinia* invasin

In Vorbereitung

Vorträge

Nägele V, Heesemann J, Ackermann N

Identification of human $\beta 1$ integrins as host cell receptors for *the Neisseria meningitidis* adhesin NadA

61. Jahrestagung der DGHM (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie), 20-23 September 2009, Göttingen, Deutschland

Posterpräsentationen

Nägele V, Heesemann J, Ackermann N

The role of YadA as translocator for a functional *Neisseria meningitidis* adhesin (NadA)

1st national conference on *Yersinia*, 25-26 Juli 2008, Braunschweig, Deutschland

Nägele V, Heesemann J, Ackermann N

Yersinia adhesin YadA as translocator for the functional domain of the *Neisseria meningitidis* adhesin NadA

60. Jahrestagung der DGHM (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie), 21-24 September 2008, Dresden, Deutschland