
Dipl.-Humanbiol. Manja Böhm

“Molecular mechanisms of *Campylobacter jejuni* induced transmigration and invasion of host target cells”

ZUSAMMENFASSUNG

Campylobacter jejuni ist ein Gram-negatives Bakterium der Gattung *Campylobacter*. Die Infektion mit diesem Pathogen ist eine der wichtigsten und häufigsten Ursachen für lebensmittelbedingte Durchfallerkrankungen und bestimmte Neuropathien beim Menschen. Durch *C. jejuni* verursachte Gastroenteritiden treten in Industrieländern 2-7 mal häufiger auf als bei Infektionen mit *Salmonella* and *Shigella*. Das Durchdringen der epithelialen Barrierefunktion von Wirtszellen im humanen Darmtrakt und die zelluläre Invasion von *C. jejuni* sind die wichtigsten Ursachen für Schäden im infizierten Gewebe, allerdings sind die molekularen Mechanismen und beteiligten Faktoren in diesen Prozessen noch nicht genau bekannt.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, das Wildtyp *C. jejuni* die Barrierefunktion von polarisierten MKN-28 Zellen im Transwell-System effizient überwindet. Ein bakterieller Faktor wurde identifiziert, die Serinprotease HtrA (*high-temperature requirement A*), welche hierbei eine entscheidende Rolle spielt. Es wurde gezeigt, dass *C. jejuni* HtrA aktiv in den Überstand des Mediums sekretiert, wo die Protease die Spaltung des bedeutenden „*adherens junction*“ Proteins und Tumorsuppressors E-Cadherin induziert. In *in vitro* Assays mit rekombinantem HtrA und in Infektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass HtrA zur Abspaltung der Ektodomäne von E-Cadherin in Wirtszellen führt. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust des *htrA* Gens in *C. jejuni* zu einem Defekt in der Fähigkeit zur E-Cadherin Spaltung führt und damit auch zum weitgehenden Verlust der Fähigkeit der bakteriellen Transmigration in polarisierten MKN-28 Zellen. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass die HtrA-vermittelte Abspaltung von E-Cadherin eine wichtige Rolle bei der Transmigration von *C. jejuni* über polarisierte Zellen mit Hilfe eines parazellulären Signalweges spielt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *C. jejuni* zur Transmigration von polarisierten Zellen befähigt ist, sollte im zweiten Teil der Arbeit untersucht werden, wie *C. jejuni* in die Wirtszellen von der basolateralen Seite eindringt. Durch die Verwendung verschiedener molekularbiologischer Methoden und „*knockout*“ Zelllinien von Fibronectin, Integrin- β 1 und fokaler Adhäsionskinase (FAK) aus defizienten Mäusen sowie den entsprechenden Wildtyp

Zelllinien konnte gezeigt werden, dass diese Wirtszellfaktoren eine entscheidende Rolle für die Aktivierung von kleinen Rho GTPasen (Rac1 und Cdc42) und die bakterielle Invasion spielen. In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte weiterhin gezeigt werden, dass *C. jejuni* eine Kräuselung der Membranen (*ruffling*) und Filopodien-Bildung nur in den infizierten Wildtyp Zellen verursacht. Außerdem konnte die durch *C. jejuni* aktivierte Autophosphorylierung von FAK und bestimmten Rezeptor-Tyrosinkinasen (EGFR und PDGFR) nachgewiesen werden. Diese Signalmoleküle stellen wiederum wichtige Schaltstellen für die Stimulierung von Guaninaustauschfaktoren dar, die hier als DOCK180, Tiam-1 und Vav2 identifiziert wurden. Durch siRNA Studien wurde anschliessend gezeigt, dass DOCK180 und Tiam-1 gemeinsam für die Aktivierung von Rac1 erforderlich sind, während Vav2 für die Aktivierung von Cdc42 verantwortlich ist. Weiterhin wurden Ergebnisse gewonnen, die zeigen, dass das Fibronectin-bindende Protein CadF und die Flagellen von *C. jejuni* in die Signaltransduktion zur Aktivierung von Rac1 und Cdc42 involviert sind. CadF ist somit ein bifunktionales Protein, welches nicht nur für die Bindung des Bakteriums an den Fibronectin/Integrin-Rezeptorkomplex der Wirtszelle verantwortlich ist, sondern trägt auch zur Aktivierung von *downstream* Faktoren und Invasion von *C. jejuni* in die Wirtszellen bei.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass *C. jejuni* fähig ist, durch einen besonderen Mechanismus die Barrierefunktion von Epithelzellen zu überwinden, wobei die Protease HtrA und E-Cadherin wichtige Signalfaktoren darstellen. Desweiteren wurde gezeigt, dass *C. jejuni* auch in die Wirtszellen eindringen kann und das Fibronectin, Integrin, FAK, verschiedene weitere Kinasen und die kleinen Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 sowie bestimmte bakterielle Faktoren wie CadF und die Flagellen eine entscheidende Rolle im Invasionsprozess dieses bedeutenden Krankheitserregers spielen.

“Molecular mechanisms of *Campylobacter jejuni* induced transmigration and invasion of host target cells”

ABSTRACT

Campylobacter jejuni is one of the most important bacterial pathogens causing food-borne illness worldwide. In industrialized countries *Campylobacter* are found to cause gastroenteritis more than 2-7 times as frequently as compared to *Salmonella* and *Shigella* species. Crossing the host epithelial barrier and invasion by *C. jejuni* is considered as one of the primary reasons of gut tissue damage, but the molecular mechanisms and the major factors involved in this process are widely unclear.

In the present study I characterized the serine protease HtrA of *C. jejuni* and its function in secretion and cleavage of the host junctional protein and tumor suppressor E-cadherin. *In vitro* cleavage assays and infection experiments showed that secreted HtrA triggers E-cadherin ectodomain shedding from MKN28 polarized epithelial cells. A deletion of the *htrA* gene in *C. jejuni* led to severe defects in E-cadherin cleavage and transmigration of the bacteria. These results suggest that HtrA-mediated E-cadherin cleavage is involved in *C. jejuni* crossing of the epithelial barrier via the paracellular route between cells and represents a novel mechanism in pathogenesis.

Having established how *C. jejuni* reaches basolateral surfaces, the next aim was to investigate how this pathogen can enter the host cells. Using different molecular biological methods and various knockout cell lines derived from fibronectin^{-/-}, integrin-β1^{-/-} and focal adhesion kinase (FAK)^{-/-} deficient mice and corresponding wild-type controls it could be shown, that these host cell factors play a role in the activation of small Rho GTPases, such as Rac1 and Cdc42. Furthermore, membrane ruffling, filopodia formation, tight engulfment of the bacteria and invasion were only seen during infection of wild-type control cells. It was also demonstrated that *C. jejuni* activates FAK autophosphorylation activity which is required for stimulation of the guanine exchange factors DOCK180, Tiam-1 and Vav2. siRNA studies show that DOCK180 and Tiam-1 act cooperatively to trigger Rac1 activation, while siRNA and the use of Vav-1/2^{-/-} knockout cells showed that Vav2 is required for Cdc42 activation and *C. jejuni* invasion. Moreover, evidence is presented that activation of Rac1 and Cdc42 involves the bacterial fibronectin-binding protein CadF and the flagella apparatus. CadF appears to be a bi-functional protein enabling bacterial binding to host cells and stimulating signalling, which leads to the activation of downstream factors inducing GTPase signaling and host cell invasion by *C. jejuni*. Collectively, the results of this work suggest that *C. jejuni* can invade host cells by a unique mechanism and that fibronectin, integrins, FAK and the small Rho GTPases Rac1 and Cdc42 play crucial roles in the invasion process.