

**Untersuchungen zur Funktion von Heparansulfat-
Proteoglykanen während der Invasion von
Neisseria gonorrhoeae in Epithelzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Elke Freissler

aus Heidenheim

1999

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juli 1999

Dekan:

Prof. Dr. W. Wohlleben

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. T. F. Meyer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. V. Braun

Meinen Eltern

Diese Arbeit wurde vom März 1997 bis März 1999 am Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Infektionsbiologie, in Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. T. F. Meyer und Herrn Dr. C. Dehio angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. T. F. Meyer möchte ich mich für die Bereitstellung des interessanten Themas bedanken.

Herrn Prof. Dr. V. Braun und Herrn Prof. Dr. T. F. Meyer danke ich für die Vertretung meiner Dissertation an der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen.

Herrn Prof. Dr. V. Braun danke ich für die Aufnahme als Stipendiatin in das Graduiertenkolleg Mikrobiologie.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Christoph Dehio für die gute Betreuung und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Dr. G. David und Dr. C. Schächtele danke ich für die Kooperation bei diesem Projekt.

Insbesondere möchte ich mich bedanken bei Dr. Roland Barten für seine vielen Tips und Tricks bei Klonierungen, Anja Haude für die Einführung in die Geheimnisse des Gentamicinassays und ihre Freundschaft, Dr. Christa Lanz für ihre Mithilfe beim Färben und vor allem Zählen von Beads, Willem van den Akker für seine ständige Diskussionsbereitschaft, Carola Scholz für ihre Mithilfe bei Gentamicinassays und den letzten Versuchen, Dr. Michaela Dehio für die gute Zusammenarbeit, Andreas Popp für seine ständige Hilfsbereitschaft, Dr. Jochen Maurer für seine gute Laune und Silvia Dambrowski für unzählige GC-Platten.

Für wertvolle Tips und Hilfen sowie eine tolle Arbeitsatmosphäre im Labor und vieles mehr bedanke ich mich bei Dr. Susanne Beck, Dr. Frank Bauer, Dr. Antonia Costacurta, Anne Entian, Dr. Eckhard Fischer, Christian Gille, Heiko Goller, Macquala Goller, Dr. Oscar Gómez-Duarte, Dr. Scott Gray-Owen, Dr. Christof Hauck, Dirk Hofreuter, Solveig Hirschle, Rose Jäger, Uwe Kagels, Alexander Knorre, Jochen Kocher, Dr. Terry Kwok, Claus Lattemann, Alexander Meyer auf der Heyde, Marlene Meyer, Carmen Müller, Ilka Müller, Petra Münzner, Gertrud Neumann, Miriam Peters, Bozena Pichler-Brand, Nalini Ramarao, Andrea Riehle, Markus Röger, Ralf Schüle, Anja Seubert, Ursula Wiedenig, Dr. Zheng-Xin Yan, Bärbel Zeller und Jürgen Zug.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums und ihre Unterstützung bedanken und bei Andreas Wieszt für so viele Dinge in den letzten drei Jahren.

Teile dieser Arbeit sind oder werden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

- Dehio, C., Freissler, E., Lanz, C., Gómez-Duarte, O.G., David, G., and Meyer, T.F. (1998). Ligation of cell surface heparan sulfate proteoglycans by antibody-coated beads stimulates phagocytic uptake into epithelial cells: a model for cellular invasion by *Neisseria gonorrhoeae*. *Exp.Cell Res.* *242*, 528-539.
- Freissler, E., Meyer auf der Heyde, A., David, G., Meyer, T.F. and Dehio, C. Syndecan-1 and syndecan-4 can mediate the invasion of Opa_{HSPG}-expressing *Neisseria gonorrhoeae* into epithelial cells. Eingereicht.
- Dehio, M., Freissler, E., Preissner, K.T., Meyer, T.F. and Dehio, C. Invasion of Opa₅₀-expressing *Neisseria gonorrhoeae* into endothelial cells is mediated by integrins. In Vorbereitung.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung	3
2.1	Primäre Zelladhäsion über den Pilus	3
2.2	Funktion und Aufbau der Lipooligosaccharide.....	4
2.3	Die Rolle des Porins PorB.....	4
2.4	Opa-vermittelte Zelladhäsion	5
2.4.1	Charakterisierung der Opa-Proteine	5
2.4.2	Interaktionen der Opa-Proteine mit CD66-Molekülen.....	6
2.4.3	Opa/CD66-abhängige Interaktion mit Epithel- und Endothelzellen	7
2.4.4	Interaktion von CD66-spezifischen Opa-Proteinen mit phagozytischen Zellen.....	8
2.4.5	CD66-abhängige, intrazelluläre Signaltransduktion.....	8
2.4.6	Interaktionen der Opa ₅₀ -Proteine mit Heparansulfat-Proteoglykanen	8
2.5	Heparansulfat-Proteoglykane.....	9
2.6	Die Syndekan-Familie	10
2.7	Ziel der Arbeit	14
3	Ergebnisse	15
3.1	Die Bedeutung der HSPGs bei der Phagozytose	15
3.1.1	Invasive <i>N. gonorrhoeae</i> interagieren mit zellulären HSPGs.....	15
3.1.2	Die Adhärenz und Invasion von HSPG-kreuzvernetzenden Beads in Epithelzellen ähnelt der von <i>N. gonorrhoeae</i>	16
3.1.3	Vitronektin erhöht spezifisch die HSPG-abhängige Phagozytose	21
3.1.4	Eine kritische Menge an Ligand-induzierter Kreuzvernetzung von HSPGs ist zur Stimulation der Phagozytose in HeLa Zellen notwendig.....	23
3.1.5	Die HSPG-abhängige Phagozytose wird durch Inhibitoren von Tyrosin Kinasen blockiert	25
3.1.6	Die HSPG-abhängige Phagozytose wird durch PKC-Inhibitoren blockiert.....	26
3.1.7	Die HSPG-abhängige Phagozytose benötigt Aktinpolymerisation	27
3.1.8	Die HSPG-abhängige Phagozytose unterscheidet sich von der Rezeptor-vermittelten Endozytose	29
3.2	Bestimmung der für die Phagozytose verantwortlichen HSPGs.....	30
3.2.1	Einfluß der Syndekan Expression in den parentalen HeLa Zellen auf die Adhärenz und Invasion von <i>N. gonorrhoeae</i>	30

Inhaltsverzeichnis

3.2.2	Klonierung von Syndekan-1 und Syndekan-4 sowie zwei Deletionsmutanten	32
3.2.3	Expression der Konstrukte in HeLa Zellen.....	34
3.2.4	Charakterisierung der transfektierten HeLa Zellen	34
3.2.5	Einfluß der Syndekan Expression in HeLa Zellen auf die Adhärenz und Invasion von <i>N. gonorrhoeae</i>	39
3.2.6	Expression von Syndekan-4 und der Deletionsmutante in K562 und Molt-4 Zellen und Charakterisierung der Zelllinien	45
3.2.7	Einfluß der Syndekan Expression in Molt-4 und K562 Zellen auf die Adhärenz und Invasion von <i>N. gonorrhoeae</i>	48
3.2.8	Invasion von anti-Syndekan Antikörper gekoppelten Latexbeads in Syndekan transfizierte HeLa Zellen	48
3.3	Die Bedeutung der intrazellulären Domäne von Syndekan-4 bei der Invasion von <i>N. gonorrhoeae</i>	51
3.3.1	Klonierung weiterer Syndekan-4 Mutanten	52
3.3.2	Charakterisierung der transfektierten HeLa Zellen	53
3.3.3	Einfluß der Syndekan-4 Deletionsmutanten auf die Adhärenz und Invasion von <i>N. gonorrhoeae</i>	56
3.4	Interaktion von Syndekan-4 und Protein Kinase C während der Infektion durch <i>N. gonorrhoeae</i>	58
3.4.1	Einfluß des Inhibitors Gö 6976 auf die Infektion durch <i>N. gonorrhoeae</i>	58
3.4.2	Reduktion von PKC α Expression durch antisense Oligonukleotide	59
3.4.3	Infektion von Epithelzellen mit <i>N. gonorrhoeae</i> und die Aktivierung der PKC	60
3.4.4	Translokation der PKC vom Zytoplasma an die Membran	61
3.4.5	Bindung der PKC an die intrazelluläre Domäne der verschiedenen Syndekan-4 Konstrukte	62
4	Diskussion	64
4.1	Die Kreuzvernetzung von Heparansulfat-Proteoglykanen führt zur Phagozytose.....	64
4.2	Syndekane vermitteln die Invasion von Opa ₅₀ -exprimierenden Gonokokken in HeLa Zellen.....	66
4.3	Bestandteile des Zytoskeletts sind an der HSPG-abhängigen Phagozytose beteiligt	68
4.4	Die Rolle der PKC bei der HSPG-abhängigen Phagozytose.....	69
4.5	Interaktion von pathogenen Organismen mit Heparansulfaten	71
4.6	Ein Modell der HSPG-abhängigen Phagozytose in HeLa Zellen.....	72

5	Material	74
5.1.	Bakterienstämme	74
5.1.1	<i>Escherichia coli</i> Stämme	74
5.1.2	Neisserien Stämme	74
5.1.3	Zelllinien	75
5.2	Nährmedien	76
5.2.1	Medien und Platten für Bakterien	76
5.2.2	Medien für die Zellkultur	76
5.3	Primer	77
5.4	Plasmide und Vektoren	78
5.5	Puffer und Lösungen für Arbeiten mit DNA	78
5.5.1	Puffer und Lösungen für Plasmidpräparationen	78
5.5.2	Puffer und Lösungen für Agarose Gelelektrophorese von DNA	79
5.5.3	Sonstige Puffer und Lösungen	79
5.5.4	Kits	79
5.6	Enzyme	79
5.7	Puffer und Lösungen für Arbeiten mit Proteinen	80
5.7.1	Puffer und Lösungen für Arbeiten mit Proteoglykanen	80
5.7.2	Puffer für das Arbeiten mit Protein Kinase C (PKC)	80
5.7.3	Puffer und Lösungen für SDS-PAGE	81
5.7.4	Coomassie-Färbung	81
5.7.5	Puffer und Lösungen für Western Blot-Analyse	81
5.7.6	Inhibitoren	81
5.8	Puffer für die Kopplung von Antikörpern an Latexbeads	82
5.9	Puffer und Lösungen für Zellassays	82
5.10	FACS-Analyse	83
5.11	Antikörper und Fluorochrome	83
5.11.1	Primäre Antikörper	83
5.11.2	Fluorochrome	84
5.12	Chemikalien	84
5.13	Geräte und sonstige Materialien	85
5.14	Computer und Software	85
5.14.1	Computer	85
5.14.2	Software	86
6	Methoden	87
6.1.1	Kultur von Bakterien	87
6.1.2	Anzucht von Bakterien	87
6.1.3	Einfrieren von Bakterien	87

Inhaltsverzeichnis

6.2	Arbeiten mit Zellkulturen.....	87
6.2.1	Allgemeines.....	87
6.2.2	Auftauen von Zellen	87
6.2.3	Einfrieren von Zellen	87
6.2.4	Kultivierung von Zellen	88
6.2.5	Behandlung von Deckgläschen.....	88
6.2.6	Trypanblau Färbung.....	88
6.2.7	Transfektionen.....	88
6.2.8	Selektion von Zellen über Magnetbeads.....	89
6.3	Arbeiten mit DNA.....	89
6.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA (Mini-Präp)	89
6.3.2	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> mit Qiagen-Säulen (Midi-Präp).....	89
6.3.3	DNA-Fällung mit Ethanol.....	90
6.3.4	DNA-Fällung mit Isopropanol	90
6.3.5	Analytische Gelelektrophorese von DNA	90
6.3.6	Präparative Gelelektrophorese von DNA	90
6.3.7	Elution der DNA aus Agarose mittels Geneclean-Kit.....	93
6.3.8	Restriktion von DNA	91
6.3.9	Zentrifugationsentsalzung	91
6.3.10	Ligation von DNA-Fragmenten.....	92
6.3.11	Plasmidübertragung in <i>E. coli</i>	92
6.3.12	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	93
6.4	Arbeiten mit Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs).....	93
6.4.1	Vorbereitung des Säulenmaterials	93
6.4.2	Isolierung von Heparansulfat-Proteoglykanen aus kultivierten Zellen	93
6.4.3	Heparitinase-/Chondroitinase ABC-Verdau	94
6.4.4	Immunpräzipitation von Syndekan-4.....	94
6.4.5	Proteinbestimmung (Bradford, 1976).....	95
6.4.6	PKC-Overlay Assay (Hyatt et al., 1990).....	95
6.5	Arbeiten mit Protein Kinase C (PKC)	95
6.5.1	PKC-Isolierung aus verschiedenen Fraktionen (Chun et al., 1996).....	95
6.5.2	PKC Peptid Assay (Chakravarthy et al., 1991)	95
6.5.3	TCA-Fällung	96
6.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).....	96
6.7	Western Blot.....	97
6.8	Proteindetektionen	97
6.8.1	Coomassie-Färbung von Proteingelen.....	97
6.8.2	Spezifische Markierung von Proteinen mit Antikörpern	97

Inhaltsverzeichnis

6.8.3	Proteindetektion durch Chemolumineszenz	97
6.9	Kopplung von Antikörpern an Latexbeads	98
6.10	Zellassays.....	98
6.10.1	Durchführung von <i>in vitro</i> Infektionsexperimenten.....	98
6.10.2	Inhibitionsstudien.....	99
6.10.3	Inkubation von adhärennten Zellen mit Antikörper-gekoppelten Latexbeads	99
6.11	Immunfluoreszenzfärbungen.....	100
6.11.1	Sequentielle Doppelimmunfluoreszenzfärbung von HSPGs und <i>N. gonorrhoeae</i>	100
6.11.2	Immunfluoreszenzfärbung von Antikörper-gekoppelten Latexbeads	100
6.11.3	Quantifizierung von adhärennten und intrazellulären, Antikörper- gekoppelten Latexbeads	101
6.12	Elektronenmikroskopie	101
6.12.1	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	101
6.12.2	Raster-Elektronenmikroskopie (REM).....	101
6.13	FACS-Analyse (Flow Cytometry)	101
6.13.1	Vorbereitung der Proben	101
6.13.2	FACS-Analyse	102
7	Literatur	103
8	Abkürzungen.....	114

1 Zusammenfassung

Neisseria gonorrhoeae ist der Erreger der Gonorrhöe beim Menschen. Er besiedelt eine Vielzahl von unterschiedlichen Habitaten wie die Schleimhäute von Ureter, Cervix oder die Konjunktiva des Auges. Ein erster Kontakt mit den Wirtszellen wird meist über Pili hergestellt. Nach dieser ersten leichten Adhärenz erfolgt eine festere Adhärenz über die "opacity" (Opa)-Proteine der Gonokokken. Von den elf verschiedenen Opa-Proteinen ist das Opa₅₀-Protein in der Lage, die Adhärenz an nicht polarisierte Epithelzellen zu vermitteln.

In einem ersten Projekt wurde untersucht, ob die Adhärenz des Opa₅₀-Proteins an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) ausreicht, um eine Invasion der Gonokokken in nicht polarisierte Epithelzellen zu bewirken. Dazu wurden Latexbeads mit einem Antikörper gegen Heparansulfat-Glukosaminoglykane (HS-GAG) gekoppelt. Über Immunfluoreszenzfärbungen konnte nachgewiesen werden, daß die Beads von den verwendeten Zellen aufgenommen werden. Die Phagozytose erfolgt mit der gleichen Kinetik wie die von Gonokokken in Epithelzellen. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß die Phagozytose der Beads nur erfolgt, wenn es zu einer Kreuzvernetzung der HSPGs kommt. Ebenso ist ein intaktes Zytoskelett notwendig, wie es für die Phagozytose der Gonokokken Voraussetzung ist. Die phagozytische Aufnahme der Beads wird durch Inhibitoren der Protein Kinase C (PKC) gehemmt wie es von Gonokokken bekannt ist. Auch der Effekt der gesteigerten Invasion durch die Zugabe von Vitronektin bzw. Serum kann für die Latexbeads gezeigt werden. Diese Daten weisen darauf hin, daß das etablierte System ein gutes Modell für die Aufnahme von Gonokokken darstellt. Es zeigt außerdem, daß allein eine Kreuzvernetzung der HSPGs zu einer Phagozytose führen kann.

In einem zweiten Projekt wurde untersucht, welche HSPGs für die Phagozytose der Gonokokken von Bedeutung sind. Durch die Klonierung von Syndekan-1 und Syndekan-4 und die Überexpression in HeLa Zellen konnte gezeigt werden, daß die HSPG-abhängige Phagozytose der Gonokokken über diese beiden Syndekane ablaufen kann. Deletionen der intrazellulären Domäne von Syndekan-1 und Syndekan-4 bewirken einen annähernd vollständigen Rückgang der Phagozytose der Gonokokken, was darauf hinweist, daß die intrazelluläre Domäne für die Signaltransduktion von Bedeutung ist.

Um diesen Bereich näher zu charakterisieren, wurden weitere Mutationen in die intrazelluläre Domäne von Syndekan-4 eingefügt und diese Syndekane in HeLa Zellen überexprimiert. Auch diese Zelllinien sind nicht mehr in der Lage, Gonokokken zu phagozytieren. Aufgrund ihrer Position beeinflussen die Deletionen entweder Interaktionen von Syndekan-4 mit zytoskelettalen Bestandteilen oder Interaktionen mit

Zusammenfassung

der Protein Kinase C (PKC) bzw. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), wodurch die Signaltransduktion, die zur Phagozytose der Gonokokken führt, unterbrochen wird.

2 Einleitung

Zu den gram-negativen Diplokokken der Gattung *Neisseria* gehören die humanpathogenen Arten *N. gonorrhoeae* (Gonokokken) und *N. meningitidis* (Meningokokken) sowie die kommensalen Arten *N. cinerea*, *N. mucosa*, *N. lactamica* und *N. sicca*. Die Gonokokken sind die Erreger einer der häufigsten Geschlechtskrankheiten beim Menschen, der Gonorrhöe. Die Übertragung erfolgt hauptsächlich durch Geschlechtsverkehr oder bei der Geburt von der infizierten Mutter auf das Kind. Die Gonokokken besiedeln dabei die Epithelzellen des Gebärmutterhalses (Cervix), des Harnleiters (Urethra) sowie das Bindehautgewebe des Auges (Konjunktiva). Charakteristische Symptome der Gonorrhöe sind ein zähflüssiger, eitriger Ausfluß, der sich aus teilweise lysierten, polymorphonukleären Neutrophilen (PMNs) und Gonokokken zusammensetzt (Salyers and Whitt, 1994). Bei 1 bis 3% der Patienten treten serumresistente Gonokokken in die Blutbahn über und verursachen dort eine systemische Infektion, die zu Arthritis, Endokarditis und Meningitis führen kann (Salyers and Whitt, 1994).

2.1 Primäre Zelladhäsion über den Pilus

Der erste Kontakt zwischen den Gonokokken und den verschiedenen Epithelien der Wirtszelle, z.B. dem Eileiter (McGee et al., 1981), dem Uretergewebe (Mosleh et al., 1997) oder der humanen Cornea (Tjia et al., 1988), wird durch Typ-4 Pili vermittelt. Der Rezeptor der Pili auf den Epithelzellen ist das humanspezifische CD46 Molekül (membrane co-factor protein), das auf fast allen Geweben vorkommt (Källstrom et al., 1997). Allerdings ist noch nicht bekannt, ob CD46 an den Pilus selbst oder an das PilC Adhäsion bindet, ein Protein das mit dem Pilus assoziiert ist.

Das PilC Adhäsion ist an der Spitze des Pilus lokalisiert (Rudel et al., 1995) und wird auch bei der Pilus-Biosynthese benötigt (Jonsson et al., 1991). Außerdem konnte für gereinigtes PilC Protein gezeigt werden, daß es an humane Epithel- und Endothelzellen bindet, wodurch die Pilus-vermittelte, aber nicht die Opa-vermittelte Adhärenz von Gonokokken verhindert wird.

Die Pili sind aus den strukturgebenden Pilin-Untereinheiten (PilE) aufgebaut (Meyer et al., 1984). Durch antigene Variation des Pilins können bis zu zehn Millionen verschiedene Pilinmoleküle durch ein einziges Bakterium gebildet werden. Spontane Variationen des Pilins erfolgen innerhalb weniger Bakteriengenerationen und ermöglichen es dem Erreger, der humoralen Immunantwort des Wirtes zu entgehen. Die Pili-Variation erfolgt durch die *recA*-abhängige, homologe Rekombination von exprimierten Genen (*pilE1* und *pilE2*) mit einer Anzahl von stillen Genkopien (*pilS*)

(Haas and Meyer, 1986; Swanson et al., 1986; Gibbs et al., 1989). Die stillen Genkopien sind über das gesamte Genom verteilt und werden aufgrund fehlender Promotoren und 5'-Leadersequenzen nicht exprimiert (Haas and Meyer, 1986). Die antigene Variation des Pilins erfolgt durch die Rekombination von Teilsequenzen, sogenannten Minikassetten, in den Expressionsort *pilE*.

2.2 Funktion und Aufbau der Lipooligosaccharide

Ein weiterer bakterieller Faktor in der frühen Phase der Infektion von Epithelzellen ist ein kurzes Lipopolysaccharid, dem die O-spezifische Seitenkette fehlt und deshalb als Lipooligosaccharid (LOS) bezeichnet wird (Apicella et al., 1987; Weel et al., 1989). Es ist aus einem hydrophoben Lipid-Rückgrat (Lipid A) sowie variablen, hydrophilen Oligosacchariden aufgebaut, von denen einige den humanen Zellmembran-Glykosphingolipiden ähneln (Mandrell et al., 1992). Auch das LOS unterliegt einer Phasenvariation, die durch Änderungen im Gehalt und der Zusammensetzung der Oligosaccharide erfolgt. Zusätzlich kann das LOS durch Sialysierung des terminalen Galaktoserestes verändert werden (Smith, 1991). Dabei wird der natürliche Sialyldonor Cytidin 5'-Monophospho-N-Acetylneuraminsäure (CAMP-NANA), der im humanen Serum vorkommt, durch die bakterielle, membranassoziierte Sialyltransferase auf das LOS übertragen (Mandrell et al., 1990). In der frühen Infektionsphase sind die Bakterien nur schwach sialysiert und können die Mukosa invadieren. Allerdings werden sie durch das Komplement-System bzw. durch Antikörper erkannt (Moran et al., 1994), da antigene Strukturen wie Porine aufgrund der fehlenden Sialysierung stärker exponiert sind. Durch eine stärkere Sialysierung bieten die Bakterien keine Angriffsfläche für Komplement bzw. Antikörper, zudem sind sie nicht mehr in der Lage, Epithelzellen zu invadieren (van Putten, 1993), weil die Opa-Proteine wahrscheinlich durch die Sialysierung sterisch maskiert sind (Virji et al., 1995b).

2.3 Die Rolle des Porins PorB

Porine sind mit die Hauptbestandteile der äußeren Neisserienmembran. Bis vor kurzem war nur das Porin PorB mit seinen zwei Allelen P.1A und P.1B bekannt (Sandström et al., 1982). Vor kurzem jedoch wurde auch ein PorA Protein entdeckt (Feavers and Maiden, 1998). PorB ist konstitutiv exprimiert und durchläuft, im Gegensatz zu den Opa- und Pili-Proteinen, keine Antigen- oder Phasenvariation. Allgemein dienen Porine als Transportkanäle für Ionen und Nährstoffe (Benz, 1988). Sie können aber auch in Eukaryontenmembranen integrieren (Blake and Gotschlich,

1987; Weel and van Putten, 1991b). Die Funktion der Pore wird durch GTP und ATP reguliert, wenn das Porin in die Zellmembran integriert ist. Die Bindung der Nukleotide an der Innenseite der Zellmembran reguliert die Porengröße, die Ionenselektivität und die Spannungsabhängigkeit (Rudel et al., 1996). In Epithelzellen und phagozytischen Zellen kann durch die Translokation des Porins in die Zellmembran Apoptose induziert werden. Es erfolgt ein rascher Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle sowie die Induktion der Kalzium-abhängigen Cysteinprotease Calpain und anderer Caspase-Proteine (Müller et al., 1999). Die Stimulierung des Ca^{2+} -Einstroms bewirkt möglicherweise eine direkte Aktivierung der Protein Kinase C (PKC), wodurch die Invasion in die Epithelzellen verstärkt wird. Die spezifische Mutation in einer Schleife des PorBs führt zu einem drastischen Rückgang der Opa/Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG)-abhängigen Invasion in Epithelzellen (Bauer et al., 1999).

2.4 Opa-vermittelte Zelladhäsion

2.4.1 Charakterisierung der Opa-Proteine

Der direkte Kontakt der Gonokokken mit der Zelloberfläche erfolgt über die Opa-Proteine. Die Opa-Proteine sind neben den Porinen die Hauptbestandteile der äußeren Membran der Gonokokken. Sie sind aus acht Transmembrandomänen aufgebaut, wobei drei der vier extrazellulären Domänen sehr variabel sind (Bhat et al., 1991). Die elf verschiedenen, variablen *opa* Gene (Bhat et al., 1991) sind über das gesamte Genom von *N. gonorrhoeae* verteilt und werden konstitutiv transkribiert. Ihre Expression wird durch einen Mechanismus kontrolliert, der "slipped strand mispairing" genannt wird (Stern et al., 1986). Jedes Opa-Protein besitzt in der 5'-Region sechs bis 27 Pentamere mit der Nukleotidsequenz CTCTT. Während der Replikation kann es durch den oben erwähnten Mechanismus zur Addition oder Deletion eines Pentamers kommen. Infolgedessen wird das Leseraster für die Translation verändert, welches in zwei von drei Fällen zur Bildung eines unvollständigen und damit nicht funktionellen Opa-Proteins führt (Stern et al., 1986; Murphy et al., 1989). Dadurch können alle Opa-Proteine unabhängig voneinander an- und abgeschaltet werden. Die verschiedenen Opa-Proteine bewirken die Adhärenz und Invasion der Gonokokken an unterschiedliche Zelltypen.

Tabelle 1: Zelluläre Rezeptoren der verschiedenen Opa-Proteine von *N. gonorrhoeae* im Stamm MS11.

opa-Allel	Opa-Protein	zellulärer Rezeptor	Referenz
<i>C30/C50^b</i>	30 (50) ^b	HSPG	(van Putten and Paul, 1995; Chen et al., 1995)
<i>B51</i>	51	CD66e	(Bos et al., 1997; Gray-Owen et al., 1997b)
<i>G52</i>	52	CD66a/c/d/e	(Bos et al., 1997; Gray-Owen et al., 1997b)
<i>A53</i>	53	CD66a	(Bos et al., 1997; Gray-Owen et al., 1997b)
<i>I54</i>	54	CD66a/e	(Bos et al., 1997; Gray-Owen et al., 1997b)
<i>E55</i>	55	CD66e	(Bos et al., 1997; Gray-Owen et al., 1997b)
<i>F56</i>	56	CD66e	(Bos et al., 1997; Gray-Owen et al., 1997b)
<i>K57</i>	57	CD66a/c/d/e	(Bos et al., 1997; Gray-Owen et al., 1997b)
<i>J58</i>	58	CD66a/c/d/e	(Bos et al., 1997; Gray-Owen et al., 1997b)
<i>D59</i>	59	CD66a/e	(Bos et al., 1997; Gray-Owen et al., 1997b)
<i>H60</i>	60	CD66a/c/d/e	(Bos et al., 1997; Gray-Owen et al., 1997b)

^a Die verwendete Nomenklatur ist bei (Malorny et al., 1998) beschrieben und wurde von M. Achtman, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, Deutschland zur Verfügung gestellt. Eine Liste der Nomenklatur für alle bis jetzt beschriebenen *opa*-Allele ist unter <http://novell-ti.rz-berlin.mpg.de> zu finden.

^b *opaC30/Opa30* und *opaC50/Opa50* sind die chromosomalen und rekombinanten Formen der gleichen Allele.

2.4.2 Interaktionen der Opa-Proteine mit CD66-Molekülen

Die meisten Opa-Proteine binden an Rezeptoren der "carcinoembryonic antigens" (CEA) oder CD66-Proteine, die zur Immunglobulinsuperfamilie gehören (Tabelle 1). Die Mitglieder besitzen alle eine konservierte, N-terminale, IgV-ähnliche Domäne. Danach folgen Domänen vom IgC2-Typ, in denen sich die CD66-Moleküle unterscheiden, ebenso wie in ihrer Verankerung in der Zellmembran. Man unterscheidet sieben CD66-Moleküle: CD66a (biliary glycoprotein, BGP), CD66b (CEA gene family member 6, CGM6), CD66c (non-specific cross-reacting antigene, NCA), CD66d (CEA gene family member 1, CGM1) und CD66e (CEA protein). CD66a und CD66d besitzen transmembranäre und intrazelluläre Domänen, während CD66b,

CD66c und CD66e über Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI) in der Membran verankert sind.

Die Rezeptoren CD66a, CD66c, CD66d und CD66e binden ein oder mehrere Opa-Proteine (Tabelle 1) (Chen and Gotschlich, 1996; Gray-Owen et al., 1997b; Virji et al., 1996) und bewirken auch die Aufnahme der Gonokokken in Zellen, während an CD66b kein Opa-Protein bindet (Virji et al., 1996; Gray-Owen et al., 1997a; Bos et al., 1997). Einige Opa-Proteine interagieren sowohl mit CD66-Rezeptoren als auch mit Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs) (de Vries et al., 1998), aber die Aufnahme der Gonokokken erfolgt aber nur über die CD66-Rezeptoren (Kupsch et al., 1993; Weel et al., 1991a; Bos et al., 1997; Gray-Owen et al., 1997b).

Obwohl die CD66-Moleküle stark glykosiliert sind, erfolgt die Bindung der Opa-Proteine nicht über die Karbohydratseitenketten (Bos et al., 1998). Aufgrund von Bindungsstudien mit CD66b/CD66c-Chimären konnte die Bindungsstelle der Opa-Proteine auf die ersten 59 Aminosäuren der N-terminalen Domäne eingegrenzt werden (Popp et al., 1999). Innerhalb dieser Region haben die CD66-Moleküle eine Homologie zwischen 71 und 89% (Thompson et al., 1991).

2.4.3 Opa/CD66-abhängige Interaktion mit Epithel- und Endothelzellen

Primäre Endothelzellen (Huvec) exprimieren normalerweise sehr wenig CD66a. Nach der Stimulation der Zellen mit dem Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNF α) kommt es aber zu einer Hochregulation der Expression (Gray-Owen et al., 1997b). Eine verstärkte Expression von CD66c, CD66d oder CD66e konnte nicht nachgewiesen werden (P. Münzner, S. Gray-Owen, C. Dehio und T.F. Meyer, nicht veröffentlicht). Die verstärkte Expression von CD66a auf Huvecs bewirkt sowohl eine erhöhte Bindung der Gonokokken, die CD66a-spezifische Opa-Proteine exprimieren, als auch ihre Aufnahme in Huvecs.

Außerdem konnte vor kurzem gezeigt werden, daß Gonokokken, die CD66-spezifische Opa-Proteine exprimieren, polarisierte T84 Epithelzellen von der apikalen zur basolateralen Seite durchqueren können. Die transepitheliale Barrierenfunktion wird dabei nicht zerstört (Wang et al., 1998). Die Bakterien sind während der Transmigration durch das Zytoplasma von einer sehr engen phagozytischen Vakuole umgeben. Die Phagozytose erfolgt über einen oder mehrere der CD66a-, CD66c- oder CD66e-Rezeptoren, die nur auf der apikalen Seite des Monolayers exprimiert werden.

2.4.4 Interaktion von CD66-spezifischen Opa-Proteinen mit phagozytischen Zellen

Klinische Proben von Patienten mit Gonorrhöe enthalten normalerweise PMNs, die von Gonokokken invadiert sind. CD66-Moleküle werden auf PMNs nur in geringen Mengen exprimiert. Durch die Degranulation der Zellen kommt es jedoch zur Freisetzung größerer Mengen an CD66-Molekülen aus primären und sekundären Granulas (Ducker and Skubitz, 1992; Kuroki et al., 1995).

Der Kontakt der CD66-Rezeptoren mit den Bakterien führt zu einer Aktivierung der phagozytischen Zellen, wodurch es zu einem "oxidative burst" kommt (Belland et al., 1992). Dieser "oxidative burst" ist allerdings im Vergleich mit dem, der von kommensalen Spezies hervorgerufen wird, gering (Hauck et al., 1997). Wahrscheinlich müssen die CD66-Moleküle für die Auslösung des "oxidative burst" durch die verschiedenen Opa-Proteine auf der Bakterienoberfläche kreuzvernetzt werden (Virji and Heckels, 1986).

2.4.5 CD66-abhängige, intrazelluläre Signaltransduktion

Durch die Adhärenz von Gonokokken an CD66-Moleküle auf Neutrophilen werden die Kinasen Hck und FGR, die zur Src-Familie gehören, aktiviert. Diese Aktivierung ist für die bakterielle Phagozytose notwendig (Hauck et al., 1998). Die Tyrosin Phosphatase-1 (SHP-1), die ebenfalls mit CD66a interagiert, wird durch die Kreuzvernetzung der Rezeptoren aktiviert (C.R. Hauck, E. Gulbins und T.F. Meyer, nicht veröffentlicht). Nachfolgend werden die GTPase Rac1, die p21 aktivierte Protein Kinase (PAK) und die Jun N-terminale Kinase (JNK) stimuliert. Aktiviertes Rac1 bewirkt die Reorganisation der Aktinfilamente, welches eine wichtige Voraussetzung für die Phagozytose der Neisserien ist. Durch Src-Kinase Inhibitoren oder Präinkubation der Zellen mit antisense Oligonukleotiden, welche die Expression von Rac1 herunterregulieren, wird die Aufnahme der Bakterien reduziert (Hauck et al., 1998).

2.4.6 Interaktionen der Opa₅₀-Proteine mit Heparansulfat-Proteoglykanen

Verschiedene Opa-Proteine binden an die oberflächenassoziierten HSPGs der Wirtszellen (Kupsch et al., 1993; van Putten and Paul, 1995; Chen et al., 1995). Allerdings ist das Opa₅₀-Protein das einzige, das auch die Invasion in Epithelzellen vermittelt (Weel et al., 1991a; Makino et al., 1991).

Die Aufnahme der Opa₅₀-exprimierenden Gonokokken erfolgt über mindestens drei verschiedene Wege. Die Invasion in Chang Zellen oder Me-180 Zellen erfolgt

durch die Aktivierung der Phosphatidylcholin-abhängigen Phospholipase C (PC-PLC) und der sauren Sphingomyelinase (ASM). Dadurch kommt es zur Bildung des "second messengers" Diacylglycerol (DAG) sowie von Ceramiden (Grassmé et al., 1997). Die Inhibition der PC-PLC durch den Inhibitor D609 bewirkt einen starken Rückgang der Invasion, während die Adhärenz der Gonokokken an die Zellen nicht beeinflusst wird.

In HeLa Zellen und CHO Zellen gibt es einen alternativen, HSPG-abhängigen Aufnahmeweg, der durch Serum induziert wird. Dabei bindet das extrazelluläre Matrixmolekül Vitronektin sowohl an die Opa₅₀-exprimierenden Gonokokken (Duensing and van Putten, 1997; Gómez-Duarte et al., 1997) als auch über seine Heparansulfat-Bindungsstelle an die HSPGs. Die Aufnahme der Gonokokken in die Zellen erfolgt über die spezifischen Rezeptoren von Vitronektin, die $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Integrine. Die Invasion kann sowohl durch die entsprechenden blockierenden Antikörper der beiden Integrine als auch durch Inhibitoren der Protein Kinase C (PKC) gehemmt werden (Dehio et al., 1998). Neben Vitronektin wird auch Fibronektin von Opa₅₀-exprimierenden Gonokokken gebunden. Für Hep-2 Zellen wurde gezeigt, daß Fibronektin die $\alpha_5\beta_1$ Integrine mit den HSPG/Opa-Komplexen vernetzt und so zur Aufnahme der Gonokokken führt (van Putten et al., 1998). Dieser zweite Aufnahmeweg ist unabhängig von einer Aktivierung der ASM (Grassmé et al., 1997).

Außerdem binden Opa₅₀-exprimierende Gonokokken sehr stark an Endothelzellen. Die Aufnahme in die Zellen erfolgt aber nur in Anwesenheit von Vitronektin oder Fibronektin (M. Dehio, K.T. Preissner, T.F. Meyer und C. Dehio, nicht veröffentlicht). Aufgrund der Bindung dieser Faktoren an die Gonokokken kommt es zu einer Integrin-abhängigen Invasion in die Zellen. Auf diesem Weg gelangen die Gonokokken möglicherweise in den Blutstrom oder von dort in die darunterliegenden, nicht-mucosalen Gewebe. Potentielle Zielzellen könnten Fibroblasten sein (Grassmé et al., 1997).

2.5 Heparansulfat-Proteoglykane

HSPGs sind eine Gruppe von Proteinen, die mindestens eine kovalent gebundene Heparansulfat (HS)- Seitenkette besitzen. Die Grundstruktur der unverzweigten HS-Seitenketten ist eine abwechselnde Folge von Glukuronsäure und N-Acetylglucosamin, die $\beta_{1,4}$ - und $\alpha_{1,4}$ -glykosidisch verbunden sind. Das Polymer wird an verschiedenen Stellen durch Sulfatierung und Epimerisierung modifiziert. Aufgrund der Variabilität dieser Modifikationen entstehen ungefähr dreißig verschiedene Disaccharide und damit wahrscheinlich die Bildung der komplexesten Polysaccharide in Säugetierzellen (Esko, 1991; Kjellén and Lindahl, 1991). Die Modifikationen bewirken eine größere Flexibilität in der Konformation und eine stark negative Ladung, wodurch die elektrostatischen Bindungsinteraktionen der

Proteoglykane unterstützt werden. Manche dieser Interaktionen sind sehr spezifisch und werden durch definierte Zuckersequenzen innerhalb der HS-Seitenketten vermittelt (Turnbull et al., 1992; Schmidt et al., 1992). Die HS-Seitenketten sind über die Bindungsregion Glukuronsäure-Galaktose-Galaktose-Xylose O-glykosidisch an Serinreste der Sequenz Glu/Asp-X-Ser-Gly gebunden (Kjellén and Lindahl, 1991; Bernfield et al., 1992).

Die Primärstruktur von verschiedenen Heparansulfat-Proteoglykanen wurde durch Klonierung von cDNAs ermittelt. Dadurch konnten auch zwei Formen von Membranassoziationen festgestellt werden. Zum einen die Verankerung über eine Transmembrandomäne (Syndekan-Familie), zum anderen die Bindung über GPI an die Plasmamembran (Glypikan-Familie). Von den Glypikanen sind bis jetzt zwei Proteine bekannt: Glypikan wird von verschiedenen Zelltypen gebildet und ist normalerweise mit einem oder mehreren Syndekanen zusammen exprimiert (David et al., 1990). Cerebroglykan wird dagegen nur im embryonalen Gehirn exprimiert (Stipp et al., 1994).

Daneben gibt es noch vier andere Transmembranproteine, die durch Heparansulfate modifiziert werden: Betaglykan enthält eine HS-Seitenkette und ist auf den Zellen meist als Hybrid (eine HS-Seitenkette und eine Chondroitinsulfat-Seitenkette) vorhanden (Segarini and Seyedin, 1988). Von dem "fibroblast growth factor receptor" (FGFR) trägt nur ein Teil der Rezeptoren eine HS-Seitenkette, die in der Ig-Schleife nahe der Membran lokalisiert ist. Bei den CD44-Molekülen besitzt nur die "splicing" Variante CD44E (Epikan), die in Keratinozyten synthetisiert wird, HS-Seitenketten (Kugelman et al., 1992). Außerdem gibt es noch Perlekan, das in der perizellulären Matrix vorhanden und in Basalmembranen verankert ist. Perlekan besitzt zwei bis drei HS-Seitenketten an einem Ende des Proteins (Noonan and Hassell, 1993).

2.6 Die Syndekan-Familie

Die Familie der Syndekane besteht aus Syndekan-1 (Saunders et al., 1989; Mali et al., 1990), Syndekan-2 oder Fibroglykan (Marynen et al., 1989), Syndekan-3 oder N-Syndekan (Carey et al., 1992) und Syndekan-4, auch Ryudokan oder Amphigykan genannt (Kojima et al., 1992; David et al., 1992).

Alle Syndekane besitzen eine extrazelluläre Domäne, deren Sequenzähnlichkeit 10 bis 20% beträgt. Die Transmembrandomäne und die kurze zytoplasmatische Domäne dieser vier Proteine haben dagegen 60 bis 70% Sequenzähnlichkeit.

Einleitung

Syndekan-1 RMKKKDEGSY	S L E E P K Q A NG G A Y Q K P T K Q E E	E F Y A
Syndekan-2 RM R K K D E G S Y	D L G E R K P S S A A Y Q K A P T K	E F Y A
Syndekan-3 RMKKKDEGSY	T L E E P K Q A S V T Y Q K P D K Q E E	E F Y A
Syndekan-4 RMKKKDEGSY	D L G K K P I Y Q K A P T N	E F Y A
	C1	V	C2

Abbildung 1: Aminosäuresequenzen der intrazellulären Domänen der vier Syndekane. Die intrazellulären Domänen werden in zwei konservierte Regionen (C1, C2) und eine variable Region (V) unterteilt. Homologe Aminosäuren sind in fetten Buchstaben dargestellt.

Die Transmembrandomäne ist unter anderem dafür verantwortlich, daß es zur Bildung von Zelloberflächen-Komplexen kommt. Alle Syndekane haben die Fähigkeit, SDS-resistente Dimere und Oligomere zu bilden. Diese Selbstassoziation ist unabhängig von den HS-Seitenketten. Bei Syndekan-3 ist diese Oligomerisation abhängig von konservierten Glycinen innerhalb der Transmembrandomäne und von vier Aminosäuren nahe der extrazellulären Domäne (ERKE) (Asundi and Carey, 1995).

Die intrazelluläre Domäne der Syndekane kann in zwei konservierte Regionen (C1, C2) und eine einzelne variable Region (V) eingeteilt werden, wobei die beiden konservierten Regionen durch die variable Region getrennt werden (Abbildung 1). Die erste konservierte Region besteht aus zehn Aminosäuren nahe der Transmembrandomäne, die zu fast 100% konserviert sind. Die zweite intrazelluläre Domäne besteht aus den vier carboxyterminalen Aminosäuren. Diese vier Aminosäuren stellen die Bindungsstelle für Proteine dar, die Klasse II PDZ-Domänen enthalten (Cohen et al., 1998; Grootjans et al., 1997; Hsueh et al., 1998). PDZ-Domänen vermitteln Protein-Protein Interaktionen und binden spezifisch an carboxyterminale Enden von verschiedenen Transmembranrezeptoren. Für CASK, ein Protein mit PDZ-Domäne, das zur Klasse der membranassoziierten Guanylat Kinasen (MAGUK) gehört, wurde nachgewiesen, daß es an Syndekan-2 und wahrscheinlich auch an die anderen Syndekane bindet (Cohen et al., 1998). CASK besitzt eine Bindungsstelle für das Protein 4.1 (Cohen et al., 1998; Marfatia et al., 1995), das die Assoziation von Zelloberflächenrezeptoren mit dem Spektrin/Aktin Zytoskelett vermittelt (Abbildung 2) (Takeuchi et al., 1994; Vaheiri et al., 1997). Eine weitere Interaktion mit dem Zytoskelett wurde für Syndekan-3 nachgewiesen (Kinnunen et al., 1998). Dabei kommt es zu Wechselwirkungen der C1-Region mit einem Komplex aus Cortactin, c-Src, Fyn, Tubulin und einem unbekanntem 30 kDa Protein.

In der zytoplasmatischen Domäne der Syndekane sind mehrere Serin-, Threonin- und Tyrosinreste vorhanden, die möglicherweise phosphoryliert werden. Für Syndekan-2 wurde nachgewiesen, daß Ser¹⁹⁷ und Ser¹⁹⁸ *in vitro* von der PKC phosphoryliert werden (Oh et al., 1997a; Prasthofer et al., 1995). Außerdem wurde eine endogene Serinphosphorylierung des Ser¹⁸³ in Syndekan-4 in NIH 3T3

Fibroblasten nachgewiesen (Horowitz and Simons, 1998b). Diese Phosphorylierung wird wahrscheinlich durch eine Protein Phosphatase vom Typ 1 oder 2a reguliert.

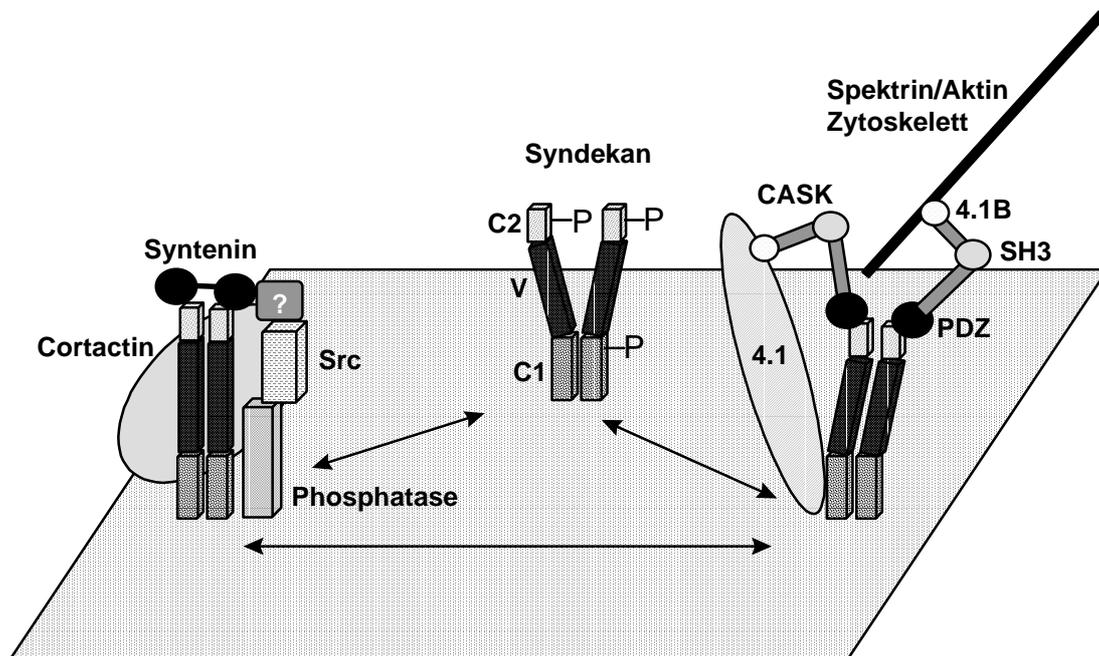


Abbildung 2: Mögliches Modell der zytosomatischen Interaktionen der konservierten Regionen (C1 und C2) von Syndekanen. Die C2-Region bindet an die PDZ-Domäne von Syntenin oder CASK, wodurch es zur Dimerisierung des Syndekans kommt. Die Bindungsdomäne 4.1B des CASK-Proteins vermittelt die direkte Bindung an das Spektrin/Aktin Zytoskelett. Die Bindung des Proteins 4.1 wird wahrscheinlich durch Interaktion mit der C1 Domäne stabilisiert. Nach (Rapraeger and Ott, 1998).

Innerhalb der C1- und C2-Region der zytosomatischen Domäne liegen zwei konservierte Tyrosinreste deren Phosphorylierung eventuell der Regulation der PDZ-Domäne und der Zytoskelett-Bindung dient. In Maus L Fibroblasten konnte gezeigt werden, daß die Syndekan Phosphorylierung durch eine konstitutiv aktive Kinase und eine gebundene Tyrosin Phosphatase kontrolliert wird (Ott and Rapraeger, 1998). Die Phosphorylierung wird rasch durch Genistein, Herbimycin A und Staurosporine blockiert, was auf eine Beteiligung von Src Kinasen hinweist. Es ist noch nicht bekannt, welche Tyrosine endogen phosphoryliert werden.

Für die V-Region von Syndekan-4 wurde gezeigt, daß die Aminosäuren LGKKPIYKK die aktivierte PKC α binden. Diese Bindung erfolgt innerhalb der katalytischen Domäne der Kinase (Oh et al., 1997c). Durch die Bindung an das LGKKPIYKK Peptid wird die Kinase Aktivität erhöht. Außerdem ist diese Region für die spontane Bildung von Dimeren und Oligomeren mitverantwortlich und nur durch diese Multimerisierung kommt es zur Bindung sowie zur verstärkten Aktivierung der PKC (Oh et al., 1997b). Diese Multimerisierung wird durch die direkte Assoziation von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) mit der V-Region gefördert (Oh et al., 1998; Lee et al., 1998). Dadurch läßt sich ein Modell aufstellen, in dem PIP₂ das

”clustering” von Syndekan-4 bewirkt, wodurch eine multivalente Bindungsstelle für PKC entsteht. Ist das Ser¹⁸³ phosphoryliert, so kann die PKC α nicht mehr an die intrazelluläre Domäne binden und die Multimerisierung der Syndekane ist beeinträchtigt (Horowitz and Simons, 1998a). Die Lokalisation von Syndekan-4 in ”focal adhesions” (Woods and Couchman, 1994) erfolgt durch die PKC Bindung (Baciu and Goetinck, 1995), durch Interaktionen der extrazellulären Domäne (Baciu and Goetinck, 1995; McFall and Rapraeger, 1997; Asundi and Carey, 1995) oder durch Interaktionen der Transmembrandomäne und der daraus erfolgenden Syndekan-4 Oligomerisation (Woods et al., 1993).

Syndekan-1 ist das vorherrschende Proteoglykan in Epithelzellen. In Fibroblasten Zellen hingegen ist es nur von geringer Bedeutung, außerdem wird es noch zu bestimmten Zeitpunkten während der Embryonalentwicklung exprimiert (Kim et al., 1994). Neben Heparansulfaten besitzt Syndekan-1 auch Chondroitinsulfate. Syndekan-2 kommt vor allem auf Fibroblasten und Endothelzellen vor, während es in den meisten Epithelzellen fehlt. Dagegen ist Syndekan-4 ein ubiquitär vorkommendes Proteoglykan (David et al., 1992).

Nach dem Verdau der HS-Seitenketten mit Heparitinase und dem Verdau der Chondroitinsulfat-Seitenketten mit Chondroitinase ABC können die vier Syndekane durch SDS-PAGE aufgetrennt werden. Die Proteine zeigen dabei ein ungewöhnliches Laufverhalten. Aufgrund der offenen Leseraster ergibt sich ein kalkuliertes Molekulargewicht von 40.8 kDa für Syndekan-3, 30.5 kDa für Syndekan-1, 20.2 kDa für Syndekan-2 und 19.7 kDa für Syndekan-4. Die Proteine wandern jedoch mit Größen von ca. 125, 80, 48 und 35 kDa.

HS-Seitenketten binden eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, extrazellulären Matrixfaktoren und anderen Proteinen, was darauf hinweist, daß HS-Seitenketten an der Zelladhäsion oder der Regulation der Zellteilungsaktivität beteiligt sind (Carey, 1997). Zudem ist bekannt, daß verschiedene pathogene Erreger mit den HS-Seitenketten interagieren. Dazu gehört die Bindung des humanen Zytomegalovirus (Compton et al., 1993) und des Herpes simplex Virus (Shieh et al., 1992), die Bindung der Bakterien *Borrelia burgdorferi* (Isaacs, 1994), *Chlamydia trachomatis* (Zhang and Stephens, 1992), *Staphylococcus aureus* (Liang et al., 1992) und der Protozoen *Leishmania* (Love et al., 1993) und *Typanosoma cruzi* (Ortega-Barria and Pereira, 1991). Auch von *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* ist bekannt, daß die negativ geladenen HS-Seitenketten die Bindungsstellen für das Opa₅₀-Protein darstellen (de Vries et al., 1998; van Putten and Paul, 1995; Chen et al., 1995).

2.7 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle der Heparansulfat-Proteoglykane während der Adhärenz und Invasion von *N. gonorrhoeae* in Epithelzellen.

In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß es bei einem Verdau der HS-Seitenketten mit Heparitinase bzw. durch Zugabe von Heparin als Kompetitor die Adhärenz und die Invasion der Gonokokken an Chang Epithelzellen verringert wird (van Putten and Paul, 1995). Des weiteren erfolgt keine Adhärenz von Gonokokken an eine mutierte CHO-Zelllinie, die nur noch schwach sulfatierte Proteoglykane bilden kann (van Putten and Paul, 1995).

Es sollte daher untersucht werden, ob die HSPGs nur die Adhärenz der Gonokokken an Epithelzellen vermitteln, oder ob sie auch in der Lage sind, die Phagozytose der Gonokokken zu induzieren. Desweiteren sollte untersucht werden, ob die HSPGs Korezeptoren benötigen oder ob sie die Phagozytose allein bewirken können.

Aus anderen Arbeiten ist bekannt, daß nur 30 bis 40% der HSPGs, die aus Chang Zellen isoliert wurden, anschließend die Fähigkeit zeigen, in Phospholipid Vesikel zu inkorporieren. Diese Liposomen zeigen außerdem eine Adhärenz von Opa₅₀-exprimierenden Gonokokken (van Putten and Paul, 1995). Dies deutet darauf hin, daß der potentielle Rezeptor eine hydrophobe Transmembrandomäne besitzt.

Außerdem sollte untersucht werden, welches HSPG als Rezeptor für die Gonokokken dient. Aufgrund der bekannten Daten ist anzunehmen, daß der Rezeptor zu den Syndekanen gehört. Diese besitzen (i) auf ihrer extrazellulären Domäne mehrere Bindungsstellen für HS-Seitenketten, (ii) eine hydrophobe Transmembrandomäne und (iii) eine zytoplasmatische Domäne, die mit dem Zytoskelett interagiert. Durch Überexpression verschiedener Syndekane in Epithelzellen sollte in dieser Arbeit der Rezeptor für die Gonokokken identifiziert werden. Durch verschiedene Mutationen in der intrazellulären Domäne der Syndekane und die Überexpression dieser Konstrukte in Epithelzellen sollte anschließend der Signaltransduktionsweg, der zur Phagozytose der Gonokokken führt, näher charakterisiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Die Bedeutung der HSPGs bei der Phagozytose

3.1.1 Invasive *N. gonorrhoeae* interagieren mit zellulären HSPGs

Pharmakologische und biochemische Studien haben gezeigt, daß vor der bakteriellen Invasion eine feste Adhärenz von *N. gonorrhoeae* an Epithelzellen notwendig ist. Diese feste Bindung wird durch das Opa₅₀-Protein an die HS-Seitenketten der zellassozierten HSPGs vermittelt (van Putten and Paul, 1995; Chen et al., 1995).

Um zu untersuchen, ob HSPGs an den Stellen rekrutiert werden, an denen die Gonokokken die Wirtszelle invadieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen

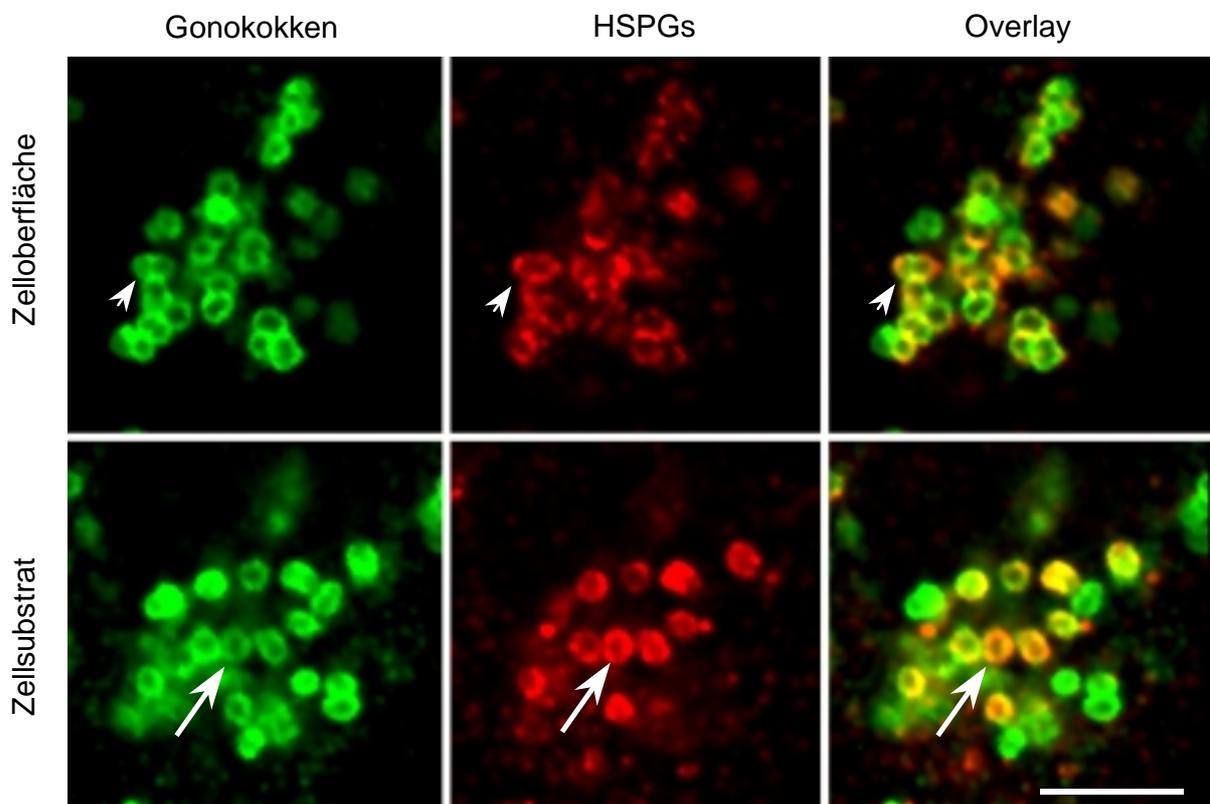


Abbildung 3: *N. gonorrhoeae* rekrutiert HSPGs während der Adhärenz und Invasion in Epithelzellen. Chang Zellen wurden mit *N. gonorrhoeae* Stamm VP1 für 2 h infiziert, fixiert, mit einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung für Gonokokken (grüner Kanal) und HSPGs (roter Kanal) gefärbt und anschließend durch konfokale Laser Scanning Mikroskopie analysiert. Es sind zwei optische x-y Schnitte gezeigt, einer nahe der Zelloberfläche, der andere im intrazellulären Bereich nahe dem Zellsubstrat. In dem überlagerten Bild (Overlay) zeigt sich eine Kolokalisation in gelb durch die Überlagerung der Signale aus dem grünen und dem roten Kanal. Die Pfeilspitzen und die Pfeile zeigen die Positionen von adhärenenten und intrazellulären Bakterien, an denen es zu einer Kolokalisation mit HSPGs kommt. Die Vergrößerung ist durch einen 5 µm langen Balken angezeigt.

durchgeführt. Chang Zellen wurden für 2 h mit dem *N. gonorrhoeae* Stamm VP1 infiziert, anschließend fixiert und eine sequentielle Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

Beim Stamm VP1 handelt es sich um ein klinisches Isolat, dessen Opa_{27.5} homolog zum HSPG-spezifischen Opa₅₀ vom Stamm MS11 ist. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird daher immer von Opa₅₀ die Rede sein.

Optische x-y Schnitte mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Abbildung 3), die von der Zelloberfläche oder intrazellulär gerade über dem Zellsubstrat gemacht wurden, zeigen eine verstärkte Färbung der HSPGs an Stellen mit adhärennten (Pfeilspitze) oder intrazellulären Bakterien (Pfeil). Ähnliche Färbungen wurden mit Gonokokken infizierten Zellen von anderen Epithelien (Me-180, Caco-2, Hec-1B und HeLa, Daten nicht gezeigt) erhalten. Der Stamm *N. gonorrhoeae* VP1.3, eine Variante von VP1, die das Opa_{27.5} nicht exprimiert, adhärnt nur an die Epithelzellen aber invadiert nicht (Makino et al., 1991). Es erfolgt außerdem keine signifikante Rekrutierung von HSPGs in Bereichen mit adhärennten Bakterien. Aus der schon gezeigten Interaktion zwischen Opa₅₀ und HSPGs (van Putten and Paul, 1995) und der Tatsache, daß HS meist in Form von HSPGs auf Zellen existieren, kann geschlossen werden, daß invasive *N. gonorrhoeae* signifikante Mengen an HSPGs rekrutieren und diese miteinander kreuzvernetzen, sobald die Bakterien an die Zelle adhärnt. Diese akkumulierten HSPGs werden dann mit den Bakterien zusammen von der Zelle aufgenommen.

3.1.2 Die Adhärenz und Invasion von HSPG-kreuzvernetzenden Beads in Epithelzellen ähnelt der von *N. gonorrhoeae*

Die Opa₅₀-vermittelte Kreuzvernetzung von HSPGs auf der Zelloberfläche erfolgt vor der Aufnahme von *N. gonorrhoeae* in Epithelzellen. Bis jetzt war noch nicht bekannt, ob diese Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung die bakterielle Aufnahme direkt auslöst. Es wurde auch noch nicht gezeigt, ob es durch die Kreuzvernetzung von HSPGs, die durch einen Liganden induziert wird, direkt zur Phagozytose kommen kann. Aus diesem Grund wurde ein Modell etabliert, um herauszufinden, welche Rolle die Kreuzvernetzung von HSPGs an der Oberfläche von Epithelzellen bei der Phagozytose spielt. Die zellulären Charakteristika dieses Modells wurden dann mit der Aufnahme von *N. gonorrhoeae* in Epithelzellen verglichen.

Latexbeads, die mit einem Rezeptor-kreuzvernetzenden Antikörper gekoppelt sind, wurden schon öfters verwendet, um zu untersuchen, welche Folgen die Oligomerisierung von Rezeptoren hat (Burbelo et al., 1995; Patel and Rickwood, 1994). Es erschien sinnvoll, HSPG-kreuzvernetzende Latexbeads zu verwenden, um

die Eigenschaften von Opa₅₀-exprimierenden Gonokokken nachzuahmen, die ebenfalls HSPGs kreuzvernetzen.

Ein monoklonaler anti-Heparansulfat-Glukosaminoglykan (HS-GAG) IgM Antikörper (Klon 10E4) (David et al., 1992) ist bekannt dafür, daß er HSPGs kreuzvernetzt. Dieser Antikörper wurde kovalent an Latexbeads mit einem Durchmesser von 2 µm gekoppelt.

Die Inkubation von Epithelzellen mit diesen Beads ergibt ein ähnliches Adhärenzmuster an der Zelloberfläche wie bei Opa₅₀-exprimierenden *N. gonorrhoeae* und dieses Adhärenzmuster ist spezifisch für verschiedene Zelllinien. In HeLa Zellen erfolgt die Adhärenz der Beads und der Gonokokken vor allem an der Peripherie der Zellen, während in T24 Blasenkarzinomzellen die Adhärenz vorwiegend an der epinukleären Region erfolgt (Abbildung 4). Beads, die mit Rinderserumalbumin (BSA) gekoppelt wurden, binden an keine der getesteten Zelllinien (Daten nicht gezeigt).

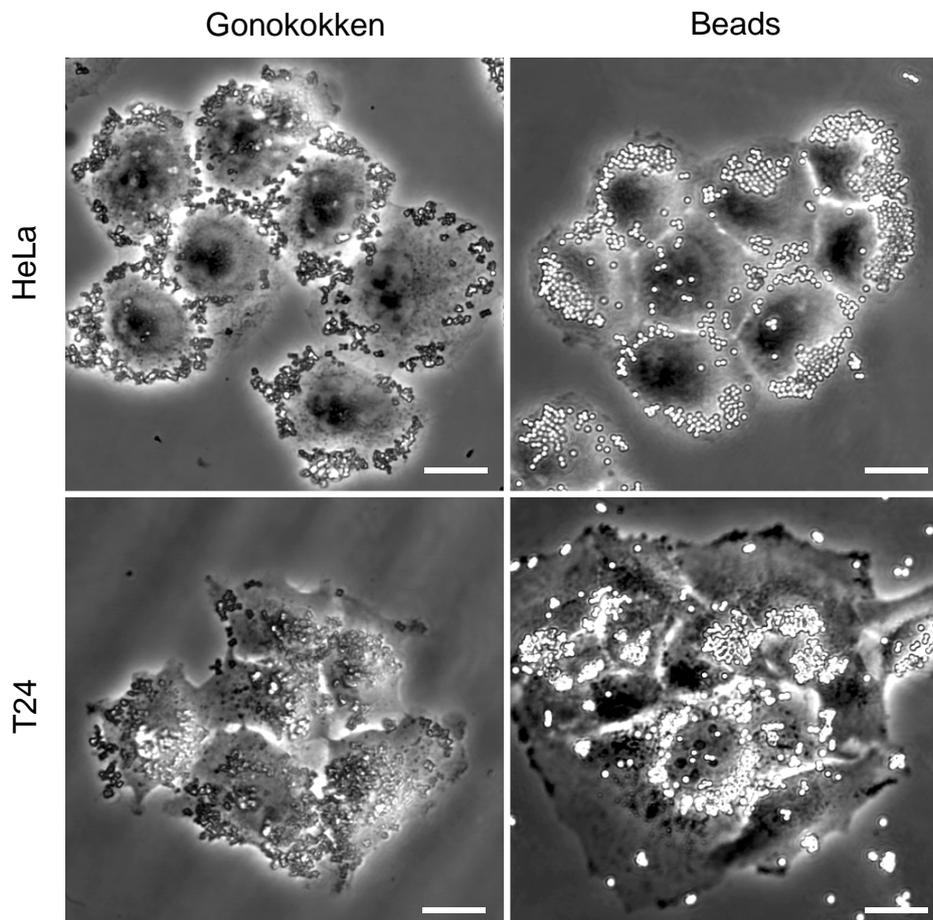


Abbildung 4: Opa₅₀-exprimierende *N. gonorrhoeae* und HSPG-kreuzvernetzende Beads zeigen ein ähnliches Adhärenzmuster, das für verschiedene Zelllinien spezifisch ist. HeLa Zellen oder T24 Zellen wurden mit *N. gonorrhoeae* Stamm VP1 für 2 Stunden oder mit HSPG-kreuzvernetzenden Beads für 4 H inkubiert, fixiert und dann durch Phasenkontrastmikroskopie analysiert. Die Vergrößerung wird durch einen Balken von 20 µm angezeigt.

Verschiedene mikroskopische Techniken wurden angewandt, um nachzuweisen, daß die adhärennten Beads von den Epithelzellen aufgenommen werden.

Aufnahmen mit der Raster-Elektronenmikroskopie (REM) zeigen, daß die adhärennten Beads von Membranen sehr eng umschlossen werden (Abbildung 5A und B, Pfeile) und daß diese Vorstülpungen über den Beads fusionieren, wodurch die Partikel komplett aufgenommen werden (Abbildung 5A, Pfeilspitze).

Die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) zeigt, daß die intrazellulären Beads innerhalb von membranumschlossenen Kompartimenten in HeLa Zellen vorliegen (Abbildung 5C und D, der Pfeil zeigt auf die phagosomale Membran).

Um die adhärennten und intrazellulären Beads zu quantifizieren, wurde ein Zellassay mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie entwickelt (Abbildung 6). Die Zellen wurden mit den HSPG-kreuzvernetzenden Beads fixiert und dann mit

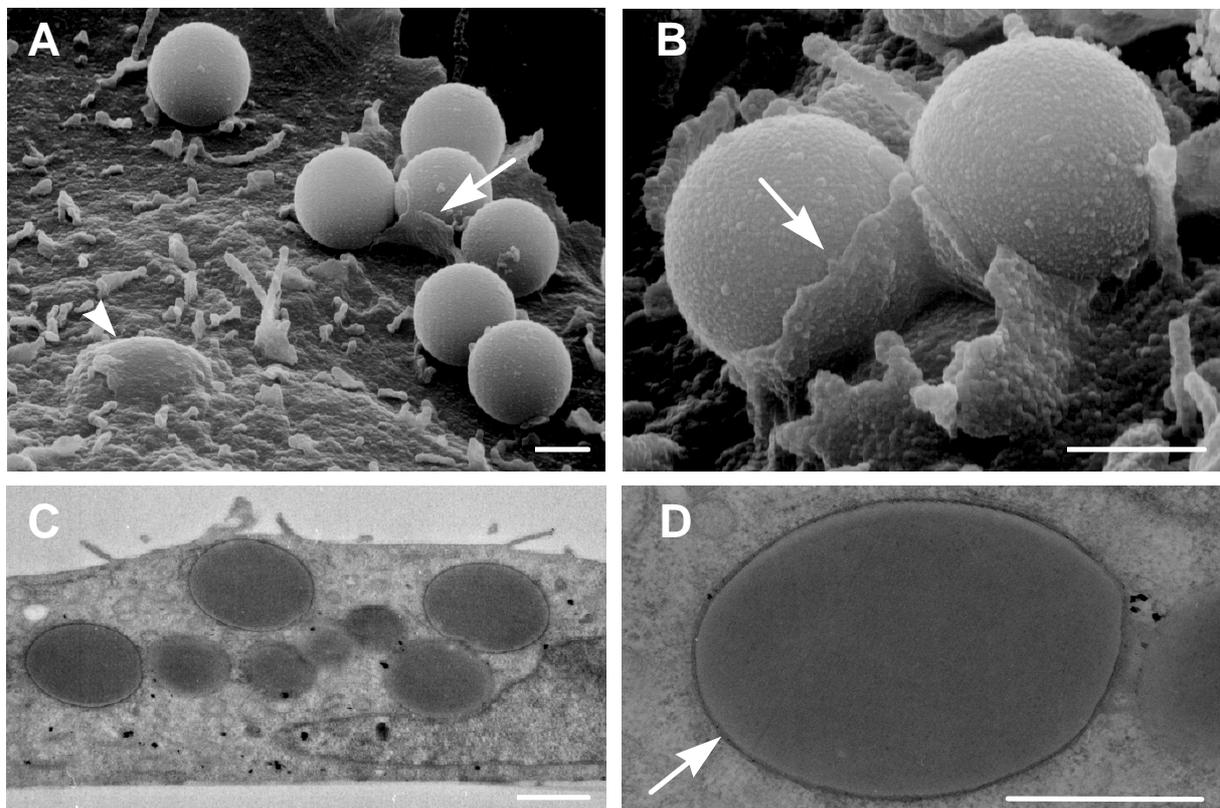


Abbildung 5: HSPG-kreuzvernetzende Beads adhären an und invadieren in HeLa Zellen. Die Zellen wurden mit HSPG-kreuzvernetzenden Beads für 4 h inkubiert, fixiert und durch Raster-Elektronenmikroskopie (REM; A, B) bzw. Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM; C, D) analysiert. Die REM Analyse zeigt, daß die adhärennten, HSPG-kreuzvernetzenden Beads fest mit Membranvorstülpungen assoziiert sind (Pfeil in A und B), die schrittweise die Beads umschließen und somit zu einer kompletten Aufnahme führen, indem die Membran über den Beads fusioniert (Pfeilspitze in A). Die TEM Analyse zeigt, daß die HSPG-kreuzvernetzenden Beads innerhalb eines Kompartiments sind, das fest mit einer Membran umgeben ist (Pfeil in D zeigt auf die phagosomale Membran). Die Vergrößerung wird durch einen Balken von 1 µm angegeben.

einem Texas-Rot-konjugierten Antikörper gefärbt, um die extrazellulären Beads zu markieren (grüner Kanal). Nach der Permeabilisierung der Membran mit Triton X-100 wurden alle Beads (adhärente und intrazelluläre) mit einem Cy5-konjugierten Antikörper (roter Kanal) markiert. Um die zellulären Strukturen sichtbar zu machen, wurde das F-Aktin gleichzeitig mit FITC-gekoppeltem Phalloidin markiert (blauer Kanal). Werden alle drei Kanäle überlagert, so erscheinen die intrazellulären Beads rot, da sie nur mit dem Cy5-konjugierten Antikörper gefärbt sind (die Position von zwei repräsentativen Beads ist durch Pfeile markiert). Extrazelluläre Beads, die mit den beiden Antikörpern Cy5 und Texas-Rot gefärbt sind, erscheinen durch die Überlagerung der Kanäle gelb (die Position von zwei repräsentativen Beads ist mit Pfeilspitzen markiert).

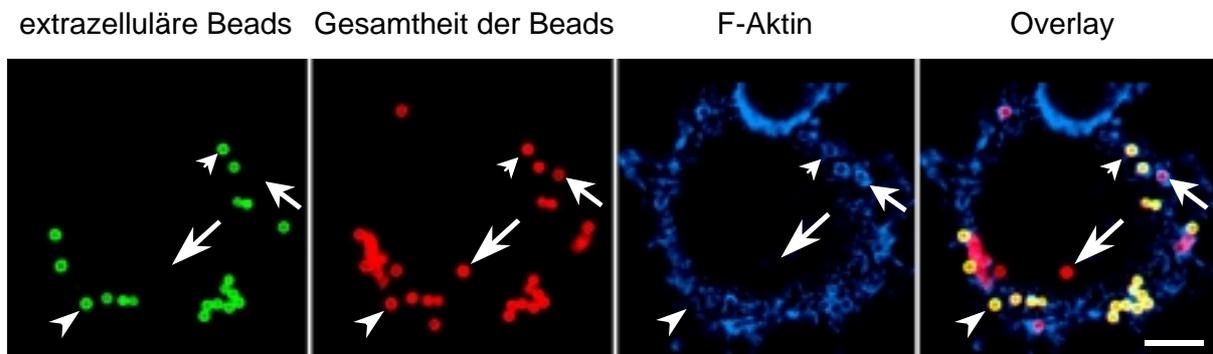


Abbildung 6: Quantifizierung der extra- und intrazellulären Beads mit Hilfe einer Dreifachimmunfluoreszenzfärbung. HeLa Zellen wurden mit HSPG-kreuzvernetzenden Beads für 4 h inkubiert, fixiert und gefärbt. Extrazelluläre Beads vor der Permeabilisierung der Membran sind in grün dargestellt, die Gesamtheit der Beads nach der Permeabilisierung ist in rot gezeigt, das F-Aktin wird durch FITC-markiertes Phalloidin in blau dargestellt. In dem Overlay-Bild erscheinen die extrazellulären Beads in gelb (Mischung aus grün und rot, repräsentative Beads sind mit Pfeilspitzen markiert) und die intrazellulären Beads in rot (repräsentative Beads sind durch Pfeile gekennzeichnet). Teilweise sind die extra- und intrazellulären Beads mit einer starken Akkumulation von F-Aktin assoziiert (kleiner Pfeil und kleine Pfeilspitze), teilweise liegt keine sichtbare Aktinakkumulation vor (großer Pfeil und große Pfeilspitze). Die Vergrößerung wird durch einen Balken von 10 μm angegeben.

Da die Anzahl der adhärennten und intrazellulären Beads von Zelle zu Zelle variiert, wurden in verschiedenen Regionen des Deckgläschens drei unabhängige Gruppen von je 30 Zellen gezählt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (Abbildung 7). Mit diesem quantitativen Assay wurde die Adhärenz und die Invasion der Beads in einem Zeitraum von 4 h bei HeLa Zellen verfolgt.

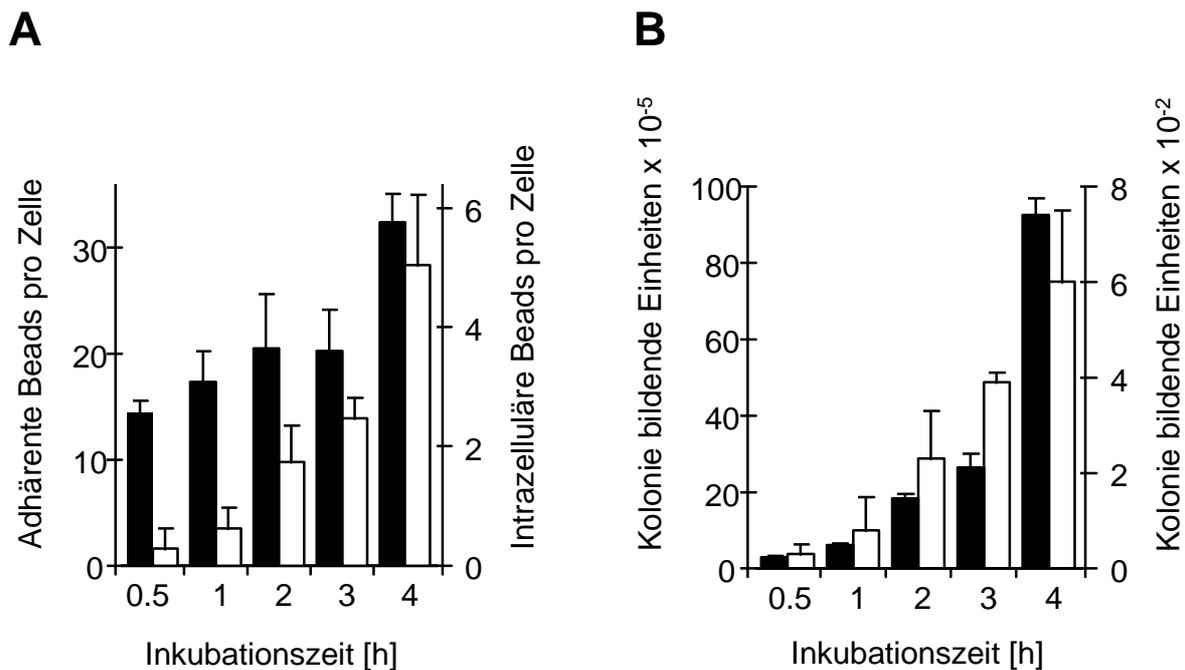


Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der Adhärenz und der Invasion von HSPG-kreuzvernetzenden Beads (A) oder Opa₅₀-exprimierenden *N. gonorrhoeae* (B) bei HeLa Zellen. Die Zellen wurden mit den HSPG-kreuzvernetzenden Beads oder *N. gonorrhoeae* Stamm VP1 für die angegebenen Zeitpunkte inkubiert. Die Quantifizierung der adhärennten (schwarze Balken) und der intrazellulären Beads (weiße Balken) pro Zelle (A) bzw. der zellassoziierten (schwarze Balken) oder der intrazellulären Bakterien (weiße Balken) pro Well (B) wurde wie in 6.11.3 beschrieben durchgeführt.

Die Gonokokken invadieren die Wirtszellen mit einer ähnlichen Kinetik wie die Beads, während die Assoziation der Bakterien mit den Zellen mehr Zeit benötigt als die Adhärenz der Beads (Abbildung 7) (Makino et al., 1991; Gómez-Duarte et al., 1997). Für alle nachfolgenden Experimente wurde eine Inkubationszeit von 4 h gewählt.

Vor kurzem wurde gezeigt, daß Serum bzw. der Serumfaktor Vitronektin (Vn) die Invasion von *N. gonorrhoeae* in HeLa und CHO Zellen sehr stark erhöht (Duensing and van Putten, 1997; Gómez-Duarte et al., 1997). Dagegen wird die Invasion von *N. gonorrhoeae* in Chang Zellen durch Serum oder Vitronektin nicht beeinflusst (Gómez-Duarte et al., 1997).

Übereinstimmend damit konnte gezeigt werden, daß die Aufnahme von HSPG-kreuzvernetzenden Beads in HeLa Zellen und MCF7 Zellen durch Serum oder Vitronektin ebenfalls um den drei- bis vierfachen Wert erhöht wird, während dies für Chang Zellen nicht zutrifft. Die Anzahl der adhärennten Beads wird durch Serum oder Vn bei HeLa und MCF7 Zellen nicht beeinflusst (Abbildung 8). Aus unbekanntem Gründen wird die Adhärenz der Latexbeads an Chang Zellen durch Serum, aber nicht

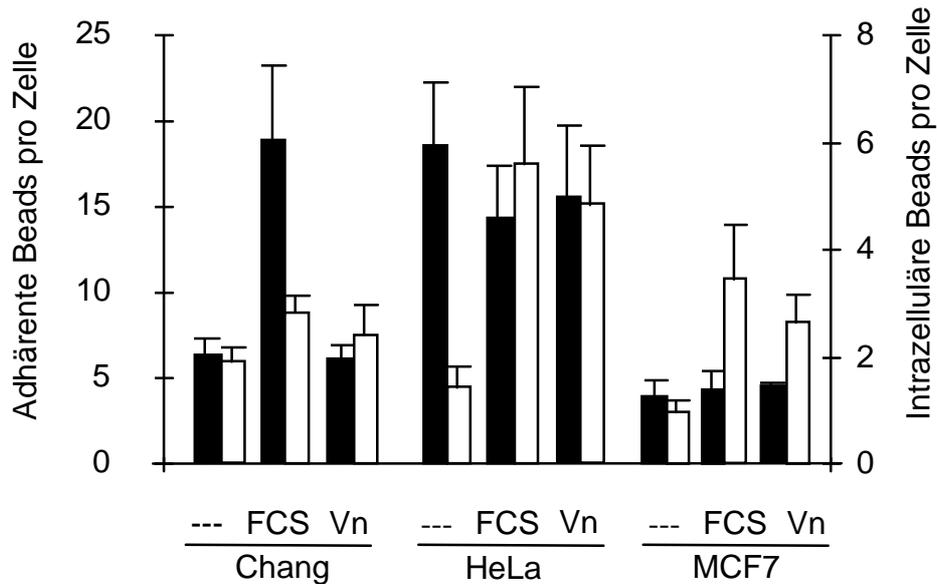


Abbildung 8: Vn stimuliert die Phagozytose von HSPG-kreuzvernetzenden Beads in bestimmten Zelllinien. Chang Zellen, HeLa Zellen oder MCF7 Zellen wurden für 4 h mit HSPG-kreuzvernetzenden Beads in Ab- bzw. Anwesenheit von 5% FCS oder 1,5 µg/ml Vn inkubiert. Die Quantifizierung der adhärennten (schwarze Balken) und der intrazellulären Beads (weiße Balken) wurde wie in 6.11.3 beschrieben durchgeführt.

durch Vitronektin stark erhöht. Dieser Unterschied scheint für den Aufnahme-prozeß der Beads jedoch nicht relevant zu sein (Abbildung 8).

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß die Quervernetzung der HSPGs an der Zelloberfläche ausreicht, um die Phagozytose in nicht-professionelle Phagozyten zu stimulieren. Der Serumfaktor Vitronektin verstärkt diese phagozytische Aktivität in einigen Zelllinien. Da diese verstärkte Invasion von *N. gonorrhoeae* und HSPG-kreuzvernetzenden Beads bei den gleichen Zelllinien erfolgt, deutet dies auf den gleichen Mechanismus der Phagozytose hin.

3.1.3 Vitronektin erhöht spezifisch die HSPG-abhängige Phagozytose

Entweder erhöht Vn spezifisch die HSPG-abhängige Phagozytose oder es wird generell jede phagozytische Aktivität erhöht. Um diesen Punkt zu klären, wurden Beads verwendet, die andere Zelloberflächenrezeptoren kreuzvernetzen. Die phagozytische Invasion dieser Beads in der Anwesenheit von Serum bzw. von Vn wurde mit der von HSPG-kreuzvernetzenden Beads verglichen. Für die Kopplung an die Latexbeads wurde zum einen ein anti- β_1 -Integrin Antikörper verwendet, da β_1 -Integrine die Rezeptoren für die Aufnahme der enteropathogenen *Yersinia* spp. (Isberg and Tran Van Nhieu, 1995) sind. Zum anderen wurde ein Antikörper gegen das

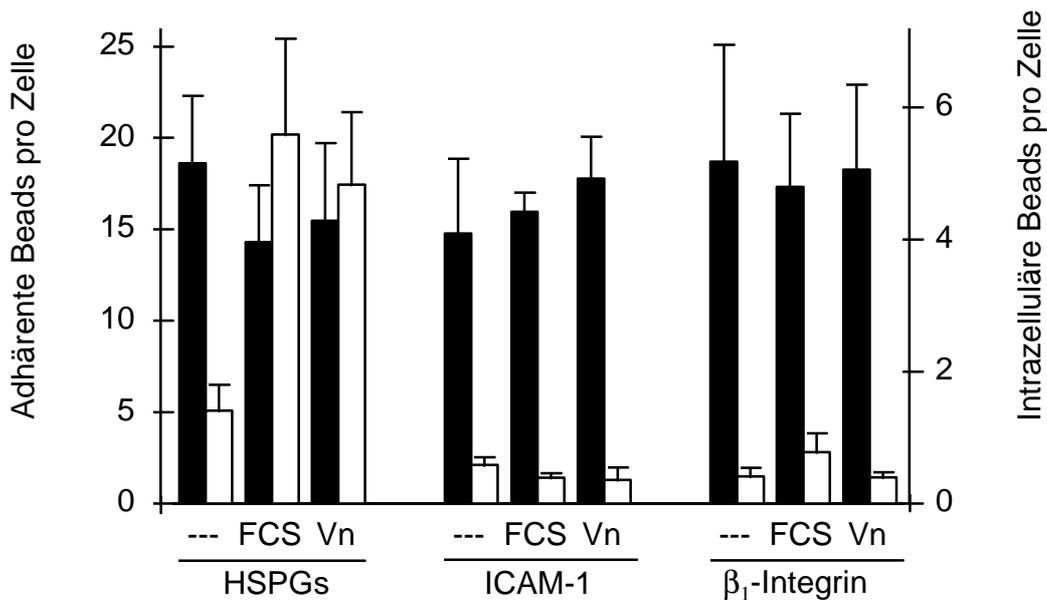


Abbildung 9: Vn erhöht spezifisch die HSPG-abhängige Phagozytose in HeLa Zellen. HeLa Zellen wurden für 4 h in der Ab- bzw. Anwesenheit von 5% FCS oder 1,5 $\mu\text{g/ml}$ Vn mit Beads inkubiert, die entweder HSPGs, ICAM-1 oder β_1 -Integrine kruzvernetzen. Die Quantifizierung der adhärennten (schwarze Balken) oder intrazellulären Beads (weiße Balken) wurde wie in 6.11.3 beschrieben durchgeführt.

interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) verwendet, das ein Ligand des funktionsassoziierten Antigens-1 (LFA-1) auf Lymphozyten ist (Marlin and Springer, 1987).

Sowohl die β_1 -Integrin-kruzvernetzenden Beads als auch die ICAM-1-kruzvernetzenden Beads wurden von HeLa Zellen in geringen Mengen aufgenommen. Im Gegensatz zu HSPG-kruzvernetzenden Beads wird die Aufnahme dieser Beads nicht signifikant durch Vn oder Serum erhöht (Abbildung 9).

Um zu untersuchen, ob dies auf eine unterschiedliche Bindung des Vitronektins an die verschiedenen Mikropartikel zurückzuführen ist, wurden die gekoppelten Beads für 30 min mit 20 ng Vn inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und mit Probenpuffer versetzt. Nach Auftrennung eines Drittels der Proben über SDS-PAGE und dem Blotting auf Nitrozellulose wurden die Blots mit einem anti-Vn Antikörper inkubiert (Abbildung 10).

Interessanterweise ist ein großer Teil des Vitronektins, das in einem Assay eingesetzt wird, mit den verschiedenen Beads assoziiert, unabhängig davon, welcher Antikörper für die Kopplung verwendet wird (Abbildung 10).

Diese unspezifische Bindung von Vn an die Beads scheint die adhäsive Eigenschaft dieses Glykoproteins widerzuspiegeln. Es ist allerdings nicht bekannt, ob die Phagozytose durch die beobachtete Assoziation von Vn mit HSPG-kruzvernetzenden Beads gesteigert wird oder ob die Steigerung auf lösliches Vn

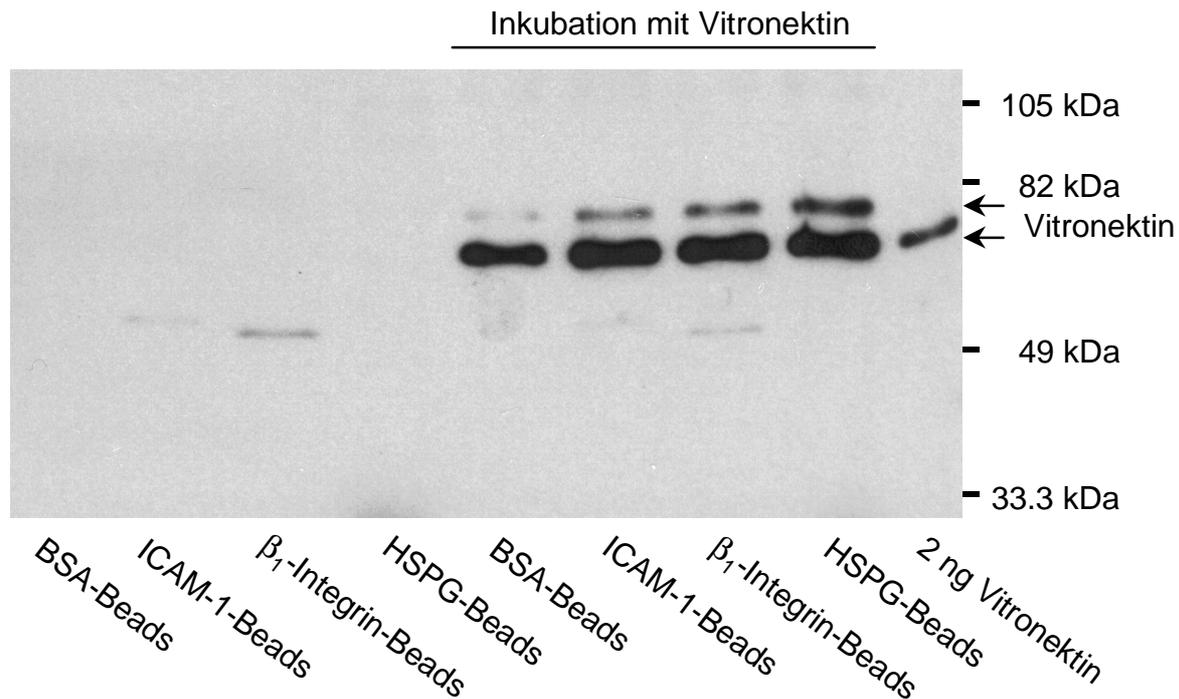


Abbildung 10: Vn bindet an HSPG-, ICAM-1- und β_1 -Integrin-kreuzvernetzende Beads. Die Beads wurden für 30 min mit 20 ng Vn inkubiert, gewaschen und ein Drittel durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion des Vitronektins erfolgt mit einem anti-Vitronektin Antikörper. Vn läuft als eine Doppelbande bei 65 und 78 kDa.

zurückzuführen ist. Obwohl ungefähr gleiche Mengen von Vn sowohl an ICAM-1-, β_1 -Integrin- oder HSPG-kreuzvernetzende Beads binden, ist die Phagozytose nur für die letzteren signifikant erhöht. Deshalb ist die durch Vn oder Serum erhöhte Phagozytose auf die Kreuzvernetzung von HSPGs angewiesen.

3.1.4 Eine kritische Menge an Ligand-induzierter Kreuzvernetzung von HSPGs ist zur Stimulation der Phagozytose in HeLa Zellen notwendig

Ein anderer Weg, um die Spezifität der Vn-erhöhten Phagozytose von HSPG-kreuzvernetzenden Beads zu überprüfen, ist der Verdau der HS-Seitenketten durch Heparitinase. Durch Verdau der HS-Seitenketten mit 1 mU/ml Heparitinase wird die Phagozytose der Beads bei Zugabe von Vn oder Serum stark reduziert, während die Adhärenz der Beads nur schwach beeinflusst wird (Abbildung 11A). Bei einer höheren Konzentration an Heparitinase erfolgt eine starke Reduktion der Adhärenz der Beads und eine weitere Verringerung der Beadaufnahme (Abbildung 11A, 5 mU/ml Heparitinase). Die Beobachtung, daß die Phagozytose durch den Heparitinase-Verdau eher beeinflusst wird als die Adhärenz, weist darauf hin, daß die Bindung von anti-HS-GAG Antikörpern an HSPGs direkt in der Adhärenz der Beads resultiert. Dagegen ist

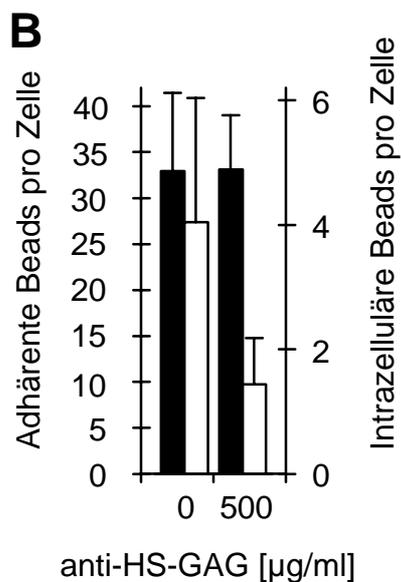
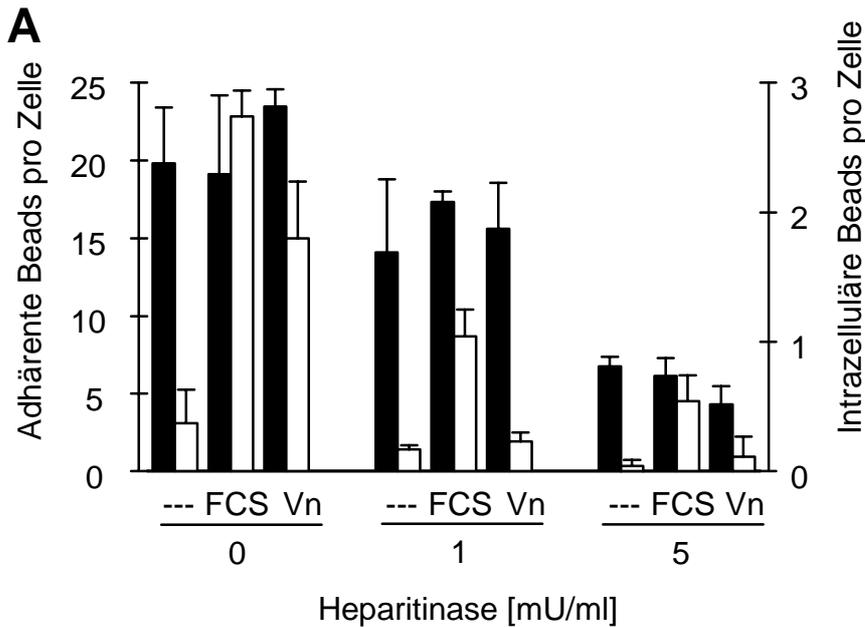


Abbildung 11: Eine kritische Menge an HSPG-Kreuzvernetzung ist notwendig, um die Phagozytose in HeLa Zellen zu induzieren. (A) Unbehandelte HeLa Zellen und HeLa Zellen, die für 3 h mit 1 oder 5 mU/ml Heparitinase inkubiert wurden. Alle Zellen wurden für 4 h mit HSPG-kreuzvernetzenden Beads und der entsprechenden Menge an Heparitinase in der Ab- bzw. Anwesenheit von 5% FCS oder 1,5 µg/ml Vn inkubiert. (B) HeLa Zellen wurden für 4 h mit HSPG-kreuzvernetzenden Beads in der Anwesenheit von 5% FCS inkubiert. Der anti-HS-GAG Antikörper 10E4 wurde in einer Konzentration von 500 µg/ml 15 min vor der Zugabe der Beads zu den Zellen gegeben und war während der gesamten Inkubationszeit anwesend. Die Quantifizierung der adhärenen (schwarze Balken) und der intrazellulären Beads (weiße Balken) wurde wie in 6.11.3 beschrieben durchgeführt.

eine kritische Menge an Antikörper-vermittelter Kreuzvernetzung von HSPGs notwendig, um die Phagozytose zu stimulieren. Da ein Verdau mit wenig Heparitinase einen ähnlichen Effekt auf die Aufnahme der Beads in der Abwesenheit von Serum oder Vn hat (Abbildung 11A), kann dieses Model sowohl für die Vn-erhöhte als auch für die Vn-unabhängige Phagozytose erweitert werden. Dies wird dadurch unterstützt, daß der anti-HS-GAG Antikörper, der für die Kopplung der HSPG-kreuzvernetzenden Beads verwendet wird, die Aufnahme stark reduziert, wenn er als löslicher Antikörper zugegeben wird, während er die Adhärenz der Beads nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 11B).

3.1.5 Die HSPG-abhängige Phagozytose wird durch Inhibitoren von Tyrosin Kinasen blockiert

Von Grassmé wurde gezeigt, daß es bei der Aufnahme von *N. gonorrhoeae* zur Phosphorylierung von Tyrosinresten und zur Kolokalisation von tyrosinphosphorylierten Proteinen mit den Gonokokken kommt (Grassmé, 1995). Um zu überprüfen, ob die Tyrosinphosphorylierung auch eine Rolle bei der Aufnahme von HSPG-kreuzvernetzenden Beads spielt, wurde der Tyrosinkinase Inhibitor Genistein während der Invasion eingesetzt.

Konzentrationsabhängige Effekte von Genistein (Abbildung 12) wurden in der Anwesenheit von Serum (Abbildung 12A) gezeigt. Außerdem wurde eine effektive Inhibitorkonzentration in parallelen Experimenten mit Serum, mit Vn oder ohne Zusatz im Medium eingesetzt (Abbildung 12B). Der Inhibitor bewirkt eine konzentrationsabhängige Inhibition der Beadaufnahme, während die Adhärenz der Beads nicht beeinflußt wird. Die Vitalität der Zellen wurde durch Trypanblau Färbung nachgewiesen.

Diese pharmakologischen Daten weisen darauf hin, daß es bei der HSPG-abhängigen Phagozytose zur Phosphorylierung von Proteinen durch Tyrosinkinasen kommt.

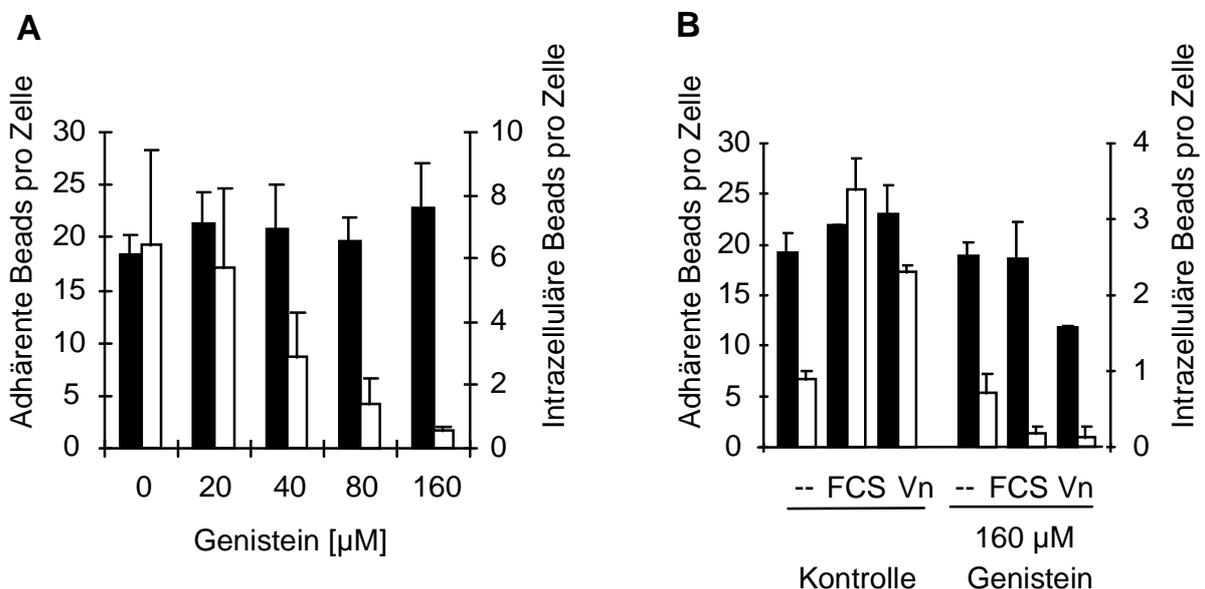


Abbildung 12: Die Aufnahme von HSPG-kreuzvernetzenden Beads in HeLa Zellen wird durch Genistein inhibiert. HeLa Zellen wurden für 4 h mit HSPG-kreuzvernetzenden Beads in der Anwesenheit von 5% FCS (A) oder in der Ab- bzw. Anwesenheit von 5% FCS oder 1,5 $\mu\text{g/ml}$ Vn (B) inkubiert. Genistein wurde in den angegebenen Konzentrationen 15 min vor der Zugabe der Beads zugegeben und war während der gesamten Inkubationszeit anwesend. Die Quantifizierung der adhärenz (schwarze Balken) und der intrazellulären Beads (weiße Balken) wurde wie in 6.11.3 beschrieben durchgeführt.

3.1.6 Die HSPG-abhängige Phagozytose wird durch PKC-Inhibitoren blockiert

Vor kurzem wurde gezeigt, daß bei der Vn-stimulierten Invasion von Epithelzellen durch *N. gonorrhoeae* die Signaltransduktion über die PKC abläuft (Dehio et al., 1998). Um zu untersuchen, ob die PKC auch bei der HSPG-abhängigen Phagozytose der Beads eine Rolle spielt, wurde der Effekt von PKC Inhibitoren auf die Aufnahme von HSPG-kreuzvernetzenden Beads getestet.

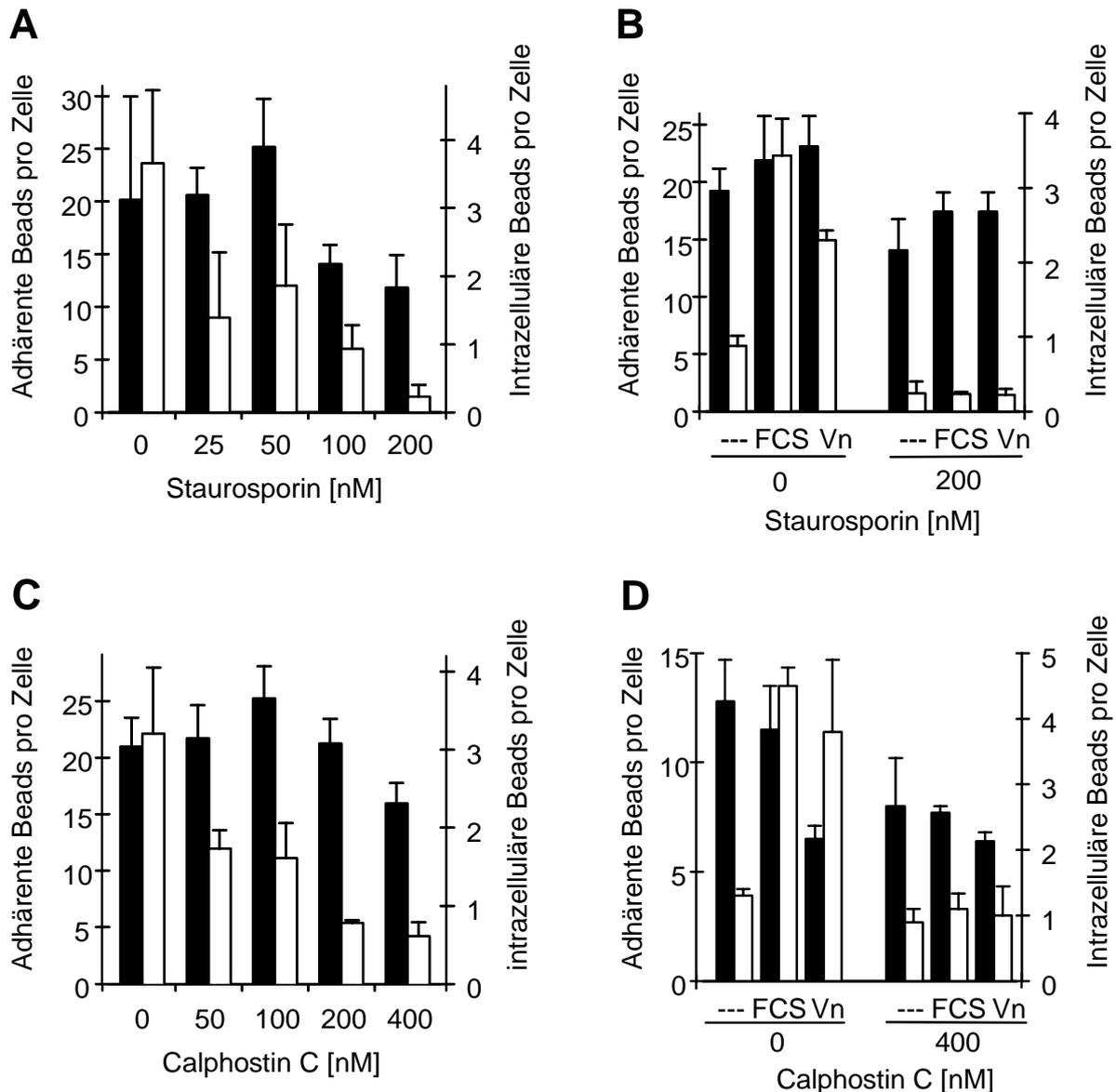


Abbildung 13: Die Aufnahme von HSPG-kreuzvernetzenden Beads in HeLa Zellen wird durch PKC Inhibitoren blockiert. Die Zellen wurden für 4 h mit HSPG-kreuzvernetzenden Beads in der Anwesenheit von 5% FCS (A, C) oder in der Ab- bzw. Anwesenheit von 5% FCS oder 1,5 µg/ml Vn (B, D) inkubiert. Staurosporin (A, B) oder Calphostin C (C, D) wurden in den angegebenen Konzentrationen 15 min vor der Zugabe der Beads zugegeben und waren während der gesamten Inkubationszeit anwesend. Die Quantifizierung der adhärennten (schwarze Balken) und der intrazellulären Beads (weiße Balken) wurde wie in 6.11.3 beschrieben durchgeführt.

Konzentrationsabhängige Effekte des Ser/Thr-Kinase Inhibitors Staurosporin (A, B) sowie des PKC-spezifischen Inhibitors Calphostin C (Abbildung 13C, D) wurden in der Anwesenheit von Serum (Abbildung 13A, C) gezeigt. Außerdem wurde eine effektive Inhibitorkonzentration in parallelen Experimenten mit Serum, mit Vn oder ohne Zusatz im Medium eingesetzt (Abbildung 13B, D). Beide Inhibitoren zeigen eine konzentrationsabhängige Inhibition der Beadaufnahme. Im Gegensatz dazu wurde die Adhärenz der Beads nur geringfügig bei der höchsten Inhibitorkonzentration beeinflusst (Abbildung 13A). Die Vitalität der Zellen wurde durch Trypanblau Färbung nachgewiesen.

Diese pharmakologischen Daten weisen darauf hin, daß sowohl bei der Vn-stimulierten Invasion als auch bei der HSPG-abhängigen Phagozytose die Signaltransduktion über die PKC abläuft.

3.1.7 Die HSPG-abhängige Phagozytose benötigt Aktinpolymerisation

Da es sich bei der Opa₅₀-vermittelten Invasion von *N. gonorrhoeae* um Phagozytose handelt, die durch eine Rekrutierung von F-Aktin charakterisiert ist (Grassmé et al., 1996), wurde der Einfluß des Aktin-Zytoskeletts auf die HSPG-abhängige Phagozytose untersucht.

Konzentrationsabhängige Effekte der Inhibitoren wurden in der Anwesenheit von Serum gezeigt (Abbildung 14A-D) und eine effektive Inhibitorkonzentration wurde parallel mit Serum, mit Vn und ohne Zusatz im Medium eingesetzt (Abbildung 14E). Cytochalasin D (Abbildung 14A), ein Inhibitor der Aktinpolymerisation sowie Nocodazol (Abbildung 14B) und Colchizin (Abbildung 14C), zwei Reagenzien, die Mikrotubuli destabilisieren, zeigen eine konzentrationsabhängige Inhibition der Beadaufnahme. Im Gegensatz dazu hat die Mikrotubuli-stabilisierende Reagenz Taxol (Abbildung 14D) bei erhöhten Konzentrationen keinen Einfluß auf die Effizienz der Phagozytose. Die Vitalität der Zellen bei den eingesetzten Inhibitorkonzentrationen wurde wiederum durch Trypanblau Färbung nachgewiesen. Mit Ausnahme von Cytochalasin D beeinflusst kein Inhibitor die Adhärenz der Beads an die HeLa Zellen. Obwohl Cytochalasin D die Adhärenz der Beads in einer konzentrationsabhängigen Art reduziert, ist die Verringerung der Beadaufnahme sehr viel stärker, was darauf hinweist, daß die Aktinpolymerisation für die Beadaufnahme notwendig ist. Auch die Phalloidin-färbung des filamentösen Aktins zeigte, daß das Aktin-Zytoskelett bei der phagozytischen Aufnahme der adhärennten, HSPG-kreuzvernetzenden Beads beteiligt ist (Abbildung 6). Ein Teil der adhärennten (kleine Pfeilspitze) und intrazellulären Beads (kleiner Pfeil) ist mit Umlagerungen des Zytoskeletts assoziiert, während andere adhärennte (große Pfeilspitze) oder intrazelluläre Beads (großer Pfeil) nicht mit dem F-Aktin assoziiert sind. Dies deutet darauf hin, daß es sich bei der Umlagerung des

Ergebnisse

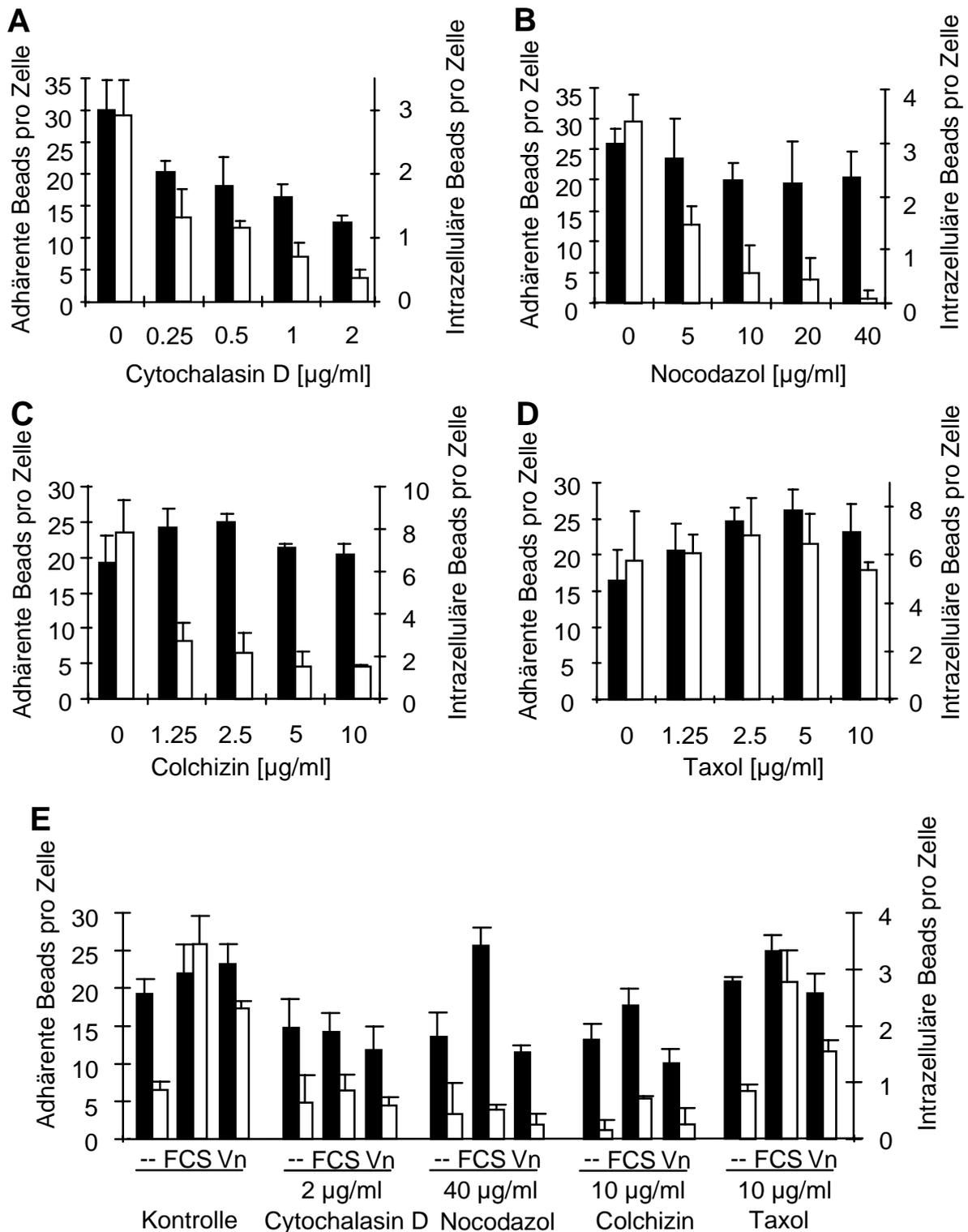


Abbildung 14: Die Aufnahme von HSPG-kreuzvernetzenden Beads erfolgt durch eine Aktin- und Mikrotubuli-abhängige Phagozytose. HeLa Zellen wurden für 4 h mit HSPG-kreuzvernetzenden Beads in der Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an Cytchalasin D (A), Nocodazol (B), Colchizin (C) und Taxol (D) sowie 5% FCS inkubiert. Effektive Konzentrationen der Inhibitoren (E) wurden zusätzlich in der Ab- bzw. Anwesenheit von 5% FCS oder 1,5 µg/ml Vn eingesetzt. Die Inhibitoren wurden in den angegebenen Konzentrationen 15 min vor der Zugabe der Beads zugegeben und waren während der gesamten Inkubationszeit anwesend. Die Quantifizierung der adhärennten (schwarze Balken) und der intrazellulären Beads (weiße Balken) wurde wie in 6.11.3 beschrieben durchgeführt.

Zytoskeletts um einen sehr dynamischer Prozeß handelt, der nur in einem begrenzten Zeitfenster sichtbar ist. Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß die pharmakologischen und zytochemischen Ergebnisse darauf hinweisen, daß die HSPG-abhängige Phagozytose die Aktinpolymerisation benötigt.

3.1.8 Die HSPG-abhängige Phagozytose unterscheidet sich von der Rezeptor-vermittelten Endozytose

Von Grassmé et al. wurde außerdem gezeigt, daß die Aufnahme der Gonokokken unabhängig von der Clathrin-vermittelten Endozytose ist (Grassmé et al., 1996). Die Endozytose kann durch den Inhibitor Monodansylcadaverin gehemmt werden (Davies et al., 1980). Um zu überprüfen, ob dies auch für die HSPG-abhängige Phagozytose zutrifft, wurde der Inhibitor auch bei den Beads eingesetzt.

Monodansylcadaverin inhibiert in den höchsten eingesetzten Konzentrationen die HSPG-vermittelte Phagozytose nicht, weder in der Ab- bzw. Anwesenheit von FCS oder Vitronektin (Abbildung 15). Dies deutet darauf hin, daß die HSPG-vermittelte Invasion unabhängig von der Rezeptor-vermittelten Invasion ist.

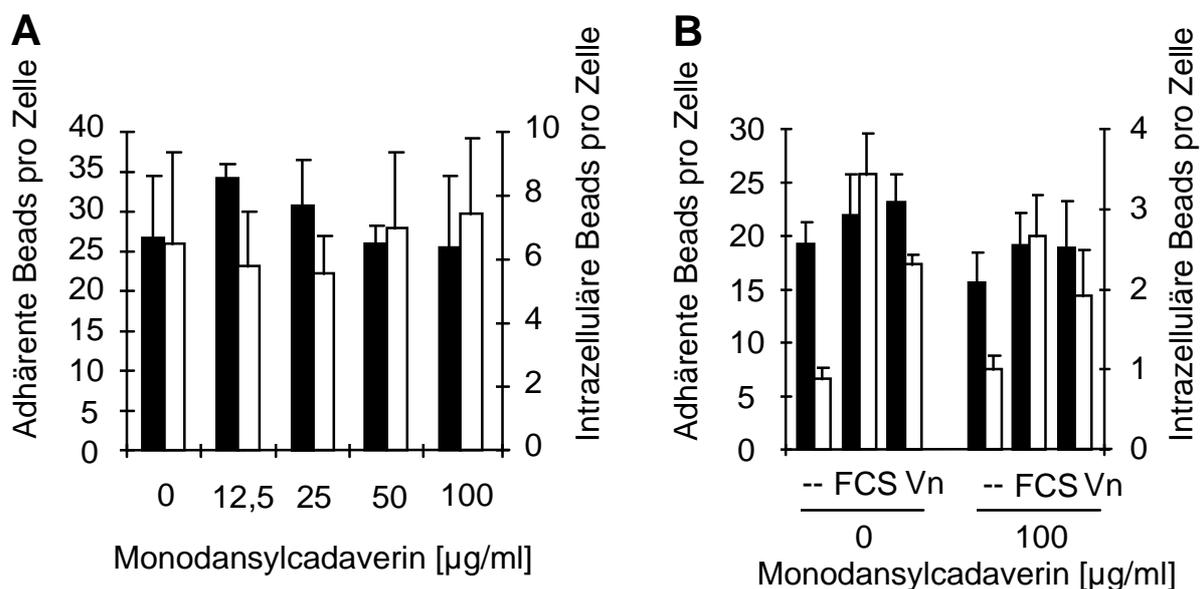


Abbildung 15: Die Aufnahme von HSPG-kreuzvernetzenden Beads unterscheidet sich von der Rezeptor-vermittelten Endozytose. HeLa Zellen wurden für 4 h mit HSPG-kreuzvernetzenden Beads in der Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an Monodansylcadaverin (A) in der Anwesenheit von 5% FCS inkubiert. Effektive Inhibitorkonzentrationen wurden zusätzlich in der Ab- bzw. der Anwesenheit von 5% FCS oder 1,5 µg/ml Vn eingesetzt. Die Inhibitoren wurden in den angegebenen Konzentrationen 15 min vor der Zugabe der Beads zugegeben und waren während der gesamten Inkubationszeit anwesend. Die Quantifizierung der adhärenente (schwarze Balken) und der intrazellulären Beads (weiße Balken) wurde wie in 6.11.3 beschrieben durchgeführt.

3.2 Bestimmung der für die Phagozytose verantwortlichen HSPGs

Es gibt mehrere Proteinfamilien, die zu den HSPGs gehören und die HS-Seitenketten tragen, z.B. die Syndekan-Familie, die Glypikane, außerdem noch Betaglykan und CD44E. Allerdings tragen die Betaglykane entweder nur HS bzw. nur Chondroitinsulfat oder überhaupt keine Glukosaminoglykane. Die CD44-Moleküle sind primär Chondroitinsulfat-Proteoglykane und nur ein kleiner Teil, die "splicing"-Variante CD44E, zählt zu den HSPGs. Daher war es anzunehmen, daß der Rezeptor für die Invasion der Gonokokken in Epithelzellen zu den Syndekanen und/oder Glypikanen gehört. In Vorarbeiten wurde außerdem gezeigt, daß Syndekan-4 in allen Zelllinien vertreten ist, die von Gonokokken invadiert werden (Meyer auf der Heyde, 1996). Hinzu kommt, daß Syndekan-1 das Proteoglykan ist, das am häufigsten auf Epithelzellen vorkommt (Bernfield et al., 1992). Von daher erschien es sinnvoll zu untersuchen, ob diese beiden Syndekane einen Einfluß auf die Adhärenz und Invasion der Gonokokken bei Epithelzellen haben.

3.2.1 Einfluß der Syndekan Expression in den parentalen HeLa Zellen auf die Adhärenz und Invasion von *N. gonorrhoeae*

Da bei Färbungen von HeLa Zellen öfters besonders stark exprimierende Zellen zu sehen waren, wurde versucht, diese Zellen durch Selektion über Magnetbeads anzureichern. Dazu wurden HeLa Zellen über Magnetbeads auf starke Syndekan-1 bzw. Syndekan-4 Expression und auf schwache Syndekan-1 bzw.

Tabelle 2: FACS-Messung der parentalen HeLa Zellen nach ihrer Selektion auf schwache und starke Syndekan Expression und Darstellung des Medians.

Zellen	anti-Syndekan-1 Antikörper	anti-Syndekan-4 Antikörper	Median
HeLa	x		31,91
schwache Syndekan-1 Expression	x		14,72
starke Syndekan-1 Expression	x		38,2
HeLa		x	17,47
schwache Syndekan-4 Expression		x	7,5
starke Syndekan-4 Expression		x	25,48

Syndekan-4 Expression selektiert. Dadurch sollte herausgefunden werden, ob eine Anreicherung bzw. Verringerung der Syndekane in HeLa Zellen zu Unterschieden in der Adhärenz und Invasion der Gonokokken führt. Die Zellen wurden dabei mit dem anti-Syndekan-1 Antikörper (Klon B-B4; Serotec, Oxford, England) bzw. dem anti-Syndekan-4 Antikörper (Klon 8G3) (David et al., 1992) sowie den Magnetbeads zweimal hintereinander positiv bzw. negativ auf Syndekan Expression selektiert. Anschließend wurden FACS-Messungen sowie Gentamicinassays durchgeführt.

Da die Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellen nicht sehr groß waren, wurde die FACS-Messung nicht dargestellt, sondern nur der Median einer Messung angegeben (Tabelle 2). Dieser entspricht dem Mittelwert der Fläche unter der Kurve einer FACS-Messung. Wie zu sehen ist, kommt es nur zu einer geringfügig stärkeren Expression von Syndekan-1 bzw. Syndekan-4 im Vergleich zu nicht selektierten HeLa Zellen. Dagegen führt die negative Selektion zu einem stärkeren Rückgang der Expression von Syndekan-1 bzw. Syndekan-4.

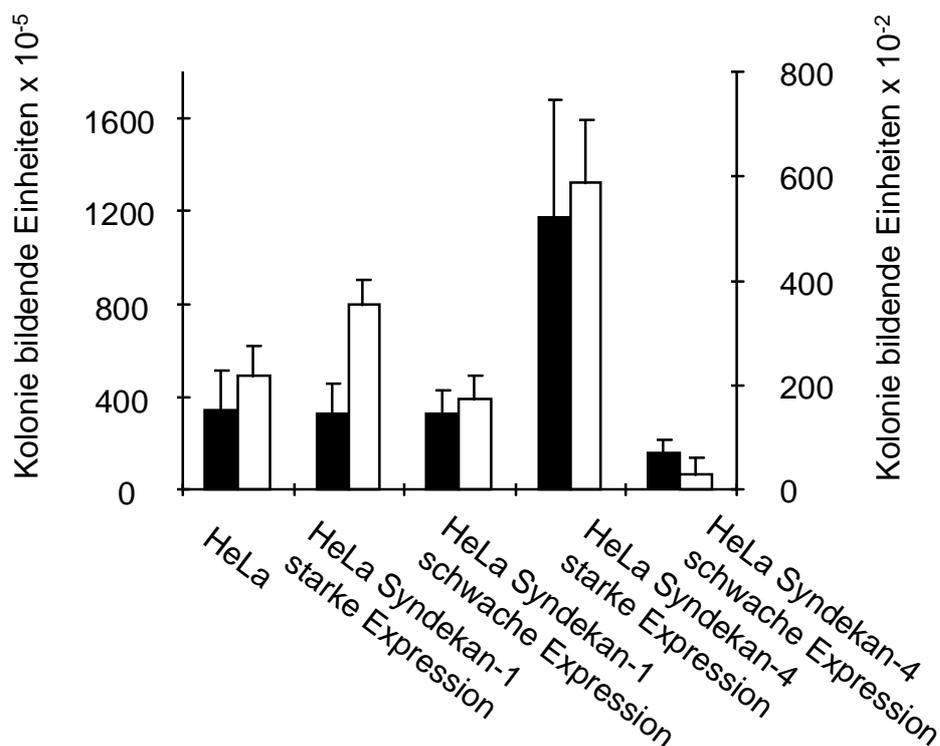


Abbildung 16: Adhärenz und Invasion von *N. gonorrhoeae* Stamm VP1 bei Syndekan selektierten HeLa Zellen in der Abwesenheit von FCS. Die Zellen wurden für 6 h in der Abwesenheit von FCS mit 1×10^7 Gonokokken inkubiert. Die Quantifizierung der adhärennten (schwarze Balken) und invasiven Bakterien (weiße Balken) wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Daten zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von einem repräsentativen Experiment, das in Triplikaten durchgeführt wurde.

Um herauszufinden, ob diese geringen Unterschiede eventuell schon zu einer Veränderung der Adhärenz- oder Invasioneigenschaften der Zellen führen, wurden Gentamicinassays durchgeführt.

Die geringfügig stärkere oder schwächere Syndekan Expression der HeLa Zellen führt schon zu einer verstärkten Invasion der Gonokokken in die Zellen, die auf starke Expression von Syndekan-1 bzw. Syndekan-4 selektiert wurden (Abbildung 16). Ebenso führt es zu einem Rückgang der Invasion bei den Zellen, die auf schwache Expression von Syndekan-1 bzw. Syndekan-4 selektiert wurden. Die Adhärenz der Gonokokken an die Zellen bleibt dabei unbeeinflusst, abgesehen von der Adhärenz bei den Syndekan-4 selektierten Zellen. Wieso die Adhärenz zunimmt konnte nicht geklärt werden. Die Versuche mit den positiv oder negativ selektierten HeLa Zellen müssen allerdings innerhalb von zwei Passagen nach der Selektion der Zellen durchgeführt werden, da die Zellen sehr schnell ihr normales Gleichgewicht an Syndekan Expression wieder einstellen.

3.2.2 Klonierung von Syndekan-1 und Syndekan-4 sowie zwei Deletionsmutanten

Da die Versuche mit den Syndekan-1 und Syndekan-4 selektierten Zellen zeigten, daß beide Syndekane einen Einfluß auf die Invasion der Gonokokken haben, erschien es sinnvoll, diese beiden Syndekane stabil in Zellen überzuexprimieren, um die Versuche unter gleichbleibenden Bedingungen durchführen zu können.

Das Syndekan-1 Gen wurde durch PCR mit den Primern EAF1 und EAF2 aus einem pBluescript SK(+) Vektor, der das Syndekan-1 Gen enthält (erhalten von Prof. G. David, Leuven, Belgien), amplifiziert. Am 5' Ende wurde eine *KpnI* Schnittstelle und am 3' Ende eine *XbaI* Schnittstelle über die verwendeten Oligonukleotide eingeführt. Das PCR-Produkt wurde an diesen Schnittstellen geschnitten und in pUC118 (Vieira and Messing, 1987) ligiert, wodurch pEAF3 entstand. Analog wurde für die

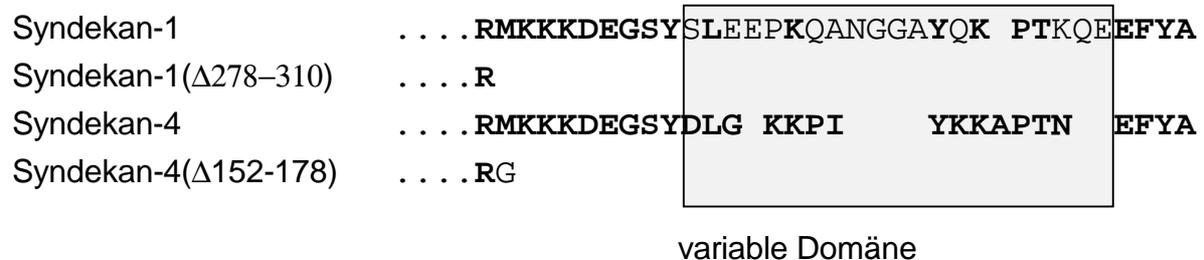


Abbildung 17: Darstellung der C-terminalen, intrazellulären Domänen von Syndekan-1 und Syndekan-4 sowie den beiden Deletionsmutanten. Die konservierten Aminosäuren im Vergleich zur Sequenz von Syndekan-4 sind in fetten Buchstaben dargestellt.

Deletionsmutante Syndekan-1(Δ 278-310) verfahren. Die PCR wurde mit den Primern EAF1 und EAF3 durchgeführt und es wurde das Plasmid pEAF4 erhalten. Die Konstruktion der Deletionsmutante erfolgte wie bei Miettinen, indem das zweite Codon der intrazelluläre Domäne (Methionin) in ein Stopcodon umgewandelt wurde (Abbildung 17) (Miettinen and Jalkanen, 1994).

Das Syndekan-4 Gen wurde durch PCR mit den Primern EAF4 und EAF5 aus einer cDNA Bank von Chang Zellen erhalten. Durch die, über die Oligonukleotide eingeführten Schnittstellen *KpnI* und *EcoRI* erfolgte die Ligation in pBluescript SK(+), wodurch das Plasmid pEAF5 entstand. Die Deletionsmutante Syndekan-4(Δ 152-178) wurde durch PCR mit den Primern EAF4 und EAF12 erstellt und das resultierende Fragment in pCRII-TOPO kloniert, wodurch das Plasmid pEAF39 entstand. Auch bei der Syndekan-4 Deletionsmutante wurde die intrazelluläre Domäne direkt nach dem zweiten Codon der intrazellulären Domäne deletiert. Allerdings wurde das Methionin in ein Glycin umgewandelt und dann das Stopcodon eingefügt (Abbildung 17) (Lebakken and Rapraeger, 1996).

Alle vier Plasmide wurden sequenziert und mit den veröffentlichten Sequenzen für Syndekan-1 und Syndekan-4 verglichen (Mali et al., 1990; David et al., 1992).

Das Syndekan-1 Gen und die Deletionsmutante enthalten beide eine Punktmutation. Bei der Base 261 kommt es zum Austausch eines Thymins gegen ein Cytosin, wodurch die Aminosäure Leucin in ein Prolin umgewandelt wird. Diese Mutation beeinflusst nicht die Anlagerung der HS-Seitenketten. Allerdings kann es durch die Mutation zu einer Konformationsänderung der Sekundärstruktur im extrazellulären Bereich des Syndekans kommen, falls sich die Mutation in einer α -Helix befindet.

Das Syndekan-4 Gen und die Deletionsmutante weisen gegenüber der publizierten Sequenz zwei Punktmutationen auf, die erste bei Base 103 durch den Austausch eines Thymins gegen ein Cytosin. Die zweite Punktmutation ist bei Base 229, der Austausch von Adenin gegen Guanin. Durch die erste Mutation wird die Aminosäure Valin gegen Alanin getauscht, bei der zweiten Mutation Aspartat gegen Glycin. Die erste Punktmutation dürfte keinen Einfluß auf die Faltung des Proteins haben, da beide Aminosäuren aliphatische Seitenketten tragen, die zu hydrophoben Bindungen im Protein beitragen. Die zweite Mutation könnte dagegen einen Einfluß haben, da eine saure Aminosäure entfernt wird. Die Anlagerung der HS-Seitenketten wird durch beide Mutationen nicht beeinflusst. Es kann nicht gesagt werden, ob die Mutationen durch die Klonierung entstanden sind oder ob es sich um Veränderungen des Syndekan-4 Gens in den kultivierten Chang Zellen handelt.

Um die vier Konstrukte in Zelllinien exprimieren zu können, wurde der Vektor pCEP4 ausgewählt (Invitrogen), der einen CMV-Promotor zur heterologen Genexpression aufweist. Er bietet den Vorteil, daß er episomal im Nukleus vorliegt und

nicht ins Genom integriert. Dadurch sind keine Veränderungen der Zellen aufgrund illegitimer Rekombination des Vektors ins Genom zu erwarten, wodurch eine Herstellung klonaler Zelllinien nicht notwendig wird. Außerdem liegt der Vektor in höherer Kopienzahl in den Zellen vor, wodurch eine stärkere Expression zu erwarten ist.

Das *KpnI-HindIII* Fragment aus pEAF3 bzw. pEAF4 wurde in die *KpnI-HindIII* geschnittenen Vektoren ligiert, wodurch die Plasmide pEAF15 (Syndekan-1) bzw. pEAF16 (Syndekan-1[Δ 278-310]) entstanden.

Das *KpnI-BamHI* Fragment aus pEAF5 wurde ebenfalls in den Vektor ligiert, wodurch pEAF17 (Syndekan-4) entstand. pEAF40 (Syndekan-1[Δ 152-178]) entstand durch Ligation des *KpnI-NotI* Fragments aus pEAF39 in pCEP4.

3.2.3 Expression der Konstrukte in HeLa Zellen

Für die Expression der vier Proteine wurde die adhärente Epithelzelllinie HeLa ausgewählt, da in ihr der von Gómez-Duarte beschriebene Effekt der Steigerung der Invasion durch Vitronektin beobachtet wurde (Gómez-Duarte et al., 1997) und diese Zelllinie sich gut transfektieren lässt. Nachteil dieser Zelllinie ist der relativ hohe Hintergrund an Syndekan-1 Expression.

Die Transfektion der vier Plasmide in die Zellen erfolgte über Liposomen. Dabei wird die DNA mit den Liposomen gemischt, wodurch es zur Bildung von DNA-Liposomen Komplexen kommt, die über Endozytose von den Zellen aufgenommen werden. Diese Methode ist sehr effektiv und die Überlebensrate der Zellen während der Transfektion ist sehr hoch. Zwei Tage nach der Transfektion erfolgt die Selektion der Zellen mit dem Antibiotikum Hygromycin B. Resistente polyklonale Zelllinien wurden nach ca. 3 bis 4 Wochen Selektion erhalten.

3.2.4 Charakterisierung der transfektierten HeLa Zellen

Durch die stabile Transfektion der HeLa Zellen mit den verschiedenen Syndekan-Konstrukten, kommt es zu morphologischen Veränderungen der Zellen.

Im Vergleich zur parentalen Zelllinie ändert sich die Morphologie der HeLa neo Zellen kaum (Abbildung 18B). In ihrer Form und ihrer Größe gleichen sie weitestgehend den nicht transfektierten HeLa Zellen (Abbildung 18A). Das gleiche gilt für die Zellen, die mit Syndekan-1(Δ 278-310) transfektiert wurden (Abbildung 18D). Durch die Überexpression von Syndekan-1 und Syndekan-4 dagegen ändert sich die Morphologie der Zellen. Die Zellen sind größer als die parentale Zelllinie, außerdem

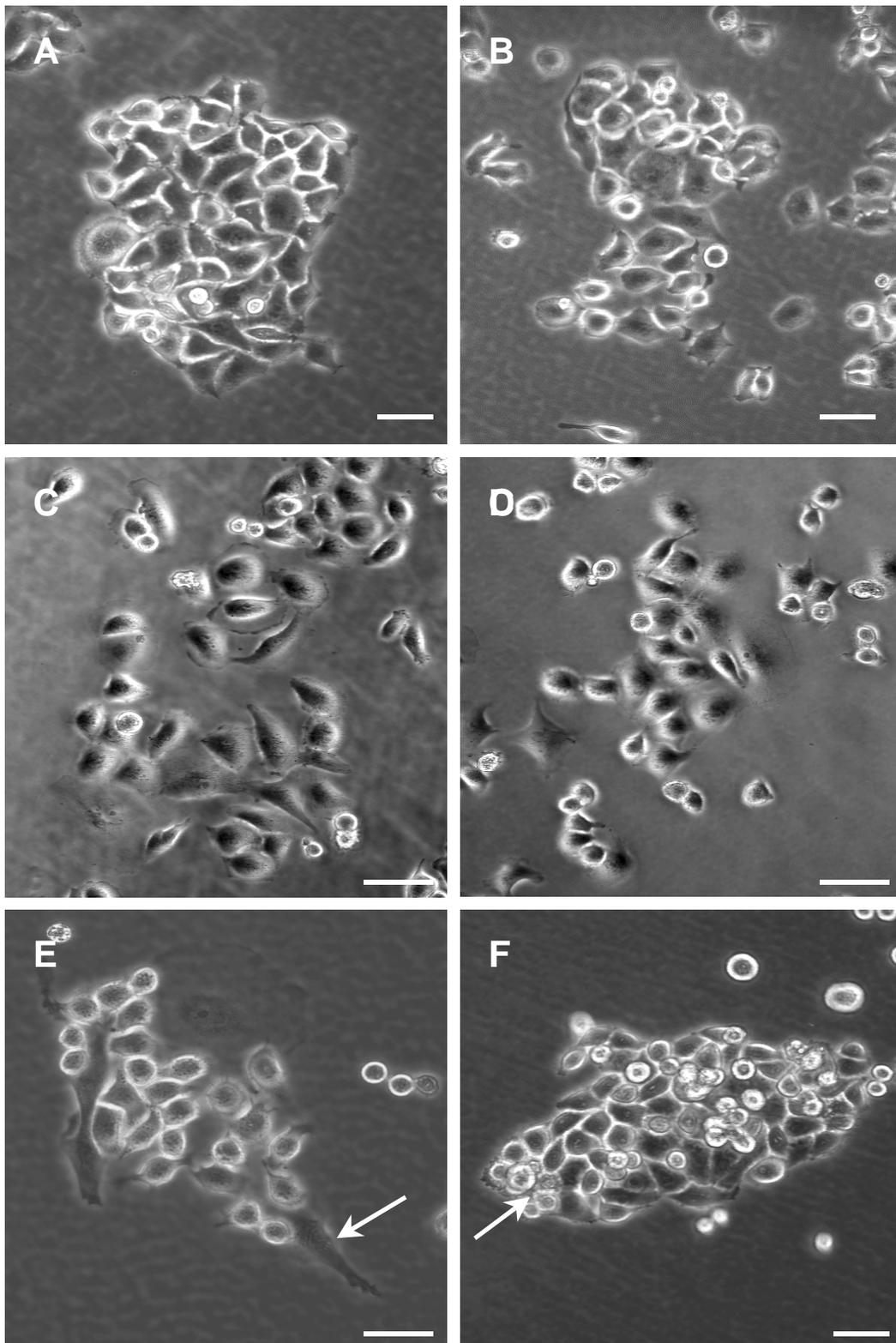


Abbildung 18: Morphologie der parentalen HeLa Zellen sowie der transfektierten Zellen. (A) Parentale HeLa Zellen, (B) HeLa neo Zellen, (C) HeLa Syndekan-1 Zellen, (D) HeLa Syndekan-1(Δ 278-310) Zellen, (E) HeLa Syndekan-4 Zellen, (F) HeLa Syndekan-4(Δ 152-178) Zellen. Die Vergrößerung wird durch einen Balken von 20 μ m angezeigt.

zeigen die Syndekan-4 überexprimierenden Zellen eine verstärkte Ausbildung von Filopodien und die Zellen werden flacher (Abbildung 18E, Pfeil). Syndekan-1(Δ 152-178) überexprimierende Zellen sind dagegen kleiner, sie haben die Tendenz, sich abzukugeln, und ein größerer Teil an Zellen wird nekrotisch oder apoptotisch (Abbildung 18F, Pfeil). Allgemein lässt sich für alle Transfektanten ein langsames Wachstum feststellen mit einer Teilungsrate von ca. 24 bis 36 h.

Dies wurde auch von Woods et al. für die Transfektion von CHO Zellen mit Syndekan-4 beschrieben (Woods et al., 1998). Die Zellen hatten ebenfalls eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie und eine Deletion der 11 C-terminalen Aminosäuren führte zu einem Rückgang der Zellspreitung.

Die Expression der Syndekane in den Zellen wurde durch FACS-Analyse überprüft. Die Zellen wurden mit dem Antikörper gegen Syndekan-1 bzw. dem Antikörper gegen Syndekan-4 gefärbt sowie einem sekundären DTAF-konjugierten Antikörper. Die Analyse erfolgt im Fluoreszenzkanal 1, während tote Zellen durch

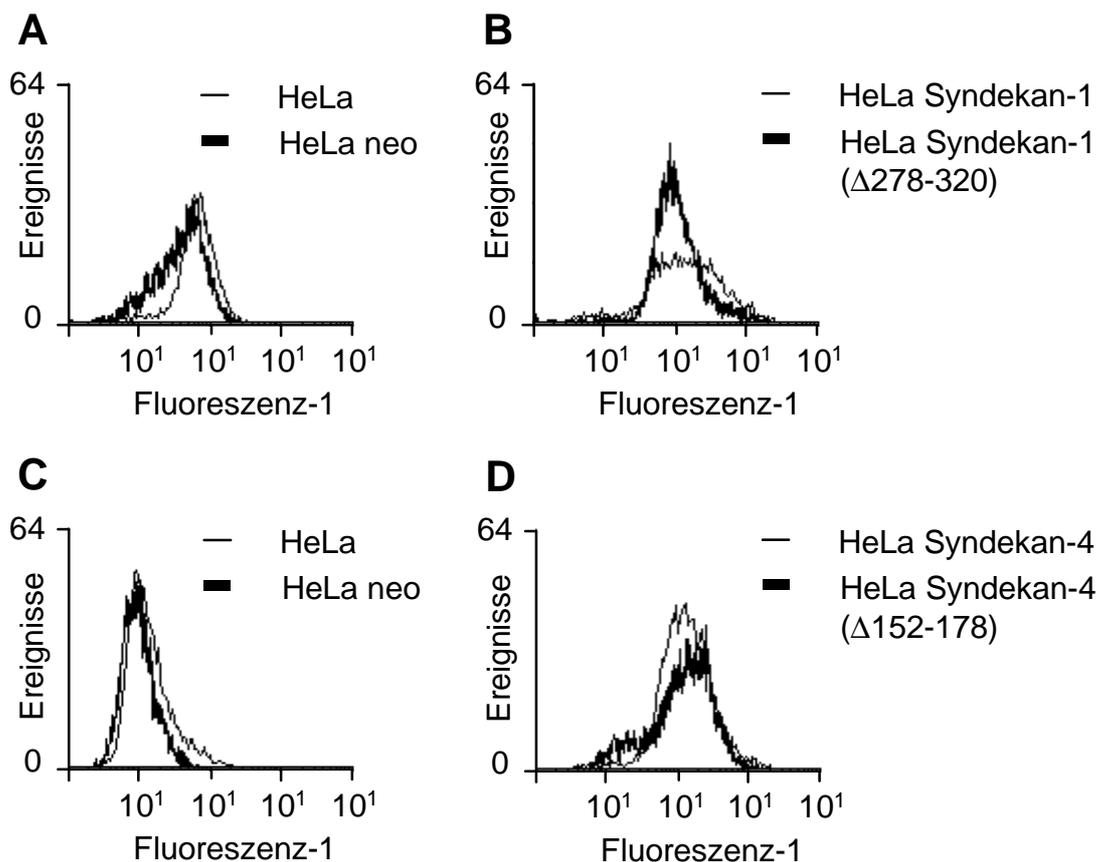


Abbildung 19: FACS-Analyse der transfizierten HeLa Zellen zur Überprüfung der Syndekan Expression. Die Zellen wurden mit EDTA vom Substrat abgelöst, mit dem anti-Syndekan-1 Antikörper (A, B) bzw. dem anti-Syndekan-4 Antikörper (C, D) und einem sekundären DTAF-konjugierten Antikörper für jeweils 1 h inkubiert. (A, C) HeLa und HeLa neo, (B) Expression von Syndekan-1 und Syndekan-1(Δ 278-310), (D) Expression von Syndekan-4 und Syndekan-4(Δ 152-178).

Propidiumjodid über den Fluoreszenzkanal 3 ausgeschlossen wurden. Dabei stellte sich heraus, daß die Zelllinien nicht aus einer homogenen Population bestehen, sondern daß teilweise noch Zellen vorhanden sind, die kein Syndekan bzw. nur sehr wenig davon exprimieren (Daten nicht gezeigt).

Um die stark exprimierenden Zellen von den restlichen Zellen abzutrennen, erfolgte eine Inkubation der entsprechenden Zelllinien mit dem monoklonalen Antikörper gegen Syndekan-1 bzw. Syndekan-4, der an Magnetbeads gekoppelt wurde. Diese Magnetbead-tragenden Zellen wurden über einen Magneten aus der Population herausgefischt. Eine FACS-Messung nach der Selektion zeigte, daß die Syndekan Expression der Zellen nun sehr homogen war. Nach ca. 4 Wochen nahm die Syndekan Expression ab und es bildete sich wieder eine inhomogene Population aus. Alle nachfolgenden Experimente wurden deshalb in einem Zeitraum von vier Wochen nach der Selektion durchgeführt.

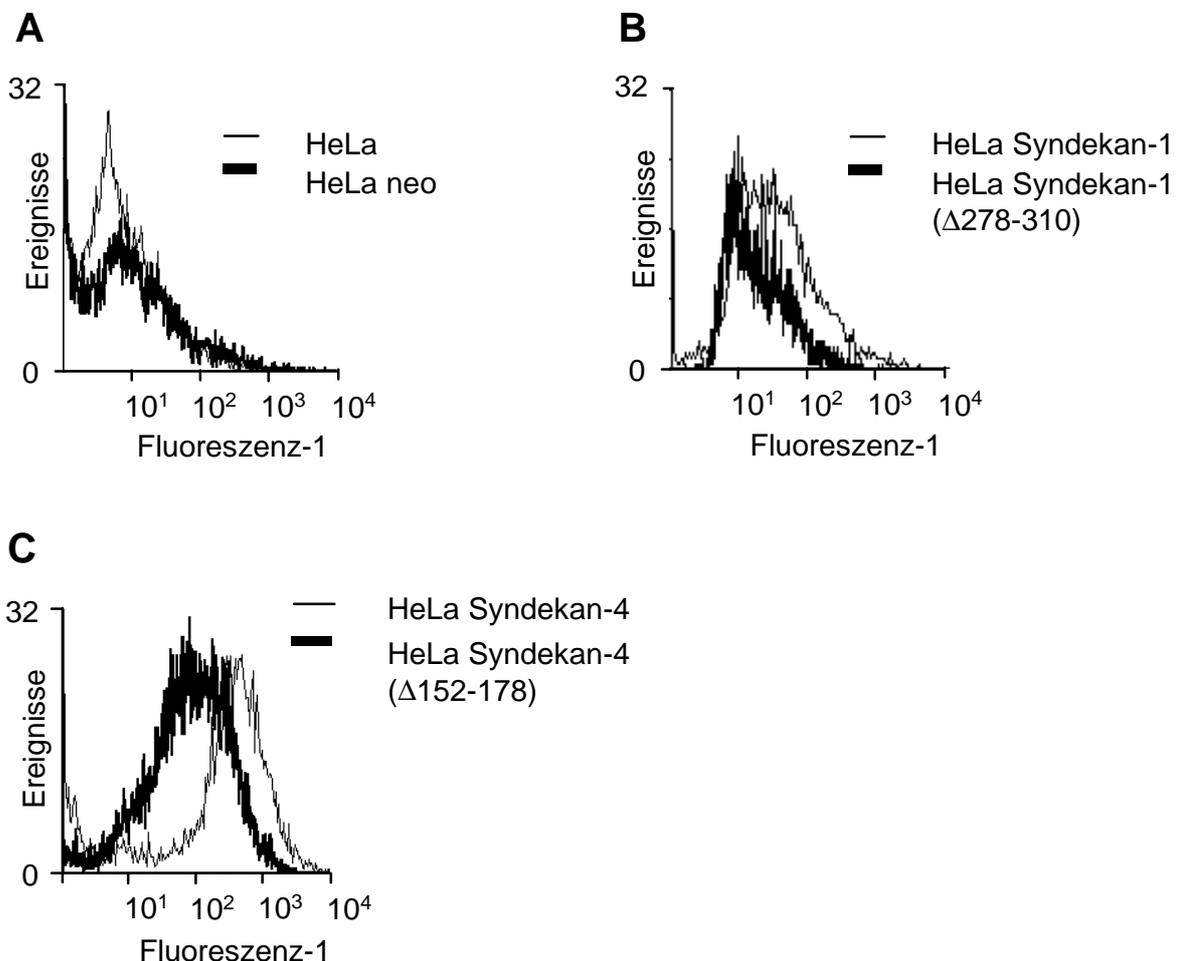


Abbildung 20: FACS-Analyse der transfizierten HeLa Zellen zur Überprüfung der HS-Seitenketten. Die Zellen wurden mit EDTA vom Substrat abgelöst, mit dem anti-HS-GAG Antikörper 10E4 und einem sekundären DTAF-konjugierten Antikörper für jeweils 1 h inkubiert. (A) HeLa und HeLa neo Zellen, (B) Expression von Syndekan-1 und Syndekan-1(Δ278-310), (C) Expression von Syndekan-4 und Syndekan-4(Δ152-178).

Vergleicht man die Expression des vollständigen Syndekan-1 und der Deletionsmutante (Abbildung 19B) mit den HeLa neo Zellen (Abbildung 19A), so ist die Erhöhung der Syndekan-1 Expression bei diesen beiden Zelllinien nicht so deutlich. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die HeLa neo Zellen bereits einen erhöhten Hintergrund an Syndekan-1 Expression aufweisen, ebenso wie die parentalen HeLa Zellen. Die Syndekan-4 Expression des vollständigen Syndekans und der Deletionsmutante (Abbildung 19D) ist dagegen stark erhöht im Vergleich zu den HeLa Zellen, die nur mit dem Vektor transfiziert wurden (HeLa neo, Abbildung 19C).

Um nachzuweisen, daß die überexprimierten Syndekane auch HS-Seitenketten tragen und somit die Möglichkeit haben, Gonokokken zu binden, wurden ebenfalls FACS-Analysen durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem anti-HS-GAG Antikörper (10E4) gefärbt und wie in 6.13.2 beschrieben analysiert.

In den FACS-Diagrammen ist zu sehen, daß alle Zelllinien, die Syndekane überexprimieren (Abbildung 20B, D), eine höhere Menge an HS-Seitenketten tragen im Vergleich zu den parentalen Zellen bzw. den Vektor transfizierten Zellen (Abbildung 20A). Die Menge an Heparansulfaten ist dabei in den Syndekan-4 überexprimierenden Zelllinien höher als in den Syndekan-1 überexprimierenden Zelllinien.

Eine weitere Überprüfung der Expression erfolgte durch Western Blots. Um HSPGs in Western Blots als einzelne Bande sehen zu können, müssen die HS-Seitenketten durch Heparitinase verdaut werden. Anschließend werden die Banden

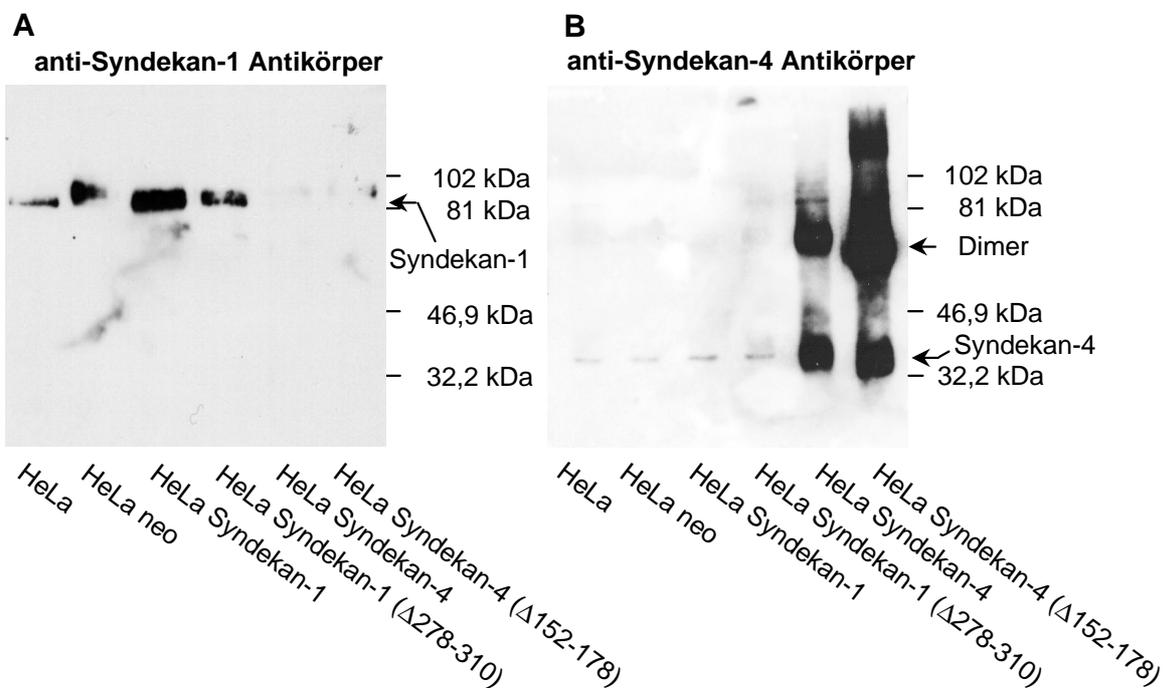


Abbildung 21: Expression von Syndekan-1 und Syndekan-4 in den transfizierten HeLa Zelllinien. (A) Expression von Syndekan-1 in den verschiedenen Zelllinien. (B) Expression von Syndekan-4 in den verschiedenen Zelllinien. Syndekan-1: ~ 75 kDa, Syndekan-4: ~ 35 kDa.

durch die bereits oben beschriebenen, spezifischen Syndekan-Antikörper detektiert.

Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, haben normale HeLa Zellen und Vektor transfizierte HeLa Zellen bereits einen relativ hohen Hintergrund an Syndekan-1 Expression. Durch die Transfektion der Zellen mit den Syndekan-1 Konstrukten kann diese Expression nur noch verdoppelt werden. In HeLa Zellen bzw. in Vektor transfizierten HeLa Zellen ist dagegen kaum ein Hintergrund an Syndekan-4 Expression zu sehen. Durch die Transfektion der Zellen mit Syndekan-4 Konstrukten erfolgt ein starker Anstieg der Expression. Bei der Entwicklung des Blots mit dem anti-Syndekan-4 Antikörper ist außerdem die Dimer-Bande von Syndekan-4 bei ca. 75 kDa zu sehen. Die Daten des Western Blots bestätigen somit die Daten der FACS-Analyse.

3.2.5 Einfluß der Syndekan Expression in HeLa Zellen auf die Adhärenz und Invasion von *N. gonorrhoeae*

Bei der Invasion der HSPG-kreuzvernetzenden Beads kommt es zur Akkumulation von HSPGs an Stellen an denen die Gonokokken an die Zellen adhären. Um festzustellen, ob es durch die Transfektion der verschiedenen Konstrukte ebenfalls zu einer Rekrutierung von HSPGs bzw. Syndekanen an den Stellen kommt, an denen die Gonokokken die Wirtszelle invadieren, wurden Infektionsexperimente mit *N. gonorrhoeae* Stamm VP1 und den verschiedenen HeLa Zelllinien durchgeführt.

Die Färbung der Zellen erfolgte mit den monoklonalen Antikörpern gegen HSPGs (10E4), Syndekan-1 (B-B4) bzw. Syndekan-4 (8G3) sowie einem polyklonalen Antikörper (Nr. 213) gegen die Gonokokken. Die Auswertung der Proben erfolgte durch optische x-y Schnitte mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Bei den HeLa neo Zellen wurde die Gesamtheit der HSPGs gefärbt. Dabei kann eine verstärkte Färbung von HSPGs an Stellen mit Gonokokken festgestellt werden (Abbildung 22, Reihe 1). Diese Rekrutierung ist vor allem bei nicht invadierten Gonokokken auf der Zelloberfläche zu sehen, während invadierte Gonokokken kaum mehr mit HSPGs assoziiert sind. Dies ist vergleichbar mit der Invasion von *N. gonorrhoeae* in Chang Zellen (Abbildung 3).

Bei den Zellen, die Syndekan-1 überexprimieren, kann ebenfalls eine Rekrutierung von Syndekan-1 an die Gonokokken beobachtet werden (Abbildung 22, Reihe 2). Dies deutet darauf hin, daß es zu einer Kreuzvernetzung des Syndekan-1 durch die Gonokokken kommt und eventuell auch zu einer Aufnahme der Bakterien über Syndekan-1 in die Zelle.

Auch bei den Zellen, die Syndekan-4 überexprimieren, sieht man eine Rekrutierung von Syndekan-4 durch Gonokokken, was ebenfalls auf eine Kreuzvernetzung des Syndekan-4 durch die Gonokokken hinweist, sowie auf eine

mögliche Invasion der Gonokokken über dieses Syndekan in die Zellen (Abbildung 22, Reihe 3).

Um nachzuweisen, daß die Kreuzvernetzung von Syndekan-1 und Syndekan-4 zur Phagozytose der Gonokokken führt, wurden Adhärenz- und Invasionsassays durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit dem Stamm VP1 für 6 h inkubiert. Um die Anzahl der adhärenenten Gonokokken zu bestimmen, wurden die Zellen nach der Inkubationszeit gewaschen, damit alle nicht adhärenenten Bakterien entfernt werden. Anschließend wurden die Zellen lysiert, Verdünnungsreihen hergestellt und auf GC-

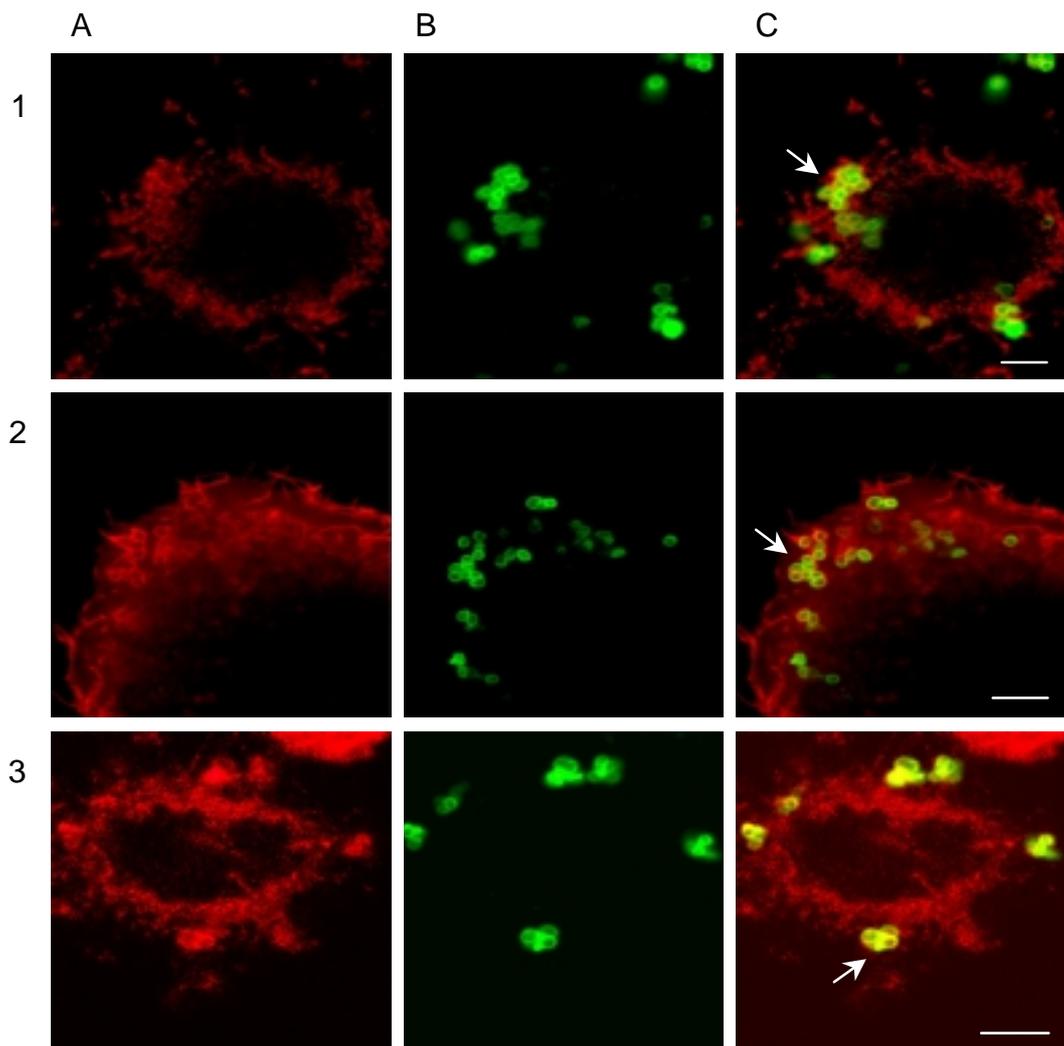


Abbildung 22: *N. gonorrhoeae* adhärert und invadiert in transfectierte HeLa Zellen durch die Rekrutierung von HSPGs bzw. Syndekan-1 und Syndekan-4. Die verschiedenen Zelllinien wurden für 2 h mit 1×10^7 Bakterien des Stamms VP1 inkubiert, mit PFA fixiert und mit einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung für HSPGs, Syndekan-1 bzw. Syndekan-4 (roter Kanal) und Gonokokken (grüner Kanal) gefärbt und anschließend durch konfokale Laser Scanning Mikroskopie analysiert. Die Kolokalisation von *N. gonorrhoeae* und HSPGs ist im Overlay in Spalte C gezeigt (Pfeile). 1. Reihe: HeLa neo gefärbt mit anti-HS-GAG Antikörper. 2. Reihe: HeLa Syndekan-1 gefärbt mit anti-Syndekan-1 Antikörper. 3. Reihe: HeLa Syndekan-4 gefärbt mit anti-Syndekan-4 Antikörper. Die Vergrößerung wird durch einen Balken von 5 μm angezeigt.

Platten ausplattiert. Nach zwei Tagen wurden die Kolonien gezählt und somit die Adhärenz der Bakterien ermittelt. Die Invasion der Gonokokken in die Zellen wurde dadurch bestimmt, daß die extrazellulären Bakterien nach der jeweiligen Inkubationszeit mit dem Antibiotikum Gentamicin, das eukaryontische Membranen nicht durchdringen kann, abgetötet wurden. Nach dem Waschen wurden die Bakterien wiederum lysiert und Verdünnungsreihen auf GC-Platten ausplattiert. Durch die Zählung der Kolonien kann somit die Invasionsrate der Bakterien bestimmt werden, indem die Anzahl der Kolonien auf die ursprüngliche Zahl der Zellen umgerechnet wird.

Hinsichtlich der Adhärenz der Bakterien an die Zellen ist kaum ein Unterschied zwischen den verschiedenen Zelllinien festzustellen. Alle Zellen binden die Gonokokken mit der gleichen Affinität (Abbildung 23). Die Invasion der Bakterien in Syndekan-1 überexprimierende HeLa Zellen ist doppelt so hoch wie in Vektor transfizierte HeLa Zellen. Die Überexpression von Syndekan-4 bewirkt hingegen eine

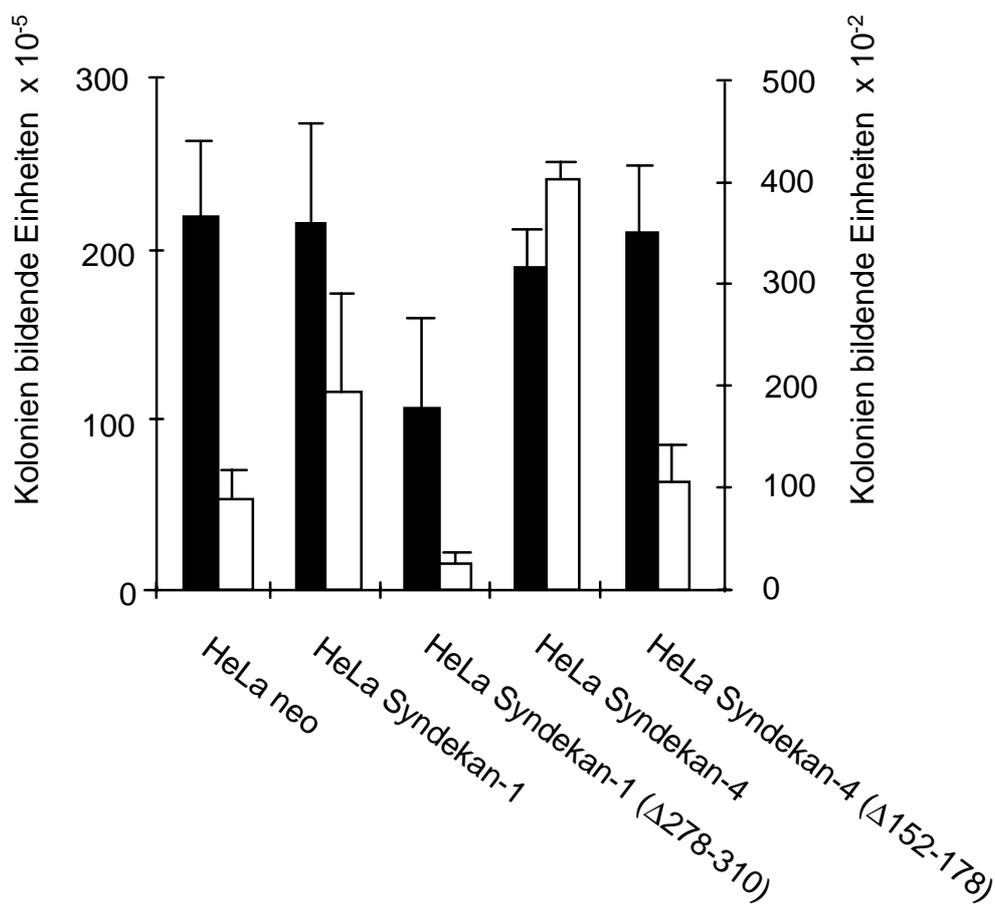


Abbildung 23: Adhärenz und Invasion von *N. gonorrhoeae* Stamm VP1 bei Syndekan transfizierten HeLa Zellen. Die Syndekan transfizierten HeLa Zellen wurden für 6 h in der Abwesenheit von FCS mit 1×10^7 Gonokokken inkubiert. Die Quantifizierung der adhärennten (schwarze Balken) und invasiven Bakterien (weiße Balken) wurde wie im Text beschrieben durchgeführt. Die Daten zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von einem repräsentativen Experiment, das in Triplikaten durchgeführt wurde.

vier- bis fünfmal höhere Invasion der Gonokokken in die Zellen. Die Überexpression der Deletionsmutanten von Syndekan-1 und Syndekan-4 zeigt, daß es zu einer Reduktion der Invasion im Vergleich zu den normalen bzw. Vektor transfizierten HeLa Zellen kommt. Dadurch läßt sich auf eine Funktion der intrazellulären Domäne der beiden Syndekane während der Aufnahme der Gonokokken schließen. Die intrazelluläre Domäne scheint für die Signaltransduktion und die anschließende Aufnahme notwendig zu sein.

Es läßt sich feststellen, daß es durch die Rekrutierung von Syndekan-1 oder Syndekan-4 zur phagozytischen Aufnahme der Gonokokken kommt. Die Phagozytose ist bei Syndekan-4 überexprimierenden Zellen doppelt so hoch wie bei Syndekan-1 überexprimierenden Zellen und dort immer noch signifikant höher als bei Vektor transfizierten Zellen.

Da die normalen HeLa Zellen hinsichtlich ihrer Syndekan-Expression sehr variabel sind, wurden bei unabhängigen Versuchen sehr unterschiedliche Werte für die Adhärenz und auch für die Invasion der Gonokokken erhalten. Daher wurden für die weiteren Versuche nur Vektor transfizierte HeLa Zellen verwendet. Um auszuschließen, daß die verwendete, Vektor transfizierte HeLa Zelllinie eine Ausnahme hinsichtlich der Adhärenz und der Invasion darstellt, wurden verschiedene Klone dieser Zelllinie getestet. Wie Abbildung 24 zeigt, ist die Invasion der Gonokokken in allen getesteten, Vektor transfizierten HeLa Zelllinien annähernd gleich. Auch bei der Adhärenz der Gonokokken an die Zellen lassen sich keine Unterschiede feststellen. Für alle weiteren Versuche wurde Klon 1 verwendet.

Um ebenfalls auszuschließen, daß die Syndekan-4 überexprimierende Zelllinie hinsichtlich ihrer Expression und Funktionalität aus der Reihe fällt, wurden weitere Syndekan-4 transfizierte Zelllinien getestet und miteinander verglichen.

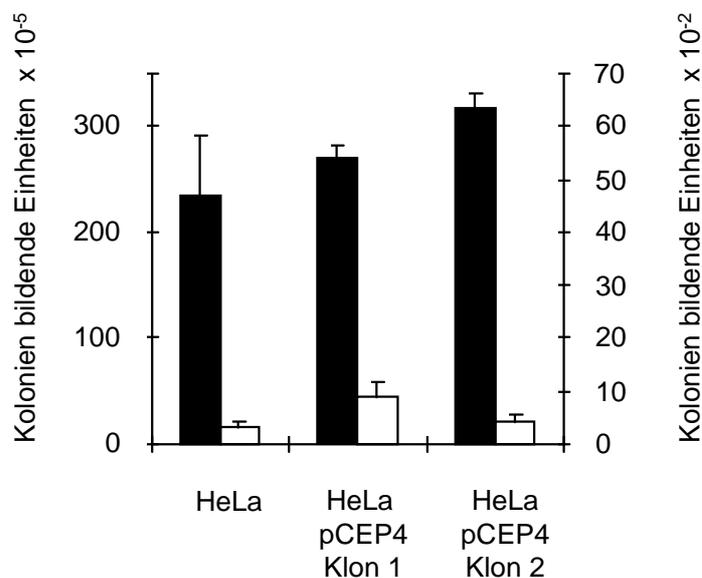


Abbildung 24: Adhärenz und Invasion von *N. gonorrhoeae* Stamm VP1 bei klonalen, Vektor transfizierten HeLa Zelllinien. Die Zellen wurden für 6 h in der Abwesenheit von FCS mit 1×10^7 Gonokokken inkubiert. Die Quantifizierung der adhärenenten (schwarze Balken) und invasiven Bakterien (weiße Balken) wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Daten zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von einem repräsentativen Experiment, das in Triplikaten durchgeführt wurde.

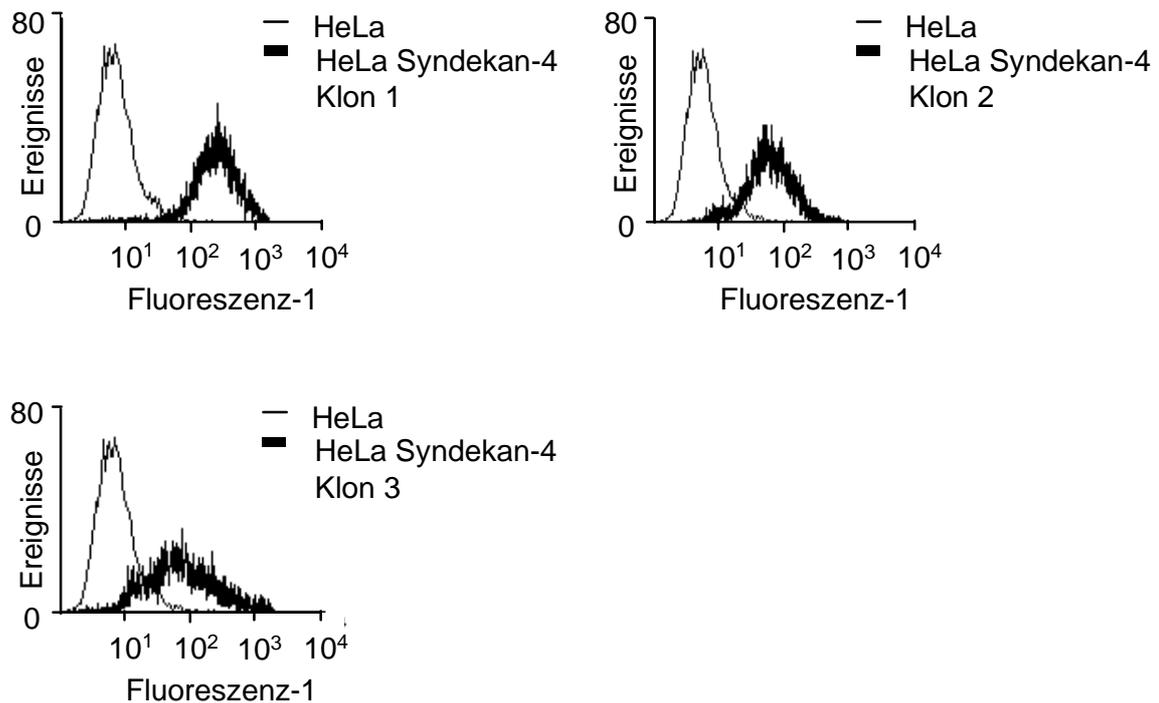


Abbildung 25: FACS-Analyse der verschiedenen Syndecan-4 transfizierten HeLa Zelllinien. Die Zellen wurden mit EDTA vom Substrat abgelöst, mit dem anti-Syndecan-4 Antikörper (8G3) und einem sekundären DTAF-konjugierten Antikörper für jeweils 1 h inkubiert.

Alle diese Syndecan-4 transfizierten Zelllinien zeigen annähernd die gleiche Expression von Syndecan-4 bei FACS-Analysen mit dem Syndecan-4 spezifischen Antikörper 8G3 (Abbildung 25). Als nächstes wurden sie auf ihre Eigenschaften bezüglich der Vermittlung von Adhärenz und Invasion getestet.

Die Invasion von *N. gonorrhoeae* ist bei allen Syndecan-4 transfizierten Zelllinien im Vergleich zu den parentalen HeLa Zellen stark erhöht, während die Adhärenz der Bakterien an die Zellen kaum beeinflusst wird (Abbildung 26). Vergleicht man die einzelnen Zelllinien miteinander, so ist zwischen Klon 1 und Klon 3 nochmals eine Verdopplung der Invasion festzustellen. Es handelt sich bei diesem Effekt also nicht um ein spezifisches Phänomen einer einzelnen, Syndecan-4 transfizierten Zelllinie, sondern um einen allgemein gültigen Prozeß. Da die klonale Zelllinie 1 zuerst erstellt worden war, wurde sie für alle weiteren Versuche verwendet.

Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, wird die Invasion von *N. gonorrhoeae* in HeLa Zellen durch Serum bzw. den Matrixfaktor Vitronektin um das acht bis zehnfache gesteigert. Diese Steigerung der Invasion erfolgt durch die Bindung von Vitronektin sowohl an die Gonokokken als auch an die $\alpha_v\beta_5$ Integrine bzw. $\alpha_v\beta_3$ Integrine (Dehio et al., 1998).

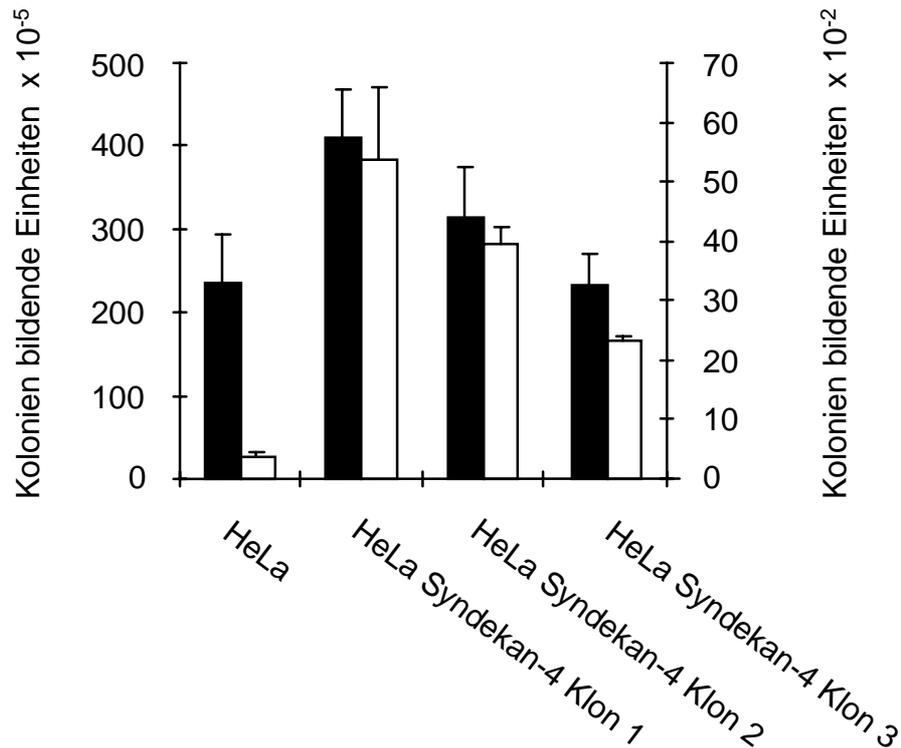


Abbildung 26: Adhärenz und Invasion von *N. gonorrhoeae* Stamm VP1 bei unabhängig transfizierten, polyklonalen, Syndekan-4 überexprimierenden HeLa Zelllinien. Die Zellen wurden für 6 h in der Abwesenheit von FCS mit 1×10^7 Gonokokken inkubiert. Die Quantifizierung der adhärenenten (schwarze Balken) und invasiven Bakterien (weiße Balken) wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt. Die Daten zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von einem repräsentativen Experiment, das in Triplikaten durchgeführt wurde.

Um zu überprüfen, ob die Aufnahme der Gonokokken in die Syndekan transfizierten HeLa Zellen ebenfalls durch Serum stimuliert werden kann, wurden Adhärenz- und Invasionsassays in der Anwesenheit von FCS durchgeführt.

Durch die Anwesenheit von Serum wird die Adhärenz der Gonokokken an die verschiedenen Zelllinien kaum beeinflusst (Abbildung 27), die Anzahl der adhärenenten Bakterien entspricht in etwa der ohne FCS (Abbildung 23). Bei der Invasion der Bakterien in die Zellen kommt es mit FCS zu einer zehnfachen Steigerung im Vergleich zu der Invasion ohne FCS. Werden die Invasionswerte der einzelnen Zelllinien mit den Vektor transfizierten HeLa Zellen verglichen, so wird die Invasion in die Syndekan-1 überexprimierenden Zellen nicht signifikant gesteigert. Die Invasion in die Syndekan-4 transfizierten HeLa Zellen führt allerdings zu einer Verdreifachung des Wertes. Bei den beiden Deletionsmutanten der Syndekane ist die Reduktion der Invasion deutlicher in der Abwesenheit von Serum.

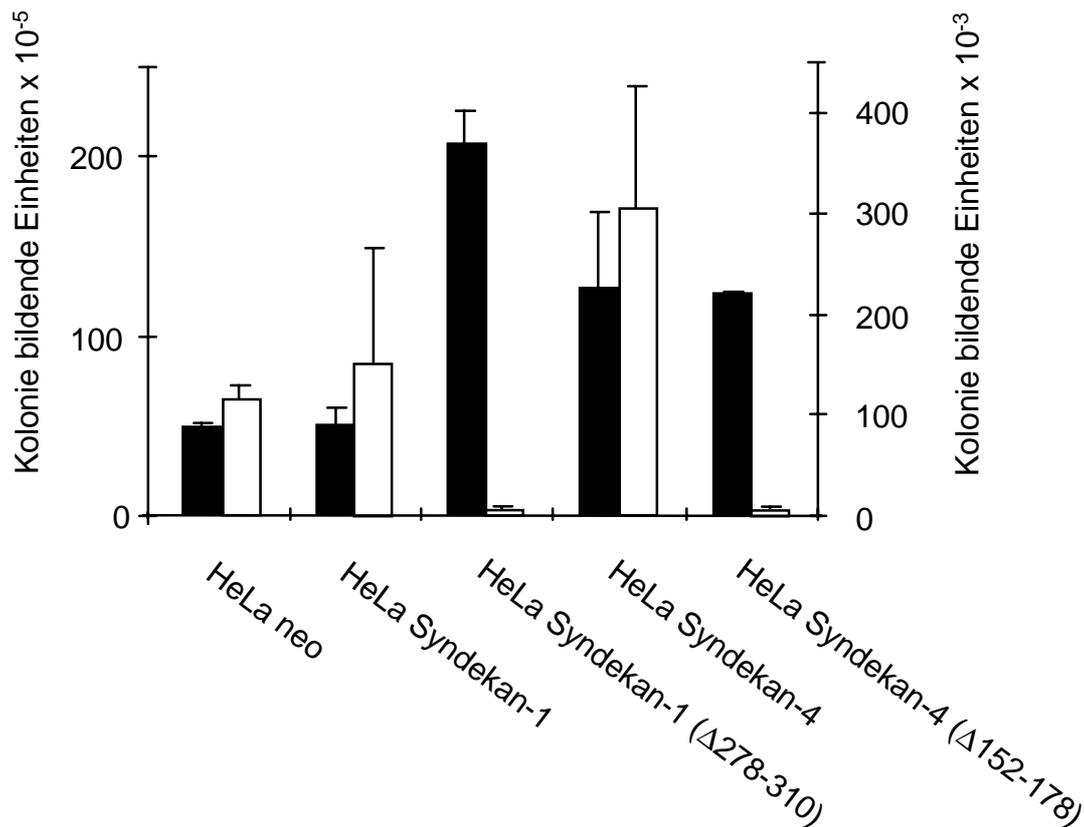


Abbildung 27: Adhärenz und Invasion von *N. gonorrhoeae* Stamm VP1 bei verschiedenen HeLa Zelllinien in der Anwesenheit von FCS. Die Zellen wurden für 6 h in der Anwesenheit von 5% FCS mit 1×10^7 Gonokokken inkubiert. Die Quantifizierung der adhärenenten (schwarze Balken) und in vasiven Bakterien (weiße Balken) wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt. Die Daten zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von einem repräsentativen Experiment, das in Triplikaten durchgeführt wurde.

Die Phagozytose der Gonokokken wird also durch die Anwesenheit von FCS um das zehnfache gesteigert, während die Adhärenz nicht beeinflusst wird. Dies trifft für alle transfektierten HeLa Zellen zu.

3.2.6 Expression von Syndekan-4 und der Deletionsmutante in K562 und Molt-4 Zellen und Charakterisierung der Zelllinien

Da HeLa Zellen einen Hintergrund an Syndekan Expression (insbesondere Syndekan-1) aufweisen, wurden zwei weitere Zelllinien, die natürlicherweise kaum Syndekane ausdrücken (Steinfeld et al., 1996), mit Syndekan-4 und dessen Deletionsmutante transfiziert. Dadurch sollte ebenfalls überprüft werden, ob es durch die Überexpression der Syndekane zu einer Invasion der Gonokokken in die Zellen kommt. Bei K562 handelt es sich um einen multipotente, maligne, hematopoetische Zelllinie. Molt-4 ist eine Zelllinie, die aus dem peripheren Blut eines Patienten mit

Lymphoblasten Leukämie isoliert wurde. Für die Transfektion der Molt-4 Zellen wurde der Vektor pREP4 verwendet, der ebenfalls episomal im Nukleus vorliegt. Im Unterschied zum pCEP4 Vektor besitzt er allerdings einen RSV-Promotor, der in lymphoiden Zellen eine höhere Expression als der CMV-Promotor vermittelt.

Durch die Ligation des *KpnI-BamHI* Fragments aus pEAF5 in pREP4 entstand pEAF23 (Syndekan-4). Durch Ligation des *KpnI-NotI* Fragments aus pEAF39 in pREP4 entstand pEAF24 (Syndekan-4[Δ 152-178]).

Die Transfektion in die Zellen erfolgte analog zu den HeLa Zellen mit einer kationischen Transfektionsreagenz. Nach der Selektion und dem Erhalt stabiler Zelllinien ist kein morphologischer Unterschied zwischen den Transfektanten und den parentalen Zelllinien festzustellen. Die Expression der Syndekane in den beiden Suspensionszelllinien wurde über FACS-Analyse überprüft.

Die Zellen wurden mit dem Antikörper gegen Syndekan-4 gefärbt sowie mit

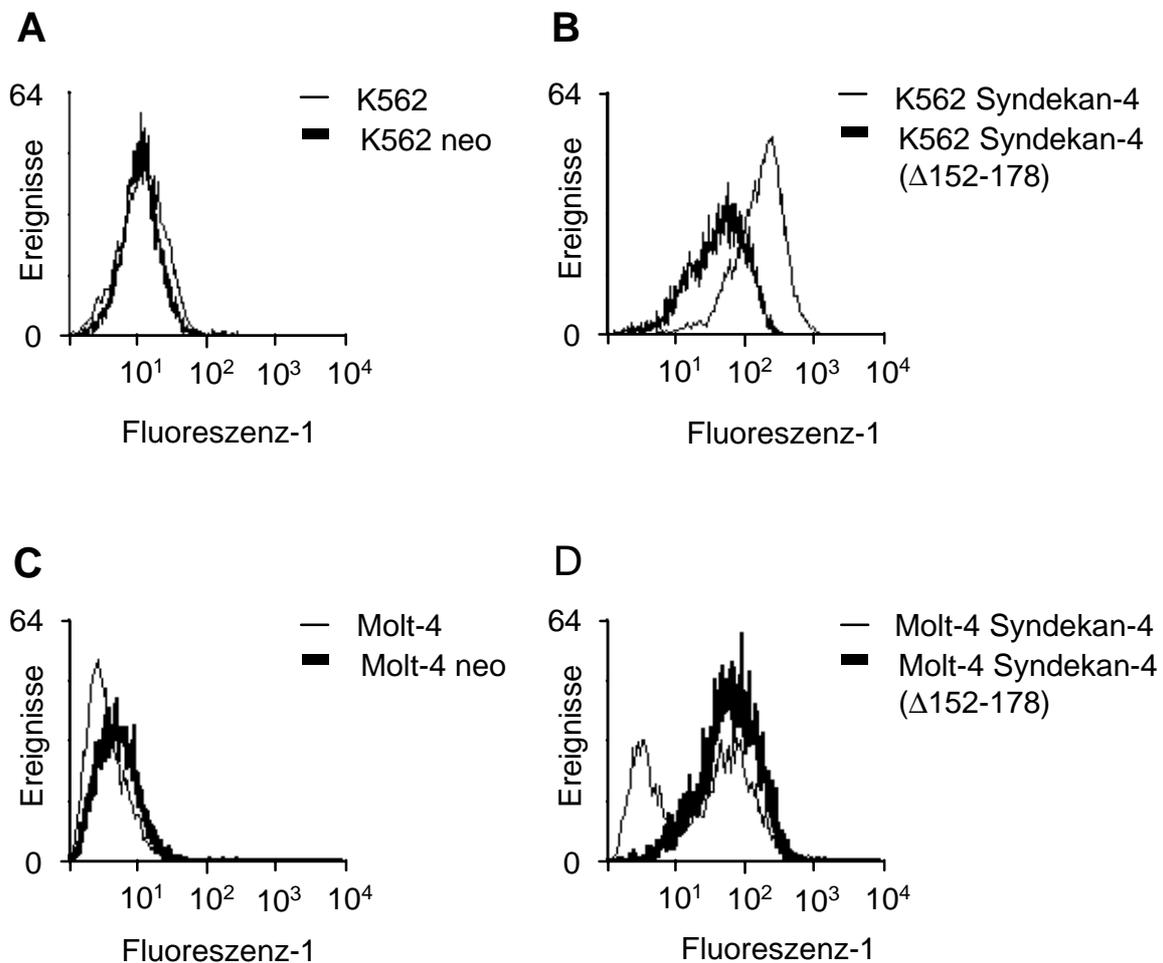


Abbildung 28: FACS-Analyse der transfizierten Suspensionszelllinien K562 und Molt-4 zur Überprüfung der Syndekan Expression. Die Färbung erfolgte mit dem anti-Syndekan-4 Antikörper und einem sekundären DTAF-konjugierten Antikörper für jeweils 1 h (A) K562 Zellen und Vektor transfizierte K562 Zellen. (B) K562 Syndekan-4 und K562 Syndekan-4(Δ 152-178). (C) Molt-4 Zellen und Vektor transfizierte Molt-4 Zellen. (D) Molt-4 Syndekan-4 und Molt-4 Syndekan-4(Δ 152-178).

einem sekundären DTAF-konjugierten Antikörper. Die Analyse der gefärbten Zellen erfolgte im Fluoreszenzkanal 1. Durch eine Propidiumjodid-Färbung wurden tote Zellen markiert und über den Fluoreszenzkanal 3 ausgeschlossen. Die Expression der jeweiligen Syndekan-Konstrukte war schon nach einer Aufreinigung über die Magnetbeads sehr homogen, es waren nur sehr wenige Zellen vorhanden, die kein oder sehr wenig Syndekan exprimierten (Abbildung 28). Dies ist dadurch erklärbar, daß die Zellen kaum einen Hintergrund an Syndekan-1 und Syndekan-4 Expression haben (Steinfeld et al., 1996) und die Effizienz der Transfektion sehr hoch gewesen sein muß.

Es wurde ebenfalls überprüft, ob die transfizierten Zelllinien auch HS-Seitenketten tragen und somit die Möglichkeit haben, Gonokokken zu binden. Dazu wurden FACS-Analysen mit dem monoklonalen Antikörper 10E4 durchgeführt, der die HS-Seitenketten von Proteoglykanen erkennt.

Wie in den FACS-Messungen zu sehen ist, exprimieren die Zellen nicht sehr

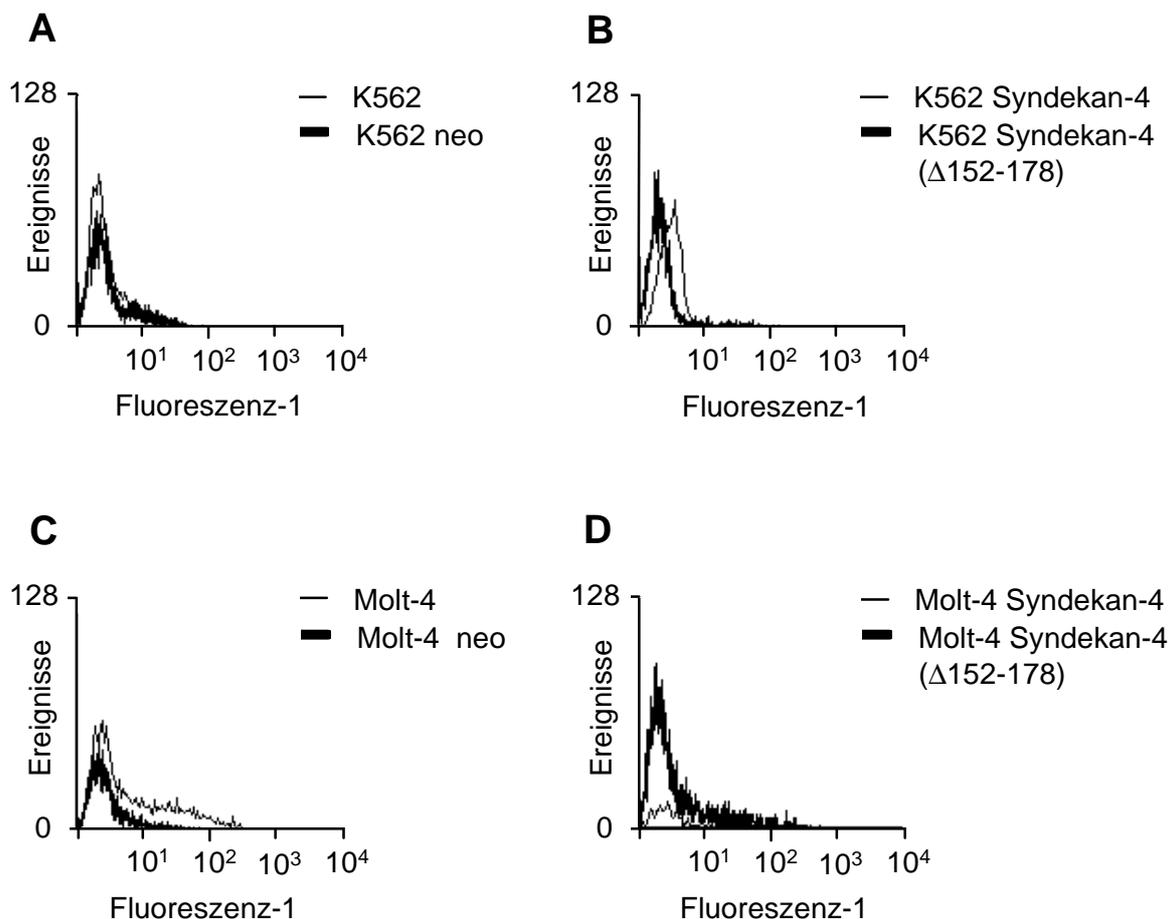


Abbildung 29: FACS-Analyse der transfizierten HeLa Zellen zur Überprüfung der HS-Seitenketten. Die Zellen wurden mit EDTA vom Substrat abgelöst, mit dem anti-HS-GAG Antikörper 10E4 und einem sekundären DTAF-konjugierten Antikörper für jeweils 1 h inkubiert. (A) K562 Zellen und Vektor transfizierte K562 Zellen. (B) K562 Syndekan-4 und K562 Syndekan-4(Δ 152-178). (C) Molt-4 Zellen und Vektor transfizierte Molt-4 Zellen. (D) Molt-4 Syndekan-4 und Molt-4 Syndekan-4(Δ 152-178).

viel mehr an Heparansulfaten im Vergleich zu den Vektor transfizierten Zelllinien bzw. den parentalen Zellen (Abbildung 29). Dies könnte sich auf die Adhärenz der Bakterien auswirken.

3.2.7 Einfluß der Syndekan Expression in Molt-4 und K562 Zellen auf die Adhärenz und Invasion von *N. gonorrhoeae*

Da es sich bei den K562 und Molt-4 Zellen um Suspensionszellen handelt, wurde versucht, diese durch verschiedene Matrix- und Adhärenzfaktoren an die Unterlage zu binden. Dabei wurden Fibronectin ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Laminin ($0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Gelatine ($0,1 \text{ mg}/\text{cm}^2$), Polylysin ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Kollagen ($50 \mu\text{l}$ pro Well) und Vitronectin ($0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) getestet. Mit Gelatine und Kollagen konnte keine Adhärenz der Zellen an die Unterlage erreicht werden. Die anderen Matrixfaktoren bewirkten eine teilweise Adhärenz der Zellen, allerdings war diese nicht ausreichend, um die Zellen während der Waschschriffe der Invasionsassays an der Unterlage zu halten. Daher wurde für Gentamicinassays versucht, die Waschschriffe in Eppendorfgefäßen durchzuführen. Allerdings war der Verlust an Zellen hierbei so hoch, daß die Versuche nicht reproduzierbar waren. Die Molt-4 und K562 Zellen konnten deshalb für die weiteren Experimente nicht verwendet werden, obwohl sie eventuell ein ideales System dargestellt hätten, da sie eine sehr gute Expression der Syndekane zeigen und auch kaum einen Hintergrund an Syndekan Expression aufweisen.

3.2.8 Invasion von anti-Syndekan Antikörper gekoppelten Latexbeads in Syndekan transfizierte HeLa Zellen

Um zu überprüfen, ob eine Kreuzvernetzung von Syndekan-1 bzw. Syndekan-4 für die phagozytische Aufnahme in Epithelzellen ausreichend sein kann, wurden die jeweiligen Antikörper an Latexbeads gekoppelt wie es schon mit dem HSPG-kreuzvernetzenden Antikörper 10E4 durchgeführt wurde (3.1.2).

3.2.8.1 Anti-Syndekan-1 Antikörper gekoppelte Latexbeads

Die Latexbeads wurden für 4 h mit den Syndekan-1 transfizierten HeLa Zellen in der Anwesenheit und Abwesenheit von FCS inkubiert.

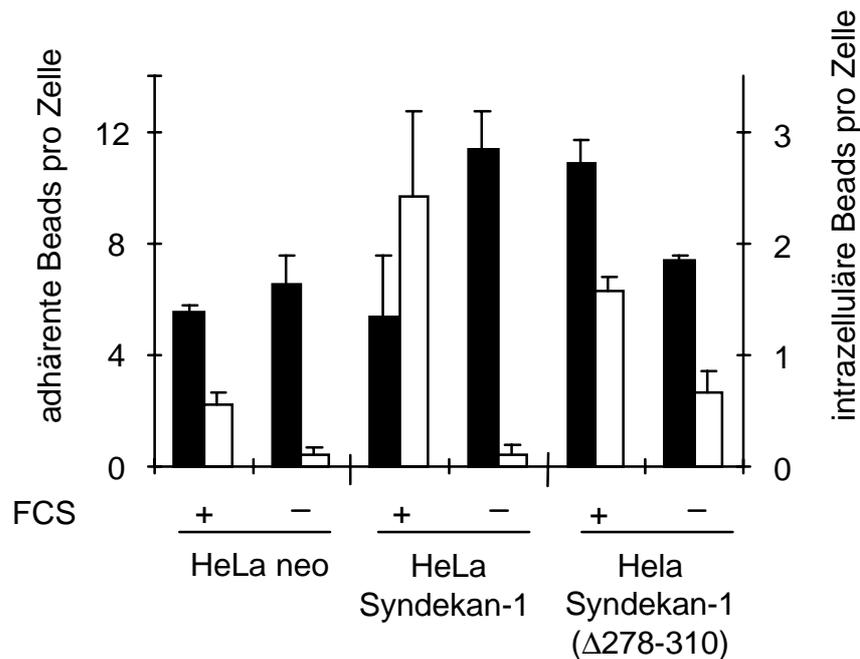


Abbildung 30: Adhärenz und Invasion von anti-Syndekan-1 Antikörper gekoppelten Beads in Syndekan-1 transfizierte HeLa Zellen. Die Zellen wurden mit den Beads für 4 h in der An- bzw. Abwesenheit von 5% FCS inkubiert. Die Quantifizierung der adhärennten (schwarze Balken) und der intrazellulären Beads (weiße Balken) pro Zelle wurde wie in 6.11.3 beschrieben durchgeführt.

Es stellte sich heraus, daß durch Serum die Aufnahme der Beads sowohl in Vektor transfizierte Zellen als auch in Syndekan-1 überexprimierende Zellen stimuliert werden kann (Abbildung 30). In letztere ist die Aufnahme von anti-Syndekan-1 Antikörper gekoppelten Latexbeads ungefähr dreimal so hoch wie die Aufnahme dieser Beads in Vektor transfizierte Zellen. In den HeLa Zellen, die mit der Syndekan-1 Deletionsmutante transfiziert wurden, kommt es in An- und Abwesenheit von FCS zu einer sehr hohen Invasion der Beads in die Zellen. In der Anwesenheit ist diese Invasion doppelt so hoch wie in die Vektor transfizierten Zellen. Dies war nicht zu erwarten, da eigentlich angenommen wurde, daß die Invasion der Beads ebenfalls inhibiert wird.

3.2.8.2 Anti-Syndekan-4 Antikörper gekoppelte Latexbeads

Die Inkubation der anti-Syndekan-4 Antikörper gekoppelten Beads erfolgte analog zu dem oben beschriebenen Versuch. Die Beads wurden ebenfalls für 4 h in der An- und Abwesenheit von FCS mit Syndekan-4 transfizierten HeLa Zellen inkubiert.

Die Inkubation von anti-Syndekan-4 Antikörper gekoppelten Latexbeads führt bei den Vektor transfizierten Zellen und Syndekan-4 überexprimierenden HeLa Zellen ebenfalls zu einer Steigerung der Invasion durch Serum (Abbildung 31). Bei den

Ergebnisse

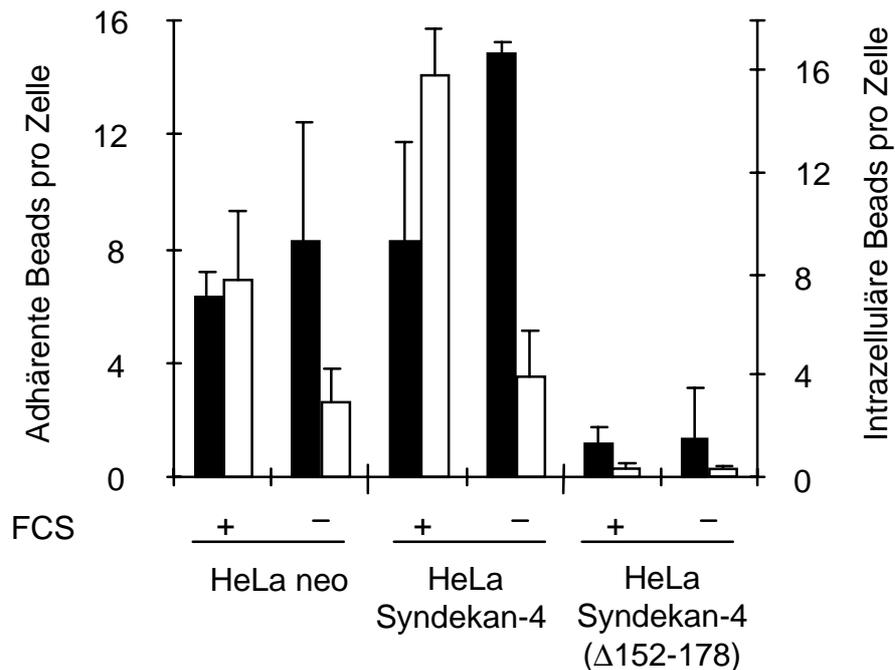


Abbildung 31: Adhärenz und Invasion von anti-Syndekan-4 Antikörper gekoppelten Beads in Syndekan-4 transfizierte HeLa Zellen. Die Zellen wurden mit den Beads für 4 h in der An- bzw. Abwesenheit von 5% FCS inkubiert. Die Quantifizierung der adhärenen (schwarze Balken) und der intrazellulären Beads (weiße Balken) pro Zelle wurde wie in 6.11.3 beschrieben durchgeführt.

Syndekan-4 überexprimierenden HeLa Zellen wird die Invasion mit FCS um das doppelte gesteigert im Vergleich zu den Vektor transfizierten HeLa Zellen. Inkubiert man die Latexbeads mit den HeLa Zellen, welche die Syndekan-4 Deletionsmutante exprimieren, so stellt man fest, daß in der An- und Abwesenheit von Serum keine Adhärenz und auch keine Invasion der Latexbeads erfolgt. Die Immunfluoreszenzfärbung der Zellen konnte zeigen, daß die Zellen nach der Inkubation mit den Latexbeads eine vergleichbare Syndekan-4 Färbung haben wie Zellen, die nicht mit Latexbeads inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt). Es scheint also nicht zum "Shedding" der extrazellulären Domäne des Syndekan-4 zu kommen. Da bei der Inkubation der Gonokokken mit den Syndekan-4(Δ152-178) transfizierten HeLa Zellen keine Abnahme der Adhärenz beobachtet wurde, könnte es auch sein, daß die Latexbeads aufgrund ihrer Größe und ihres Gewichts das Syndekan aus der Zellmembran herausziehen, da es durch die Deletion nicht mehr intrazellulär verankert ist und die zwei noch vorhanden Aminosäuren als Verankerung nicht ausreichen. Deshalb wurden alle Zelllinien, die mit den verschiedenen Syndekan-4 Deletionsmutanten transfiziert wurden (Abbildung 33), ebenfalls mit den Syndekan-4-kreuzvernetzenden Latexbeads für 4h inkubiert. Nach der Immunfluoreszenzfärbung war ein sehr großer Teil der Beads adhären an den Zellen (Daten nicht gezeigt), was die Vermutung von oben bestätigt.

3.2.8.3 Anti-Syndekan-2 Antikörper gekoppelte Latexbeads

Um zu untersuchen, ob eventuell auch Syndekan-2 die phagozytische Aufnahme in Epithelzellen vermitteln kann, wurden anti-Syndekan-2 Antikörper (10H4) (Lories et al., 1989) an Latexbeads gekoppelt. Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zu den beiden vorher beschriebenen.

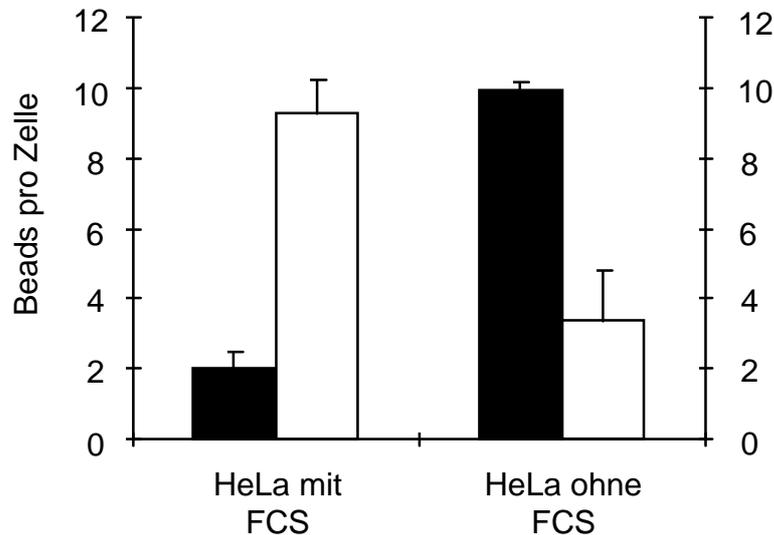


Abbildung 32: Adhärenz und Invasion von anti-Syndekan-2 Antikörper gekoppelten Beads in HeLa Zellen. Die Zellen wurden mit den Beads für 4 h in der An- bzw. Abwesenheit von 5% FCS inkubiert. Die Quantifizierung der adhärenenten (schwarze Balken) und der intrazellulären Beads (weiße Balken) pro Zelle wurde durchgeführt wie in 6.10.3 beschrieben.

Nach der Inkubation der Beads mit den HeLa Zellen in der An- und Abwesenheit von Serum ist zu beobachten, daß die Phagozytose der Latexbeads um das vierfache erhöht ist, sobald FCS im Medium vorhanden ist (Abbildung 32). Des weiteren ist festzustellen, daß ohne Serum viel mehr Latexbeads pro Zelle gebunden werden wie mit Serum. Betrachtet man die absolute Menge an Latexbeads pro Zelle, so ändert sich die Zahl in der An- bzw. Abwesenheit von FCS nicht.

Daraus läßt sich schließen, daß auch über Syndekan-2 eine Phagozytose von Partikeln erfolgen kann und es eventuell auch zu einer Invasion von Gonokokken über diesen Rezeptor in die Zelle kommt.

3.3 Die Bedeutung der intrazellulären Domäne von Syndekan-4 bei der Invasion von *N. gonorrhoeae*

Von Oh et al. wurde beschrieben, daß die intrazelluläre Domäne von Syndekan-4 mit der Protein Kinase C interagieren kann bzw. diese bindet (Oh et al., 1997c). Diese Bindung erfolgt im Bereich der Aminosäuren LGKKPIYKK der

intrazellulären Domäne (Abbildung 1), in dem sich Syndekan-4 am stärksten von den übrigen Syndekanen unterscheidet.

3.3.1 Klonierung weiterer Syndekan-4 Mutanten

Um herauszufinden, ob sich durch Veränderungen in dem Bereich der intrazellulären Domäne von Syndekan-4, der mit den konventionellen PKCs interagiert, auch Veränderungen bezüglich der Invasion von *N. gonorrhoeae* in Epithelzellen ergeben, wurden verschiedene Deletionen und Punktmutationen in die intrazelluläre Domäne eingeführt. Diese beruhen zum Teil auf den Konstrukten von Oh et al. (Oh et al., 1997c).

Die verschiedenen Deletionen und Punktmutationen wurden durch PCR erzeugt. Dafür wurde der Primer EAF4 in Kombination mit den Primern EAF7, EAF8, EAF9, EAF10 und EAF11 mit dem Plasmid pEAF5 als Template eingesetzt. Die PCR Produkte der ersten vier PCRs wurden in den Vektor pCR-Script SK(+) (Stratagene) kloniert. Dadurch entstanden die Plasmide pEAF25 (Syndekan-4[Δ 168-178]), pEAF26 (Syndekan-4[Δ 174-178]), pEAF27 (Syndekan-4[Δ 164-170]) und pEAF28 (Syndekan-4[K164R; K169R]). Das PCR Produkt mit den Primern EAF4/EAF11 wurde über die durch die PCR eingeführten Schnittstellen *KpnI* und *EcoRI* geschnitten und in pBluescript KS(+) ligiert, wodurch pEAF29 (Syndekan-4[K169Q]) entstand.

Sequenzierungen der Plasmide ergaben, daß bei pEAF25 und pEAF27 ein Teil der extrazellulären Domäne fehlt. Deshalb wurden pEAF39 und pEAF25 mit *BglII* und *NotI* geschnitten und miteinander ligiert, pEAF5 und pEAF27 wurden mit *XbaI* und *NotI* geschnitten und ebenfalls miteinander ligiert. Dadurch entstanden die Plasmide pEAF37 und pEAF38.

Um die Konstrukte in HeLa Zellen überexprimieren zu können, erfolgte eine Umklonierung in den Vektor pCEP4. pEAF25, pEAF26 und pEAF27 wurden über die

Syndekan-4RMKKKDEGSYDLGKKPIYKKAPTNEFYA
Syndekan-4(Δ 168-178)RMKKKDEGSYDLGKKPI
Syndekan-4(Δ 174-178)RMKKKDEGSYDLGKKPIYKKAPT
Syndekan-4(Δ 164-170)RMKKKDEGSYDLG-----APTNEFYA
Syndekan-4(K164R; K169R)RMKKKDEGSYDLGRKPIYRKAPTNEFYA
Syndekan-4(K169Q)RMKKKDEGSYDLGKKPIYQKAPTNEFYA

Abbildung 33: Darstellung der intrazellulären Domänen der verschiedenen Syndekan-4 Deletionsmutanten. Die homologen Aminosäuren im Vergleich zum Syndekan-4 sind in fetten Buchstaben dargestellt.

Schnittstellen *KpnI* und *NotI* kloniert, während pEAF28 und pEAF29 über *KpnI* und *BamHI* kloniert wurden. Es entstanden die Plasmide pEAF31 bis pEAF35.

Alle Plasmide wurden wiederum sequenziert und die Sequenzen mit der publizierten Syndekan-4 Sequenz verglichen. Alle neu konstruierten Syndekan-4 Deletionsmutanten tragen ebenfalls die Punktmutationen in der extrazellulären Domäne bei Position 103 und 229, die schon auf dem Plasmid pEAF17 vorliegen (3.2.2).

3.3.2 Charakterisierung der transfektierten HeLa Zellen

Die Transfektion der Konstrukte in die HeLa Zellen erfolgte wiederum über Liposomen. Durch die stabile Transfektion der Zellen mit den verschiedenen Syndekan-4 Konstrukten veränderte sich die Morphologie der Zellen. Die Zellen sind geringfügig größer als die parentale HeLa Zelllinie, auch kommt es zu einem rascheren Abkugeln der Zellen und eine größere Menge an Zellen wird apoptotisch oder

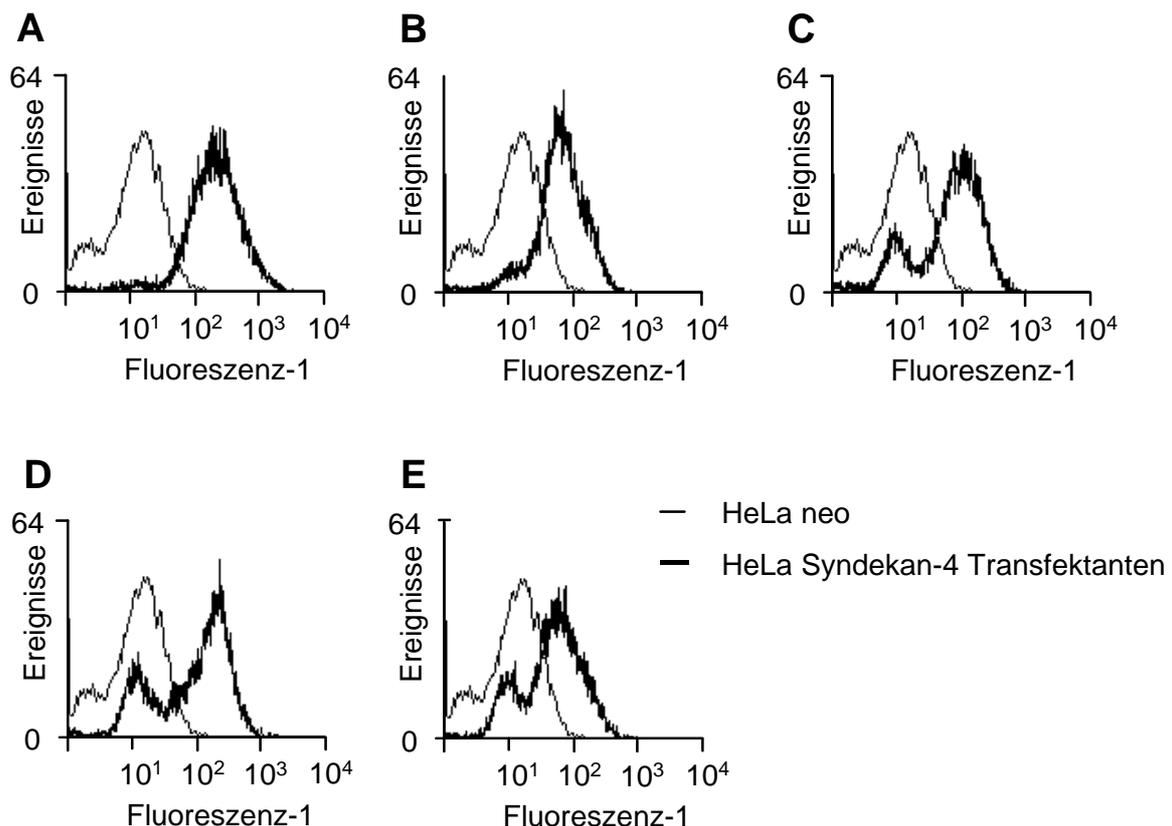


Abbildung 34: FACS-Analyse der transfizierten HeLa Zellen zur Überprüfung der Syndekan Expression. Die Zellen wurden mit EDTA vom Substrat abgelöst, mit dem anti-Syndekan-4 Antikörper und einem sekundären DTAF-konjugierten Antikörper für jeweils 1 h inkubiert. Die Analyse der gefärbten Zellen erfolgt im Fluoreszenzkanal 1. Tote Zellen wurden durch eine Propidiumjodid-Färbung sowie Analyse im Fluoreszenzkanal 3 ausgeschlossen. (A) Expression von Syndekan-4(Δ 168-178), (B) Expression von Syndekan-4(Δ 174-178), (C) Expression von Syndekan-4(Δ 164-170), (D) Expression von Syndekan-4(K164R; K169R), (E) Expression von Syndekan-4(K169Q).

nekrotisch. Allerdings ist die Anzahl nicht so groß wie bei der Zelllinie Syndekan-4(Δ 152-178).

Die Expression der Konstrukte in den verschiedenen stabilen Zelllinien wurde zum einen durch FACS-Analyse überprüft zum anderen durch Western Blots.

Wie in Abbildung 34 zu sehen ist, haben alle Zelllinien annähernd die gleiche Expression der Syndekan-4 Konstrukte. Die Zellen mußten dazu bis zu dreimal über die Magnetbeads selektiert werden, damit nicht exprimierende Zellen entfernt wurden. Allerdings ist in einigen Linien noch immer ein kleiner Anteil an nicht exprimierenden Zellen vorhanden (Abbildung 34C, D, E). In allen Zelllinien ist die Expression der transfektierten Syndekane deutlich höher als in den Vektor transfizierten HeLa Zellen.

Durch FACS-Messung mit dem anti-HS-GAG Antikörper 10E4 wurde überprüft, ob bei alle Zelllinien die Menge an HS-Seitenketten zunimmt.

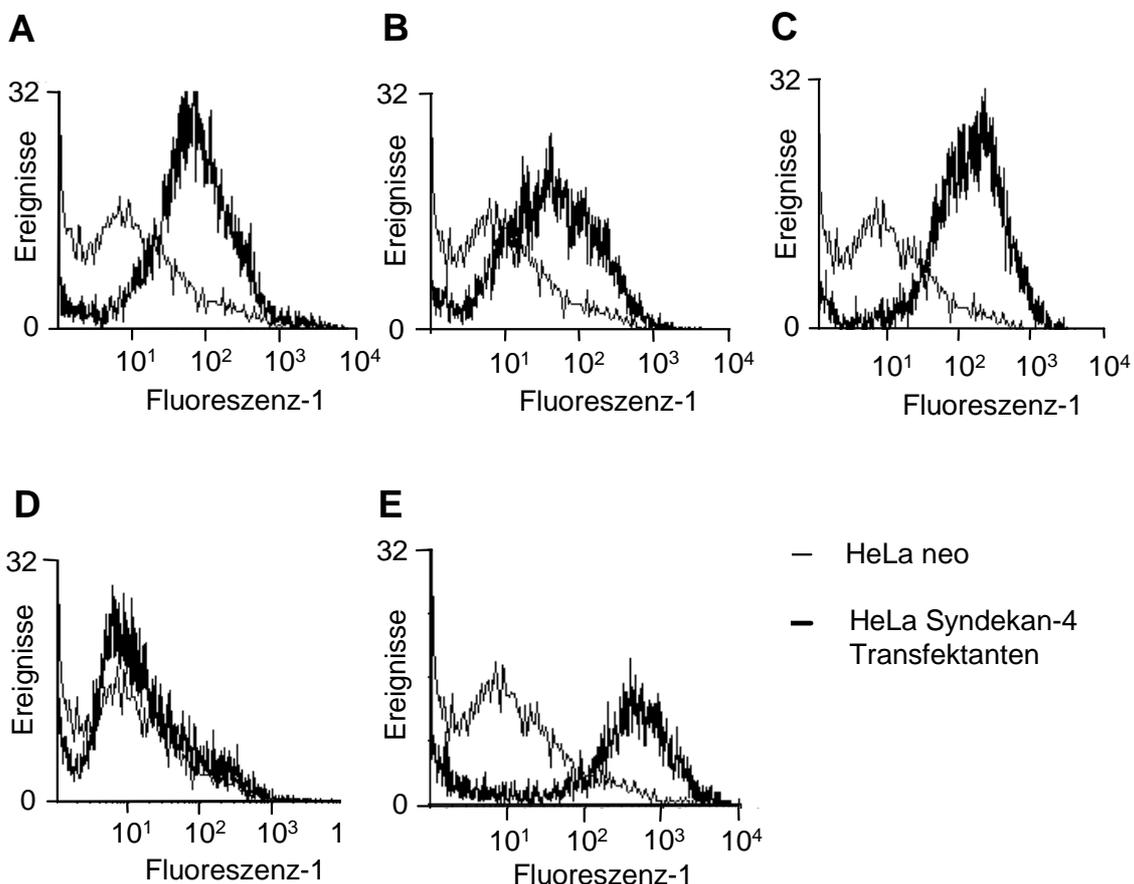


Abbildung 35: FACS-Analyse der transfizierten HeLa Zellen zur Überprüfung der HS-Seitenketten. Die Zellen wurden mit EDTA vom Substrat abgelöst, mit dem anti-HS-GAG Antikörper 10E4 und einem sekundären DTAF-konjugierten Antikörper für jeweils 1 h inkubiert. Die Analyse der gefärbten Zellen erfolgt im Fluoreszenzkanal 1. Tote Zellen wurden durch eine Propidiumjodid-Färbung sowie Analyse im Fluoreszenzkanal 3 ausgeschlossen. (A) Expression von Syndekan-4(Δ 168-178), (B) Expression von Syndekan-4(Δ 174-178), (C) Expression von Syndekan-4(Δ 164-170), (D) Expression von Syndekan-4(K164R; K169R), (E) Expression von Syndekan-4(K169Q).

In den FACS-Diagrammen in Abbildung 35 ist zu sehen, daß die Menge an HS-Seitenketten auf den Zellen durch die Überexpression der verschiedenen Konstrukte erhöht wird. Die einzige Ausnahme ist die Zelllinie Syndekan-4(Δ 174-178) (Abbildung 35D), da bei dieser Linie die Expression der HS-Seitenketten nur so hoch wie in den Vektor transfizierten Zellen ist, was sich auf die Adhärenz der Gonokokken auswirken könnte.

Neben der FACS-Analyse wurde die Expression ebenfalls im Western Blot überprüft. Dazu wurden die HSPGs über eine DEAE-Säule isoliert, die HS-Seitenketten durch Heparitinase verdaut, die Proteine auf einem Gel aufgetragen und anschließend geblottet.

Die Detektion der Syndekane erfolgte mit dem Antikörper 3G10 (David et al., 1992), der das Δ -Glucuronat erkennt, das die „HS-Stummel“ umgibt. Die Expression der verschiedenen Syndekan-4 Konstrukte ist im Vergleich zu der Vektor transfizierten Zelllinie um einiges stärker, da diese nur eine sehr schwache Syndkan-4 Bande aufweist (Abbildung 36). In der Höhe von 80 kDa ist wiederum die Dimer-Bande des Syndekan-4 zu sehen. Vergleicht man die Größe der einzelnen Konstrukte auf dem Blot mit der zu erwartenden Größe aufgrund der Klonierung, so stellt man fest, daß das Konstrukt Syndekan-4(K169Q) höher läuft als erwartet wird. Dies ist wahrscheinlich auf das abnormale Laufverhalten der Syndekane zurückzuführen, da

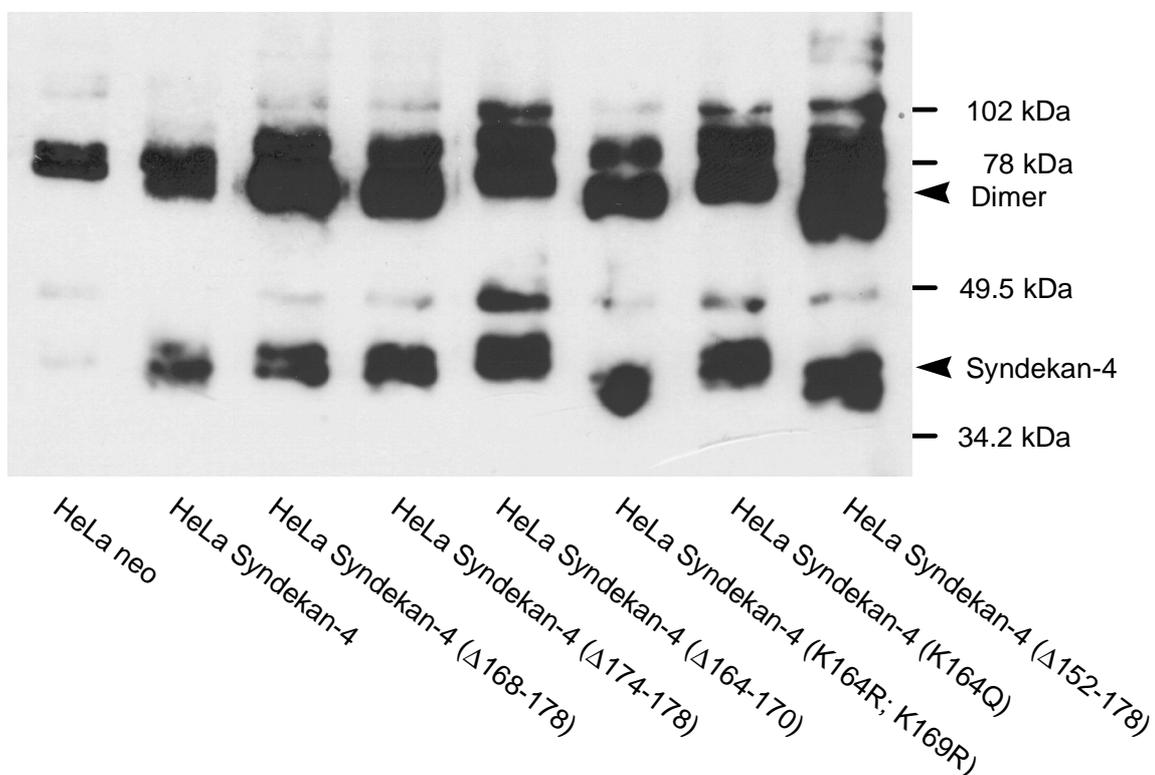


Abbildung 36: Expression der verschiedenen Syndekan-4 Konstrukte in HeLa Zellen. Der Western Blot wurde mit dem anti-HSPG Antikörper 3G10 (David et al., 1992) inkubiert, der das Δ -Glucuronat erkennt, das die HS-Stummel umgibt. Syndekan-4: ~ 35 kDa.

die Sequenzüberprüfung des Plasmids dessen Richtigkeit ergab. Es wurde zusätzlich versucht, über PCR das Insert des episomalen Vektors direkt aus den Zellen zu amplifizieren, um nochmals einen Größenvergleich durchzuführen, was aber nicht gelang.

3.3.3 Einfluß der Syndekan-4 Deletionsmutanten auf die Adhärenz und Invasion von *N. gonorrhoeae*

Die Zelllinien mit den Deletionsmutanten der intrazellulären Domäne von Syndekan-4 wurden in Adhärenz- und Invasionsassay getestet, um herauszufinden, welchen Einfluß die verschiedenen Deletionen auf die Phagozytose der Gonokokken haben.

Dabei zeigte sich, daß in der Abwesenheit von Serum alle Konstrukte eine reduzierte Invasion zeigen, die maximal so hoch, meist aber niedriger als die Invasion

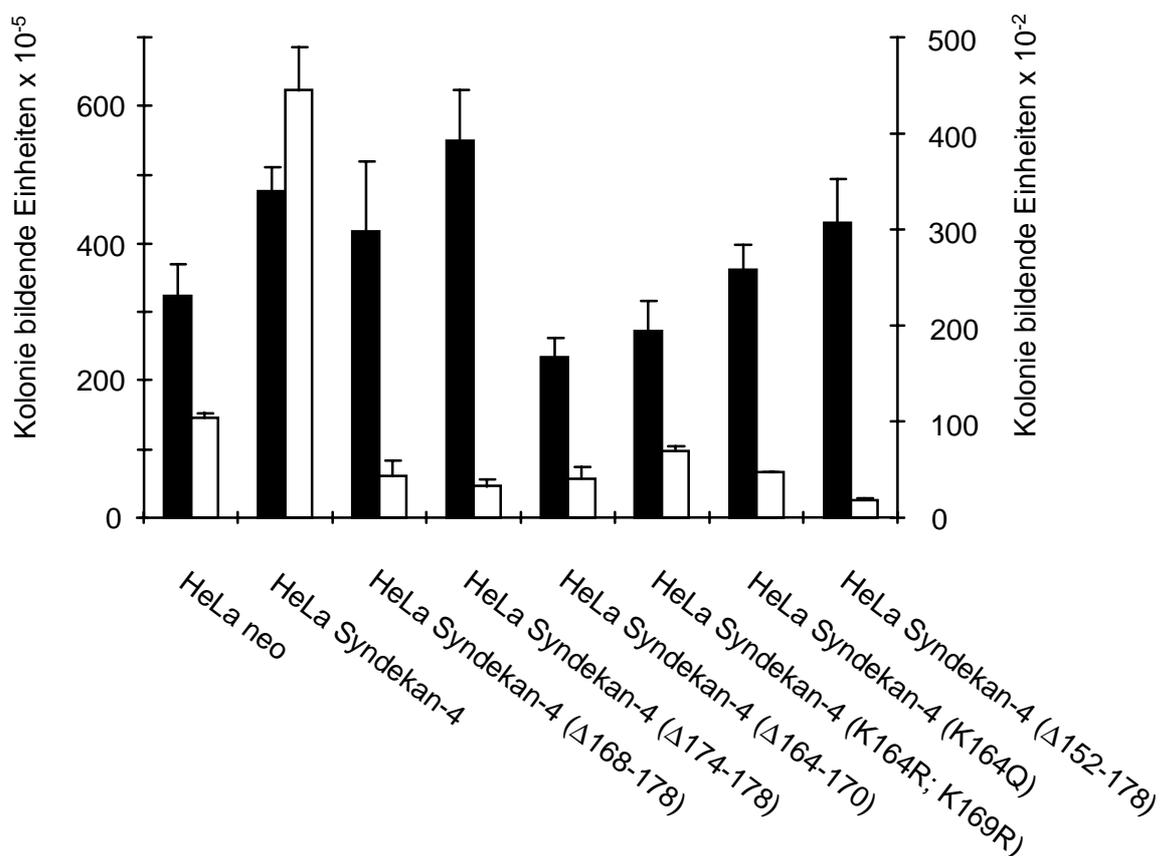


Abbildung 37: Adhärenz und Invasion von *N. gonorrhoeae* Stamm VP1 bei HeLa Zellen, die mit den verschiedenen Syndekan-4 Konstrukten transfiziert wurden. Die Zellen wurden für 6 h in der Abwesenheit von FCS mit 1×10^7 Gonokokken inkubiert. Die Quantifizierung der adhärennten (schwarze Balken) und invasiven Bakterien (weiße Balken) wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die Daten zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von einem repräsentativen Experiment, das in Triplikaten durchgeführt wurde.

bei den Vektor transfizierten HeLa Zellen liegt (Abbildung 37). Die höchste Invasion erfolgt bei den Syndekan-4(K164;K169R) transfizierten Zellen. Das weist darauf hin, daß durch die verschiedenen Deletionen in der intrazellulären Domäne von Syndekan-4 die Phagozytose der Gonokokken beeinflusst wird. Wahrscheinlich ist die Bindung der PKC α an die intrazelluläre Domäne nicht mehr möglich, weswegen die anschließende Signaltransduktion unterbrochen ist. Die Adhärenz der Gonokokken an die transfizierten Zellen war dagegen durch die verschiedenen Konstrukte nicht beeinflusst.

Im Vergleich zu der Infektion ohne FCS ist in der Gegenwart von Serum die Invasion der Gonokokken in die Zellen um das zehnfache gesteigert (Abbildung 38). Aber auch in Gegenwart von Serum ist die Invasion der Gonokokken in die Zellen, die mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert wurden, im Vergleich zu den Vektor transfizierten HeLa Zellen beeinträchtigt. Der Effekt ist allerdings nicht so stark ausgeprägt wie bei der Abwesenheit von Serum. Die höchste Invasion erfolgt wiederum in die mit Syndekan-4(K164R; K169R) transfizierten Zellen. Die Adhärenz der Bakterien an die Zellen wird durch die Deletionen kaum beeinflusst.

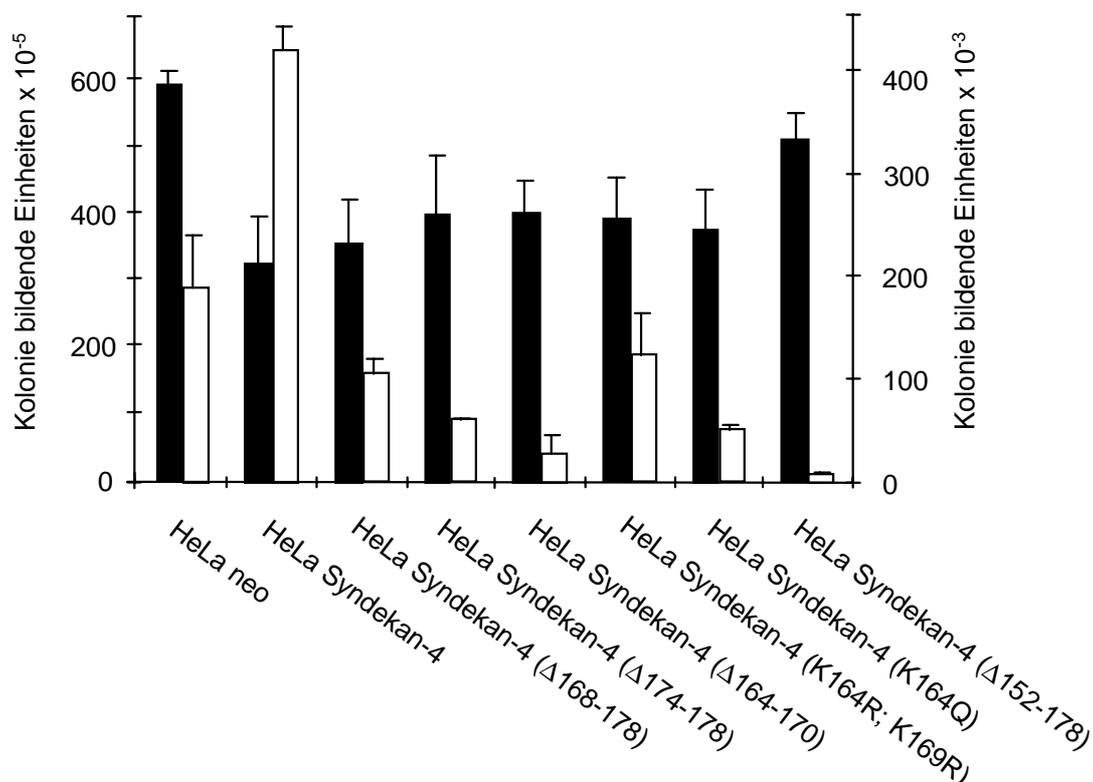


Abbildung 38: Adhärenz und Invasion von *N. gonorrhoeae* Stamm VP1 bei HeLa Zellen, die mit den verschiedenen Syndekan-4 Konstrukten transfiziert sind. Die Zellen wurden für 6 h in der Anwesenheit von 5% FCS mit 1×10^7 Gonokokken inkubiert. Die Quantifizierung der adhärenenten (schwarze Balken) und invasiven Bakterien (weiße Balken) wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die Daten zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von einem repräsentativen Experiment, das in Triplikaten durchgeführt wurde.

3.4 Interaktion von Syndekan-4 und Protein Kinase C während der Infektion durch *N. gonorrhoeae*

Für die PKC Inhibitoren Staurosporin und Calphostin C wurde schon gezeigt, daß sie die Invasion der Gonokokken in Epithelzellen konzentrationsabhängig reduzieren (Dehio et al., 1998) wie auch die Invasion von HSPG-kreuzvernetzenden Latexbeads (3.1.6) inhibiert wurde. Allerdings inhibieren diese beiden Chemikalien alle Isoformen der PKC, Staurosporin darüber hinaus weitere Serin-Threonin Kinasen.

3.4.1 Einfluß des Inhibitors Gö 6976 auf die Infektion durch *N. gonorrhoeae*

Von der Protein Kinase C sind bisher elf verschiedene Isoformen bekannt, die in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Man unterscheidet die konventionellen PKCs (α , β , γ) von den atypischen (δ , ε , μ , σ , ν , θ) und den neuen PKCs (λ , ζ). Während die konventionellen PKCs durch Ca^{2+} , Diacylglycerol (DAG) und

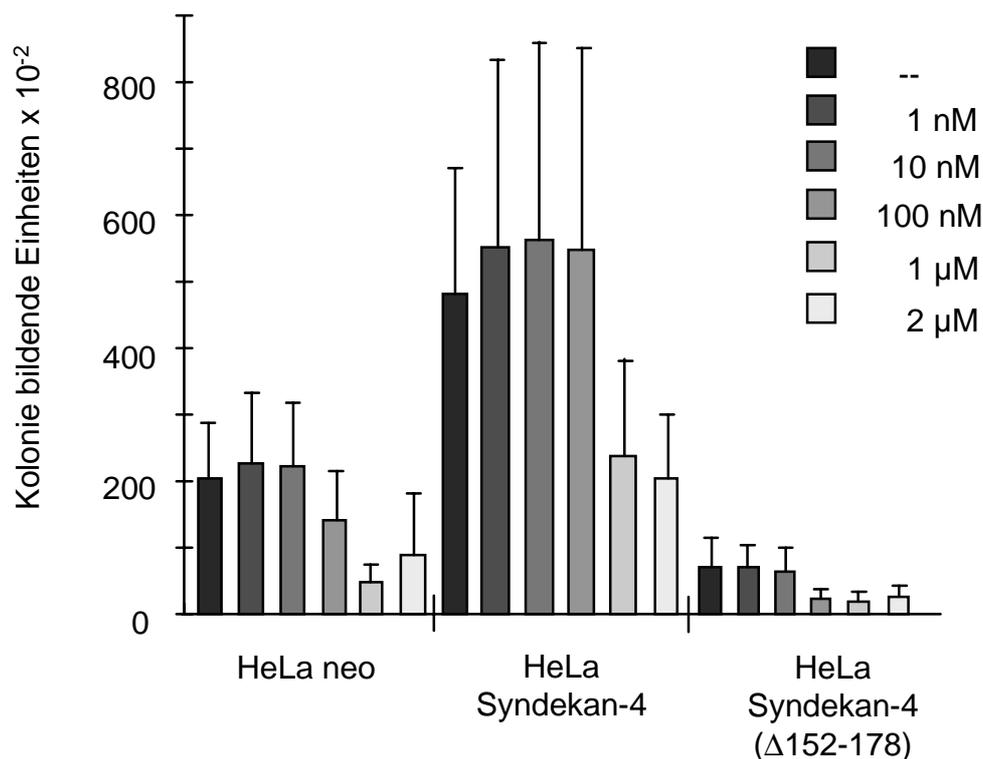


Abbildung 39: Adhärenz und Invasion von *N. gonorrhoeae* Stamm VP1 bei transfizierten HeLa Zellen in Anwesenheit des Inhibitors Gö 6976. Der Inhibitor wurde 15 min vor Zugabe der Bakterien zu den Zellen gegeben und war während der gesamten Inkubationszeit anwesend. Die Zellen wurden für 6 h mit 1×10^7 Gonokokken inkubiert. Die Quantifizierung der adhärennten (schwarze Balken) und invasiven Bakterien (weiße Balken) wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die Daten zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung von einem repräsentativen Experiment, das in Triplikaten durchgeführt wurde.

Phosphatidylserin (PS) reguliert werden, sind neue PKCs nicht durch Ca^{2+} regulierbar und atypische PKCs nur durch PS.

Um nachzuweisen, daß die konventionellen PKCs an der Signaltransduktion beteiligt sind, wurde der Inhibitor Gö 6976 getestet, der spezifisch konventionelle PKCs inhibiert (Martiny-Baron et al., 1993). Der Inhibitor wurde 15 min vor Zugabe der Bakterien in den angegebenen Konzentrationen zu den Zellen zugegeben und war während der gesamten Inkubationszeit präsent. In seiner höchsten Konzentration hatte er keinen Einfluß auf die Vitalität der Zellen was durch Trypanblau Färbungen überprüft wurde.

Wie man in Abbildung 39 sieht, zeigt der Inhibitor eine konzentrationsabhängige Inhibition sowohl bei Vektor transfizierten HeLa Zellen als auch bei Syndekan-4 transfizierten HeLa Zellen. Bei den HeLa Zellen, die mit der Deletionsmutante transfiziert wurden, ist die Wirkung nicht so deutlich, da die Invasion schon ohne Inhibitor sehr stark reduziert ist. Der Inhibitor hat keinerlei Einfluß auf die Adhärenz der Gonokokken an die Zellen (Daten nicht gezeigt).

Dies bedeutet, daß die konventionellen PKCs an der Signaltransduktion während der Invasion von Gonokokken in Epithelzellen beteiligt sind.

3.4.2 Reduktion von PKC α Expression durch antisense Oligonukleotide

Durch den Versuch mit dem Inhibitor Gö 6976 wurde gezeigt, daß konventionelle PKCs (α , β , γ) an der Signaltransduktion beteiligt sind. Da PKC β in HeLa Zellen nicht vorkommt (Chun et al., 1996), können nur noch PKC α oder PKC γ an der Signaltransduktion beteiligt sein. Um herauszufinden, welche der beiden Isoformen beteiligt ist, wurden antisense (ISIS 3521) und sense Oligonukleotide von PKC α verwendet (Dean et al., 1994). Diese Oligonukleotide besitzen statt des Phosphats im DNA-Rückgrat ein Sulfat, wodurch sie stabiler gegenüber Nukleasen sind und der Abbau von Hybriden aus RNA und Oligonukleotiden durch die RNaseH beschleunigt wird (Stein et al., 1988). ISIS 3521 ist komplementär zum 3'-untranslatierten Ende von PKC α . Für dieses Oligonukleotid wurde gezeigt, daß es spezifisch die Menge an PKC α in sehr hohem Maße reduziert (Dean et al., 1994). Die Oligonukleotide wurden mit der Transfektionsreagenz Lipofectin in HeLa Zellen eingeschleußt. Nach 48 h wurden Adhärenz- und Invasionsassays durchgeführt, um zu überprüfen, ob es möglich ist, durch das antisense Oligonukleotid die Invasion der Gonokokken zu beeinflussen. Allerdings waren die Zellen durch die Transfektion so stark in Mitleidenschaft gezogen, daß sie zum einen nicht mehr sehr vital waren und zum anderen sich sehr leicht von der Substratoberfläche ablösten, so daß keine Waschschriffe durchgeführt werden konnten, ohne sämtliche Zellen vom Substrat abzulösen.

Von daher kann keine Aussage getroffen werden, ob durch die Reduktion der PKC α die Phagozytose der Gonokokken beeinflusst wird.

3.4.3 Infektion von Epithelzellen mit *N. gonorrhoeae* und die Aktivierung der PKC

Die Oligomerisierung der intrazellulären Domäne von Syndekan-4 führt zu einer Bindung der PKC und PIP₂ und dadurch zu einer erhöhten PKC Aktivität (Oh et al., 1997b). Da die Gonokokken eine Kreuzvernetzung von Syndekan-4 bewirken und somit auch eine Oligomerisierung von Syndekan-4 erfolgen könnte, wurde versucht, die daraus resultierende, erhöhte Aktivität der PKC nachzuweisen.

3.4.3.1 Immunpräzipitation und Kinase-Assay

PKC α wurde aus den Syndekan-4 überexprimierenden HeLa Zellen durch eine Immunpräzipitation mit dem anti-PKC α Antikörper (Transduction Laboratories, Lexington, USA) isoliert. Die Präzipitate wurden mit Phosphatidylserin und Myelin Basic Protein (MBP) versetzt und radioaktives [γ ³²P]-ATP zugegeben. Da MBP ein Substrat für die PKC ist, sollte dieses phosphoryliert werden, wenn ein Teil der PKC α durch die Bindung an Syndekan-4 aktiviert wurde.

Der Nachweis der Phosphorylierung erfolgte durch Auftrennen des MBPs über SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie. PKC α wurde nach verschiedenen Zeitpunkten der Infektion immunpräzipitiert da nicht bekannt ist, in welchem Zeitraum eine mögliche Aktivierung der PKC erfolgt. Allerdings war mit dieser Methode zu keinem Zeitpunkt (0 min, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min) eine Steigerung der Radioaktivität im MPB festzustellen.

3.4.3.2 Membranisolierung und Peptid-Kinase-Assay

Eine weitere Methode zum Nachweis der PKC Aktivierung ist die Isolierung von nativen Zellmembranen über Saccharose-Gradienten. Durch die Aktivierung der PKC und der dadurch erfolgenden Bindung an die Zellmembran, sollte bei einer Membranisolierung auch die daran hängende, aktive PKC isoliert werden.

Der Nachweis der PKC Aktivität erfolgt durch die Zugabe eines Peptides, das durch die aktivierte PKC phosphoryliert wird (Chakravarthy et al., 1991; Chakravarthy et al., 1994). Die Phosphorylierung wird durch Einbau von [γ ³²P]-ATP in das Peptid und anschließender Szintillationsmessung nachgewiesen.

Die Membran der Syndekan-4 überexprimierenden HeLa Zellen wurde zu den gleichen Zeitpunkten wie in 3.4.3.1 während der Infektion isoliert und anschließend der Peptid-Kinase-Assay durchgeführt. Aber auch durch diesen Assay konnte keine Aktivierung der PKC nachgewiesen werden. Die positiv Kontrolle mit gekaufter PKC α führte zu einer starken Phosphorylierung des Peptides.

3.4.4 Translokation der PKC vom Zytoplasma an die Membran

Wird die PKC aktiviert, so kommt es zu einer Translokation der PKC von der zytoplasmatischen Fraktion in die Membranfraktion (Newton, 1995), da die Affinität der PKC für Phosphatidylserin erhöht wird und sie an das in der Membran vorhandene Phosphatidylserin und Syndekan-4 binden kann. In ruhenden HeLa Zellen ist die Hauptmenge von PKC α und γ im Zytoplasma vorhanden (Chun et al., 1996) und der Übergang in die Membran erfolgt durch einen externen Stimulus, wozu die Infektion der Zellen durch Gonokokken zählen könnte. Da die beiden Kinase-Assays kein Ergebnis gebracht haben, wurde überprüft, ob es durch die Infektion der Zellen überhaupt zu einer Translokation der PKC an die Membran kommt. Dafür wurden verschiedene Fraktionen der Zelle isoliert: Membran, Zytoplasma und die Detergenz unlösliche Fraktion, wozu die Bestandteile des Zytoskeletts und der Nukleus gehören.

Für die Isolation der Zellfraktionen wurden verschiedene Zeitpunkte nach der Infektion gewählt. Als Positivkontrolle wurde PMA eingesetzt, ein Phorbolster, der sehr effektiv die PKC aktiviert und somit einen raschen Übergang der PKC in die

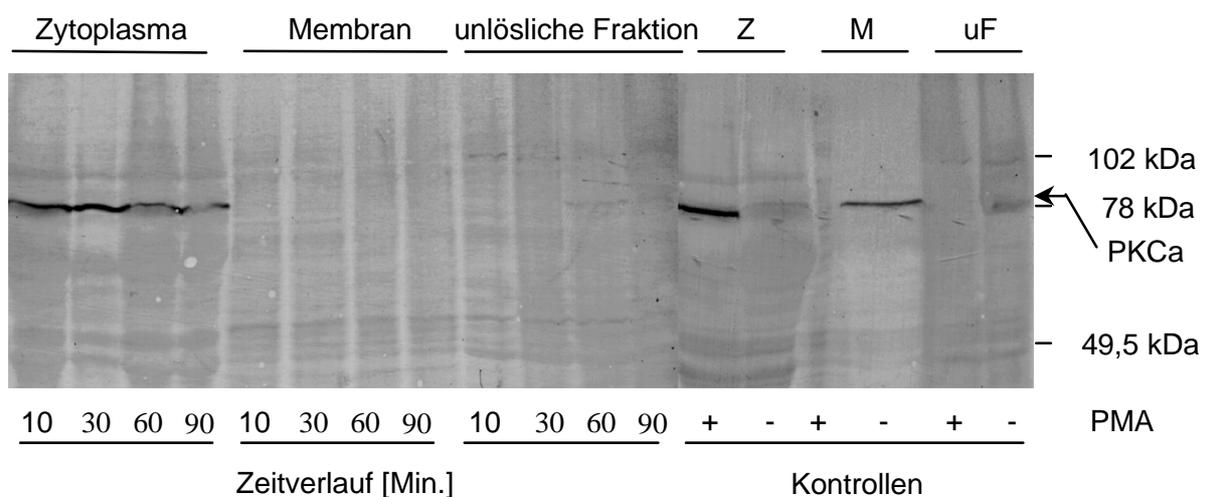


Abbildung 40: Infektion von Syndekan-4 überexprimierenden HeLa Zellen mit *N. gonorrhoeae* und Isolierung der Zellfraktionen zu den Zeitpunkten 10 min, 30 min, 60 min und 90 min. Die Zellfraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit dem anti-PKC α Antikörper inkubiert. PKC α : ~ 80 kDa. Z: Zytoplasma, M: Membran, uF: unlösliche Fraktion.

Membranfraktion bewirkt.

Nach der Isolierung wurden die einzelnen Zellfraktionen durch SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf Nitrozellulose transferiert und mit dem anti-PKC α Antikörper inkubiert. Wie in Abbildung 40 zu sehen ist, erfolgte bei der Positivkontrolle nach der Stimulation der Zellen mit PMA ein Übergang der PKC α vom Zytoplasma in die Membranfraktion und zu einem kleineren Teil in die unlösliche Fraktion. Allerdings konnte durch die Infektion der Zellen mit *N. gonorrhoeae* zu keinem Zeitpunkt ein Übergang der PKC in eine andere Fraktion beobachtet werden. Auch durch eine höhere Infektionsdosis der Zellen, durch die Wahl anderer Zeitpunkte oder durch Erhöhung der Proteinmenge auf dem Gel konnte kein Übergang der PKC α beobachtet werden. Das gleiche Ergebnis wurde für die PKC γ erhalten (Daten nicht gezeigt).

Bei PMA handelt es sich um eine unphysiologische Reagenz, die zu einer sehr raschen und starken Aktivierung der PKC führt. Möglicherweise liegt eine moderate Aktivierung der PKC, wie sie eventuell durch die Gonokokken erfolgt, in den durchgeführten Experimenten unter der Nachweisgrenze.

3.4.5 Bindung der PKC an die intrazelluläre Domäne der verschiedenen Syndekan-4 Konstrukte

Da von Oh et al. beschrieben wurde, daß die intrazelluläre Domäne mit PKC α interagiert (Oh et al., 1997c), wurde versucht nachzuweisen, welches der Syndekan-4 Konstrukte aufgrund seiner Deletionen und Mutationen noch mit der PKC α interagieren kann. Dazu wurde Syndekan-4 mit dem anti-Syndekan-4 Antikörper 8G3 immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und anschließend mit einem anti-PKC α Antikörper inkubiert.

Allerdings gelang es nicht, eine Immunpräzipitation von PKC α über Syndekan-4 durchzuführen. Auch die Stimulation der PKC α durch PMA bewirkte keine Bindung an die intrazelluläre Domäne von Syndekan-4.

Die Bindung der PKC an die intrazelluläre Domäne der verschiedenen Syndekan Konstrukte sollte deshalb auf eine andere Art nachgewiesen werden. Dazu wurden die HSPGs aus den verschiedenen Zelllinien über DEAE-Sephacel isoliert, mit Heparitinase und Chondroitinase ABC verdaut und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulose mit PKC α in Anwesenheit von Kalzium, PIP₂ und Phosphatidylserin inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der PKC-Bindung über einen anti-PKC α Antikörper. Allerdings konnte eine unspezifische Bindung der PKC α bzw. des sekundären Antikörpers auf dem ganzen Blot nicht verhindert werden, so daß auch dieser Nachweis nicht gelang.

Bis jetzt wurde die Interaktion von PKC α mit Syndekan-4 *in vivo* nur in Fibroblasten bzw. in Endothelzellen gezeigt. Und auch in diesen Zellen handelt es sich

um ein Ereignis, das nicht sehr häufig vorkommt (persönliche Kommunikation mit Anne Woods). Von daher könnte es sein, daß die Interaktion zwischen PKC α und Syndekan-4 in den transfizierten HeLa Zellen unter der Nachweisgrenze liegt.

4 Diskussion

4.1 Die Kreuzvernetzung von Heparansulfat-Proteoglykanen führt zur Phagozytose

Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) kommen auf Zelloberflächen von Säugetierzellen vor (Gallagher, 1996). Sie bestehen aus einem Proteingerüst, an das eine oder mehrere Heparansulfat-Glukosaminoglykane (HS-GAG) kovalent gebunden sind. cDNA Klonierungen haben gezeigt, daß die meisten HSPGs zu den Syndekanen oder zu den Glypikänen gehören. Erstere sind über eine Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert, letztere über GPI (David, 1993). Den Syndekanen werden verschiedene Funktionen zugeschrieben. Sie wirken als alleinige Rezeptoren für Liganden oder als Korezeptoren, also als Teil eines nicht-kovalenten Rezeptorkomplexes. HSPGs sind aber auch spezifische Rezeptoren für die Interaktion von pathogenen Erregern mit der Zelloberfläche (Sawitzky, 1996). Bis jetzt konnte noch nicht gezeigt werden, daß allein die Bindung an HSPGs zur Phagozytose führen kann, noch konnte nachgewiesen werden, daß durch die Liganden-induzierte Kreuzvernetzung der HSPGs die phagozytische Aktivität von nicht professionellen Phagozyten stimuliert wird. Des Weiteren war auch noch nicht bekannt, ob es ein spezifisches HSPG gibt, das die Phagozytose induziert oder das als Korezeptor dient.

Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, welche Rolle die HSPGs beim Aufnahme-prozeß von *N. gonorrhoeae* in Epithelzellen spielen. Bekannt war, daß ein Opa-Protein (Opa₅₀) spezifisch an die HS-GAGs der HSPGs bindet, wodurch eine stabile bakterielle Adhärenz etabliert wird (van Putten and Paul, 1995; Chen et al., 1995). Mit Hilfe der Immunfluoreszenz Mikroskopie wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß es in der Nähe von Opa₅₀-exprimierenden Gonokokken, die in Epithelzellen aufgenommen werden, zur Kreuzvernetzung von HSPGs kommt. Ob die HSPG-Kreuzvernetzung direkt die Phagozytose induziert, kann nicht gesagt werden, da Bindung und Aufnahme von *N. gonorrhoeae* möglicherweise zwei unabhängige Ereignisse sind. Idealerweise müßte das Opa₅₀-Protein isoliert und an Beads gekoppelt werden, um direkt zu zeigen, daß die Opa₅₀-vermittelte HSPG-Kreuzvernetzung die Phagozytose bewirkt. Ein ähnlicher Ansatz wurde gewählt, um gereinigte Proteine von *Shigella flexneri* als Faktoren zu identifizieren, welche die Aufnahme in Epithelzellen bewirken (Ménard et al., 1996). Die Opa-Proteine der Gonokokken sind jedoch typische Außenmembranproteine von gram-negativen Bakterien, die mehrere Membrandurchgänge haben (Bhat et al., 1991). Daher sind sie nicht geeignet, um in einer löslichen und funktionellen Konformation rekonstituiert zu werden. Außerdem ist die Bindung des Opa₅₀-Proteins an HSPGs zwar gut etabliert, aber der bakterielle Ligand könnte auch an einen weiteren Rezeptor binden, der

möglicherweise die bakterielle Aufnahme bewirkt. Für die zehn anderen Opa-Proteine der Gonokokken, die sehr homolog zum HSPG-spezifischen Opa₅₀-Protein sind, wurde gezeigt, daß sie die verschiedenen CD66 "carcinoembryonic antigens" binden, die auf phagozytischen Zellen und Endothelzellen exprimiert werden (Virji et al., 1996; Chen and Gotschlich, 1996; Gray-Owen et al., 1997b; Gray-Owen et al., 1997a).

Anstatt gereinigter Opa₅₀-Proteine wurde deshalb ein monoklonaler Antikörper an Latexbeads gekoppelt, der spezifisch die HS-GAGs der HSPGs erkennt (David et al., 1992). Die Bindungsspezifität dieser Beads an HS-GAGs wurde dadurch gezeigt, daß die Interaktion mit den Epithelzellen nach einem Heparitinase Verdau der HS-GAGs reduziert ist.

Die HSPG-kreuzvernetzenden Beads ermöglichten es, die Rolle der HSPGs während der Phagozytose durch Epithelzellen in einem generellen Kontext zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß HSPG-kreuzvernetzende Beads an alle getesteten, humanen Epithelzellen adhären und diese invadieren. Die Aufnahme der Beads wird jedoch durch einen milden Heparitinase Verdau der HS-GAGs von HSPGs stark reduziert, obwohl die Adhärenz nur leicht beeinflußt wird. Generell zeigt dieses Ergebnis, daß eine kritische Menge an HSPG-Kreuzvernetzung notwendig und ausreichend ist, um die Phagozytose in Epithelzellen zu stimulieren. Im Speziellen ist diese Beobachtung kohärent mit den Charakteristika der Aufnahme von *N. gonorrhoeae* in Chang Zellen und in HeLa Zellen in der Abwesenheit von Serum, die durch einen limitierten Heparitinase Verdau ebenfalls inhibiert wird (van Putten and Paul, 1995; Michaela Dehio, nicht veröffentlicht). Die Invasion wird auch hier schon bei einem schwächeren Verdau beeinflußt, während die bakterielle Adhärenz noch normal verläuft.

Transmissions- und Raster-Elektronenmikroskopie zeigen, daß die aufgenommenen, HSPG-kreuzvernetzenden Beads in Endosomen von der Zellmembran umgeben sind, ähnlich wie es für die Aufnahme von *N. gonorrhoeae* gezeigt wurde (Weel et al., 1991a). Ausgehend von diesem Model repräsentiert die Kreuzvernetzung der HSPGs bei der direkten Aufnahme der Gonokokken in Chang Zellen oder in HeLa Zellen in der Abwesenheit von Serum einen zentralen Mechanismus für die Stimulation der Phagozytose.

Im Gegensatz zur Aufnahme von *N. gonorrhoeae* in Chang Zellen wird die Aufnahme von Opa₅₀-exprimierenden Gonokokken in HeLa Zellen durch Serum oder den gereinigten Serumfaktor Vitronectin (Vn) stark erhöht (Gómez-Duarte et al., 1997). Die Aufnahme von HSPG-kreuzvernetzenden Beads wird durch Serum oder gereinigtes Vn in HeLa Zellen ebenfalls erhöht, was darauf hindeutet, daß diese Beads auch ein geeignetes Modell repräsentieren, um die Rolle von Vn bei der HSPG-abhängigen Phagozytose zu beschreiben. Die Vn stimulierte Aufnahme von Gonokokken erfolgt über den $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Integrin Rezeptor (Dehio et al., 1998;

Duensing and van Putten, 1997). Allgemein läßt sich sagen, daß Vn für seine Funktion die Interaktion mit Integrin Rezeptoren auf der Oberfläche der Säugetierzellen benötigt. Für diese Interaktion wurde gezeigt, daß sie abhängig vom Konformationszustand des Vn ist und nur in der multimeren Form des Vn erfolgt (Zanetti et al., 1994; Panetti and McKeown-Longo, 1993b). Die Wechselwirkung des Vn über seine Heparinbindestelle mit den HSPGs und über seine RGD-Domäne mit dem $\alpha_v\beta_5$ Integrin führt zur Endozytose von Vn (Panetti and McKeown-Longo, 1993a; Völker et al., 1993). Durch limitierten Heparitinase Verdau der HS-GAGs oder durch Konkurrenz mit dem löslichen HSPG-kreuzvernetzenden Antikörper wird die Interaktion der Beads mit der Zelloberfläche verringert und dadurch die Vn- oder Serum-stimulierte Aufnahme stark reduziert, obwohl bei diesen Bedingungen die Adhärenz der Beads noch nicht beeinflußt ist. Daraus läßt sich schließen, daß in dem etablierten Model die durch Serum oder Vn verstärkte Phagozytose spezifisch von der Kreuzvernetzung der HSPGs abhängig ist. Die Invasion von Latexbeads, die andere Oberflächenrezeptoren kreuzvernetzen, wird dagegen durch Vn oder Serum nur geringfügig erhöht. Mit diesen Rezeptor-kreuzvernetzenden Beads sind ähnliche Mengen an Vn assoziiert wie mit HSPG-kreuzvernetzenden Beads. Dies schließt die Möglichkeit aus, daß Vn unterschiedlich mit den gekoppelten Latexbeads reagiert, wodurch sich die auffälligen Unterschiede bei der erhöhten Phagozytose hätten erklären lassen. Die wahrscheinlich unspezifische Bindung des von Natur aus sehr "klebrigen" Vn an HSPG-kreuzvernetzende Beads ist der entscheidende Punkt in der Vermittlung der erhöhten Phagozytose. Ob die HSPG-abhängige Phagozytose auch durch frei vorliegendes Vn stimuliert wird, kann nicht gesagt werden.

4.2 Syndekane vermitteln die Invasion von Opa₅₀-exprimierenden Gonokokken in HeLa Zellen

Durch das etablierte Modell konnte zwar gezeigt werden, daß die Kreuzvernetzung der HSPGs ausreicht, um die Phagozytose von *N. gonorrhoeae* zu stimulieren, aber es war noch unbekannt, durch welche HSPGs dies erfolgt. Das am häufigsten auf Epithelzellen vorkommende HSPG ist Syndekan-1 (Bernfield et al., 1992). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, daß Syndekan-4 das einzige Syndekan ist, das in allen Zelllinien vorkommt, die von Gonokokken infiziert werden (Meyer auf der Heyde, 1996). Deshalb wurden diese beiden Syndekane ausgewählt, um sie in HeLa Zellen überzuexprimieren. Die Expression von Syndekan-1 in HeLa Zellen ist dabei nicht so stark wie die von Syndekan-4. Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Gonokokken sowohl Syndekan-1 als auch Syndekan-4 während der Adhärenz an die Zellen rekrutieren und es dadurch zu

einer Kollokalisierung der Gonokokken mit den Syndekanen kommt. Adhärenz- und Invasionsassays zeigen des Weiteren, daß durch die Überexpression von Syndekan-1 bzw. Syndekan-4 die Invasion um das zwei- bzw. vierfache gesteigert wird. Der Unterschied in der Invasion ist dadurch erklärbar, daß sowohl die Expression von Syndekan-1 auf den Zellen geringer ist als auch die Anzahl der HS-GAGs, welche die Adhärenz der Gonokokken an die Zellen vermitteln.

Um nachzuweisen, daß Syndekan-1 und Syndekan-4 allein die Phagozytose induzieren können, wurden Syndekan-1- bzw. Syndekan-4-kreuzvernetzende Latexbeads eingesetzt. Diese waren ebenfalls in der Lage, die Phagozytose zu induzieren, wie die schon zuvor beschriebenen HSPG-kreuzvernetzenden Latexbeads.

Durch die Expression von Syndekan-1 und Syndekan-4 in Zellen mit einem HSPG-negativen Hintergrund (K562, Molt-4) wurde versucht, ein weiteres System für die Invasion von Gonokokken zu schaffen. Allerdings konnte mit diesen Zellen kein Adhärenz- und Invasionsassay durchgeführt werden, da die Zellen mit keinem Matrixfaktor ausreichend an der Unterlage haften. Da sie sehr wenig HS-GAGs auf ihrer Oberfläche präsentierten, muß davon ausgegangen werden, daß sie wahrscheinlich keine Invasion vermittelt hätten. Der Grund für diese geringe Expression ist nicht bekannt, da von Steinfeld et al. gezeigt wurde, daß die Zellen in der Lage sind, ausreichend HS-GAGs zu bilden (Steinfeld et al., 1996).

Aufgrund dieser Daten kann aber noch nicht geschlossen werden, daß es sich bei Syndekan-1 und Syndekan-4 um die alleinigen HSPG Rezeptoren handelt, welche die Invasion von Gonokokken in Epithelzellen vermitteln. In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, daß Syndekan-2-kreuzvernetzende Latexbeads ebenfalls in der Lage sind, die Phagozytose zu induzieren. Von daher wäre es möglich, daß Syndekan-2, das vor allem in Fibroblasten exprimiert wird, ebenfalls die Phagozytose von *N. gonorrhoeae* bewirken kann. Von Grassmé et al. wurde gezeigt, daß *N. gonorrhoeae* auch von Fibroblasten Zellen phagozytiert wird (Grassmé et al., 1997), nachdem die Gonokokken wahrscheinlich über HSPGs adhären, was aber noch nicht nachgewiesen wurde. Deshalb stellt sich die Frage, ob Syndekan-3, das vor allem in neuronalen Geweben vorkommt, ein weiterer Rezeptor für Gonokokken sein könnte, zumal *N. meningitidis* nach Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn vordringen kann.

4.3 Bestandteile des Zytoskeletts sind an der HSPG-abhängigen Phagozytose beteiligt

Um die Komponenten des Zytoskeletts zu charakterisieren, die an der HSPG-abhängigen Phagozytose beteiligt sind, wurden verschiedene Inhibitoren von zytoskelettalen Funktionen getestet. Die Inhibition der Depolymerisation von F-Aktin durch Cytochalasin D reduziert die phagozytische Aufnahme von HSPG-kreuzvernetzenden Beads. Ebenso erfolgt eine Reduktion durch die Substanzen Colchizin und Nocodazol, die beide Mikrotubuli destabilisieren. Im Gegensatz dazu zeigen Monodansylcadaverin, ein Inhibitor der Rezeptor-vermittelten Endozytose (Davies et al., 1980), und Taxol, das die Mikrotubuli stabilisiert, keine Wirkung auf die Invasion der Beads. Beide Inhibitoren haben einen ähnlichen Effekt bei der Aufnahme von Gonokokken in Chang Zellen (Grassmé, 1995). Diese Daten weisen darauf hin, daß an der HSPG-abhängigen Phagozytose in Epithelzellen F-Aktin beteiligt ist und sie sich von der Rezeptor-vermittelten Endozytose unterscheidet.

Wie in dieser Arbeit auch gezeigt wurde, ist mit der Kreuzvernetzung der Syndekane eine Umlagerung des F-Aktins verbunden. Vor kurzem wurde bekannt, daß die zytoplasmatischen Domänen von Syndekanen mit verschiedenen Proteinen interagieren, die PDZ Domänen enthalten (Grootjans et al., 1997; Cohen et al., 1998; Hsueh et al., 1998). Eines dieser Proteine, CASK, bindet das Protein 4.1, das eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett herstellt (Cohen et al., 1998). Zytoplasmatische Proteine, die PDZ Domänen enthalten, sind oft in Adhäsionskomplexen an der Plasmamembran lokalisiert und es wird vermutet, daß sie als Adapter Moleküle für die Bildung von Struktur- und/oder Signalkomplexen an der Zelloberfläche wirken (Ponting et al., 1997). Die Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne von Syndekanen wird eventuell durch Phosphorylierungen reguliert.

In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, daß es durch Überexpression von Syndekan-1 und Syndekan-4, denen die komplette intrazelluläre Domäne fehlt, zu einer Reduktion der Invasion der Gonokokken kommt. Da Syntenin bzw. CASK an die letzten 4 C-terminalen Aminosäuren der intrazellulären Domäne von Syndekanen binden (Cohen et al., 1998; Hsueh et al., 1998; Grootjans et al., 1997), kann aufgrund der Deletion keine Interaktion mehr erfolgen. Dadurch ist auch die Verbindung zum Aktinzytoskelett nicht mehr vorhanden, weswegen der Rückhalt für die Phagozytose durch das Zytoskelett fehlt. Auch durch Überexpression der Syndekan-4 Konstrukte ($\Delta 168-178$) und ($\Delta 174-178$) wird die Invasion der Gonokokken reduziert. Da bei diesen Konstrukten ebenfalls die letzten vier Aminosäuren fehlen, kann es auch hier nicht mehr zu einer Interaktion über CASK oder Syntenin mit dem Zytoskelett kommen. Für Syndekan-1 wurde gezeigt, daß eine Deletion der 23 C-terminalen Aminosäuren die Assoziation mit den Mikrofilamenten verhindert (Carey et al., 1996).

Bei Syndekan-1 und Syndekan-4 kommt es zu Phosphorylierungen von Tyrosinresten in der intrazellulären Domäne, wenn Zellen mit Pervanadat behandelt werden (Reiland et al., 1996; Ott and Rapraeger, 1998). Bei diesen Phosphorylierungen handelt es sich um ein transientes Ereignis, daß sehr stark durch eine konstitutiv aktive Kinase und eine assoziierte Tyrosin Phosphatase reguliert wird. Genistein, ein Inhibitor von Tyrosin Kinasen, der die Bindung von ATP kompetitiv hemmt und eine geringe inhibitorische Aktivität für Serin/Threonin Kinasen zeigt (Akiyama and Ogawara, 1991), inhibiert die Phosphorylierung von Syndekan-1 und Syndekan-4 (Ott and Rapraeger, 1998). Wie in dieser Arbeit für Beads und von Grassmé für Gonokokken gezeigt wurde (Grassmé, 1995), kann die HSPG-abhängige Phagozytose durch Genistein inhibiert werden. Immunfluoreszenzfärbungen zeigen außerdem, daß invadierende Gonokokken von Tyrosinphosphorylierten Proteinen umgeben sind (Grassmé, 1995). Allerdings konnte noch nicht gezeigt werden, daß es sich dabei um Syndekane handelt.

4.4 Die Rolle der PKC bei der HSPG-abhängigen Phagozytose

Syndekan-4 interagiert über die Aminosäuren LGKKPIYK seiner intrazellulären Domäne mit der PKC α (Oh et al., 1997c) und erhöht deren Aktivität, wenn die intrazelluläre Domäne von Syndekan-4 als Multimer vorliegt (Oh et al., 1997b). PIP₂ interagiert ebenfalls über die Aminosäuren LGKKPIYK mit Syndekan-4, wodurch die Aktivität der PKC α zusätzlich erhöht wird (Oh et al., 1998). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die HSPG-abhängige Invasion von Latexbeads durch verschiedene PKC-Inhibitoren gehemmt wird. Staurosporin, ein PKC Inhibitor, der aber auch ein breites Spektrum an Serin/Threonin Kinasen und Tyrosin Kinasen inhibiert, wirkt im nanomolaren Bereich auf PKC und Src-Kinasen (Tamaoki, 1991). Staurosporin sowie der PKC-spezifische Inhibitor Calphostin C blockieren die Aufnahme von HSPG-kreuzvernetzenden Beads in der Gegenwart und Abwesenheit von Vn. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen bei Gonokokken, deren Invasion durch die gleichen Inhibitoren in der Gegenwart und Abwesenheit von Vn gehemmt wird (Dehio et al., 1998). Auch der spezifische Inhibitor für konventionelle PKCs Gö 6976 blockiert die Aufnahme von Opa₅₀-exprimierenden Gonokokken in Syndekan-4 überexprimierende HeLa Zellen. Diese Daten deuten darauf hin, daß die konventionellen PKCs an der Signaltransduktion bei der HSPG-abhängigen Phagozytose beteiligt sind.

Um zu untersuchen, welche Bereiche der intrazellulären Domäne für die Signaltransduktion über konventionelle PKCs notwendig sind, wurden Deletionsmutanten von Syndekan-4 konstruiert. Alle diese Mutanten zeigen eine reduzierte Invasion der Gonokokken sowohl in der An- als auch in der Abwesenheit

von Serum. Allerdings war es nicht möglich, über Immunpräzipitation die direkte Bindung von PKC α an Syndekan-4 bzw. die verschiedenen Deletionsmutanten nachzuweisen. Diese Bindung wurde in der Literatur ausschließlich in Fibroblasten Zellen sowie in Endothelzellen nachgewiesen (Oh et al., 1997c; Horowitz and Simons, 1998b). Da es sich bei HeLa Zellen um Epithelzellen handelt, liegt es eventuell an den unterschiedlichen Zelltypen, daß die Bindung der PKC α an die intrazelluläre Domäne von Syndekan-4 nicht nachweisbar war. Theoretisch wäre zu erwarten gewesen, daß es bei den Konstrukten Syndekan-4(Δ 152-178), Syndekan-4(Δ 168-178) und Syndekan-4(Δ 164-170) zu keiner PKC α Bindung an die intrazelluläre Domäne mehr kommt, da in allen drei Konstrukten die Domäne LGKKPIYK, die für die Oligomerisierung und die Bindung von PKC α notwendig ist, komplett bzw. teilweise deletiert ist. Nur durch diese Oligomerisierung kann es zur direkten Aktivierung von PKC α kommen (Oh et al., 1997b; Oh et al., 1997c). Bei der Deletion von Syndekan-4(K164R; K169R) sind Lys¹⁶⁴ und Lys¹⁶⁹ gegen Arginin ausgetauscht und bei Syndekan-4(K169Q) Lys¹⁶⁴ durch ein Glutamin. Von Lee et al. wurde gezeigt, daß Lys¹⁸⁸ (Nummerierung bezieht sich auf die Hühnchen cDNA, entspricht Lys¹⁶⁹) wichtig für die Interaktion von Syndekan-4 mit PIP₂ ist, da zwischen dem Sauerstoff des PIP₂ und der Aminogruppe von Lys¹⁸⁸ eine Wasserstoffbrücke ausgebildet wird (Lee et al., 1998). Es wäre also anzunehmen, daß PIP₂ nicht mehr an die intrazelluläre Domäne von Syndekan-4(K164R; K169R) bindet. Ob die Bindung von PKC α durch diesen Aminosäureaustausch beeinflusst wird, ist nicht bekannt. Die Bindung von PKC α und PIP₂ an die Aminosäuren LGKKPIYK scheint sich gegenseitig nicht auszuschließen, wodurch eventuell eine Bindung von PKC α an die beiden Deletionsmutanten noch möglich sein müßte. Dafür spricht, daß zumindest mit der Zelllinie Syndekan-4(K164R; K169R) eine etwas höhere Invasion von *N. gonorrhoea* im Vergleich zu den anderen Zelllinien zu beobachten ist. Allerdings muß dann für die Aufnahme von *N. gonorrhoeae* die Bindung von PIP₂ an die intrazelluläre Domäne von Syndekan-4 ebenfalls essentiell sein. Und diese Bindung dürfte durch die Deletion Syndekan-4(K164R; K169R) nicht mehr möglich sein (Abbildung 33). Bei dem Konstrukt Syndekan-4(Δ 174-178) müßte eine Bindung der PKC α an die intrazelluläre Domäne noch möglich sein, da die Aminosäuren LGKKPIYK noch vorhanden ist. Allerdings fehlen die letzten vier Aminosäuren der intrazellulären Domäne, die für die Bindung des CASK Proteins bzw. Syntenin notwendig sind. Diese Proteine vermitteln die Verbindung an das Aktinzytoskelett der Zelle, das wie gezeigt für die Aufnahme der Gonokokken oder der HSPG-kreuzvernetzenden Latexbeads notwendig ist. Deshalb ist auch bei dieser Zelllinie eine Reduktion der Invasion zu beobachten.

4.5 Interaktion von pathogenen Organismen mit Heparansulfaten

Neben *N. gonorrhoeae* wurde für verschiedene andere pathogene Organismen eine Interaktion mit Heparansulfaten beschrieben. Allerdings konnte bis jetzt für keinen Organismus der direkte Rezeptor auf der Zelloberfläche bestimmt werden. Für die meisten dieser Organismen ist nur bekannt, daß die Interaktion mit der Zelloberfläche bzw. die Invasion in die Zellen durch Heparin oder durch Verdau der HS-GAGs durch Heparitinase gehemmt werden kann.

Tabelle 3: Interaktion von pathogenen Organismen mit Heparansulfaten.

Organismus		Referenz
Typ O Maul- und Klauenseuche Virus	<ul style="list-style-type: none"> • spezifische Affinität für HS • wahrscheinlich sind auch Integrine an der Invasion beteiligt 	(Jackson et al., 1996)
<i>Herpes simplex</i>	<ul style="list-style-type: none"> • keine Infektion nach Heparitinase Verdau • keine Infektion von CHO Zellen, die keine HS-GAGs haben 	(Shieh et al., 1992)
humaner Cytomegalovirus	<ul style="list-style-type: none"> • Invasion wird durch Heparin inhibiert • keine Invasion in CHO Zellen, die keine HS-GAGs tragen 	(Compton et al., 1993)
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Invasion wird durch Heparin inhibiert • keine Invasion in CHO Zellen, die keine HS-GAGs tragen • keine Invasion nach Heparitinase Verdau 	(Isaacs, 1994)
<i>Neisseria meningitidis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • keine Invasion nach Heparitinase Verdau 	(de Vries et al., 1998)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Invasion wird durch Heparin inhibiert • Verdau der Chlamydien mit Heparitinase verhindert die Bindung an Zellen 	(Zhang and Stephens, 1992)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Bindung von <i>S. aureus</i> an HS ist sättigbar, zeitabhängig, reversibel, Hitze und Proteasen sensitiv. 	(Liang et al., 1992)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Bindung von Penetrin (Adhäsion und Invasion) wird durch Heparin, HS und Kollagen inhibiert 	(Ortega-Barria and Pereira, 1991)
Leishmania Amastigote	<ul style="list-style-type: none"> • keine Invasion in CHO Zellen, die keine HS-GAGs tragen • keine Invasion nach Heparitinase Verdau 	(Love et al., 1993)

Für *N. meningitidis* wurde von de Vries et al. gezeigt, daß das Opc-Invasin an HSPGs auf Epithelzellen bindet ebenso wie an gereinigte Proteoglykane (de Vries et al., 1998). Des weiteren ist beschrieben worden, daß Vn die Bindung von Meningokokken an Integrine auf Huvec Zellen vermittelt (Virji et al., 1995a; Virji et al., 1995b). Dieser Mechanismus entspricht der Vitronektin-vermittelten Invasion von Gonokokken in Huvec Zellen (Michaela Dehio, nicht veröffentlicht). Auch hier kommt es ohne Vn nur zu einer Adhärenz der Bakterien an die Zellen, während die Aufnahme nur in der Gegenwart von Vn oder Fibronektin erfolgt.

4.6 Ein Modell der HSPG-abhängigen Phagozytose in HeLa Zellen

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß es mehrere Wege für die Aufnahme von Opa₅₀-exprimierenden Gonokokken in HeLa Zellen zu geben scheint. Zum einen gibt es die HSPG-abhängige Phagozytose, die allein über Syndekane ablaufen kann, wie durch Syndekan-1- bzw. Syndekan-4-kreuzvernetzende Latexbeads gezeigt. Die Kreuzvernetzung der Syndekane durch die Gonokokken führt zu einer Phagozytose, die unabhängig vom Vorhandensein von Vn ist (Abbildung 41A + B). Bei einer Kreuzvernetzung von mehreren Syndekan-4 Molekülen können PIP₂ und PKC an deren intrazelluläre Domänen binden. Die Aktivität der PKC wird dadurch erhöht und ihre Regulation wird sowohl unabhängig von einem Kalzium-Einstrom als auch von Diacylglycerol (DAG) (Abbildung 41A). Kommt es zu einer Kreuzvernetzung von anderen Syndekanen, so führt dies ebenfalls zur Phagozytose der Gonokokken. An die intrazelluläre Domäne der anderen Syndekane kann allerdings keine PKC binden, weswegen die Aktivierung der PKC weiterhin über DAG und Kalzium erfolgt (Abbildung 41B).

Alle Syndekane können über Syntenin oder CASK an das Zytoskelett der Zellen binden, wodurch auch der nötige Rückhalt für die Aufnahme der Gonokokken gewährleistet ist. Außerdem kann es durch diese Interaktion zu den beobachteten Umlagerungen des F-Aktins während der Invasion kommen. Syndekan-3 kann außerdem über die C1-Region der intrazellulären Domäne mit einem Komplex aus Cortactin, C-Src, Fy, Tubulin interagieren und somit eine weitere Verbindung zum Zytoskelett herstellen (Abbildung 41). Wahrscheinlich muß man aber davon ausgehen, daß die in Abbildung 41A+B dargestellten Prozesse gemeinsam ablaufen, da es unwahrscheinlich ist, daß durch Gonokokken nur gleiche Syndekane kreuzvernetzt werden.

Sobald Vn während der Invasion vorhanden ist, kommt es zu einer Komplexbildung zwischen Opa₅₀, Vn und HSPGs (Abbildung 41C). Über das Vn bindet der Komplex an das $\alpha_v\beta_5$ Integrin. Durch diesen zusätzlichen Rezeptor erfolgt eine gesteigerte Phagozytose der Gonokokken.

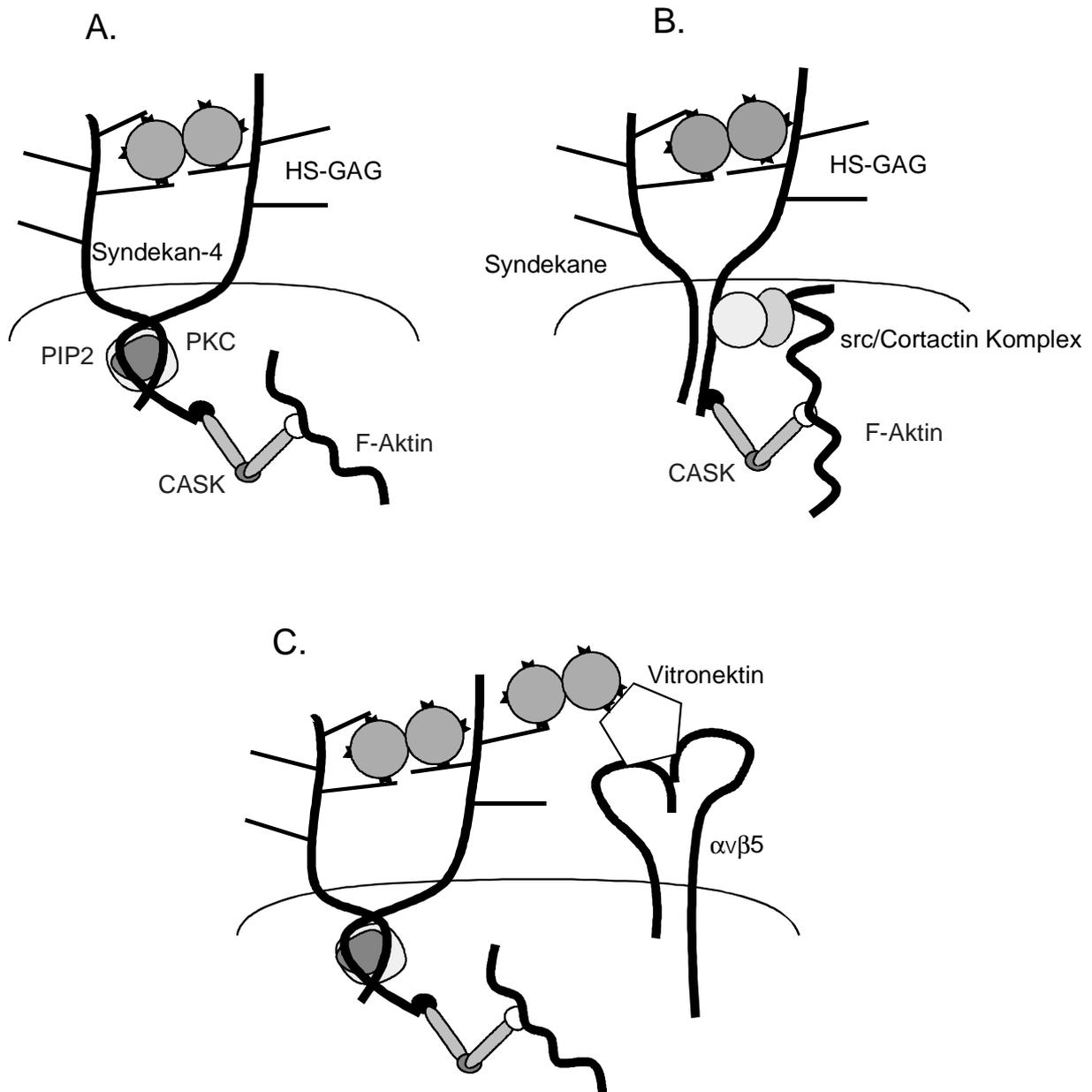


Abbildung 41: Modell der HSPG-abhängigen Phagozytose in HeLa Zellen in der Abwesenheit (A, B) und Anwesenheit (C) von Vitronektin.

Die in dieser Arbeit dargestellte HSPG-abhängige Phagozytose stellt nur einen von mehreren Mechanismen dar, über den Gonokokken in Zellen invadieren können. Zukünftige Arbeiten können weiteres zur Signaltransduktion über Heparansulfat-Proteoglykane und Syndekane beitragen und somit zu einem grundlegenden Verständnis zellulärer Signaltransduktionswege und bakterieller Infektionen führen.

5 Material

5.1 Bakterienstämme

5.1.1 *Escherichia coli* Stämme

DH5 α	F ⁻ , endA1, hsdR17(<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁻), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, Δ (argF lacZYA)U169, phi80d, lacZ Δ M15 (GibcoBRL)
HB101 pil22	F ⁻ , hsdS20 (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galk2, rpsL20 (<i>Str^f xyl-5 mtl-1 supE44λ</i>), thi, leu, pil22
TOP10F'	F' [lacI ^q TN10(Tet ^R)] <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRmS-mcrBC</i>) Φ 80/lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (<i>Str^R</i>) endA1 nupG (Invitrogen)
XL1 Blue MRF'	Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [<i>F'</i> proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^f)] (Stratagene)
H2677	humanes Syndekan-4 in XL-1Blue
H2933	pEAF3 in DH5 α
H2934	pEAF4 in DH5 α
H2935	pEAF5 in DH5 α
H2936	pEAF15 in DH5 α
H2937	pEAF16 in DH5 α
H2938	pEAF17 in DH5 α
H2939	pEAF25 in XL1 Blue MRF'
H2940	pEAF26 in XL1 Blue MRF'
H2941	pEAF27 in XL1 Blue MRF'
H2942	pEAF28 in XL1 Blue MRF'
H2943	pEAF29 in TOP10F'
H2944	pEAF31 in DH5 α
H2945	pEAF32 in DH5 α
H2946	pEAF33 in DH5 α
H2947	pEAF34 in DH5 α
H2948	pEAF35 in DH5 α
H2949	pEAF37 in DH5 α
H2950	pEAF38 in DH5 α
H2951	pEAF39 in TOP10F'
H2952	pEAF40 in DH5 α
H2975	pEAF23 in DH5 α
H2976	pEAF24 in DH5 α

5.1.2 Neisserien Stämme

N242	<i>N. gonorrhoeae</i> VP1, Klinisches Isolat eines Patienten mit systemischer Gonorrhöe; Serotyp PIA, Opa _{27; 27,5; 28; 29} P ⁻ , (Makino et al., 1991)
------	--

N976	Opa-Variante von <i>N. gonorrhoeae</i> VP1 (VP1.3), Serotyp PIA, Opa ₂₉ , P ⁻ , (Makino et al., 1991)
N483	<i>N. gonorrhoeae</i> MS-11-B2.1, Opa ₃₀ , P ⁻ , P _n (Deletion im Promotorbereich des Pilingens), Serotyp PIB (Makino et al., 1991)
5.1.3 Zelllinien	
Caco-2	Darmkarzinoma Zellen (ATCC HTB37), Kultur in RPMI-Medium/5% FCS/5% CO ₂
Chang	Humanes Konjunktivaepithel (ATCC CCL20.2), Kultur in RPMI-Medium/5% FCS/5% CO ₂
Hec-1B	Humane endometriale Karzinomazellen (ATCC HTB113), Kultur in DME-Medium/20% FCS/1% nicht-essentielle Aminosäuren/10% CO ₂
HeLa	Humanes Cervixkarzinom (ATCC CCL2), Kultur in RPMI-Medium/5% FCS/5% CO ₂
HeLa-Transfektanten	HeLa Syndekan-1, transfektiert mit pEAF15 HeLa Syndekan-1(Δ278-310), transfektiert mit pEAF16 HeLa Syndekan-4, Klon 1, Klon 2 und Klon 3, transfektiert mit pEAF17 HeLa Syndekan-4(Δ168-178), transfektiert mit pEAF31 HeLa Syndekan-4(Δ174-178), transfektiert mit pEAF32 HeLa Syndekan-4(Δ164-170), transfektiert mit pEAF33 HeLa Syndekan-4(K164R; K169R), transfektiert mit pEAF34 HeLa Syndekan-4(K169Q), transfektiert mit pEAF35 HeLa Syndekan-4(Δ152-178), transfektiert mit pEAF40 HeLa pCEP4 Klon 1 und Klon 2; transfektiert mit pCEP4 Alle HeLa-Transfektanten werden in RPMI mit 5% FCS/5% CO ₂ mit 200 µg/ml Hygromycin B kultiviert.
K562	Multipotente, maligne, hematopoetische Zelllinie; Kultur in RPMI-Medium/10% FCS/5% CO ₂
K562-Transfektanten	K562 Syndekan-4, transfektiert mit pEAF17 K562 Syndekan-4(Δ152-178), transfektiert mit pEAF40 K562 neo, transfektiert mit pCEP4 Alle K562 Transfektanten werden in RPMI mit 10% FCS/5% CO ₂ mit 200 µg/ml Hygromycin B kultiviert.
Me180	Humanes Cervixkarzinom (ATCC HTB33), Kultur in RPMI-Medium/5% FCS/5% CO ₂
Molt-4	Humanes Lymphoblastom; Kultur in RPMI-Medium/10% FCS/5% CO ₂
Molt-4-Transfektanten	Molt-4 Syndekan-4, transfektiert mit pEAF23 Molt-4 Syndekan-4(Δ152-178), transfektiert mit pEAF24 Molt-4 neo, transfektiert mit pREP4

	Alle Molt-4 Transfektanten werden in RPMI mit 5% FCS/5% CO ₂ mit 200 µg/ml Hygromycin B kultiviert.
T24	Humanes Blasenkarzinom (ATCC HTB4), Kultur in RPMI-Medium/5% FCS/5% CO ₂

5.2 Nährmedien

5.2.1 Medien und Platten für Bakterien

LB-Flüssigmedium	Luria-Bertani-Flüssigmedium: 10 g Bacto-Trypton; 5 g Bacto-Yeast-Extract; 10 g NaCl; mit H ₂ O auf 1 l auffüllen und mit 1 N NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren.
GC-Platten	36 g GC Agar Base (GibcoBRL) werden mit H ₂ O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert, nach dem Abkühlen auf 55 °C Zugabe von 10 ml Vitaminmix.
PPM-Medium	Proteose-Pepton-Medium: 15 g Proteose-Peptide (Difco); 5 g NaCl; 1 g lösliche Stärke (Serva); 4 g KH ₂ PO ₄ und 1 g K ₂ HPO ₄ in 1 l H ₂ O lösen und autoklavieren; Lagerung bei 4 °C.
Vitaminmix	100 g D-Glucose, 10 g L-Glutamin; 26 g Cystein Cl; 0,1 g Cocarboxylase; 0,02 g Fe(NO ₃) ₃ ; 0,003 g Thiamin HCl; 0,25 g Diphosphopyridinnukleotid/NAD und 0,01 g Vitamin B ₁₂ werden in ca. 500 ml H ₂ O bidest. gelöst. Dazu wird eine Lösung aus 1,1 g L-Cystin; 1 g Adenin; 0,03 g Guanin HCl; 0,5 g Uracil; 0,15 g L-Arginin HCl und 0,013 g p-Aminobenzoesäure in 15 ml HCl konz. gegeben und auf 1 l mit H ₂ O bidest. aufgefüllt und sterilfiltriert.
IPTG	Isopropylthio(-D-galactosid): 2 g IPTG werden in 10 ml H ₂ O bidest. gelöst. Sterilfiltrieren, bei -20 °C lagern. 20 µl pro Agarplatte einsetzen.
X-Gal	20 mg/ml in Dimethylformamid, bei -20 °C lagern. 20 µl pro Agarplatte einsetzen.
Einfriermedium	PPM-Medium mit 20% (v/v) Glycerol
Antibiotika	Ampicillin 100 µg/ml

5.2.2 Medien für die Zellkultur

Milli-Q-H ₂ O	Wasser von höchstem Reinheitsgrad, das durch das Milli-Q ^{UF} -PLUS Ultra Pure Water System von MILLIPORE hergestellt wird.
Trypsinlösung	0,25% Trypsin (w/v); 0,05% EDTA (w/v); 5 mM Glucose in 1x PBS, pH 7,2
FCS	Fötales Kälberserum (Boehringer Mannheim)
RPMI-1640	Synthetisches Zellkulturmedium (GibcoBRL)

Material

DMEM	Dulbecco's modified Eagle Tissue culture Medium (GibcoBRL)
Trypanblau	0,175% Trypanblau in H ₂ O bidest.
Lipofectamine	Transfektionslösung (GibcoBRL)
Lipofectin	Transfektionslösung (GibcoBRL)
OPTIMEM	Serumfreies Medium für Transfektionen (GibcoBRL)

5.3 Primer

Name	5'-3'-Sequenz	Bemerkung
EAF1	cgcggtaccagcctgccgctctcccgccg	Syndekan-1, N-Terminus
EAF2	tactctagatcaggcatagaattcctct	Syndekan-1, C-Terminus
EAF3	tactctagatcacattcgatacagcataaaaccaccaggcacaca	Syndekan-1 (Δ278-310), C-Terminus
EAF4	cgggggtaccgccttctccagtcgcggt	Syndekan-4, N-Terminus
EAF5	ggaattctcacgcgtagaactcattggt	Syndekan-4, C-Terminus
EAF7	ggaattctcagatgggttcttggcccaggt	Syndekan-4 (Δ168-178), C-Terminus
EAF8	ggaattctcaggtgggggcttcttctgtaga	Syndekan-4 (Δ174-178), C-Terminus
EAF9	ggaattctcacgcgtagaactcattggtgggtgcgccgaggtcatagctgcct	Syndekan-4 (Δ164-170), C-Terminus
EAF10	ggaattctcacgcgtagaactcattggtgggggcttctctgtagatgggtctcttggccc	Syndekan-4 (K164R; K169R), C-Terminus
EAF11	ggaattctcacgcgtagaactcattggtgggggcttcttctgtaga	Syndekan-4 (K164R), C-Terminus
EAF12	ggaattcttagccacggtacatgagcagtaggat	Syndekan-4 (Δ152-178), C-Terminus
EAF13	attctagttgtggtttgtcc	pCEP4, Position 360
EAF14	gagctcgtttagtgaaccgt	pCEP4, Position 480

5.4 Plasmide und Vektoren

pBluescript KS(+)	pUC19 Derivat (Stratagene)
pCEP4	episomaler Expressionsvektor für Säugetierzellen mit CMV Promotor (Invitrogen)
pCR-Script SK(+)	pBluescript II SK(+) Derivat (Stratagene)
pCRII-TOPO	Klonierung von <i>Taq</i> Polymerase amplifizierten PCR-Produkten (Invitrogen)
pEAF3	PCR mit EAF1/EAF2, über <i>KpnI</i> , <i>XbaI</i> in pUC118
pEAF4	PCR mit EAF1/EAF3 über <i>KpnI</i> , <i>XbaI</i> in pUC118
pEAF5	PCR mit EAF4/EAF5 über <i>KpnI</i> , <i>EcoRI</i> in pBluescript SK(+)
pEAF15	pEAF3 über <i>KpnI</i> , <i>HindIII</i> in pCEP4
pEAF16	pEAF4 über <i>KpnI</i> , <i>HindIII</i> in pCEP4
pEAF17	pEAF5 über <i>KpnI</i> , <i>BamHI</i> in pCEP4
pEAF23	pEAF5 über <i>KpnI</i> , <i>BamHI</i> in pREP4
pEAF24	pEAF39 über <i>KpnI</i> , <i>NotI</i> in pREP4
pEAF25	PCR mit EAF4/EAF7 in pCR-Script SK(+) (Teil der extrazellulären Domäne fehlt)
pEAF26	PCR mit EAF4/EAF8 in pCR-Script SK(+)
pEAF27	PCR mit EAF4/EAF9 in pCR-Script SK(+) (Teil der extrazellulären Domäne fehlt)
pEAF28	PCR mit EAF4/EAF10 in pCR-Script SK(+)
pEAF29	PCR mit EAF4/EAF11 über <i>KpnI</i> , <i>EcoRI</i> in pBluescript KS(+)
pEAF31	pEAF37 mit <i>KpnI</i> , <i>NotI</i> geschnitten in pCEP4
pEAF32	pEAF26 mit <i>KpnI</i> , <i>NotI</i> geschnitten in pCEP4
pEAF33	pEAF38 mit <i>KpnI</i> , <i>NotI</i> geschnitten in pCEP4
pEAF34	pEAF28 mit <i>NotI</i> , <i>BamHI</i> geschnitten in pCEP4
pEAF35	pEAF29 mit <i>KpnI</i> , <i>BamHI</i> geschnitten in pCEP4
pEAF37	pEAF5 mit Fragment pEAF25 <i>BglII</i> , <i>NotI</i> in pBluescript KS(+)
pEAF38	pEAF5 mit Fragment pEAF27 <i>XbaI</i> , <i>NotI</i> in pBluescript KS(+)
pEAF39	PCR mit EAF4/EAF12 in pCRII TOPO
pEAF40	pEAF39 mit <i>KpnI</i> , <i>NotI</i> geschnitten in pCEP4
pHuSyn-1	Humanes Syndekan-1 (Guido David)
pUC118	pUC18 Derivat (Vieira and Messing, 1987)
pREP4	episomaler Expressionsvektor für Säugetierzellen mit RSV Promotor (Invitrogen)

5.5 Puffer und Lösungen für Arbeiten mit DNA

5.5.1 Puffer und Lösungen für Plasmidpräparationen

Puffer P1	Resuspensionspuffer: 50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A; pH 8,0; Lagerung bei 4 °C.
Puffer P2	Lysepuffer: 200 mM NaOH; 1% SDS
Puffer P3	Neutralisationspuffer: 3 M K-Acetat, pH 5,5; Lagerung bei 4 °C.
Puffer QBT	Equilibrierungspuffer: 750 mM NaCl; 50 mM MOPS; 15% (v/v) Ethanol; 0,15% (v/v) Triton X-100; pH 7,0

Puffer QC	Waschpuffer: 1 M NaCl; 50 mM MOPS; 15% (v/v) Ethanol; pH 7,0
Puffer QF	Elutionspuffer: 1,25 M NaCl; 50 mM Tris/HCl; 15% (v/v) Ethanol; pH 8,5

5.5.2 Puffer und Lösungen für Agarose Gelelektrophorese von DNA

50 x TAE	Tris-Acetat/EDTA als 1 x TAE Laufpuffer für präparative Agarose-Gele: 2 M Tris-Acetat, 100 mM EDTA, pH 8,0
10 x TBE	Tris-Borat/EDTA als 1 x TBE Laufpuffer für analytische Agarose-Gele: 900 mM Tris; 900 mM Borsäure; 20 mM EDTA, pH 8,0
5 x GEBS	DNA-Auftragspuffer für Agarose-Gele: 20% (w/v) Glycerol; 50 mM EDTA; 0,05% Bromphenolblau; 0,5% Sarcosyl

5.5.3 Sonstige Puffer und Lösungen

3 M NaAc	Natriumacetat: 24,61 g Na-Acetat in 100 ml H ₂ O lösen und pH 5,2 mit Eisessig einstellen.
TE pH 8,0	Tris-EDTA: 10 mM Tris/HCl; 1mM EDTA, pH 8,0
0,5 M EDTA	186,1 g EDTA•2 H ₂ O in 800 ml H ₂ O lösen; pH 8,0 mit NaOH-Pellets (ca. 20 g) einstellen, auf 1 l mit H ₂ O auffüllen und autoklavieren.

5.5.4 Kits

GeneClean-Kit	Fertige Lösungen der Firma Bio101, Inc. (Vista, CA): Glasmilch (Silicamatrix in H ₂ O); 6 M NaI-Lösung; New Wash: Stammlösung (Tris-EDTA, pH 7,0-8,5, NaCl,) versetzt mit 520 ml Ethanol, mit H ₂ O auf 1 l auffüllen; Lagerung bei -20 °C.
---------------	---

5.6 Enzyme

RNaseA, T4-DNA-Ligase, Benzonase und Proteinase K wurden von Boehringer Mannheim bezogen, Trypsin von GibcoBRL, Restriktionsenzyme von den Firmen AppliGene Oncor (Illkirch, Frankreich), New England Biolabs (Beverly, MA), Boehringer Mannheim, Gibco BRL, Amersham Pharmacia Biotech und USB.

5.7 Puffer und Lösungen für Arbeiten mit Proteinen

5.7.1 Puffer und Lösungen für Arbeiten mit Proteoglykanen

Zellwaschpuffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl
Extraktionspuffer	60 mM N-Octyl-β-D-glucopyranosid; 10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 10 mM EDTA; 5 mM N-Ethylmaleimid; 5 mM Benzamidin; 1 µg/ml Pepstatin A; 1 mM PMSF
Säulenwaschpuffer	0,1% Triton X-100; 50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 200 mM NaCl; 10 mM EDTA; 1 mM PMSF
Elutionspuffer	0,1% Triton X-100; 50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 1 M NaCl; 10 mM EDTA; 1 mM PMSF
Heparitinase-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,0; 100 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ ; 2,5 µg/ml BSA, 1 µg/ml Pepstatin A; 1 µg/ml Leupeptin; 1 mM PMSF
Chondroitinsulfat	5 mg/ml in H ₂ O bidest.
Enzympuffer	100 mM Na-Acetat pH 7,0; 1 mM CaCl ₂
Chondroitinase ABC	5 U in 1 ml Enzympuffer lösen, bei -70 °C lagern.
Heparitinase	0,1 U in 1 ml Enzympuffer lösen, bei -70 °C lagern.
Immunpräzipitation	Lysepuffer: 1% Triton X-100; 50 mM Tris, pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,2 mM PMSF; 1 mM Benzamidin; 1 mM Leupeptin; 750 µM CaCl ₂

5.7.2 Puffer für das Arbeiten mit Protein Kinase C (PKC)

PKC-Isolierung	Puffer A: 20 mM Tris, pH 7,5; 0,25 M Suchrose; 2 mM EGTA; 2 mM EDTA; 0,5 mM PMSF; 10 µg/ml Leupeptin; 10 µg/ml Pepstatin A
	Puffer B: 20 mM Tris, pH 7,5; 1% Nonidet P-40; 150 mM NaCl; 1 mM EGTA; 1 mM EDTA; 0,5 mM PMSF; 10 µg/ml Leupeptin; 10 µg/ml Pepstatin A
	Puffer C: 20 mM Tris, pH 7,5; 1% SDS; 150 mM NaCl; 1 mM EGTA; 1 mM EDTA; 0,5 mM PMSF; 10 µg/ml Leupeptin; 10 µg/ml Pepstatin A
TCA 100%	500 g TCA in 227 ml H ₂ O bidest. lösen.
PKC-Peptid-Assay	Lysepuffer: 1 mM NaHCO ₃ ; 5 mM MgCl ₂ ; 100 µM PMSF; 1 mM NaF; 100 µM NaVO ₃
	2 x Assay Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 5 mM MgCl ₂ ; 1 µM CaCl ₂ ; 100 µM NaVO ₃ ; 100 µM Na-Pyrophosphat; 1 mM Na-Fluorid; 100 µM PMSF
	PKC-Peptid: (900 µM) in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 lösen.
PKC-Overlay	Phosphatidylserin: 5 mg/ml in Chloroform, bei -20 °C lagern.

5.7.3 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE

Acrylamid-Lösung	30% (w/v) Polyacrylamid; 0,8% (w/v) Bisacrylamid
APS	10% Ammoniumpersulfat in H ₂ O bidest.; Lagerung bei 4 °C.
TEMED	0,1% N,N,N',N'-Tetramethyldiamin; Lagerung bei 4 °C.
Sammelgelpuffer	30,3 g Tris-Base; 10 ml 20% (w/v) SDS, pH 6,8 mit HCl einstellen (ca. 20 ml) und mit H ₂ O auf 500 ml Gesamtvolumen auffüllen; Lagerung bei 4 °C.
Trenngelpuffer	90,85 g Tris-Base; 10 ml 20 (w/v) SDS; pH 8,8 mit HCl einstellen (ca. 12,5 ml) und mit H ₂ O auf 500 ml Gesamtvolumen auffüllen; Lagerung bei 4 °C.
1 x Probenpuffer	2,5 ml 1M Tris/HCl, pH 6,8; 1,77 g DTT; 10 ml 10% (w/v) SDS; 0,05 g Bromphenolblau; 5,8 ml 86% Glycerol; mit H ₂ O auf 50 ml auffüllen; Lagerung bei -20 °C.
2 x Probenpuffer	5 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8; 1,54 g DTT; 20 ml 10% (w/v) SDS; 0,1 g Bromphenolblau; 11,6 ml 86% Glycerol; mit H ₂ O auf 50 ml auffüllen; Lagerung bei -20 °C.
Laemmli-Puffer	Elektrophorese-Laufpuffer (5fach konzentriert): 15,1 g Tris und 94 g Glycin werden auf 900 ml mit H ₂ O bidest. aufgefüllt, danach mit 50 ml 10% (w/v) SDS versetzt und mit H ₂ O bidest. auf ein Gesamtvolumen von 1 l aufgefüllt.

5.7.4 Coomassie-Färbung

Proteinfärbelösung	0,275 g Coomassie Blue R250; 90 ml Methanol:H ₂ O 1:1 (v/v) Gemisch; 10 ml Eisessig
Entfärbelösung	40% Methanol; 10% Eisessig; 50% H ₂ O

5.7.5 Puffer und Lösungen für Western Blot-Analyse

TBS	Tris-buffered saline: 150 mM NaCl; 25 mM Tris pH 7,4
TBS-T	TBS mit 0,05% (v/v) Tween-20
TBS-T-Milch	5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T
Transferpuffer	192 mM Glycin; 25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 20% (v/v) Methanol; 0,1% (w/v) SDS
ECL-Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)

5.7.6 Inhibitoren

Aprotinin	10 mg/ml in 0,01 M Tris/HCl, pH 8,0; bei -20 °C lagern.
Benzamidin	0,5 M in 50% Ethanol, bei 4 °C lagern.
Calphostin	1 mM in DMSO, bei -20 °C lagern.
Colchizin	1 mg/ml in Ethanol, bei -20 °C lagern.

Material

Cytochalasin D	1 mg/ml in DMSO, bei -20 °C lichtgeschützt lagern.
Genistein	10 mM in DMSO, bei -20 °C lagern.
Gö6976	1 mM in DMSO, bei -20 °C lichtgeschützt lagern.
Leupeptin	1 mg/ml in H ₂ O bidest., bei -20 °C lagern.
Monodansylcadaverin	100 mg in 3,97 ml 1 x PBS aufnehmen und tropfenweise konz. NaCl zugeben, bis es sich löst (75 mM), bei -20 °C lagern.
N-Ethylmaleimid	0,5 M in Ethanol, bei 4 °C lagern.
Nocodazol	10 mM in DMSO, bei -20 °C lagern.
Pepstatin A	1 mg/ml in Methanol, bei 4 °C lagern.
PMA	1 mg/ml in DMSO, bei -20 °C lagern.
PMSF	100 mM in Isopropanol, bei -20 °C lagern.
Staurosporine	1 mg/ml in DMSO, bei -20 °C lagern.
Taxol	1 mg/ml in DMSO, bei -20 °C lagern.

5.8 Puffer für die Kopplung von Antikörpern an Latexbeads

Karbonatpuffer	0,1 M Na ₂ CO ₃ werden zu 0,1 M NaHCO ₃ gegeben, bis der pH 9,6 erreicht ist.
Phosphatpuffer	0,02 M Na ₂ HPO ₄ werden zu 0,02 M NaH ₂ PO ₄ gegeben, bis der pH 4,5 erreicht ist.
2% Carbodiimid	2% 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethyl Carbodiimid Hydrochlorid wird in Phosphatpuffer gelöst. Innerhalb von 15 min verwenden.
Boratpuffer	0,2 M Borsäure mit 1 M NaOH auf pH 8,5 einstellen.
Ethanolamin	20 µl Ethanolamin (2-Aminoethanol) zu 1,3 ml Boratpuffer geben.
Storagepuffer	0,1 M NaH ₂ PO ₄ werden zu 0,1 M Na ₂ HPO ₄ gegeben, bis der pH 7,4 erreicht ist. 20 ml des 0,1 M Phosphatpuffers; 0,88 g NaCl; 1 g BSA; 5 ml Glycerol und 0,1 g NaN ₃ auf 100 ml mit H ₂ O bidest. auffüllen. pH auf 7,4 mit HCl oder NaOH einstellen.

5.9 Puffer und Lösungen für Zellassays

Mowiol	14 g 86% Glycerol abwiegen, mit 4,8 g Mowiol 4-88 (Hoechst) und 10 ml H ₂ O ersetzen und mindestens über Nacht bei RT stehen lassen; dann 24 ml 0.2 M Tris/HCl, pH 8,5 zugeben, 30 min bei 50 °C inkubieren und 15 min bei 4.000 rpm zentrifugieren; Lagerung bei 4 °C.
10 x PBS	Phosphate-Buffered Saline: 80 g NaCl; 2 g KCl; 2 g KHPO ₄ ; 14,42 g Na ₂ HPO ₄ •2 H ₂ O; auf 1 l mit H ₂ O bidest. auffüllen, pH auf 7,3 einstellen und autoklavieren.
PBS + Mg ²⁺ + Ca ²⁺	Zu 900 ml H ₂ O bidest. werden unter Rühren 0,5 ml 1 M CaCl ₂ , 100 ml 10x PBS und 1 ml 1 M MgCl ₂ dazugegeben, wobei diese Reihenfolge unbedingt eingehalten werden muß; danach wird die Lösung sterilfiltriert.

2% GA/Hepes	2% (v/v) Glutaraldehyd werden in 0,2 M Hepes gelöst und der pH auf 7,4 eingestellt; Lagerung bei -20 °C.
3,7% PFA/Hepes	Zu 320 ml H ₂ O bidest. werden 14,8 g PFA und 250 µl 1 N NaOH gegeben, dieses Gemisch wird 30 min bei 55 °C bis 60 °C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert, bis es gelöst ist, danach erfolgt die Zugabe von 80 ml 1 M Hepes, pH 7,2 und 800 µl 1 N HCl, der pH sollte zwischen 7,2 und 7,4 liegen (pH-Papier!); Lagerung bei -20 °C.
Saponinlösung	1 x PBS+Mg ²⁺ +Ca ²⁺ ; 1% (w/v) Saponin einwiegen, sterilfiltrieren.

5.10 FACS-Analyse

FACS-Puffer	PBS + Mg ²⁺ + Ca ²⁺ mit 3% FCS
Propidiumjodid	2,5 mg/ml in Ethanol
FACS Flow	(Becton Dickinson)
FACS Rinse	(Becton Dickinson)
FACS Safe	(Becton Dickinson)

5.11 Antikörper und Fluorochrome

5.11.1 Primäre Antikörper

AK 93	Polyklonales Kaninchen Serum gegen ganze Bakterien von <i>N. gonorrhoeae</i> Stamm MS11 (MPI Tübingen), 1:100 für Immunfluoreszenz.
AK 213	Polyklonales Kaninchen Serum gegen ganze Bakterien von <i>N. gonorrhoeae</i> Stamm VP1 (MPI, Tübingen), 1:400 für Immunfluoreszenz.
AK 231	Polyklonales Ratten Serum gegen ganze Bakterien von <i>N. gonorrhoeae</i> Stamm MS11 B2.1 (MPI, Tübingen), 1:200 für Immunfluoreszenz.
3G10	Monoklonaler Maus IgG2 Antikörper gegen Heparitinase-verdaute Proteoglykane(Lories et al., 1989), 1:60 für Western Blots.
6.5B5	Monoklonaler Maus IgG Antikörper gegen ICAM-1 (Dr. D. Haskard, Hammersmith Hospital, London)
8G3	Monoklonaler Maus IgG1 Antikörper gegen Syndekan-4 (David et al., 1992), 1:80 für Immunfluoreszenzfärbungen, 1:200 für Western Blots.
10E4	Monoklonaler Maus IgM Antikörper gegen HSPGs (David et al., 1992), 1:100 für Immunfluoreszenzfärbungen.
SG/19	Monoklonaler Maus IgG1 Antikörper gegen humanes β ₁ -Integrin (Seikagaku, Tokio, Japan)

MCA	Monoklonaler Maus IgG1 Antikörper gegen Syndekan-1 (Serotec, Oxford, England), 1:100 für Immunfluoreszenzfärbungen, 1:200 für Western Blots.
PKC α	Monoklonaler Maus IgG2b Antikörper gegen PKC α (Transduction Laboratories, Lexington, KA), 1:100 für Immunfluoreszenzfärbungen, 1:1000 für Western Blots.
PKC α	Polyklonaler Kaninchen Antikörper gegen PKC α (Dr. C. Schächtele, Klinik für Tumorbiologie, Freiburg), 1:500 für Western Blots.
PKC γ	Monoklonaler Maus IgG1 Antikörper gegen PKC γ (Transduction Laboratories), 1:200 für Immunfluoreszenzfärbungen, 1:5000 für Western Blots.

5.11.2 Fluorochrome

FITC Phalloidin	Stammlösung 0,5 mg/ml Methanol p.a., lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahren, 5 µg/ml einsetzen.
TRSC Phalloidin	Stammlösung 0,5 mg/ml Methanol p.a., lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahren, 2,5 µg/ml einsetzen.

Konjugierte sekundäre Antikörper wurden von Biorad, Dianova (Hamburg, Deutschland), JacksonImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA), Serotec (Oxford, England) und Sigma bezogen.

5.12 Chemikalien

Die eingesetzten Chemikalien wurden über folgende Firmen (in Klammern genannt) bezogen:

Agarose (SeaKem), Acrylamid (Serva), Agar-Agar (Difco), Ammoniumperoxodisulfat (Serva), [³²P]ATP (Amersham), Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva), DEAE-Sephacel (Pharmacia), Dithiothreitol und DMSO (Serva), DNA-Marker (New England Biolabs), Dulbecco's Modified Eagles Medium (GibcoBRL), Dynal RAM IgG1 Collection Kit (Dynal), FACSFlow (Becton Dickinson), FCS (Boehringer Mannheim), GC Agar Base (GibcoBRL), Glukose (Riedel), Glycerol (Roth), Gö 6976 (Calbiochem), Hefeextrakt (Difco), Immersionsöl (Zeiss), IPTG (Serva), Lipofectamin, Lipofectin, M199 (GibcoBRL), β -Mercaptoethanol (Serva), Methylenblau (Serva), Mowiol 4-88 (Hoechst), N-Octyl- β -D-glucopyronosid (Calbiochem), Nukleotide (Boehringer), Polyacrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid (Serva), Polybead Carboxylate Microspheres \varnothing 1,909 µm, (Polysciences Inc.), Protein-G Sepharose 4Cl (Pharmacia), Proteinmarker (BioRad), Proteose-Peptide (Difco), Rinderserumalbumin (BSA) (Miles Laboratories), Stärke (Difco), Szintillationsflüssigkeit Quickszint (Zinsser), TEMED (Serva), Tris-Base (Roth), Trypton (Difco), Tween 20 (Serva); alle übrigen Chemikalien wurden von Merck, Sigma oder Roth bezogen.

5.13 Geräte und sonstige Materialien

Folgende Geräte und Materialien (Bezugsquelle in Klammern) wurden eingesetzt:

Brutschränke (Bühler, Heraeus, Heinicke, Memmert), Drucker (Macintosh, Hewlett Packard und Kodak), Dynal MPC E-1 (Dynal), Elektrobplot-Apparatur (Biotech-Fischer), Elektronenmikroskop (Philips), Elektroporationsküvetten (BioRad), Feldemissions-Scanning Elektronenmikroskop (Hitachi), Fluoreszenzmikroskop (Nikon, Zeiss), Filtersätze für Fluoreszenzmikroskopie am Axiovert 35 von Zeiss (Zeiss), FACSort und Zubehör (Becton Dickinson), Filme für Farbdiaspositive (Kodak und Fuji), Filme für EM-Aufnahmen (Agfa), Gasbrenner (Tecnomara und Hanau), Gelapparatur für Polyacrylamidgelelektrophorese (BioRad), Gelkammern für Agarosegele (BioRad), Glaswaren (Schott), Hamilton-Spritzen (Hamilton Bonaduz AG), Heizblöcke (Grant Instruments), Immunfluoreszenzmikroskop /Konfokales Laser Scanning Mikroskop (Leica), Kanülen und Einmalspritzen (Becton Dickinson, Braun Melsungen), Kühl- und Gefrierschränke (Colora, Liebherr), Küvetten (Sarstedt), 3 MM-Papier (Whatman), Magnetrührer (Heidolph und Kamag), Mehrkanalpipette (Micronic), Cellcounter (Schärfe System), Mikroskopische Deckgläschen rund Ø 12 mm (Multimed), Mikrowellenherde (Phillips und Bosch), Milli-Q Ultra Pure Water System (Millipore), Nitrocellulose-Filter (Millipore, Schleicher & Schuell, Sartorius), Objektträger 67x26 mm (Assistent), P81 Papier (Whatman), Papier für Schwarz/Weiß-Abzüge vom Negativ (Tetenal und Ilford), Parafilm (American Can Company), Pasteurpipetten (Brand, Hirschmann), Plastikwaren (Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc, Sarstedt), für die Zellkultur (Greiner, Nunc), pH-Meter (Radiometer Kopenhagen), Photometer (Beckmann, Hach), Pipetten (Gilson, Greiner), Pipettierhilfen (Hirschmann), Quiagentip Säulen (Diagen), Röntgenfilme (Fuji, Kodak), Schüttler (Bühler), Spannungsgeräte (Bachhofer, LKB, Fischer, Delta Elektronik), Sterilbank (Gelaire, Heraeus), Sterilpumpe (Millipore), Szintillationszähler (Beckmann), Taumler (Heidolph), Ultramikrotom (LKB), UV-Lampen (Benda), Vortex (Bender & Hobein AG), Videomager (Intas), Waagen (Sauter, Mettler, Sartorius), Wasserbäder (Bachofen, GFL), Wattestäbchen (steril) (Becton Dickinson), Zentrifugen und Zubehör (Eppendorf, Heraeus, Hermle, Sorvall, Beckmann), Zeta-Probe-Membran (Biorad)

5.14 Computer und Software

5.14.1 Computer

Apple-Computer	Macintosh Quadra 650 für Erfassung und Auswertung von FACS-Daten
HP ScanJet 4C	
IBM /IBM-Kompatibel	für Textverarbeitung, Tabellenkalkulation, Konfokale Laser Scanning Mikroskopie, graphische Daten- und Bildverarbeitung und Online-Literaturrecherchen

5.14.2 Software

Microsoft Word 6.0 und 7.0 für Textverarbeitung

Microsoft Excel 7.0 für Tabellenkalkulation

Microsoft Power Point 7.0 für graphische Datenverarbeitung

Clone Manager 4.0 für die Erstellung von Plasmidkarten

Leica TCS NT für Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Adobe Photoshop 4.0 für graphische Datenverarbeitung und Bearbeitung von konfokalen Bilddaten

Ovid für Online-Literaturrecherchen

CellQuest 1.1.1 für FACS-Messung und Daten-Auswertung

Reference Manager 8.0 für Erstellung des Literaturverzeichnisses

6 Methoden

6.1.1 Kultur von Bakterien

6.1.2 Anzucht von Bakterien

Alle Gonokokken werden bei 37 °C/5% CO₂ inkubiert, *E.coli* bei 37 °C/2% CO₂. *E. coli* wird auf LB-Platten kultiviert, die bei Bedarf die zur Selektion notwendigen Antibiotika enthalten. *N. gonorrhoeae* wird auf GC-Platten kultiviert, die bei Bedarf die zur Selektion notwendigen Antibiotika enthalten. Gonokokken werden immer phänotypisch bzgl. Opa selektiert, bevor sie in Infektionsversuchen eingesetzt werden.

6.1.3 Einfrieren von Bakterien

Alle Mikroorganismen werden bei –70 °C gelagert, wobei für *E. coli* PPM-Medium mit 20% Glycerol (v/v) als Einfriermedium verwendet wird. Gonokokken werden in PPM-Medium mit 20% Glycerol (v/v) suspendiert und sterile Glasbeads mit dieser Suspension für ca. 1 min inkubiert, wobei die Bakterien an den Plastikbeads adhären. Die Suspension wird verworfen und die Glasbeads eingefroren.

6.2 Arbeiten mit Zellkulturen

6.2.1 Allgemeines

Die gesamte Arbeit mit den Zellen erfolgt unter einer Sterilbank. Es werden separate Gefäße, Pipetten und sonstige Geräte verwendet. Glasflaschen für die Aufbewahrung von Zellkulturmedien werden mit speziellen Detergenzien gewaschen und bei 220 °C ausgebacken. Rückstände von Reinigungsmitteln sollten nicht in den Flaschen zurückbleiben, da diese schon in geringen Konzentrationen für die Zellen schädlich sind.

6.2.2 Auftauen von Zellen

Die bei –135 °C gelagerten Zellen werden im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und der Inhalt des Kryoröhrchens wird in ein kleines PPN-Röhrchen überführt. Das PPN-Röhrchen wird mit Medium aufgefüllt, danach erfolgt eine Zentrifugation für 5 min bei 500 rpm. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 6 ml Wachstumsmedium resuspendiert, die Zellsuspension in eine kleine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt und bei 37 °C/5% CO₂ inkubiert.

6.2.3 Einfrieren von Zellen

Eine konfluente 75 cm² Flasche wird trypsiniert, die Zellen in Medium aufgenommen und bei 500 rpm für 5 min bei RT abzentrifugiert. Der Überstand abgenommen und die Zellen in 1,5 ml Wachstumsmedium mit 20% FCS resuspendiert. Danach wird langsam 1,5 ml Wachstumsmedium mit 20% FCS/15% DMSO zugegeben. Jeweils 1 ml Zellsuspension wird in einem Kryoröhrchen

eingefroren und bei -70 °C gelagert. Nach 24 h werden die Zellen auf -135 °C überführt und dort aufbewahrt.

6.2.4 Kultivierung von Zellen

Zellen werden in Zellkulturflaschen (75 cm²) im jeweiligen Wachstumsmedium kultiviert. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5% CO₂. Die Subkultivierung der Zellen findet alle zwei bis drei Tage statt. Dazu werden die Zellen nach Entfernung des alten Kulturmediums mit 1 ml einer auf 37 °C vorgewärmten Trypsinlösung gewaschen, um abgestorbene Zellen und Mediumreste zu entfernen. Anschließend erfolgt für einige Minuten eine Inkubation in ca. 1 ml Trypsinlösung bei 37 °C. Die Ablösung der Zellen während der Inkubationszeit wird mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wird je nach gewünschter Zelldichte Medium zugegeben, wobei die Zellen vorsichtig abgespült und durch mehrmaliges Aufziehen in einer sterilen Plastikpipette vereinzelt werden. Das noch vorhandene Trypsin wird durch die im Serum vorhandenen Proteine inaktiviert. Die Zellen werden in neuen Zellkulturflaschen ausgesät.

6.2.5 Behandlung von Deckgläschen

Die Deckgläschen werden zweimal in Aceton gewaschen und dann in einem gläsernen Becherglas verteilt. Das Sterilisieren erfolgt für 4 h bei 180 °C.

6.2.6 Trypanblau Färbung

Die Zellen werden für 5 min mit 0,175% Trypanblau inkubiert, danach einmal mit PBS gewaschen und mikroskopiert. Da die Zellmembran von toten Zellen permeabilisiert ist, nehmen sie das Trypanblau auf und können von lebenden Zellen unterschieden werden.

6.2.7 Transfektionen

Die Zellen werden in einer 6-Well Platte am Tag vorher ausgesät, so daß sie 60-70% konfluent sind. Für jede Transfektion werden 1,25 µg DNA in 1 ml serumfreien OPTIMEM gelöst, ebenso 20 µl Lipofectamin Reagenz. Beide Lösungen werden vorsichtig gemischt und für 15 min bei RT inkubiert, damit sich DNA-Liposomen Komplexe bilden können. Die Zellen dreimal mit serumfreiem OPTIMEM waschen, dann mit der DNA-Liposomen Lösung überschichten und für 6 h bei 37 °C/5% CO₂ inkubieren. Die Transfektion wird durch Zugabe von 1 ml OPTIMEM mit 10% FCS abgestoppt. Nach 48 h wird mit der Selektion durch Hygromycin B (200 µg/ml) begonnen. Zellen, die nicht transfiziert wurden, sterben innerhalb der nächsten zwei bis vier Wochen ab, während die transfizierten Zellen hochwachsen.

Für transiente Transfektionen werden die Zellen einen Tag vorher in einer 24-Well Platte ausgesät. Folgenden Mengen werden für die Transfektion eingesetzt: 200 ng DNA, 4 µl Lipofectamin und jeweils 200 µl OPTIMEM.

6.2.8 Selektion von Zellen über Magnetbeads

Die Dynabeads werden sorgfältig gemischt und pro Ansatz 15 µl Dynabeads in ein Eppendorfgefäß geben. Das Eppendorfgefäß wird für 2 min in den Dynal MPC gestellt, der Überstand abgenommen und die Dynabeads in 1 ml RPMI mit 1% FCS resuspendiert. Danach den Waschschrift nochmals wiederholen. Die Dynabeads in 30 µl RPMI/1% FCS resuspendieren und für 30 min bei RT mit dem zu koppelnden Antikörper rollend inkubieren. Die gekoppelten Beads dreimal über den Dynal MPC waschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen.

Die Zellen einer konfluenten 75 cm² Flasche werden mit PBS/2 mM EDTA abgelöst, in RPMI mit 1% FCS aufgenommen und bei 500 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 500 µl RPMI/1% FCS resuspendiert und die Zellen zu den Antikörper gekoppelten Dynabeads geben. Für 15 min bei 4 °C rollend inkubieren. Die Dynabead-tragenden Zellen so lange über den Dynal MPC waschen, bis alle Zellen entfernt sind, die keine Dynabeads tragen, die Kontrolle erfolgt über das Mikroskop.

Die Dynabeads können aufgrund eines DNA-Linkers von den Zellen entfernt werden. Dazu werden die Zellen mit 4 µl (200 U) DNase für 15 min bei 37 °C rollend inkubiert. Die Zellen wieder über den Dynal MPC waschen, allerdings den Überstand aufheben, da dieser die Zellen enthält.

6.3 Arbeiten mit DNA

6.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini-Präp)

Eine Viertel Platte einer ÜN-Kultur wird mittels eines Wattestäbchens in einem Eppendorfgefäß in 350 µl P1-Puffer resuspendiert, mit 300 µl Puffer P2 gemischt und bei RT 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl eiskaltem P3-Puffer wird durch Invertieren gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm/RT, die sofortige Abnahme des Überstands und die Präzipitation der DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol. Nach der Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm/RT wird das DNA-Pellet mit 0,5 ml Ethanol gewaschen, bei 37 °C im Heizblock getrocknet und in 50 µl H₂O bidest. aufgenommen.

6.3.2 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli* mit Qiagen-Säulen (Midi-Präp)

50 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum werden mit einer Bakterienkultur angeimpft und ÜN bei 37 °C/225 rpm geschüttelt. Die Bakterien werden 10 min bei 6000 rpm/RT in einem SS34 Sorvall-Rotor zentrifugiert und das Zellpellet in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffers P2 wird der Ansatz vorsichtig durch Invertieren des Röhrchens gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Das durch die alkalische Lyse erhaltene Zellysat wird anschließend zur Neutralisation mit 4 ml eisgekühltem Puffer P3 versetzt und 15 min auf Eis gestellt. Es folgt eine Zentrifugation von 30 min bei 15.000 rpm/4 °C im oben erwähnten Rotor; der resultierende Überstand wird dann nochmals unter denselben Bedingungen 15 min zentrifugiert. Der Überstand dieser zweiten Zentrifugation wird auf eine mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen tip 100 Säule gegeben. Nach dem Durchlauf der Probe wird die Säule zweimal mit je 10 ml Puffer QC gewaschen, bevor die DNA mit 2,65 ml Puffer QF eluiert wird. Die Präzipitation erfolgt durch Zugabe von 0,7 Volumen

Isopropanol bei RT mit anschließender Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm in der Eppendorfszentrifuge. Nach dem Waschen des Pellets mit 70% Ethanol wird die DNA bei 37 °C getrocknet und in 100 µl H₂O bidest. aufgenommen. Anschließend erfolgt eine DNA-Konzentrationsbestimmung.

6.3.3 DNA-Fällung mit Ethanol

Diese Methode wird zur Konzentrierung und Entsalzung DNA-haltiger Lösungen angewendet. Alle Schritte werden bei RT durchgeführt, da bei 4 °C zusätzlich noch Proteine gefällt werden. Die DNA-Lösung wird mit 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 5,2 und dem 2,5fachen Volumen Ethanol versetzt, kurz gevortext und 25 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, danach bei 37 °C getrocknet und dann in dem gewünschten Volumen H₂O aufgenommen.

6.3.4 DNA-Fällung mit Isopropanol

Eine gepufferte DNA-Lösung wird mit 0,7 Volumen Isopropanol gemischt und dann 20 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert, das Pellet anschließend mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, 5 min bei 37 °C im Heizblock getrocknet und in H₂O aufgenommen. Diese Methode fällt weniger Salze als die Ethanolfällung. Enthält die DNA-Lösung keine Salze, ist vor der Fällung mit Isopropanol 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 zur Lösung hinzuzugeben.

6.3.5 Analytische Gelelektrophorese von DNA

In dieser Arbeit wurden horizontale Gele mit einer Agarosekonzentration zwischen 0,8 und 1,2% (w/v) verwendet. Bei analytischen Gelelektrophoresen wird die Agarose durch Aufkochen in 1 x TBE gelöst und nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C in eine Gelkassette gegossen, in die zur Aussparung der Proben Taschen ein Kamm eingesetzt worden ist. Vor dem Auftragen werden die DNA-Proben mit 1/5 Volumen des Probenpuffers 5 x GEBS gemischt. Nach der 1 bis 2 h dauernden Auftrennung (80-100 V), bei der 1 x TBE als Laufpuffer verwendet wird, erfolgt die Färbung in einer Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) für 15 min. Nach dem Entfärben für 10 min in H₂O werden die DNA-Banden durch Bestrahlung mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und anschließend fotografiert.

6.3.6 Präparative Gelelektrophorese von DNA

Für präparative Gelelektrophoresen zur Fragmentisolierung werden ebenfalls Agarosegele verwendet. Im Unterschied zu den analytischen Gelen wird jedoch die Agarose in 1 x TAE gelöst, wobei dieser Puffer auch als Laufpuffer verwendet wird. Je nach Probenmenge werden die Taschen durch Abkleben der Zwischenräume einzelner Zähne des Kamms vergrößert. Die DNA-Banden werden entweder durch Färben mit Ethidiumbromid für 15 min oder mit Methylblau-Lösung (0,1% v/v) für 5 min und anschließendem Entfärben in H₂O bidest. sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA erfolgt durch Verwendung des GeneClean-Kits (siehe 6.3.7).

6.3.7 Elution der DNA aus Agarose mittels Geneclean-Kit

Diese Methode eignet sich zur schnellen und effizienten Elution von DNA-Fragmenten zwischen 500 bp und 8 kbp aus TAE-Agarosegelen. Das aus dem präparativen Agarosegel ausgeschnittene Gelblöckchen mit der zu isolierenden DNA-Bande wird gewogen, mit der dreifachen Menge einer 6 M Natriumjodid-Lösung versetzt und bei 55 °C geschmolzen. Anschließend werden 6 µl Glasmilch (Silicamatrix) zugegeben, der Ansatz gründlich gemischt und für 10 min auf Eis gestellt. Die Glasmilch mit der daran gebundenen DNA wird 7 Sek. in der Tischzentrifuge pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet dreimal mit je 500 µl New Wash gewaschen. Die Elution der DNA von der Glasmilch erfolgt durch Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm, der Aufnahme des Pellets in 8 µl H₂O und anschließender 10minütiger Inkubation bei 50 °C. Dieser Elutionsschritt wird einmal wiederholt und die vereinigten Elutionsüberstände werden erneut für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um die letzten Reste von Glasmilch zu entfernen.

6.3.8 Restriktion von DNA

Restriktionen für analytische Zwecke werden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Puffer und Reaktionsbedingungen richten sich nach den Angaben der Herstellerfirmen der entsprechenden Restriktionsenzyme. Die DNA-Menge beträgt 0,1 bis 0,5 µg DNA pro Ansatz, wobei in der Regel 5 U Restriktionsenzym eingesetzt werden. Alle Restriktionen finden bei 37 °C statt, die Zeitdauer beträgt 1 h bis ÜN. Die Reaktionen werden durch Zugabe von 1/5 Volumen 5 x GEBS gestoppt.

Restriktionsverdau für präparative Zwecke werden in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt, die DNA Mengen liegen hierbei bei 1 bis 3 µg DNA, von den Enzymen werden zwischen 20 und 40 U eingesetzt. Der Verdau wird für 2 bis 3 h bei 37 °C inkubiert.

Wird ein Restriktionsverdau mit zwei Restriktionsenzymen durchgeführt, so sollte, falls nicht derselbe Puffer verwendet werden kann, vor dem zweiten Restriktionsverdau eine Zentrifugationsentsalzung durchgeführt werden (siehe 6.3.9), ggf. sollten die Restriktionsenzyme durch 20minütige Erhitzung auf 70 °C zuvor hitzeinaktiviert werden.

6.3.9 Zentrifugationsentsalzung

Diese gelchromatographische Methode dient dem Entfernen niedermolekularer Bestandteile (z.B. Salze, SDS, Farbstoffen, sehr kleinen DNA-Fragmenten) aus DNA-Lösungen. In den Boden eines hohen 0,5 ml Eppendorfgefäßes wird mittels einer glühenden Kanüle ein kleines Loch gestochen. Zur Abdichtung werden in das Eppendorfgefäß ca. 30 µl silikonisierte Glaskügelchen gegeben, das Eppendorfgefäß dann mit 400 µl Sephacryl 250 aufgefüllt. Das so entstandene "Säulchen" wird in den durchbohrten Deckel eines 1,5 ml Eppendorfgefäßes gesteckt, die gesamte Anordnung in der Hermle-Zentrifuge 2 min bei 2.000 rpm/RT zentrifugiert (hierbei dient das große Eppendorfgefäß als Auffanggefäß für zu verwerfende Lösungen), das Säulchen unter erneuter Zentrifugation dann mit 100 µl H₂O bidest. gewaschen. Das gewaschene Säulchen wird auf ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß umgesteckt und die Probe auf die Säulenmatrix aufgetragen. Nach erneuter Zentrifugation bleiben die abzutrennenden Substanzen in der Säule zurück, die gereinigte DNA-Lösung wird im Eppendorfgefäß aufgefangen.

6.3.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden in dieser Arbeit in einem Gesamtvolumen von 15 μ l angesetzt und die Inkubation erfolgte ÜN im Wasserbad bei 14 °C. Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor beträgt 5:1 und es wird 1 μ l T4-Ligase (1 U/ μ l) eingesetzt.

6.3.11 Plasmidübertragung in *E. coli*

6.3.11.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli*

500 ml LB-Medium wird mit 5 ml einer ÜN-Kultur angeimpft und bei 37 °C im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1,0 herangezogen (4 bis 6 h). Nach einer 15minütigen Inkubation auf Eis werden die Zellen in einem Sorvall-GS3-Rotor 15 min bei 6.000 rpm/4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 500 ml eisgekühltem sterilem H₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach der Resuspension in 500 ml eisgekühltem, sterilem H₂O und anschließender erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 1,5 ml eisgekühltem, sterilem und destilliertem H₂O mit 10% (w/v) Glycerol resuspendiert, was einer 50 bis 100fachen Konzentration der Ausgangskultur entspricht. Die Zellen werden in 40 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Die Waschschrte sind notwendig, um die Salzkonzentration und damit die Leitfähigkeit der Zellsuspension herabzusetzen.

6.3.11.2 Elektroporation

Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und mit 1 μ l der zu transformierenden Plasmid-DNA auf Eis gemischt und mindestens 5 min auf Eis inkubiert. Danach wird der Ansatz in eine eisgekühlte Transformationsküvette (0,2 cm, BioRad, Cambridge) überführt. Die Elektroporation wird in einem Gene Pulser der Firma BioRad bei 2,5 kV, 25 μ F und 200 Ω mit einem Puls von 4 bis 5 ms durchgeführt. Unmittelbar danach werden die Zellen in 1 ml vorgewärmtem LB-Medium resuspendiert und zur Ausprägung der Resistenzen in einem 10 ml PPN-Röhrchen für 1 h bei 37 °C/225 rpm im Schüttler inkubiert. Anschließend werden 100 μ l und 900 μ l des Ansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

6.3.11.3 Herstellung transformationskompetenter *E. coli* nach der CaCl₂-

Methode

Eine Kolonie von *E. coli* wird in 5 ml LB-Medium ÜN bei 37 °C inkubiert. 400 ml LB-Medium werden mit 4 ml der ÜN-Kultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,375 unter guter Belüftung kultiviert. Die Flüssigkultur wird in vorgekühlte SS34 Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Alle folgenden Inkubations- und Zentrifugationsschritte finden bei 4 °C statt. Nach dem Ernten der Bakteriensuspension durch Zentrifugation für 7 min bei 3.000 rpm mit dem SS34-Rotor wird jedes Pellet in 10 ml kalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut für 5 min bei 2.500 rpm zentrifugiert. Dieser Waschschrte wird zweimal wiederholt, wobei das Pellet nach der letzten Zentrifugation in 2 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert wird. Nach anschließender 30minütiger Inkubation können 200 μ l Aliquots schockgefroren und bei -70 °C gelagert werden.

6.3.11.4 Transformation von *E. coli* nach der CaCl_2 -Methode

Für die Transformation werden 100 μl der kompetente Zellen aufgetaut und mit 10 bis 15 μl der zu transformierenden DNA (Mini-Präp- oder Midi-Präp-DNA) versetzt und das Gemisch mindestens für 10 min auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme der DNA durch die Bakterien wird ein Temperaturschock bei 42 °C für 90 Sek. durchgeführt, danach wird zu jedem Ansatz 1 ml LB-Medium hinzugefügt und für 1 h im Schüttler bei 225 rpm/37 °C inkubiert. Im Anschluß daran wird für 5 min bei 5.000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 100 μl LB-Medium aufgenommen und auf Selektionsplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgt ÜN bei 37 °C.

6.3.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde in dieser Arbeit zur Erstellung von Genfragmenten für die Klonierung benutzt. Die Reaktionen werden in einem Volumen von 100 μl angesetzt, wobei nach folgendem Pipettierschema vorgegangen wird:

10 x Puffer	10 μl
MgCl_2 (2 mM)	4 μl
dNTP (1,25 mM)	16 μl
Template-DNA	max. 100 ng
Primer (50 pmol/ μl)	jeweils 1 μl
Taq-Polymerase (5 U)	1 μl
ad 100 μl H_2O bidest	

Jeweils 100 μl Reaktionsansatz wird in einem PCR-Eppendorfgefäß vorgelegt und auf Eis gehalten. Nach Überführung der PCR-Reaktionsgefäße in den Thermo Cycler wird die Reaktion mit folgenden Parametern gestartet: Einmalige Erhitzung der Proben für 10 Sek. auf 94 °C zur Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer für 10 Sek. bei der, den Primern entsprechenden annealing Temperatur, Polymeraseschritt bei 72 °C, wobei hier pro kbp 30 Sek. zu rechnen sind. Nach Ablauf von 30 Zyklen werden die Proben 2 min auf 72 °C gehalten, um nicht abgeschlossene Reaktionen zu beenden. Im Anschluß werden die Proben auf 4 °C gekühlt.

6.4 Arbeiten mit Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs)

6.4.1 Vorbereitung des Säulenmaterials

Das DEAE-Sephacel Säulenmaterial wird in der zweifachen Menge an Zellwaschpuffer gelöst und über Nacht bei 4 °C auf dem Taumler inkubiert. Die DEAE-Sephacel Körner sedimentieren lassen, den Puffer verwerfen, durch neuen Puffer ersetzen und nochmals für 15 min auf dem Taumler inkubieren. Den Puffer wiederum abnehmen und durch frischen Puffer ersetzen. Das Säulenmaterial bei 4 °C aufbewahren.

6.4.2 Isolierung von Heparansulfat-Proteoglykanen aus kultivierten Zellen

Die Isolierung erfolgt nach dem Prinzip der Ionenaustauschersäule. Als Säule wird eine entleerte Qiagen tip 20 verwendet. Von 4 blauen Spitzen wird die Kappe abgeschnitten und diese auf die Qiagen tip 20 gesetzt. Für die Isolierung der HSPGs

wird jeweils eine 175 cm² Zellkulturflasche der entsprechenden Ziellinie benötigt, die gesamte Aufarbeitung erfolgt bei 4 °C. Das Medium der konfluent gewachsenen Zellen wird verworfen und die Zellen dreimal mit 10 ml Zellwaschpuffer gewaschen. Der Zellwaschpuffer wird möglichst vollständig abgenommen, jeweils 3 ml des Extraktionspuffers zu den Zellen gegeben und die Zellen für 20 min bei 4 °C auf einem Taumler inkubiert. Die Zellreste werden mit einem Zellschaber (rubber policeman) abgeschabt und mit dem Extraktionspuffer in ein 10 ml Corex-Röhrchen überführt. Die Zellkulturflaschen werden mit 3 ml Extraktionspuffer gewaschen, die Zellreste ein weiteres Mal abgeschabt und die Suspension ebenfalls in das Corex-Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 4.000 rpm/4 °C in der Sorvall-Zentrifuge wird mit dem Überstand eine Gesamtproteinbestimmung nach Bradford (siehe 6.4.5) durchgeführt. Gleiche Mengen an Protein werden mit 1.5 ml DEAE-Sephacel für 1 h bei 4 °C auf dem Taumler inkubiert, wobei die Röhrchen waagrecht gelagert werden. Die aufgeschwemmte Säulenmatrix wird auf die Säulen aufgebracht und nach dem Durchlauf des Überstandes wird die Säule mit 8 ml Säulenwaschpuffer gewaschen. Die Proteoglykane werden mit 5 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert und in einem 30 ml Corex-Röhrchen aufgefangen. Als Präzipitierhilfe werden zu der Lösung 50 µg/ml Chondroitinsulfat C hinzugegeben, anschließend werden die Proteoglykane mit 15 ml Ethanol absolut (-20 °C) gefällt. Der Ansatz wird 30 min auf Eis inkubiert und dann 30 min bei 5.000 rpm/4 °C in der Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert. Die Überstände werden verworfen, die Röhrchen mit Kleenextüchern ausgewischt und die Pellets luftgetrocknet. Die Proteoglykan-Pellets werden jeweils in 1 ml Heparitinase-Puffer aufgenommen. Die Proben können nach diesem Schritt bei –70 °C tiefgefroren werden.

6.4.3 Heparitinase-/Chondroitinase ABC-Verdau

Dieser Verdau schließt sich an die Extraktion von Proteoglykanen an (siehe 6.4.2). Der Verdau dient der Entfernung der Glukosaminoglykan-Seitenketten (Heparansulfate und Chondroitinsulfate) von den Proteoglykanen. Nur dadurch ist es möglich, die Proteoglykane als definierte Bande auf dem Western Blot zu sehen.

Zu den in Heparitinase-Puffer gelösten Proteoglykanen werden je 1,25 mU Heparitinase und 62,5 mU Chondroitinase ABC gegeben. Nach einer zweistündige Inkubation bei 37 °C im Wasserbad wird die gleiche Menge an Enzym nochmals hinzugegeben und der Ansatz für weitere 2 h im Wasserbad inkubiert. Der Ansatz wird in 10 ml Corex-Röhrchen überführt und die Proteoglykane mit 2 ml Aceton absolut (-20 °C) gefällt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgt eine Zentrifugation für 15 min bei 10.000 rpm/4 °C in der Sorvall-Zentrifuge. Der Überstand wird verworfen, nochmals 2 ml 50% Aceton (eiskalt) zugegeben und ein weiteres Mal zentrifugiert. Der Überstand wird wieder verworfen, das Röhrchen mit Kleenextüchern ausgewischt und die Pellets luftgetrocknet. Nach Abdampfen des Acetons wird das Pellet in 50 µl PBS gelöst, 50 µl 2x SDS-Probenpuffer hinzugegeben und eingefroren. Für Western Blots erwiesen sich Proben zwischen 3,5 µl und 10 µl als ausreichend.

6.4.4 Immunpräzipitation von Syndekan-4

Die Zellen von zwei konfluenten 75 cm² Flaschen werden mit insgesamt 3 ml Lysepuffer abgeschabt und für 30 min bei 4 °C auf dem Rotor inkubiert. Alle weiteren Schritte werden bei 4 °C durchgeführt. Es erfolgt eine Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm und die Inkubation des Überstandes für 30 min mit Protein G Sepharose. Zentrifugation und Bestimmung des Proteingehalts (siehe 6.4.5). Gleiche

Proteinmengen werden mit 3 µg 8G3 Antikörper für 3 h inkubiert. Zugabe von 30 µl Protein G-Sepharose und Inkubation für 2 h. Danach erfolgen fünf Waschschriffe mit jeweils 1 ml Lysepuffer, dazwischen wird für 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Am Schluß wird das Pellet in 30 µl 2 x Probenpuffer aufgenommen.

6.4.5 Proteinbestimmung (Bradford, 1976)

Zur Bestimmung der Proteinmenge in einem Lysat muß vorab eine Eichkurve mit bekannten Proteinproben erstellt werden. Dazu wird eine Stammlösung von 1 mg/ml BSA in dem jeweiligen Puffers hergestellt, um eine Verdünnungsreihe mit BSA zu erstellen. Die Proben werden auf gleiches Volumen eingestellt. Nach Zugabe von 1 ml Bradford-Reagenz (BioRad) werden sie gevortext, mindestens 5 min inkubiert und die OD₅₉₅ am Spektralphotometer bestimmt. Danach kann eine Eichkurve - OD₅₉₅/Konzentration BSA - erstellt werden.

Ebenso wie mit den BSA-Proben wird auch mit den zu bestimmenden Proben verfahren. Mittels der photometrisch bestimmten OD₅₉₅ kann in der Eichkurve die Proteinkonzentration abgelesen werden.

6.4.6 PKC-Overlay Assay (Hyatt et al., 1990)

Nach dem Blotten von isolierten HSPGs auf Nitrozellulose wird der Blot mit 5% TBS-T Milch für 1 h rollend blockiert. Danach wird der Blot mit 1 µg/ml gereinigter PKC, 20 µg/ml Phosphatidylserin, 50 mM Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, 1,2 mM CaCl₂ und 1 mM EGTA in TBS-T mit 1% BSA über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wird der Blot mit 0,1 mM CaCl₂ in TBS-T dreimal gewaschen. Die Detektion erfolgt durch Inkubation mit anti-PKCα Antikörper sowie einem sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper.

6.5 Arbeiten mit Protein Kinase C (PKC)

6.5.1 PKC-Isolierung aus verschiedenen Fraktionen (Chun et al., 1996)

Die Zellen werden einen Tag vorher in einer 100 mm Schale konfluent ausgesät. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS werden die Zellen in 1 ml Puffer A abgekratzt und für 3 x 15 Sek. mit Ultraschall behandelt (Stellung 3). Durch eine Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei 50.000 rpm/4 °C im TLA-100.3 Rotor für 1 h werden die Membranen und die unlöslichen zytoskelettalen Bestandteile pelletiert, der Überstand entspricht der zytosolischen Fraktion. Von dieser wird eine Proteinbestimmung durchgeführt (siehe 6.4.5) und der Überstand mit TCA gefällt (siehe 6.5.3). Die Membranproteine werden durch eine Inkubation für 30 min bei 4 °C mit Puffer B extrahiert. Danach wird für 15 min bei 4 °C in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand entspricht der löslichen Membranfraktion und wird ebenfalls durch TCA gefällt, das Pellet entspricht der unlöslichen Fraktion und wird in 15 µl Puffer C gelöst.

6.5.2 PKC Peptid Assay (Chakravarthy et al., 1991)

Die membranassoziierte PKC Aktivität wird direkt in isolierten Membranen nachgewiesen, indem der Einbau von radioaktivem [³²P]-ATP in ein PKC-selektives Peptid-Substrat gemessen wird. Die Zellen werden einen Tag vorher in einer 35 mm

Schale konfluent ausgesät. Nach dem dreimaligen Waschen mit kaltem PBS werden die Zellen abgeschabt und in 1 ml kaltem Lysepuffer aufgenommen. Alle weiteren Schritte erfolgen bei 4 °C. Die Zellen werden für 2 min lysiert und 2 min gevortext. Nach der Zentrifugation bei 2.800 rpm für 5 min in der Eppendorfzentrifuge pelletieren die Nuklei und unlysierte Zellen. Der Überstand wird für 20 min bei 16.000 rpm im SS34 Rotor zentrifugiert, wodurch die Membranen pelletieren. Das Pellet wird in 150 µl 2 x Assay-Puffer aufgenommen, resuspendiert und gevortext. Ein 50 µl Aliquot (4-6 µg) wird mit 10 µl Peptid-Substrat (900 µM) gemischt und mit 2 x Assay-Puffer auf 90 µl aufgefüllt. Es erfolgt die Zugabe von 10 µl 50 mM [³²P]-ATP und die Inkubation für 10 min bei 25 °C. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 10 µl 5% Essigsäure abgestoppt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 4 °C werden die Proben auf Eis gestellt. 90 µl Reaktionsansatz werden auf P81 Whatman Papier getropft und zweimal für 10 min mit 5% Essigsäure rollend inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von Szintillationsflüssigkeit und die Messung der Inkorporation im Szintillationszähler.

6.5.3 TCA-Fällung

TCA mit einer Endkonzentration von 10% wird zu dem zu fällenden Lysat gegeben. Das Lysat wird für 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend in der Eppendorfzentrifuge für 10 min bei 13.000 rpm/4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird mit kaltem Aceton gewaschen, nochmals zentrifugiert und luftgetrocknet. Aufnahme in 2 x Probenpuffer. Wenn sich der Probenpuffer gelblich verfärbt, muß mit einem in Ammoniak getränkten Wattestäbchen, das ins Eppendorfgefäß gehalten wird, ein Farbumschlag herbeigeführt werden.

6.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Proteine werden aufgrund ihrer Größe mittels SDS-PAGE getrennt, wobei das Detergenz SDS alle nicht-kovalenten Bindungen zerstört. Durch seine Anlagerung an die Proteine diese eine negative Ladung und bewegen sich proportional zu ihrer Masse im Polyacrylamidgel.

Die Polyacrylamid-Konzentration der Sammel- und Trenngel richtet sich nach der Größe der zu untersuchenden Proteine, wobei bei kleinen Proteinen hochprozentige Gele verwendet werden.

Es wird das vertikale Minigelsystem von BioRad verwendet, wobei für zwei Gele folgende Mengen pipettiert werden:

Sammelgel	8%	10%	12,5%	Trenngel
H ₂ O [ml]	3,9	3,33	2,66	1,63
Trenngelpuffer [ml]	2	2	2	
Sammelgelpuffer [ml]				0,63
30% Acrylamidlösung [ml]	2,13	2,66	2,93	0,38
TEMED [µl]	10	10	10	10
10% APS [µl]	40	40	40	17,5

Das Trenngel wird nach Zugabe von TEMED und APS zwischen zwei, mit 70% Ethanol entfettete Glasplatten gegossen und mit Isopropanol ca. 0,5 cm hoch

überschichtet. Nach der Polymerisation wird Isopropanol mit H₂O entfernt und das Sammelgel über das Trenngel gegossen, wobei zur Aussparung von Probestaschen ein Kamm in das Sammelgel vor dessen Aushärtung eingesetzt wird. Nach Abnehmen des Kamms werden die Probestaschen mit H₂O bidest. ausgespült, das Gel in die Gelkammer eingesetzt und in 1 x Laemmli-Puffer getaucht. Nach dem Auftragen der Proben erfolgt die Auftrennung bei einer Spannung von 140 V.

6.7 Western Blot

Nach der Proteinauftrennung durch SDS-PAGE wird das Gel aus der Elektrophoreseapparatur genommen und das Sammelgel entfernt. Der Transfer der Proteine auf eine PVDF- Nitrozellulose- oder Zeta-Probe-Membran (für Heparansulfate) erfolgt in einem Semi-Dry Verfahren.

Dazu werden auf einer Graphitanode zwei dicke und ein dünnes, in Transferpuffer getränkte Whatmanfilter, die ebenfalls in Transferpuffer getränkte Membran, das Trenngel und nochmals zwei dicke und ein dünner Whatmanfilter übereinander gelegt. Hierbei ist zu beachten, daß sowohl die Whatmanfilter als auch die Membran auf die Größe des Trenngels zugeschnitten werden. Nach sorgfältiger Entfernung aller Luftblasen zwischen den Schichten wird die zweite Graphitanode auf den Stapel gesetzt. Der Proteintransfer erfolgt für 1,5 h bei einer Stromstärke von 2 mA/cm² Membran. Nach Beendigung des Blots wird das Polyacrylamidgel zur Ermittlung der Effizienz des Proteintransfers mit Coomassie gefärbt (siehe 6.8.1). Die Membran wird zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen 1 h bei RT auf dem Taumler in 10 ml TBS-T-Milch inkubiert.

6.8 Proteindetektionen

6.8.1 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Zur Fixierung und Anfärbung wird das Gel für ca. 15 min in Coomassie-Färbelösung geschüttelt und ÜN auf dem Schüttler in Entfärbelösung entfärbt.

6.8.2 Spezifische Markierung von Proteinen mit Antikörpern

Nach der Blockierung wird die Membran mit dem primären Antikörper ÜN bei 4 °C inkubiert. Danach wird einmal in TBS-T Milch und dreimal in TBS-T für jeweils 5 min bei RT gewaschen. Die darauffolgende Inkubation mit dem sekundären Antikörper (verdünnt in TBS-T-Milch) erfolgt bei RT für mindesten 2 h. Es folgen drei Waschschrte von mindestens 10 min mit TBS-T bei RT. Für alle Inkubationen und Waschschrte wird ein Taumler benutzt.

6.8.3 Proteindetektion durch Chemolumineszenz

Die Detektion des sekundären, Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörpers erfolgt durch den ECL-Kit der Firma Amersham, der sich ein Luminolsystem zunutze macht. Durch die Oxidation von Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und alkalischen Bedingungen wird das Luminol in einen angeregten Zustand gebracht. Beim Zurückkehren in den Grundzustand wird Licht emittiert, das durch Schwärzung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht wird.

Je 1 ml von Fertiglösung 1 (Luminol) wird mit 1 ml von Fertiglösung 2 (phenolhaltige Verstärkersubstanz) gemischt und die Antikörper markierte Membran darin 1 min bei RT inkubiert. Sofort danach wird auf diese Membran ein Röntgenfilm aufgelegt und dieser je nach Stärke des Signals zwischen 15 Sek. und 15 min belichtet.

6.9 Kopplung von Antikörpern an Latexbeads

Zur Kopplung von Antikörpern an Latexbeads werden 200 µl 2,5% carboxylierte Latexbeads in einem Eppendorfgefäß mit 1 ml Karbonatpuffer gemischt, 6 min bei 10.000 rpm in der Eppendorfschleife zentrifugiert und der Überstand entfernt. Es wird nochmals mit 1 ml Karbonatpuffer gewaschen und die Latexbeads dann in 1 ml Phosphatpuffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation werden die Latexbeads dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen und in 0,625 ml Phosphatpuffer resuspendiert. Tropfenweise wird 0,625 ml 2% Carbodiimidlösung zugegeben und die Latexbeads für max. 4 h auf einem Rotor bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand verworfen, die Beads in Phosphatpuffer resuspendiert und noch zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen, um überschüssiges Carbodiimid zu entfernen. Die Beads werden in 600 µl Boratpuffer aufgenommen, 100 µg des zu koppelnden Antikörpers zugegeben und auf dem Rotor über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag werden 25 µl Ethanolamin zugegeben und die Beads für weitere 30 min auf dem Rotor inkubiert. Dieser Schritt blockiert Stellen auf den Latexbeads, die nicht mit dem Antikörper reagiert haben. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 min wird das Pellet in 1 ml Boratpuffer mit 1 mg/ml BSA für 30 min bei RT inkubiert, wodurch alle nicht-spezifischen Proteinbindungsstellen abgesättigt werden. Nach erneuter Zentrifugation mit BSA in Boratpuffer wird nochmals zentrifugiert und das Pellet anschließend in 200 µl "storage" Puffer aufgenommen.

6.10 Zellassays

6.10.1 Durchführung von *in vitro* Infektionsexperimenten

Die Durchführung der *in vitro* Infektionsexperimente erfolgt mit konfluenten Zellen (5×10^4), die einen Tag vorher in einer 24-Well Zellkulturplatte ausgesät wurden. Über Nacht angezogene Bakterien werden mit einem sterilen Wattestäbchen von der Platte genommen und in PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der Bakterienzahl werden 100 µl der Bakteriensuspension 1:10 verdünnt und die OD₅₅₀ bestimmt. Die entsprechende Bakterienzahl kann einer Eichkurve entnommen werden. Die konfluenten Epithelzellen werden dreimal mit dem jeweiligen Wachstumsmedium gewaschen und dann für die entsprechende Zeit mit 1×10^7 Bakterien/Well bei 37 °C/5% CO₂ inkubiert. Das Abstoppen der Infektion erfolgt durch dreimaliges Waschen mit PBS + Mg²⁺ + Ca²⁺.

Anschließend kann ein Adhärenz- bzw. Invasionsassay durchgeführt werden oder die Zellen werden für die Immunfluoreszenz mit 3.7% PFA/Hepes für mindestens 20 min bei RT fixiert.

6.10.1.1 Adhärenzassay

Zur Bestimmung der Adhärenz werden die Zellen mit 1 ml Saponinlösung für 15 min bei 37 °C/5% CO₂ inkubiert, dadurch werden die Zellen lysiert, aber nicht die Bakterien. Es werden 1:10 Verdünnungen mit PBS hergestellt und nach 3 bzw. 4 Verdünnungsschritten jeweils 25 µl auf eine GC-Platte plattiert. Nach Inkubation der Platten für zwei Tage bei 37 °C/5% CO₂ werden die Kolonien ausgezählt.

Bei der Verwendung verschiedener Zelllinien im gleichen Experiment, wird die Zahl der Zellen in einem Well mit dem cell-counter (Schärfe System) bestimmt, um die Anzahl der erhaltenen Kolonien auf die Gesamtzahl an Zellen zurückrechnen zu können. Außerdem wird jede Probe dreifach angesetzt, um die Genauigkeit der Durchführung zu erhöhen.

6.10.1.2 Invasionsassay (Gentamicinassays)

Um die Invasion der Bakterien in die Zellen zu bestimmen, wird nach der Infektion 50 µg Gentamicin/ml zu den Zellen gegeben. Nach Inkubation für 2 h bei 37 °C/5% CO₂ sind die extrazellulären Bakterien abgetötet. Die Zellen werden dreimal mit PBS + Mg²⁺ + Ca²⁺ gewaschen, um das Gentamicin zu entfernen und dann wie beim Adhärenzassay mit Saponinlösung lysiert. Des weiteren wird analog zum Adhärenzassay vorgegangen, allerdings werden jeweils 25 µl des ersten bzw. zweiten Verdünnungsschritts ausplattiert.

6.10.2 Inhibitionsstudien

Experimente, die eine Blockierung von eukaryontischen Prozessen zum Ziel hatten, wurden, wenn nicht anders angegeben, wie die *in vitro* Infektionsexperimente (siehe 6.10.1) durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden Mengen an Inhibitoren 15 min vor Zugabe der Bakterien zu den Zellen gegeben, um ein "priming" der Wirtszellen zu erreichen. Die Inhibitoren waren während der gesamten Inkubationszeit vorhanden. Die Toxizität der Inhibitoren wurde durch eine Trypanblau Färbung (siehe 6.2.6) ausgeschlossen.

6.10.3 Inkubation von adhärennten Zellen mit Antikörper-gekoppelten Latexbeads

Die Durchführung erfolgt analog zu den Infektionsbedingungen mit Bakterien *in vitro* (siehe 6.10.1). Die Zellen werden dreimal mit dem jeweiligen Wachstumsmedium gewaschen und dann ungefähr 7×10^6 Latexbeads (entspricht 140 Beads pro Zelle) zugegeben. Die Beads werden für 5 min bei 500 rpm auf die Zellen zentrifugiert und für die entsprechende Zeit bei 37 °C/5% CO₂ inkubiert. Die Inkubation wird durch drei Waschschrte mit PBS + Mg²⁺ + Ca²⁺ abgebrochen und die Zellen mit 3.7% PFA/Hepes für mindestens 20 min bei RT fixiert.

Bei der Verwendung von Inhibitoren wurden diese ebenfalls 15 min vor Zugabe der Latexbeads zu den Zellen gegeben.

6.11 Immunfluoreszenzfärbungen

6.11.1 Sequentielle Doppelimmunfluoreszenzfärbung von HSPGs und *N. gonorrhoeae*

Die folgenden Schritte werden bei RT in 24-Well Zellkulturplatten ausgeführt. Die Deckgläschen mit den fixierten Zellen werden dreimal für 5 min mit 1 x PBS gewaschen und danach für 20 min mit 1% (v/v) Triton X-100 in 1 x PBS permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 1 x PBS erfolgt das Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen durch eine 20minütige Inkubation mit 0,2% (w/v) BSA in 1 x PBS. Als nächstes werden 25 µl des jeweiligen Syndekan Antikörpers auf eine mit Parafilm beschichtete Glasplatte pipettiert, die Deckgläschen mit der zellbeschichteten Seite nach unten luftblasenfrei auf den Antikörpertropfen gelegt und für 1 h in einer abgedunkelten Feuchtkammer bei RT inkubiert. Die Deckgläschen werden mit einer Pinzette in einen Tropfen 1 x PBS überführt und dort für 5 min inkubiert. Dieser Waschschriff wird noch zweimal wiederholt, bevor die Inkubation mit 25 µl des FITC-konjugierten Ziege anti-Maus Antikörpers unter denselben Bedingungen wie für den ersten erfolgt. Nach drei Waschschriffen in 1 x PBS werden die Deckgläschen mit dem polyklonalen Kaninchen anti-*N.gonorrhoeae* Antiserum (AK 213) für 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wird das Deckgläschen für 1 h mit dem Texas-Rot konjugierten Ziege anti-Kaninchen Antikörper inkubiert, bevor die Deckgläschen mit der zellbeschichteten Seite nach unten auf einen Objektträger transferiert werden. Für die Einbettung wird Mowiol verwendet, die Abdichtung erfolgt mit Nagellack und die Präparate werden im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt, bis sie mit dem TCS NT-System von Leica mit einem Krypton/Argon-Laser bei den Wellenlängen 488 nm, 568 nm und 647 nm durch konfokale Laser Scanning Mikroskopie angeschaut werden.

6.11.2 Immunfluoreszenzfärbung von Antikörper-gekoppelten Latexbeads

6.11.2.1 HSPG-gekoppelte Latexbeads

Die Färbung der HSPG-gekoppelten Latexbeads verläuft analog zu der sequentiellen Doppelimmunfluoreszenzfärbung (siehe 6.11.1). Die Zellen werden dreimal mit 1 x PBS gewaschen und für 20 min mit 0,2% BSA in PBS inkubiert. Die erste Inkubation erfolgt mit dem Texas-Rot konjugierten Ziege anti-Maus Antikörper für 1 h, dann die Permeabilisierung mit 0,1% Triton X-100 in PBS für 20 min, die Blockierung mit 0,2% BSA in PBS für 20 min und die Inkubation mit dem Cy5-konjugierten Ziege anti-Maus Antikörper zusammen mit FITC-markiertem Phalloidin in PBS für 1 h. Jeweils drei Waschschriffe mit PBS kommen vor und nach jedem Inkubationsschritt. Die gefärbten Deckgläschen werden in Mowiol eingebettet.

6.11.2.2 Andere Antikörper-gekoppelte Latexbeads

Die Färbung von ICAM-1 IgG, anti- β_1 Integrin IgG, anti-Syndekan-1 IgG, anti-Syndekan-2 IgG oder anti-Syndekan-4 IgG gekoppelten Latexbeads wird durch einen weiteren Inkubationsschritt verstärkt. Die Zellen werden nach der Fixierung dreimal mit 1 x PBS gewaschen und für 20 min mit 0,2% BSA in PBS inkubiert. Die Inkubation erfolgt mit einem Kaninchen anti-Maus IgG Antikörper und dann mit dem Texas-Rot konjugierten Ziege anti-Kaninchen Antikörper für jeweils 1 h. Permeabilisierung mit 0,1% Triton X-100 in PBS für 20 min, Blockierung mit 0,2% BSA in PBS für 20 min und

Inkubation mit dem Kaninchen anti-Maus IgG Antikörper sowie dem Cy5-konjugierten Ziege anti-Kaninchen Antikörper, zusammen mit FITC-markiertem Phalloidin in PBS für jeweils 1 h. Jeweils drei Waschschriffe mit PBS kommen vor und nach jedem Inkubationsschritt. Die gefärbten Deckgläschen werden in Mowiol eingebettet.

6.11.3 Quantifizierung von adhärenfen und intrazellulären, Antikörpergekoppelten Latexbeads

Die gefärbten Deckgläschen werden mit dem Leica TCS NT konfokalen Laser Scanning Mikroskop, ausgerüstet mit einem Argon/Krypton Gaslaser angeschaut. Durch ständiges auf- und abfokussieren wurde die Gesamtzahl an adhärenfen und intrazellulären Latexbeads pro Zelle bestimmt. Aufgrund der Variabilität zwischen den Zellen wurde die Anzahl der adhärenfen und intrazellulären Latexbeads pro Zelle als Mittelwert von 30 einzelnen Zellen bestimmt. Die Standardabweichungen errechnen sich aus den Mittelwerten von drei Gruppen á 30 Zellen, die in verschiedenen Regionen des Deckgläschens gezählt wurden. Die Daten repräsentieren eines von drei unabhängigen Experimenten.

6.12 Elektronenmikroskopie

6.12.1 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Für die Transmissions-Elektronenmikroskopie werden die PFA-fixierten Deckgläschen nochmals mit 1% Osmiumtetroxid in PBS für 1 h auf Eis nachfixiert. Nach einem Waschschriff mit H₂O bidest. werden die Deckgläschen mit 1% wäßrigem Uranylacetat für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Proben werden durch eine Reihe von Ethanol-schritten dehydriert und in Epon eingebettet. Ultradünne Schnitte werden mit Uranylacetat und Bleizitrat gefärbt und in einem Philips CM10 Elektronenmikroskop angeschaut.

6.12.2 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)

Für die Raster-Elektronenmikroskopie werden die PFA-fixierten Deckgläschen mit 1% Glutaraldehyd nochmals fixiert und anschließend mit 1% Osmiumtetroxid nachfixiert. Es erfolgt eine Dehydrierung mit Ethanol und eine Trocknung am kritischen Punkt von CO₂. Die Proben werden mit einer 1 nm dicken Schicht aus Chrom bedeckt und bei 10 kV Beschleunigungsspannung in einem Hitachi S-800 Feldemissions Scanning Elektronen-mikroskop angeschaut.

6.13 FACS-Analyse (Flow Cytometry)

6.13.1 Vorbereitung der Proben

Die Zellen in einem Well einer 6-Well Platte werden mit 2 mM EDTA in PBS abgelöst und in 5 ml FACS-Puffer resuspendiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 500 rpm wird der Überstand entfernt und die Konzentration der Zellen auf 5×10^5 Zellen in 30 µl FACS Puffer eingestellt. In einer 96-Well Platte werden die Zellen mit jeweils 20 µl des entsprechenden primären Antikörpers (100 µg/ml) für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die 96-Well Platte wird bei 1.500 rpm für 5 min/4 °C zentrifugiert und zweimal mit jeweils 200 µl FACS-Puffer pro Well gewaschen. Die Inkubation mit dem

sekundären, DTAF-konjugierten Antikörper erfolgt für 1 h bei 4 °C. Nach zweimal Waschen mit FACS-Puffer werden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer mit 5 µg/ml Propidiumjodid aufgenommen. Als Kontrolle werden die Zellen mit einem Isotyp-gleichen Antikörper gefärbt.

6.13.2 FACS-Analyse

Die Analyse erfolgt an einem FACSort von Becton Dickinson bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm im Fluoreszenzkanal (FL-1), wobei die Messung abgebrochen wird, nachdem 10.000 Ereignisse ein vorher definiertes Fenster passiert haben (forward scatter gegen side scatter). Der forward scatter ist proportional zum Zelldurchmesser, der side scatter ist proportional zur Granularität der Zellen. Tote Zellen werden durch eine Propidiumjodid Färbung und Analyse im Fluoreszenzkanal 3 (FL-3) ausgeschlossen. Die Auswertung der Messungen erfolgt mit dem CellQuest-Programm von Becton Dickinson.

7 Literatur

- Akiyama, T. and Ogawara, H. (1991). Use and specificity of genistein as inhibitor of protein-tyrosine kinases. *Method.Enzymol.* 201, 362-370.
- Apicella, M.A., Shero, M., Jarvis, G.A., Griffiss, J.M., Mandrell, R.E., and Schneider, H. (1987). Phenotypic variation in epitope expression of the *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide. *Infect.Immun.* 55, 1755-1761.
- Asundi, V.K. and Carey, D.J. (1995). Self-association of *N*-syndecan (syndecan-3) core protein is mediated by a novel structural motif in the transmembrane domain and ectodomain flanking region. *J.Biol.Chem.* 270, 26404-26410.
- Baciu, P.C. and Goetinck, P.F. (1995). Protein kinase C regulates the recruitment of syndecan-4 into focal contacts. *Mol.Biol.Cell* 6, 1503-1513.
- Bauer, F.J., Rudel, T., Stein, M., and Meyer, T.F. (1999). Mutagenesis of the *Neisseria gonorrhoeae* porin reduces invasion in epithelial cells and enhances phagocyte responsiveness. *Mol.Microbiol.* 31, 903-913.
- Belland, R.J., Chen, T., Swanson, J., and Fischer, S.H. (1992). Human neutrophil response to recombinant neisserial opa proteins. *Mol.Microbiol.* 6, 1729-1737.
- Benz, R. (1988). Structure and function of porins from gram-negative bacteria. *Ann.Rev.Micobiol.* 42, 359-393.
- Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M.T., Spring, J., Gallo, R.L., and Lose, E.J. (1992). Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Ann.Rev.Cell Biol.* 8, 365-393.
- Bhat, K.S., Gibbs, C.P., Barrera, O., Morrison, S.G., Jahng, F., Stern, A., Kupsch, E.M., Meyer, T.F., and Swanson, J. (1991). The opacity proteins of *Neisseria gonorrhoeae* strain MS11 are encoded by a family of 11 uncomplete genes. *Mol.Microbiol.* 5, 1889-1902.
- Blake, M.S. and Gotschlich, E.C. (1987). Functional and Immunologic Properties of Pathogenic *Neisseria* Surface Proteins. In *Bacterial outer membranes as model systems*. M. Inouye, ed. (Somerset, New Jersey, USA; Chichester, England, UK: John Wiley and Sons, Inc.), pp. 377-400.
- Bos, M.P., Kuroki, M., Krop-Watorek, A., Hogan, D., and Belland, R.J. (1998). CD66 receptor specificity exhibited by neisserial Opa variants is controlled by protein determinants in CD66 N-domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95, 9584-9589.
- 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.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72, 248-254.
- Burbelo, P.D., Myamoto, S., Utoni, A., Brill, S., Yamada, K.M., Hall, A., and Yamada, Y. (1995). p190-B, a new member of the Rho GAP family, and Rho are induced to cluster after integrin cross-linking. *J.Biol.Chem.* 270, 30919-30926.
- Carey, D.J. (1997). Syndecans: multifunktional cell-surface co-receptors. *Biochem.J.* 327, 1-16.
- Carey, D.J., Bendt, K.M., and Stahl, R.C. (1996). The cytoplasmic domain of syndecan-1 is required for cytoskeleton association but not detergent insolubility: Identification of essential cytoplasmic domain residues. *J.Biol.Chem.* 271, 15253-15260.
- Carey, D.J., Evans, D.M., Stahl, R.C., Asundi, V.K., Conner, K.J., Garbes, P., and Cizmeci-Smith, G. (1992). Molecular cloning and characterization of *N*-syndecan, a novel transmembrane heparan sulfate proteoglycan. *J.Cell Biol.* 117, 191-201.
- Chakravarthy, B.R., Whitfield, J.F., and Durkin, J.P. (1994). Inactive membrane protein kinase Cs: A possible target for receptor signalling. *Biochem.J.* 304, 809-816.
- Chakravarthy, B.R., Bussey, A., Whitfield, J.F., Sikorska, M., Williams, R.E., and Durkin, J.P. (1991). The direct measurement of protein kinase C (PKC) activity in isolated membranes using a selective peptide substrate. *Anal.Biochem.* 196, 144-150.
- Chen, T. and Gotschlich, E.C. (1996). CGM1a antigen of neutrophils, a receptor of gonococcal opacity proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93, 14851-14856.
- Chen, T., Belland, R.J., Wilson, J., and Swanson, J. (1995). Adherence of *Pilus⁻ Opa⁺* Gonococci to Epithelial Cells In Vitro Involves Heparan Sulfate. *J.Exp.Med.* 182, 511-517.
- Chun, J.S., Ha, M.J., and Jacobson, B.S. (1996). Differential translocation of protein kinase C ϵ during HeLa cell adhesion to a gelatin substratum. *J.Biol.Chem.* 271, 13008-13012.
- Cohen, A.R., Woods, D.F., Marfatia, S.M., Walther, Z., Chishti, A.H., and Anderson, J.M. (1998). Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and Protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells. *J.Cell Biol.* 142, 129-138.
- Compton, T., Nowlin, D.M., and Cooper, N.R. (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virol.* 193, 834-841.
- David, G. (1993). Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. *FASEB J.* 7, 1023-1030.

- David, G., Bai, X.M., van der Schueren, B., Cassiman, J.J., and Van Den Berghe, H. (1992a). Developmental changes in heparan sulfate expression: in situ detection with mAbs. *J.Cell Biol.* 119, 961-975.
- David, G., van der Schueren, B., Marynen, P., Cassiman, J.J., and Van Den Berghe, H. (1992b). Molecular cloning of amphiglycan, a novel integral membrane heparan sulfate proteoglycan expressed by epithelial and fibroblastic cells. *J.Cell Biol.* 118, 961-969.
- David, G., Lories, V., Decock, B., Marynen, P., Cassiman, J.J., and Van Den Berghe, H. (1990). Molecular cloning of a phosphatidylinositol-anchored membrane heparan sulfate proteoglycan from human lung fibroblasts. *J.Cell Biol.* 111, 3165-3176.
- Davies, P.J.A., Davies, D.R., Levitzki, A., Maxfield, F.R., Milhaud, P., Willingham, M.C., and Pastan, I.H. (1980). Transglutaminase is essential in receptor-mediated endocytosis of α 2-macroglobulin and polypeptide hormones. *Nature* 283, 162
- de Vries, F.P., Cole, R.L., Dankert, J., Frosch, M., and van Putten, J.P.M. (1998). *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. *Mol.Microbiol.* 27, 1203-1212.
- Dean, N.M., McKay, R., Condon, T.P., and Bennett, C.F. (1994). Inhibition of protein kinase C α expression in human A549 cells by antisense oligonucleotides inhibits induction of intercellular adhesion molecules 1 (ICAM-1) mRNA by phorbol esters. *J.Biol.Chem.* 269, 16416-16424.
- Dehio, M., Gómez-Duarte, O.G., Dehio, C., and Meyer, T.F. (1998). Vitronectin-dependent invasion of epithelial cells by *Neisseria gonorrhoeae* involves α_v integrin receptors. *FEBS Lett.* 84-88.
- Ducker, T.P. and Skubitz, K.M. (1992). Subcellular localization of CD66, CD67, and NCA in human neutrophils. *J.Leukoc.Biol.* 52, 11-16.
- Duensing, T.D. and van Putten, J.P.M. (1997). Vitronectin mediates internalization of *Neisseria gonorrhoeae* by Chinese hamster ovary cells. *Infect.Immun.* 65, 964-970.
- Esko, J.D. (1991). Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Curr.Opin.Cell Biol.* 3, 805-816.
- Feavers, I.M. and Maiden, M.C. (1998). A gonococcal porA pseudogene: implications for understanding the evolution and pathogenicity of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Mic.* 30, 647-656.
- Gallagher, J.T. (1996). Heparan Sulphate Proteoglycans: The Control of Cell Growth. In *Extracellular Matrix*. W.D. Comper, ed. (Amsterdam: Harwood Academic Publishers GmbH), pp. 230-245.
- 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.

- Gómez-Duarte, O.G., Dehio, M., Guzmán, C.A., Chhatwal, G.S., Dehio, C., and Meyer, T.F. (1997). Binding of vitronectin to Opa-expressing *Neisseria gonorrhoeae* mediates invasion of HeLa cells. *Infect.Immun.* 65, 3857-3866.
- Grassmé, H.U.C., Gulbins, E., Brenner, B., Ferlinz, K., Sandhoff, K., Harzer, K., Lang, F., and Meyer, T.F. (1997). Acidic Sphingomyelinase Mediates Entry of *N. gonorrhoeae* into Nonphagocytic Cells. *Cell* 91, 605-615.
- Grassmé, H.U.C., Ireland, R.M., and van Putten, J.P.M. (1996). Gonococcal opacity protein promotes bacterial entry-associated rearrangements of the epithelial cell actin cytoskeleton. *Infect.Immun.* 64, 1621-1630.
- Grassmé, H. U. C. Molekulare Mechanismen der induzierten Phagozytose von *Neisseria gonorrhoeae* in humane Epithelzellen. (1995). Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Gray-Owen, S.D., Dehio, C., Haude, A., Grunert, F., and Meyer, T.F. (1997a). CD66 carcinoembryonic antigens mediate interactions between Opa- expressing *Neisseria gonorrhoeae* and human polymorphonuclear phagocytes. *EMBO J.* 16, 3435-3445.
- Gray-Owen, S.D., Lorenzen, D.R., Haude, A., Meyer, T.F., and Dehio, C. (1997b). Differential Opa specificities for CD66 receptors influence tissue interactions and cellular response to *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol.Microbiol.* 26, 971-980.
- Grootjans, J.J., Zimmermann, P., Reekmans, G., Smets, A., Degeest, G., Durr, J., and David, G. (1997). Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94, 13683-13688.
- Haas, R. and Meyer, T.F. (1986). The repertoire of silent pilus genes in *Neisseria gonorrhoeae*: evidence for gene conversion. *Cell* 44, 107-115.
- Hauck, C.R., Meyer, T.F., Lang, F., and Gulbins, E. (1998). CD66-mediated phagocytosis of Opa₅₂ *Neisseria gonorrhoeae* requires a Src-like tyrosine kinase- and Rac1-dependent signalling pathway. *EMBO J.* 17, 443-454.
- Hauck, C.R., Lorenzen, D.R., Saas, J., and Meyer, T.F. (1997). An in vitro-differentiated human cell line as a model system to study the interaction of *Neisseria gonorrhoeae* with phagocytic cells. *Infect.Immun.* 65, 1863-1869.
- Horowitz, A. and Simons, M. (1998a). Phosphorylation of the cytoplasmic tail of syndecan-4 regulates activation of Protein Kinase C α . *J.Biol.Chem.* 273, 25548-25551.
- Horowitz, A. and Simons, M. (1998b). Regulation of Syndecan-4 Phosphorylation *in Vivo*. *J.Biol.Chem.* 273, 10914-10918.
- Hsueh, Y., Yang, F., Kharazia, V., Naisbitt, S., Cohen, A.R., Weinberg, R.J., and Sheng, M. (1998). Direct Interaction of CASK/LIN-2 and Syndecan Heparan Sulfate Proteoglycan and Their Overlapping Distributin in Neuronal Synapses. *J.Cell Biol.* 142, 139-151.

- Hyatt, S.L., Klauck, T., and Jaken, S. (1990). Protein kinase C is localized in focal contacts of normal but not transformed fibroblasts. *Mol.Carcinogen.* 3, 45-53.
- Isaacs, R.D. (1994). *Borrelia burgdorferi* bind to epithelial cell proteoglycans. *J.Clin.Invest.* 93, 809-819.
- Isberg, R.R. and Tran Van Nhieu, G. (1995). The mechanism of phagocytic uptake mediated by invasin-integrin interaction. *Trends Cell Biol.* 5, 120
- Jackson, T., Ellard, F.M., Ghazaleh, R.A., Brookes, S.M., Blakemore, W.E., Corteyn, A.H., Stuart, D.I., Newman, J.W., and King, A.M.Q. (1996). Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J.Virol.* 70, 5282-5287.
- Jonsson, A.B., Nyberg, G., and Normark, S. (1991). Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in *pilC* a novel gene for pilus assembly. *EMBO J.* 10, 477-488.
- Källstrom, 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.
- Kim, C.W., Goldberger, O.A., Gallo, R.L., and Bernfield, M. (1994). Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development- specific patterns. *Mol.Biol.Cell* 5, 797-805.
- Kinnunen, T., Kaksonen, M., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Peng, H.B., and Rauvala, H. (1998). Cortactin-Src kinase signaling pathway is involved in N-syndecan-dependent neurite outgrowth. *J.Biol.Chem.* 273, 10702-10708.
- Kjellén, L. and Lindahl, U. (1991). Proteoglycans: structures and interactions. *Ann.Rev.Biochem.* 60, 443-475.
- Kojima, T., Shworak, N.W., and Rosenberg, R.D. (1992). Molecular cloning and expression of two distinct cDNA-encoding heparan sulfate proteoglycan core proteins from a rat endothelial cell line. *J.Biol.Chem.* 267, 4870-4877.
- Kugelman, L.C., Ganguly, S., Haggerty, J.G., Weissman, S.M., and Milstone, L.M. (1992). The core protein of epican, a heparan sulfate proteoglycan on keratinocytes, is an alternative form of CD44. *J.Invest.Dermatol.* 99, 886-891.
- 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.
- Kuroki, M., Yamanaka, T., Matsuo, Y., Oikawa, S., Nakazato, H., and Matsuoka, Y. (1995). Immunochemical analysis of carcinoembryonic antigen (CEA)-related antigens differentially localized in intracellular granules of human neutrophils. *Immunol.Invest.* 24, 829-843.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lebakken, C.S. and Rapraeger, A.C. (1996). Syndecan-1 mediates cell spreading in transfected human lymphoblastoid (Raji) cells. *J.Cell Biol.* 132, 1209-1221.
- Lee, D., Oh, E.S., Woods, A., Couchman, J.R., and Lee, W. (1998). Solution Structure of a Syndecan-4 Cytoplasmic Domain and Its Interaction with Phosphatidyl 4,5-Bisphosphate. *J.Biol.Chem.* 273, 13022-13029.
- Liang, O.D., Ascencio, F., Fransson, L.A., and Wadstrom, T. (1992). Binding of heparan sulfate to *Staphylococcus aureus*. *Infect.Immun.* 60, 899-906.
- Lories, V., Cassiman, J.J., Van Den Berghe, H., and David, G. (1989). Multiple distinct membrane heparan sulfate proteoglycans in human lung fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 264, 7009-7016.
- Love, D.C., Esko, J.D., and Mosser, D.M. (1993). A heparin-binding activity on *Leishmania amastigotes* which mediates adhesion to cellular proteoglycans. *J.Cell Biol.* 123, 759-766.
- Makino, S.I., van Putten, J.P.M., and Meyer, T.F. (1991). Phase variation of the opacity outer membrane protein controls invasion by *Neisseria gonorrhoeae* into human epithelial cells. *EMBO J.* 10, 1307-1316.
- Mali, M., Jaakkola, P., Arvilommi, A.M., and Jalkanen, M. (1990). Sequence of human syndecan indicates a novel gene family of integral membrane proteoglycans. *J.Biol.Chem.* 265, 6884-6889.
- Malorny, B., Morelli, G., Kusecek, B., Kolberg, J., and Achtman, M. (1998). Sequence diversity, predicted two-dimensional protein structure, and epitope mapping of neisserial Opa proteins. *J.Bacteriol.* 180, 1323-1330.
- Mandrell, R.E., McLaughlin, R., Kwaik, Y.A., Lesse, A.J., Yamasaki, R., Gibson, B., Spinola, S.M., and Apicella, M.A. (1992). Lipooligosaccharides (LOS) of some *Haemophilus* species mimic human glycosphingolipids and some LOS are sialylated. *Infect.Immun.* 60, 1322-1328.
- Mandrell, R.E., Lesse, A.J., Sugai, J.V., Shero, M., Griffiss, J.M., Cole, J.A., Parsons, N.J., Smith, H., Morse, S.A., and Apicella, M.A. (1990). *In vitro* and *in vivo* modification of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide epitope structure by sialylation. *J.Exp.Med.* 171, 1649-1664.
- Marfatia, S.M., Leu, R.A., Branton, D., and Chishti, A.H. (1995). Identification of the protein 4.1 binding interface on glycophorin C and p55, a homologue of the *Drosophila discs-large* tumor suppressor protein. *J.Biol.Chem.* 270, 715-719.
- Marlin, S.D. and Springer, T.A. (1987). Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 51, 813-819.
- Martiny-Baron, G., Kanzanietz, M.G., Mischak, H., Blumberg, P.M., Kochs, G., Hug, H., Marme, D., and Schächtele, C. (1993). Selective inhibition of protein kinase C isoenzymes by the indolocarbazole Gö 6976. *J.Biol.Chem.* 268, 9194-9197.

- Marynen, P., Zhang, J.P., Cassiman, J.J., Van Den Berghe, H., and David, G. (1989). Partial primary structure of the 48- and 90-kilodalton core proteins of cell surface-associated heparan sulfate proteoglycans of lung fibroblasts. Prediction of an integral membrane domain and evidence for multiple distinct core proteins at the cell surface of human lung fibroblasts. *J.Biol.Chem.* *264*, 7017-7024.
- McFall, A.J. and Rapraeger, A.C. (1997). Identification of an adhesion site within the syndecan-4 extracellular protein domain. *J.Biol.Chem.* *272*, 12901-12904.
- McGee, Z.A., Johnson, A.P., and Taylor-Robinson, D. (1981). Pathogenic mechanisms of *Neisseria gonorrhoeae*: observations on damage to human fallopian tubes in organ culture by gonococci of colony type 1 or type 4. *J.Infect.Dis.* *143*, 413-422.
- Meyer auf der Heyde, A. Untersuchungen zur Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung während der Opa30-vermittelten Invasion von Epithelzellen durch *Neisseria gonorrhoeae*. (1996). Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Meyer, T.F., Billyard, E., Haas, R., Storzbach, S., and So, M. (1984). Pilus genes of *Neisseria gonorrhoeae*: chromosomal organization and DNA sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* *81*, 6110-6114.
- Ménard, R., Dehio, C., and Sansonetti, P.J. (1996). Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. *Trends Microbiol.* *4*, 220-226.
- Miettinen, H.M. and Jalkanen, M. (1994). The cytoplasmic domain of syndecan-1 is not required for association with Triton X-100-insoluble material. *J.Cell Sci.* *107*, 1571-1581.
- Moran, E.E., Brandt, B.L., and Zollinger, W.D. (1994). Expression of the L8 Lipopolysaccharide Determinant Increases the Sensitivity of *Neisseria meningitidis* to Serum Bactericidal Activity. *Infect.Immun.* *62*, 5290-5295.
- Mosleh, I.M., Boxberger, H.J., Sessler, M.J., and Meyer, T.F. (1997). Experimental infection of native human ureteral tissue with *Neisseria gonorrhoeae*: adhesion, invasion, intracellular fate, exocytosis, and passage through a stratified epithelium. *Infect.Immun.* *65*, 3391-3398.
- Murphy, G.L., Connell, T.D., Barritt, D.S., Koomey, J.M., and Cannon, J.G. (1989). Phase variation of gonococcal protein II: regulation of gene expression by slipped-strand mispairing of a repetitive DNA sequence. *Cell* *56*, 539-548.
- Müller, A., Günther, D., Dux, F., Naumann, M., Meyer, T.F., and Rudel, T. (1999). Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. *EMBO J* *18*, 339-352.
- Newton, A.C. (1995). Protein kinase C: Structure, function, and regulation. *J.Biol.Chem.* *270*, 28495-28498.
- Noonan, D.M. and Hassell, J.R. (1993). Perlecan, the large low-density proteoglycan of basement membranes: structure and variant forms. *Kidney Int.* *43*, 53-60.

- Oh, E.S., Woods, A., Lim, S.T., Theibert, A.W., and Couchman, J.R. (1998). Syndecan-4 Proteoglycan Cytoplasmic Domain and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Coordinately Regulate Protein Kinase C Activity. *J.Biol.Chem.* 273, 10624-10629.
- Oh, E.S., Couchman, J.R., and Woods, A. (1997a). Serine phosphorylation of syndecan-2 proteoglycan cytoplasmic domain. *Arch.Biochem.Biophys.* 344, 67-74.
- Oh, E.S., Woods, A., and Couchman, J.R. (1997b). Multimerization of the cytoplasmic domain of syndecan-4 is required for its ability to activate protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 272, 11805-11811.
- Oh, E.S., Woods, A., and Couchman, J.R. (1997c). Syndecan-4 proteoglycan regulates the distribution and activity of protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 272, 8133-8136.
- Ortega-Barria, E. and Pereira, M.E. (1991). A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell* 67, 411-421.
- Ott, V.L. and Rapraeger, A.C. (1998). Tyrosine phosphorylation of syndecan-1 and -4 cytoplasmic domains in adherent B82 fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 273, 35291-35298.
- Panetti, T.S. and McKeown-Longo, P.J. (1993a). Receptor-mediated endocytosis of vitronectin is regulated by its conformational state. *J.Biol.Chem.* 268, 11988-11993.
- Panetti, T.S. and McKeown-Longo, P.J. (1993b). The $\alpha_v\beta_5$ integrin receptor regulates receptor-mediated endocytosis of vitronectin. *J.Biol.Chem.* 268, 11492-11495.
- Patel, D. and Rickwood, D. (1994). Optimization of conditions for specific binding of antibody coated beads to cells. *J.Immunol.Methods* 184, 71
- Ponting, C.P., Phillips, C., Davies, K.E., and Blake, C.J. (1997). PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays* 19, 469-479.
- Popp, A., Dehio, C., Grunert, F., Meyer, T.F., and Gray-Owen, S. (1999). Molecular analysis of neisserial Opa protein interaction with the CEA family of receptors: Identification of determinants contributing to the differential specificities. Submitted.
- Prasthofer, T., Ek, B., Ekman, P., Owens, R., Höök, M., and Johansson, S. (1995). Protein Kinase C Phosphorylates Two of The Four Known Syndecan Cytoplasmic Domains in vitro. *Biochem.Mol.Biol.Int.* 36, 793-802.
- Rapraeger, A.C. and Ott, V.L. (1998). Molecular interactions of the syndecan core proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 10, 620-628.

- Reiland, J., Ott, V.L., Lebakken, C.S., Yeaman, C., McCarthy, J.B., and Rapraeger, A.C. (1996). Pervanadate activation of intracellular kinases leads to tyrosine phosphorylation and shedding of syndecan-1. *Biochem.J.* 319, 39-47.
- Rudel, T., Schmid, A., Benz, R., Kolb, H.A., Lang, F., and Meyer, T.F. (1996). Modulation of *Neisseria* porin (PorB) by cytosolic ATP/GTP of target cells: Parallels between pathogen accommodation and mitochondrial endosymbiosis. *Cell* 85, 391-402.
- Rudel, T., Scheuerpflug, I., and Meyer, T.F. (1995). *Neisseria* PilC protein identified as type-4 pilus tip-located adhesin. *Nature* 373, 357-357.
- Salyers, A.A. and Whitt, D.D. (1994). *Bacterial pathogenesis: A molecular approach.* Washington: ASM Press.
- Sandström, E.G., Chen, K.S., and Buchanan, T.M. (1982). Serology of *Neisseria gonorrhoeae*: coagglutination serogroups WI and WII/WIII correspond to different outer membrane protein I molecules. *Infect.Immun.* 38, 462-470.
- Saunders, S., Jalkanen, M., O'Farrell, S., and Bernfield, M. (1989). Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *J.Cell Biol.* 108, 1547-1556.
- Sawitzky D. (1996). Protein-glycosaminoglycan interactions: infectious aspects. *Med.Microbiol.Immunol.* 184, 155-161.
- Schmidt, A., Yoshida, K., and Buddecke, E. (1992). The antiproliferative activity of arterial heparan sulfate resides in domains enriched with 2-O-sulfated uronic acid residues. *J.Biol.Chem.* 267, 19242-19247.
- Segarini, P.R. and Seyedin, S.M. (1988). The high molecular weight receptor to transforming growth factor β contains glycosaminoglycan chains. *J.Biol.Chem.* 263, 8366-8370.
- Shieh, M.T., Wudunn, D., Montgomery, R.I., Esko, J.D., and Spear, P.G. (1992). Cell surface receptors for *Herpes simplex* virus are heparan sulfate proteoglycans. *J.Cell Biol.* 116, 1273-1281.
- Smith, H. (1991). The Leeuwenhoek Lecture 1991: The influence of the host on microbes that cause disease. *P.Roy.Soc.Lond.B Bio.* 246, 97-106.
- Stein, C.A., Subasinghe, C., Shinozuka, K., and Cohen, J.S. (1988). Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 16, 3209-3221.
- Steinfeld, R., Van Den Berghe, H., and David, G. (1996). Stimulation of fibroblast growth factor receptor-1 occupancy and signaling by cell signaling by cell surface-associated syndecans and glypican. *J.Cell Biol.* 133, 405-416.
- Stern, A., Brown, M., Nickel, P., and Meyer, T.F. (1986). Opacity genes in *Neisseria gonorrhoeae*: control of phase and antigenic variation. *Cell* 47, 61-72.
- Stipp, C.S., Litwack, E.D., and Lander, A.D. (1994). Cerebroglycan: an integral membrane heparan sulfate proteoglycan that is unique to the developing

- nervous system and expressed specifically during neuronal differentiation. *J.Cell Biol.* 124, 149-160.
- Swanson, J., Bergström, S., Robbins, K., Barrera, O., Corwin, D., and Koomey, J.M. (1986). Gene conversion involving the pilin structural gene correlates with pilus⁺ in equilibrium with pilus⁻ changes in *Neisseria gonorrhoeae*. *Cell* 47, 267-276.
- Takeuchi, K., Kawashima, A., Nagafuchi, A., and Tsukita, S. (1994). Structural diversity of band 4.1 superfamily members. *J.Cell Sci.* 107, 1921-1928.
- Tamaoki, T. (1991). Use and Specificity of Staurosporine, UCN-01, and Calphostin C as Protein Kinase Inhibitors. *Method.Enzymol.* 2001, 340-347.
- Thompson, J.A., Grunert, F., and Zimmermann, W. (1991). Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J.Clin.Lab.Anal.* 5, 344-366.
- Tjia, K.F., van Putten, J.P.M., Pels, E., and Zanen, H.C. (1988). The interaction between *Neisseria gonorrhoeae* and the human cornea in organ culture. An electron microscopic study. *Graef.Arch.Clin.Exp.* 226, 341-345.
- Turnbull, J.E., Fernig, D.G., Ke, Y., Wilkinson, M.C., and Gallagher, J.T. (1992). Identification of the basic fibroblast growth factor binding sequence in fibroblast heparan sulfate. *J.Biol.Chem.* 267, 10337-10341.
- Vaheri, A., Carpén, O., Heiska, L., Helander, T.S., Jääskeläinen, J., Majander-Nordenswan, P., Sainio, M., Timonen, T., and Turunen, O. (1997). The ezrin protein family: membrane-cytoskeleton interactions and disease associations. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9, 659-666.
- van Putten, J.P.M., Duensing, T.D., and Cole, R.L. (1998). Entry of OpaA⁺ gonococci into HEp-2 cells requires concerted action of glycosaminoglycans, fibronectin and integrin receptors. *Mol.Microbiol.* 29, 369-378.
- van Putten, J.P.M. and Paul, S.M. (1995). Binding of syndecan-like cell surface proteoglycan receptors is required for *Neisseria gonorrhoeae* entry into human mucosal cells. *EMBO J.* 14, 2144-2154.
- van Putten, J.P.M. (1993). Phase variation of lipopolysaccharide directs interconversion of invasive and immuno-resistant phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae*. *EMBO J.* 12, 4043-4051.
- Vieira, J. and Messing, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Method.Enzymol.* 153, 3-11.
- Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D.J.P., and Watt, S.M. (1996). 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. (1995a). 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., Makepeace, K., Peak, I.R.A., Ferguson, D.J.P., Jennings, M.P., and Moxon, E.R. (1995b). Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: Molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides. *Mol.Microbiol.* *18*, 741-754.
- Virji, M. and Heckels, J.E. (1986). The effect of protein II and pili on the interaction of *Neisseria gonorrhoeae* with human polymorphonuclear leukocytes. *J.Gen.Microbiol.* *132*, 503-512.
- Völker, W., Hess, S., Vischer, P., and Preissner, K.T. (1993). Binding and processing of multimeric vitronectin by vascular endothelial cells. *J.Histochem.Cytochem.* *41*, 1823-1832.
- Wang, J., Gray-Owen, S.D., Knorre, A., Meyer, T.F., and Dehio, C. (1998). Opa binding to cellular CD66 receptors mediates the transcellular traversal of *Neisseria gonorrhoeae* across polarized T84 epithelial cell monolayers. *Mol.Microbiol.* *30*, 657-671.
- Weel, J.F.L., Hopman, C.T.P., and van Putten, J.P.M. (1991a). In situ expression and localization of *Neisseria gonorrhoeae* opacity proteins in infected epithelial cells: apparent role of opa proteins in cellular invasion. *J.Exp.Med.* *173*, 1395-1405.
- Weel, J.F.L. and van Putten, J.P.M. (1991b). Fate of the fate of the major outer membrane protein P.IA in early and late events of gonococcal infectino of epithelial cells. *Res.Microbiol.* *142*, 985-994.
- Weel, J.F.L., Hopman, C.T.P., and van Putten, J.P.M. (1989). Stable expression of lipooligosaccharide antigens during attachment internalization and intracellular processing of *Neisseria gonorrhoeae* in infected epithelial cells. *Infect.Immun.* *57*, 3395-3402.
- Woods, A., Oh, E.S., and Couchman, J.R. (1998). Syndecan Proteoglycans and Cell Adhesion. *Matrix Bio.* *17*, 477-483.
- Woods, A. and Couchman, J.R. (1994). Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol.Biol.Cell* *5*, 183-192.
- Woods, A., McCarthy, J.B., Furcht, L.T., and Couchman, J.R. (1993). A Synthetic Peptide from the COOH-Terminal Heparin-binding Domain of Fibronectin Promotes Focal Adhesion. *Mol.Biol.Cell* *4*, 605-613.
- Zanetti, A., Conforti, G., Hess, S., Martin-Padure, I., Ghibaudi, E., Preissner, K., and Dejana, E. (1994). Clustering of Vitronectin and RGD Peptides on Microspheres Leads to Engagement of Integrins on the Luminal Aspect of Endothelial Cell Membranes. *Blood* *84*, 1116-1123.
- Zhang, J.P. and Stephens, R.S. (1992). Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. *Cell* *69*, 861-869.

8 Abkürzungen

AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ASM	saure Sphingomyelinase
Asp	Aspartat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
CAMP-NANA	Cytidin 5'-monophospho-N-Acetylneuraminsäure
CEA	carcinoembryonic antigen
CHO	chinese hamster ovary
CMV	Zytomegalovirus
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTAF	Dichlorotriazinyl Amino Fluorescein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Glu	Glutamin
Gly	Glycin
GPI	Glykosyl-Phosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HS	Heparansulfat
HS-GAG	Heparansulfat-Glukosaminoglykan
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
Huvecs	Human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LOS	Lipooligosaccharid
MBP	Myelin Basic Protein
min	Minuten
OD	Optische Dichte
opa	opacity
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline
PC-PLC	Phosphatidyl-abhängige Phospholipase C
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Protein Kinase C
PMA	Phorbolmyristat-Acetat

Abkürzungen

PMN	polymorphonukleäre Leukozyten
REM	Raster-Elektronenmikroskopie
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute Medium
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sek	Sekunde
Ser	Serin
TAE	Tris Essigsäure EDTA Puffer
TBE	Tris Borsäure EDTA Puffer
TBS	Tris-buffered saline
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TEMED	N, N, N', N', -Tetramethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin B Isothiocyanat
U	units
ÜN	über Nacht
v/v	volume per volume
Vn	Vitronektin
w/v	weight per volume

Lebenslauf

Name: Elke Anita Freissler

Geburtsdatum und -ort: 31.03.1971 in Heidenheim/Brenz

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1978 - 1982 Heckental Grundschule in Heidenheim

1982 - 1990 Max-Planck Gymnasium in Heidenheim

Abschluß mit der allgemeinen Hochschulreife

Studium:

10/1990-2/1996 Studium der Biologie an der Universität Ulm

WS 1995 Diplomprüfungen in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie, Biochemie und Molekularbiologie

3/1995 - 2/1996 Diplomarbeit bei Prof. Dr. D. Wedlich, Abt. Biochemie, Universität Ulm: Vergleichende Analyse der Proteinexpression in monoklonalen, XB-Cadherin transfizierten *Xenopus* Fibroblasten-Zellen.

Dissertation:

3/1996 - 3/1999 Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Infektionsbiologie in Tübingen bei Prof. Dr. T.F.Meyer: Untersuchungen zur Funktion von Heparansulfat-Proteoglykanen während der Invasion von *N. gonorrhoeae* in Epithelzellen.

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Elke Freissler

Anne-Frank-Weg 6

89075 Ulm