

---

**CEACAM-vermittelte Regulation der angeborenen  
Immunantwort von Darmepithelzellen gegen *Candida albicans***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Miriam Ruth Schäfer  
geboren am 15.11.1991 in Gelnhausen

---

**Gutachter (akademischer Grad, Vor- und Nachname sowie Wirkungsort)**

1. Frau Prof. Dr. med. Hortense Slevogt, Klinik für Innere Medizin I, Funktionsbereich, Pneumologie, Universitätsklinikum Jena
2. Herr Prof. Dr. rer. nat. Ignacio Rubio, Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Jena
3. Herr Prof. Dr. rer. nat. Bernhard B. Singer, Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen, Hufelandstraße 55, 45147 Essen

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.02.2022**

*„Was wir wissen, ist ein Tropfen; was wir nicht wissen, ein Ozean.“*

Isaac Newton

---

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>iv</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>4</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>6</b>
2.1 Invasive Candidiasis.....	6
2.2 Die mukosale Immunantwort von <i>C. albicans</i> .....	8
2.3 C2BBel-Zellen ein <i>in-vitro</i> Modell für Darmepithel.....	10
2.4 Die Familie der CEACAM-Rezeptoren und deren Funktionen .....	11
2.5 CEACAMs auf humanen Darmepithelien.....	11
<b>3 Ziele der Arbeit</b> .....	<b>19</b>
<b>4 Materialien</b> .....	<b>21</b>
4.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien .....	21
4.2 Software.....	23
4.3 Chemikalien, Medien und weitere Materialien .....	23
4.4 Stammlösungen, Puffer, Medien, Zusätze.....	23
4.5 Antikörper.....	26
4.6 Rekombinante Proteine .....	27
4.7 Sets und Kits.....	27
<b>5 Methode</b> .....	<b>29</b>
5.1 Zell- und Mikrobiologische Methoden.....	29
5.1.1 C2BBel-Zellkultur .....	29
5.1.2 CEACAM1-knockdown C2BBel- Zelllinien.....	30
5.1.3 HeLa-Zellkultur .....	31
5.1.4 Hefekulturen und deren Vorbehandlungen.....	32
5.1.5 Analyse von C2BBel Zellkulturüberstand, Mukusfraktion und Zelllysate	33
5.1.6 Durchflusszytometrie und FACS-Analyse .....	34
5.1.7 Adhäsionsassay mit HeLa- und C2BBel-Zellen .....	35
5.1.8 FITC-Dextran Translokation .....	36
5.1.9 TEER-Messung.....	36
5.2 Molekularbiologische Methoden.....	37
5.2.1 Methoden zum Nachweis von Proteinen .....	37
5.2.2 Methoden zum Nachweis von RNA und DNA.....	38
5.3 Proteinbiochemische Methoden .....	39
5.3.1 <i>Pull-down</i> Bindungs Assay.....	39
5.3.2 Phosphorylierungs-Assay mit C2BBel-Zellen.....	40
5.3.3 Immunpräzipitation.....	40
5.3.4 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	41
5.3.5 Western Blot .....	41
5.3.6 Silberfärbung (Ag-Färbung) .....	42
5.3.7 Coomassie-Brilliant-Blue Färbung.....	43

5.4	Statistiken .....	43
<b>6</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
6.1	Humane-CEACAM-Rezeptoren binden <i>C. albicans</i> und andere Hefen .....	44
6.2	Bindung von CEACAM1 und CEACAM6 zu <i>C. albicans</i> kann abgesättigt werden	46
6.3	Die Interaktion von extrazellulären CEACAM-Domänen mit <i>C. albicans</i> benötigt intakte Zellwandproteine.....	47
6.4	Differenzierungsstufen und stimulusabhängiges Expressionsverhalten von CEACAMs in C2BBel-Zellen.....	50
6.5	C2BBel-Darmepithelzellen exprimieren auf der Zelloberfläche verstärkt CEACAM1 und CEACAM6 bei <i>C. albicans</i> Infektion .....	54
6.6	Zunehmende Mengen von CEACAM6 unterbindet die CEACAM1-Bindung zu Epitopen der Zelloberfläche von <i>C. albicans</i> .....	57
6.7	CEACAM-Expression hat keinen Einfluss auf die Adhäsion von <i>C. albicans</i> zu Epithelzellen .....	58
6.8	<i>C. albicans</i> Stimulation von C2BBel-Zellen induziert eine vorübergehende CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung .....	61
6.9	Validierung von shRNA-vermittelten CEACAM1-knock-down in C2BBel-Zellen	62
6.10	CEACAM1 knock-down verhindert Erhöhung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) mit <i>C. albicans</i> .....	64
6.11	CEACAM1 ist obligat für die <i>C. albicans</i> -induzierte IL8-Freisetzung.....	67
6.12	<i>C. albicans</i> induzierte IL-8 Sekretion benötigt eine Bindung zu C2BBel-Zellen ....	69
<b>7</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>72</b>
7.1	Humane-CEACAM-Rezeptoren binden <i>C. albicans</i> und andere Hefen .....	72
7.2	<i>C. albicans</i> bindet CEACAM1 und CEACAM6 über spezifische Oberflächenstrukturen und ist absättigbar.....	72
7.3	<i>C. albicans</i> kann die Expression von CEACAM1 und CEACAM6 in Darmepithelien modulieren.....	73
7.4	CEACAM6 beeinflusst CEACAM1.....	76
7.5	CEACAM-Expression hat keinen Einfluss auf die Adhäsion von <i>C. albicans</i> zu Epithelzellen .....	78
7.6	<i>C. albicans</i> Stimulation von Darmepithelien induziert eine vorübergehende CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung .....	78
7.7	CEACAM1 vermittelt Modulierung der Darmepithelpermeabilität nach Bindung von <i>C. albicans</i> .....	79
7.8	CEACAM-Rezeptoren und Einflüsse der mukosalen Immunität bei <i>C. albicans</i> Infektion .....	80
<b>8</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b>	<b>87</b>
<b>10</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>97</b>
10.1	Abbildungsverzeichnis .....	97
10.2	Tabellenverzeichnis.....	99
10.3	Danksagung .....	100
10.4	Ehrenwörtliche Erklärung .....	101

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
A. dest.	<i>Aqua destillata</i>
Ag	Silber
AIEC	engl. <i>Adherent invasive Escherichia coli</i>
BGP	engl. <i>Biliary glycoprotein</i>
bp	Basenpaare
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
C2BBel-Zellen	Humane kolorektale Adenokarzinomzellen, Tochterklon von Caco-2-Zellen
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	engl. ( <i>complementary</i> ) <i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
CEA	engl. <i>carcinoembryonic antigen</i>
CEACAM	engl. <i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule</i>
CGM2	engl. CEA gene family member 2 (=CEACAM7)
CLR	engl. <i>C-type lectine receptor</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	engl. Cycle of treshold (Zyklus-Schwellenwert bei qPCR)
DBPS	engl. <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylfumarat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. <i>enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (immunologisches Nachweisverfahren)
Et al	Und andere
FACS	engl. <i>Flourescence-activated cell sorting</i> (FACS- Analyse)
Fc-Rezeptor	<i>fragment crystallisable-</i> Rezeptor
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> (fetäles Kälberserum)
FITC-Dextran	Fluorescein isothiocyanate–Dextran (Permeabilitätstest)
g	Gramm
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker

<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBSM	HEPES- <i>buffered saline</i> mit Magnesium
HCl	Salzsäure
HCMV	<i>Humanes Cytomegalievirus</i>
HEK 293	engl. <i>human embryonic kidney</i> cells (humane embryonale Nierenzellen)
HeLa	Humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HIV	engl. <i>human immunodeficiency virus</i>
HRPO	engl. <i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
ITAM	engl. <i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	engl. <i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
KBE	Koloniebildende Einheit
kDA	Kilodalton
L	Liter
LB-Medium	engl. <i>Lysogeny broth</i> -Medium
LCMV	Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus
<i>M. catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
MAPK	engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>
ml	Mililiter
mM	miliMol
MOI	Multiplicity of infection
<i>mTOR</i>	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
NaCl	Natriumchlorid
NCA	engl. <i>nonspecific cross-reacting antigen</i> (=CEACAM6, CD 66c)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NK- $\kappa$ B	engl. <i>nuclear factor-kappaB</i>
NLR	Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomänen (NOD)-ähnliche Rezeptoren (NLRs)
Nm	Nanometer
<i>N-terminal IgV-like domain</i>	engl. N-terminale IgV-ähnliche Domäne
PAMP	engl. <i>pattern-associated molecular pattern</i>
PBS	engl. Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)

PE-Konjugat	Phycoerythrin-Konjugat
PF	Polymeric formula (=enterale Ernährung)
pH	<i>Potential hydrogenii</i> (negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität)
PRR	engl. <i>pattern-recognition receptor</i>
<i>Pull-down</i> Assay	<i>In-vitro</i> Bindungsassay
RLR	retinosäureinduzierbare Gen I (RIGI)-ähnliche Rezeptoren
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROS	engl. <i>Reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	engl. <i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	engl. <i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese
SHP	engl. Src homology domain-containing phosphatase
shRNA	engl. <i>short hairpin- ribonucleic acid</i>
spp.	<i>Species pluralis</i>
Src	Tyrosinkinase
Syk	engl. <i>spleen tyrosine kinase</i>
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	<i>Tris-Borat-EDTA</i> -Puffer
TBS(-T)-Puffer	<i>Tris-buffered saline (-tween20)</i> -Puffer
TEER	engl. <i>transepithelial electrical resistance</i> (transepithelialer elektrischer Widerstand)
TE-Puffer	<i>Tris-EDTA</i> -Puffer
TLR	engl. <i>Toll-like receptor</i> (Toll-ähnlicher Rezeptor)
TNF $\alpha$	engl. <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i> (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ )
Tris	<i>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
TWEEN 20	Polysorbat
UK	engl. United Kingdom (Vereinigtes Königreich)
V	Volt
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
xg	Gravitation (Erdbeschleunigung)
YPD	engl. <i>yeast extract peptone dextrose</i>



---

## 1 Zusammenfassung

---

In den letzten Jahrzehnten nimmt die Anzahl an invasiver Candidiasis zu. Diese gehen mit einer hohen Mortalität und Morbidität einher. *C. albicans* kommt als Kommensale auf verschiedenen Schleimhäuten, wie im Gastrointestinaltrakt des Menschen vor. Bei Immungeschwächten, bei Frühgeborenen, nach Epithelschäden durch Antibiotikabehandlung, bei chronisch entzündlicher Darmerkrankung und großen Operationen, kann *C. albicans* die Darmbarriere durchdringen und eine Blutstrominfektion verursachen. Auf den Darmepithelien werden verschiedene *pattern-recognition-receptors* (PRRs) exprimiert, die eine Immunantwort hervorrufen und fakultative Pathogene wie *C. albicans* erkennen können. *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules* (CEACAMs) sind immunmodulatorische Rezeptoren und werden auf humanen Schleimhäuten innerhalb des Gastrointestinaltrakt exprimiert. Auf Darmepithelien werden CEACAM1, 5 und 6 exprimiert. Sie werden von verschiedenen bakteriellen und viralen Pathogenen rekrutiert und erfüllen unterschiedliche Zellfunktionen, wie zum Beispiel die angeborene und adaptive Immunantwort. Für die Immunantwort gegen *C. albicans* ist eine Erkennung von Oberflächenstrukturen, sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) durch PRRs des Wirtorganismus obligat. In der vorliegenden Arbeit wurden CEACAM1, 3, 5 und 6 als potenzielle neue Rezeptoren für *C. albicans* untersucht.

Das Bindungsverhalten von *C. albicans* zu extrazellulären CEACAM-Domänen wurde durch den Einsatz von *Pull-Down* Assays biochemisch untersucht. Mit verschiedenen Vorbehandlungen von *C. albicans*, wie Hitze, Proteinase K und Zymolyase, wurden Oberflächenstrukturen von *C. albicans* auf deren Bindungsinteraktion mit CEACAMs untersucht. Kompetitive *Pull-down* Assays wurden eingesetzt, um die Bindungsinteraktionen zwischen CEACAM1 und CEACAM6 zu *C. albicans* zu bestimmen. Um die Funktion dieser Rezeptoren in einem physiologisch-relevanten Kontext zu untersuchen, wurden immortalisierte C2BBel-Zellen als zelluläres Modellsystem für Darmepithelien eingesetzt. Western-Blot, FACS- und qPCR-Analysen wurden verwendet, um die Expression unterschiedlicher CEACAM-Rezeptoren auf Darmepithelien näher zu bestimmen. Die Fähigkeit von CEACAM1 auf die Bindung von *C. albicans* durch Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden zu reagieren, wurde mittels Immunpräzipitation und Western-Blot von transienten Phosphorylierungsereignissen am CEACAM1-Rezeptor ermittelt. Um die Beteiligung des Rezeptors bei Initiierung der zellulären Immunantwort auf *C. albicans* zu testen, wurde einer stabile CEACAM1-defiziente C2BBel-Zelllinie durch shRNA-vermittelten knock-down generiert. Hierbei wurde die Beteiligung des CEACAM1-Rezeptors sowie der Einfluss von

löslichem CEACAM6 auf die nach *C. albicans* Infektion initiierte IL-8 Sekretion mittels ELISA ermittelt. Letztlich wurde die Rezeptor-vermittelte Modulationsfähigkeit der transepithelialen Permeabilität nach *C. albicans* Infektion durch Bestimmung des transepithelialen Widerstandes (TEER) in CEACAM1-defiziente C2BBel-Zellen bestimmt.

In den Versuchen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass fungale Pathogene, wie *C. albicans* eine Bindung mit den extrazellulären Domänen von CEACAM-Rezeptoren 1, 3, 5 und 6 eingehen. Die Bindung von *C. albicans* erscheint humanspezifisch und wird über die *N-terminal IgV-like domain* vermittelt. CEACAM1 und CEACAM6 benötigen für die Bindung zu *C. albicans* intakte Zellwandproteine und sind absättigbar. In der Darmepithelzelllinie C2BBel erhöht *C. albicans* die Expression von membrangebundenen CEACAM1 und löslichem CEACAM6. *C. albicans* adhärert nicht CEACAM-abhängig am Darmepithel, löst aber über die Bindung an CEACAM1 eine epitheliale Immunantwort aus. Die Bindung verursacht eine transiente Phosphorylierung an der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1, was nachfolgende Signalkaskade aktivieren kann. Zur CEACAM1-vermittelten Immunantwort nach *C. albicans* Infektion gehört die Ausschüttung von pro-inflammatorischem IL-8 und die Permeabilitätserniedrigung des Darmepithels. Der CEACAM1-Rezeptor ist obligat für die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokin IL-8, das wiederum Neutrophile rekrutieren kann. Lösliches CEACAM6 reduziert die CEACAM1 Bindung zu *C. albicans*. Zusätzlich beeinflusst lösliches CEACAM6 die Immunantwort von CEACAM1 durch Verringerung der IL-8 Sekretion aus Enterozyten. Die Ausschüttung von löslichem CEACAM6 nach Infektion von *C. albicans*, könnte somit eine Auswirkung auf die Immunantwort ausüben und einen protektiven Effekt für den Wirtsorganismus haben.

In dieser Arbeit konnte durch funktionelle Untersuchungen gezeigt werden, dass die CEACAM-Rezeptoren die Barrierefunktion sowie die angeborene Immunantwort in epithelialen Zellverbänden des Darms nach Bindung von *C. albicans* modulieren können. Die vorliegenden Ergebnisse können für nachfolgende Untersuchungen zur Wirtsantwort in Epithelien, Neutrophilen und T-Zellen nach *C. albicans* Infektion zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie von mukokutaner und invasiver Candidiasis beitragen. Ziel zukünftiger Untersuchungen an den beteiligten Rezeptor-vermittelten und Pathogen-spezifischen Mechanismen kann eine schnellere Diagnostik und eine zielgerichtete Therapie zur Folge haben und kann damit zur Reduktion der Morbidität und Mortalität von durch *C. albicans* verursachten Blutstrominfektionen führen.

---

## 2 Einleitung

---

### 2.1 Invasive Candidiasis

Laut der neuen Leitlinie, welche in einer Konsensuskonferenz 2016 festgelegt wurde, ist Sepsis eine „lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer fehlregulierten Körperantwort auf eine Infektion“ (Singer et al. 2016). Sepsis und septischer Schock sind Hauptursachen für Mortalität und Morbidität weltweit (Fleischmann et al. 2016, Vincent et al. 2014). Sepsis ist eine der am weitverbreitetsten Ursachen von Sterblichkeit auf Intensivstationen, zudem hat sich die Inzidenz während der letzten Jahre stark erhöht (Kumar et al. 2011, Martin et al. 2003). Studien vermuten, dass die ansteigende Inzidenz in einer Zunahme von Risikopatienten liegt (Mayr et al. 2014). Die Mortalitätsraten für Sepsis und septischen Schock in Krankenhäusern variieren von 28-50 % (2016, Levy et al. 2012, Legrand et al. 2012, Angus et al. 2001). Sie sind abhängig von Ländern, Regionen und Ausstattung der Versorgungszentren (Levy et al. 2012, Angus et al. 2006, Martin et al. 2003). Sepsis kann durch infektiöse Prozesse ausgelöst werden (Bone et al. 1992). Infektiöse Prozesse können durch das Eindringen von Pathogenen verursacht werden, wie zum Beispiel durch Bakterien und Pilze (Mayr et al. 2014). Während der Sepsis kehrt die durch einen eindringenden Erreger ausgelöste Immunantwort nicht in die Homöostase zurück und erzeugt einen Zustand, der durch eine anhaltende übermäßige Entzündung und Immunsuppression gekennzeichnet ist (van der Poll et al. 2017). Gram-positive Bakterien, der Pilz *C. albicans* und andere *Candida spp.* zeigen über die letzten Jahre eine ansteigende Inzidenz (Mayr et al. 2014, Martin et al. 2003). Die European Prevalence of Infection Studie (EPIC II) von 2009 gibt 19,4 % Fungi (17% *Candida*) in positiven Blutkulturen von infizierten und hospitalisierten Patienten auf der Intensivstation an (Vincent et al. 2009). *C. albicans* Infektionen sind weltweit ein wachsendes Problem aufgrund der Inzidenz von Immungeschwächten (Zheng et al. 2015, Naglik et al. 2011, Moyes und Naglik 2011). Je nach Studie sind sie die dritt- oder vierthäufigste Ursache von nosokomialen Infektionen der Blutbahn, was die medizinische Bedeutung nochmals verdeutlicht (Lewis et al. 2012, Gudlaugsson et al. 2003).

*Candida spp* sind Pilze, die eine Rolle für menschliche Infektionserkrankungen haben können und gehören zu den klassischen opportunistischen Pathogenen, die als Kommensale beim gesunden humanen Individuum auf mukosalen Oberflächen des Gastrointestinaltraktes, des Mundrachenraums, des Urogenital-, des respiratorischen Trakts und der Haut vorkommen (da Silva Dantas et al. 2016, Eggimann und Pittet 2014, Eggimann et al. 2003, Cohen et al. 1969). Die durch diese Organismen verursachten Infektionen lassen sich grob in mukokutane und

invasive Candidiasis einteilen (Mayer et al. 2013). Die mukokutanen Erkrankungen umfassen oropharyngeale Candidiasis (Mundsoor), ösophageale Candidiasis und vaginale Candidiasis (Moyes und Naglik 2011, Vazquez und Sobel 2002). Zur invasiven Candidiasis gehört sowohl die Candidämie, als auch Infektionen tieferer Organe, welche mit einer hohen Mortalität und Morbidität verbunden sind (Pappas 2006, Martin et al. 2003). Zu den Risikopatienten gehören immungeschwächte Patienten/-innen aufgrund einer HIV-Infektion, einer Chemotherapie, einer Knochenmark- oder Organtransplantation, Trauma- oder Verbrennungspatienten und Patienten/-innen auf Intensivstationen (Eggimann und Pittet 2014, Shoham und Marwaha 2010, Pappas 2006). Bei diesen Patienten/-innen können *Candida spp* eine pathogene Form annehmen und zu einer Blutstrominfektion führen (Eggimann und Pittet 2014, Eggimann et al. 2003). Bei einer Störung der epithelialen Homöostase, wie beispielsweise bei Patienten/-innen nach einer Glukokortikoidbehandlung, nach einer systemischen Antibiose, bei totaler parenteraler Ernährung, nach großen abdominellen Operationen, bei renaler Insuffizienz oder Neutropenie, können *Candida spp* wie *C. albicans* und *Candida glabrata* orale, ösophageale, gastrointestinale, vaginale und urogenitale Infektionen der Mukosa bis hin zu schweren invasiven Infektionen mit einer hohen Mortalität verursachen (Eggimann und Pittet 2014, Brown et al. 2012, Gudlaugsson et al. 2003). Auch bei Frühgeborenen stellen die *Candida spp* die Hauptursache für invasive Pilzinfektionen dar, was wahrscheinlich zum Teil auf die Unreife und die Modulation des Immunsystems im sich entwickelnden Fötus zurückzuführen ist (Arsenault und Bliss 2015, Pfaller et al. 2012). Wegen der globalen Zunahme an Frühgeborenen stellt dies eine wachsende Gefahr dar (Farrant et al. 2019, Blencowe et al. 2013).

Trotz des Einsatzes mehrerer neuer Antimykotika mit verbessertem Spektrum und verbesserter Wirksamkeit hat die Häufigkeit der *C. albicans* Infektionen und die damit verbundene Mortalität in den letzten zwei Jahrzehnten nicht abgenommen (Pfaller und Castanheira 2016). Der Mangel an schnellen und empfindlichen diagnostischen Tests hat zu einem erheblichen Überverbrauch von Antimykotika geführt, was zu erhöhten Kosten, Selektionsdruck für Resistenzen, unnötiger Medikamententoxizität und unerwünschten Medikamenteninteraktionen geführt hat (Pfaller und Castanheira 2016, Pfaller et al. 2012, Morrell et al. 2005). Ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge von *C. albicans* könnte die Therapie und sogar die Sterblichkeit reduzieren.

## 2.2 Die mukosale Immunantwort von *C. albicans*

Intraabdominale Infektionen sind bei septischen Patienten/-innen mit einer höheren Mortalität verbunden (Chou et al. 2020). Der Darm eines Menschen bildet die größte Oberfläche des Körpers steht im engen Kontakt zu Nährstoffen, symbiotischer Mikroflora und Pathogenen. Um den Körper effektiv vor den infektiösen Mikroorganismen zu schützen, ist der Darm mit dem Großteil des lymphatischen Gewebes assoziiert und enthält den Großteil aller Zellen des Immunsystems im Organismus. Die Hauptaufgabe des Darmes besteht, neben Verdauung sowie der Absorption von Nährstoffen und Wasser darin, eine effektive Schutzbarriere zwischen der antigenreichen Außenumgebung und dem inneren Milieu des Organismus sicherzustellen. Die Strategien, die dafür verwendet werden, beinhalten unter anderem eine durch das Epithel sichergestellte physikalische Barriere, die Produktion antibakterieller Peptide sowie insbesondere die Organisation lymphatischer Strukturen deren Hauptaufgabe darin besteht, IgA zu produzieren. Gleichzeitig wird das luminale Mikrobiom aktiv immunologisch toleriert (D. Haller 2015). Die Mehrzahl der systemischen Infektionen werden durch endogene *C. albicans* verursacht, die den Gastrointestinaltrakt des Patienten/-innen kolonisieren und im gesunden Individuum über die Mukus-Oberfläche einen direkten Kontakt mit dem Darmepithelium haben (Netea et al. 2015, Moyes und Naglik 2011). *C. albicans* muss über die intestinale epitheliale Barriere ins Blut gelangen, die den Organismus von der mikrobiellen Darmflora trennt, um eine systemische Infektion zu verursachen. Dies kann unter bestimmten Umständen, wie bei Immungeschwächten und bei Epithelschäden erleichtert stattfinden. Epithelschäden entstehen zum Beispiel bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder nach Antibiotikabehandlung (Eggimann und Pittet 2014, Naglik et al. 2011, Moyes und Naglik 2011). Die Umwandlung von der Hefe- zur Hyphenform, weist auf einen pathogenen Zustand hin und ist ein entscheidender Virulenzfaktor von *C. albicans* (Naglik et al. 2017, Zheng et al. 2015, Mech et al. 2014, Mayer et al. 2013). Die Hefeform wird vom Wirtsimmunsystem toleriert, während die invasive hyphale Form robuste Immunantworten induzieren kann (Moyes et al. 2010). *C. albicans* kann über die in Enterozyten dominierende pilzgetriebene aktive Penetration in Hyphenform, epithelgetriebene induzierte Endozytose oder über den Abbau von inter-epitheliale Zellverbindungen durch Proteolyse von sekretierten Aspartyl-Proteinasen und anschließender Diffusion durch das Darmepithel translozieren und in den Blutstrom gelangen (Naglik et al. 2017, Netea et al. 2015, Zhu und Filler 2010, Dalle et al. 2010). Der Einfluss der Virulenzfaktoren von *C. albicans* auf mukosale Epithelzellen der Darmschleimhaut und lokale Immunzellen des Gastrointestinaltrakts entscheidet über das physiologische Gleichgewicht und dementsprechend darüber, ob eine Immunreaktion

hervorgerufen wird und es zu einer invasiven Infektion kommen kann (Qin et al. 2016a, Moyes und Naglik 2011, Weindl et al. 2010). Immunzellen und Epithelzellen der Darmschleimhaut können durch proinflammatorische Substanzen, wie TNF $\alpha$  oder Interleukine, eine adaptive und angeborene Immunantwort initiieren und weiterführen (Naglik et al. 2017, Naglik et al. 2011, Moyes und Naglik 2011). Botenstoffe, wie zum Beispiel IL8 können von epithelialen Zellen ausgeschüttet werden (Eckmann et al. 1993) und orchestrieren dabei antiinfektiösen Prozesse und Abwehrmechanismen, wie die chemotaktische Rekrutierung von Neutrophilen (Baggiolini und Clark-Lewis 1992). Sie versuchen durch diese Mechanismen den Wirt vor eindringenden Pathogenen zu schützen. Sie können aber auch eine kritische Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis einnehmen (Hack et al. 1992).

Sepsis ist mit einer starken Aktivierung des angeborenen Immunsystems verbunden, die durch die Aktivierung der *pattern-recognition-receptors* (PRRs) durch *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) vermittelt wird (van der Poll et al. 2017). Darmepithelzellen exprimieren eine Vielzahl an PRRs, die *C. albicans* als potenzielles Pathogen erkennen und eine angeborene Immunantwort auslösen können (Zheng et al. 2015, Becker et al. 2015, Medzhitov und Janeway 1997, Netea et al. 2015). PRRs sind notwendig für die Unterscheidung von körperfremden und körpereigenen Bestandteilen. Sie können sogenannte PAMPs erkennen und folglich eine suppressive oder aktivierende Immunantwort auslösen (Medzhitov und Janeway 1997, Janeway 1992). *C. albicans* besitzt verschiedene PAMPs, die vom Wirt über PRRs erkannt werden können und über Signalinduktion Einfluss auf die Immunantwort über die Ausschüttung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen nehmen können (Becker et al. 2015, Netea et al. 2015, Netea und Marodi 2010). Die Zellwand von *C. albicans* kann in engem Kontakt mit dem intestinalen Epithel stehen und somit von PRRs des Epithels erkannt werden. Sie besteht aus Chitin, das sich im Inneren der Zellwand befindet und kovalent mit dem mittleren Netzwerk aus  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,6-Glucanen verbunden ist und aus den außen liegenden Mannoseproteinen an die hoch glykosylierte O- und N-gebundene Glykoproteine gebunden sind. Die Grundkomponenten der fungalen Zellwand sind ähnlich, allerdings sind die genauen Strukturen und die chemischen Eigenschaften bei verschiedenen Formen von *C. albicans* unterschiedlich, was dem Immunsystem des Wirts die Erkennung verschiedener Zellformen erleichtern kann (Snarr et al. 2017, Lowman et al. 2014, Nather und Munro 2008, Mora-Montes et al. 2011). Die innere Zellwand enthält die oben benannten Polysaccharide Chitin,  $\beta$ -1,3-Glucan und  $\beta$ -1,6-Glucan, die den Zellen Stabilität und Form verleihen, sich zwischen Hefen und Hyphen unterscheiden und zu den wesentlichen PAMPs

gehören, die der Wirtsorganismus über PRRs erkennt und folglich eine Immunantwort hervorrufen (Naglik et al. 2017, Moyes und Naglik 2011, Naglik et al. 2011). Zu den vier Hauptklassen von PRRs, die PAMPs von Pathogenen identifizieren können, gehören Toll-like-Rezeptoren (TLRs), C-Typ-Lectin-Rezeptoren (CLRs), Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomänen (NOD)-ähnliche Rezeptoren (NLRs) und retinosäureinduzierbare Gen I (RIGI)-ähnliche Rezeptoren (RLRs) (Netea et al. 2015). Mukosale Epithelzellen exprimieren TLR1-6 und TLR8-10, Dectin-1/2, Galektine sowie NOD1 (Zheng et al. 2015). TLRs und CLRs spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung von *C. albicans* über deren PAMPs. PAMPs von *C. albicans*, wie Phospholipomannane, können von TLR2 (Jouault et al. 2003), Zellwandmannane von TLR4 (Netea et al. 2006) und DNA von TLR9 (Miyazato et al. 2009) erkannt werden. Fungale  $\beta$ -1,3-Glucan können über CLRs, wie Dectin-1 erkannt werden, während weitere bekannte CLRs, wie Dectin-2, Galectin-3 und Mannose-Rezeptoren, Mannan-Strukturen von *C. albicans* detektieren können (Zheng et al. 2015, Netea et al. 2015). Die Aktivierung von TLRs und CLRs führt zur Induktion von NF- $\kappa$ B, MAPK- und Syk-Signalen und zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und weiteren nachgeschalteten Immuneffektoren (Naglik et al. 2019, Naglik et al. 2017).

Die Gesamtheit der Rezeptoren, die mit *C. albicans* als Kommensale oder als Pathogen auf Darmepithelzellen interagieren sowie folgende Immunantwort, sind zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht gänzlich aufgeklärt. Aus diesem Grund sollen in dieser Arbeit humane CEACAMs, welche auf Darmepithelien exprimiert werden, als potenzielle PRRs untersucht werden.

### 2.3 C2BBe1-Zellen ein *in-vitro* Modell für Darmepithel

In unseren Versuchen wurde die human kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie C2BBe1 verwendet, die ein Klon der Caco-2 Zelllinie ist. Der Klon wurde aufgrund der morphologischen Homogenität und der exklusiven apikalen Villin-Lokalisierung ausgewählt. Die Zelllinie exprimiert ein mit humanen Enterozyten vergleichbares Bürstensaum-Zellskelett, das sich differenziert und ist vergleichbar mit den etablierten Caco-2-Zelllinien (Peterson und Mooseker 1992, Chantret et al. 1988). Das Herausstellungsmerkmal gegenüber der Mutterklonzelllinie liegt in der Expression des humanen Myosin-1-Bürstensaum Immunogen (Peterson und Mooseker 1992). Die C2BBe1-Zellen wachsen als polarisierte Monolayer mit einem apikalen Bürstensaum, der morphologisch mit dem des humanen Darms vergleichbar ist. Die C2BBe1-Zelllinie ist bei vielen *in-vitro* Zellversuchen ein etabliertes Modell (Böhringer et al. 2018, Bohringer et al. 2016, Peterson und Mooseker 1992). Sie differenzieren sich nach ungefähr 2-3 Wochen und bilden eine Domformation. Die Zellen bilden verschiedene Rezeptoren auf ihrer Oberfläche aus, um

beispielsweise Pathogene identifizieren zu können oder das eigene Immunsystem zu trainieren. Zu den auf der Darmschleimhaut natürlich vorkommenden Rezeptoren gehören CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 und CEACAM7, die auch in Caco-2 Zellen nachgewiesen wurden und als potenzielle Rezeptoren für *C. albicans* in Frage kommen (Ou et al. 2009). In unseren Versuchen wird die Expression der CEACAM-Rezeptoren auf der verwendeten Zellklonlinie C2BBel mithilfe verschiedener Methoden und zu unterschiedlichen Differenzierungsstadien untersucht. Außerdem wird deren Expressionsverhalten auf Sepsis-assoziierte Agenzien näher analysiert.

#### **2.4 Die Familie der CEACAM-Rezeptoren und deren Funktionen**

Das auf Zelloberflächen lokalisierte Repertoire der Zelladhäsionsmoleküle bestimmt die Spezifität und Flexibilität der Zellkontakte. Zu den Zelladhäsionsmolekülen gehören Integrine, Selektine, Cadherine und die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) (Aplin et al. 1998), welche an den homophilen und heterophilen Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind (Ruoslahti und Obrink 1996). Integrine und Cadherine sind vor allem an starken interzellulären Bindungen beteiligt. Selektine und die Mitglieder der IgSF vermitteln schwächere Bindungen und besitzen vielmehr die Funktion eines Adhäsions-Rezeptors, indem sie Signalkaskaden initiieren oder beeinflussen (Ruoslahti und Obrink 1996). Die *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules* (CEACAMs), eine Untergruppe der CEA-Genfamilie der IgSF, werden im menschlichen Genom von 12 Genen codiert, die auf dem Chromosom 19q13 liegen (Beauchemin und Arabzadeh 2013, Sadarangani et al. 2011). Die Rezeptoren sind bei der Zell-Zell-Erkennung beteiligt und modulieren verschiedene zelluläre Prozesse, wie Neovaskularisierung, Regulation der Insulin-Homöostase und Gestaltung der Gewebsarchitektur. Des Weiteren spielen die Rezeptoren eine entscheidende Rolle in der Immunmodulation und der Wirts-Pathogen-Interaktion (Kim et al. 2019, Kelleher et al. 2019, Kuespert et al. 2006, Zebhauser et al. 2005, Teglund et al. 1994). CEACAMs können im humanen Organismus auf verschiedenen Zelltypen, wie Immunzellen und epithelialen Geweben des Respirations- und Gastrointestinaltrakts, exprimiert werden (Klaile et al. 2013, Sadarangani et al. 2011).

#### **2.5 CEACAMs auf humanen Darmepithelien**

Auf der apikalen Oberfläche der Darmepithelien des Menschen werden CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 und CEACAM7 als Membranproteine der Glykokalyx exprimiert (Fahlgren et al. 2003, Frangmyr et al. 1999, Kinugasa et al. 1998). CEACAM1, 5 und 6 werden von verschiedenen viralen und bakteriellen Pathogenen als Rezeptor rekrutiert und führen vielseitige



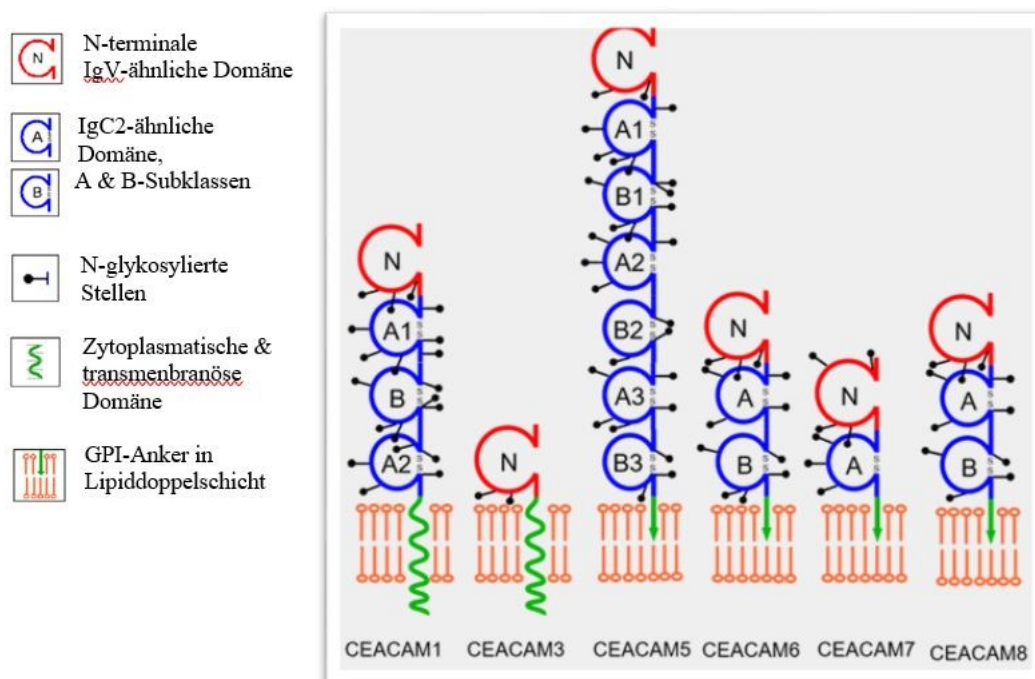
zelluläre Funktionen durch. Hierzu gehören exemplarisch die homo- oder heterophile intrazelluläre Adhäsion, Proliferation, Zelloptose, Internalisierung von Bakterien und die Modulation der Immunantwort (Sadarangani et al. 2011, Gray-Owen und Blumberg 2006, Hammarstrom und Baranov 2001). CEACAMs können die angeborene und adaptive Immunantwort beeinflussen. Beispielsweise kann CEACAM1 die TLR-4 vermittelnde Funktion von Neutrophilen durch die von CEACAM1 geförderte CD8-T-Zell-Antwort bei lymphozytären Choriomeningitis beeinflussen (Khairnar et al. 2018). Des Weiteren können Neutrophile an Endothelien über verschiedene CEACAMs vermittelt adhären (Panczyszyn und Wieczorek 2012, Skubitz und Skubitz 2008). Außerdem führt die Bindung von CEACAMs auf Neutrophilen zu deren Aktivierung (Heinrich et al. 2016a, Panczyszyn und Wieczorek 2012, Sarantis und Gray-Owen 2012) und zur verzögerten Apoptose durch CEACAM1 (Singer et al. 2005). Die Bindung von *Neisseria* zu CEACAM1 inhibiert die Aktivierung und Proliferation von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, induziert die Apoptose von B-Zellen und verhindert deren Antikörperproduktion (Sadarangani et al. 2011, Pantelic et al. 2005, Boulton und Gray-Owen 2002). CEACAMs können als potenzielle PRRs für *C. albicans* die mukosale Immunreaktion regulieren, indem sie epitheliale Immunantworten über beispielsweise Zytokinproduktion und Rekrutierung, Differenzierung sowie Aktivierung einer Vielzahl von Immunzellen, einschließlich Neutrophiler, dendritischer Zellen und T-Zellen stimulieren (Moyes und Naglik 2011).

Zu den interagierenden Pathogenen gehören gram-negative Bakterien, wie *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, Stämme von *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseriae meningitides*, *Helicobacter pylori* und *Salmonella spp* (Kelleher et al. 2019, Javaheri et al. 2016a, Tchoupa et al. 2014, Gray-Owen und Blumberg 2006, Kuespert et al. 2006). Aber auch virale Erreger, wie Influenzaviren und HCMV, können CEACAMs binden (Vitenshtein et al. 2016, Kuespert et al. 2006).

Die Interaktion zwischen CEACAMs und fungalen Erregern, wie *C. albicans* soll in dieser Arbeit auf Darmepithelien untersucht werden. Hierfür soll die CEACAM-Expression unter Einfluss von *C. albicans* auf dem Zellklon C2BBel der Darmepithelzelllinie Caco-2 analysiert werden. Caco-2 Zellen exprimieren CEACAM1, 5, 6 und 7 (Ou et al. 2009). Eine genaue Charakterisierung der CEACAM-Expression auf dem Zellklon C2BBel wird im Zusammenhang mit den Versuchen durchgeführt.

## Die Struktur der CEACAM-Familie

Die auf dem Darmepithel exprimierten CEACAMs weisen eine N-terminale extrazelluläre *IgV-like domain* auf, welche der variablen Region von Immunglobulinen ähnelt (Nagaishi et al. 2008, Oikawa et al. 1987). An diese *N-terminal IgV-like domain* binden die unterschiedlichen viralen und bakteriellen Pathogene mit ihren strukturell verschiedenen Oberflächenproteinen (Tchoupa et al. 2014, Sadarangani et al. 2011, Gray-Owen und Blumberg 2006). Je nach Mitglied folgt eine variable Anzahl von 0-6 IgC2-ähnlichen Domänen, welche an die konstante Region der Immunglobuline erinnert (Nagaishi et al. 2008, Oikawa et al. 1987). An den Asparaginresten besitzen alle CEACAMs ausgeprägte Glykosylierungen durch multikomplexe Kohlenhydratketten, welche einen Großteil der molekularen Masse der Rezeptoren ausmachen (Lucka et al. 2005, Thompson et al. 1991). Die folgende Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung der CEACAM-Rezeptoren, welche in dieser Arbeit untersucht wurden.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung von CEACAM1, CEACAM3, CEACAM6, CEACAM7 und CEACAM8.

IgC2-ähnliche Domänen enthalten Cysteinreste, welche Disulfidbrücken (S – S) ausbilden. Striche mit Punkten an den Domänen stellen potentielle N-Glykolysierungen dar. CEACAM1 (ITIM) und CEACAM3 (ITAM) besitzen eine transmembranöse Domäne. CEACAM5-CEACAM8 besitzen einen GPI-Anker in der Lipiddoppelschicht (Zimmermann 2011).

Über die extrazelluläre *N-terminal IgV-like domain* der CEACAM-Rezeptoren wird durch homo- und heterophile Interaktionen die interzelluläre Adhäsion erleichtert (Sadarangani et al. 2011,

Gray-Owen und Blumberg 2006, Watt et al. 2001). So können CEACAM1, 5 und 6 homophile Bindungen eingehen. CEACAM1 mit CEACAM6, CEACAM1 mit CEACAM8, CEACAM1 mit CEACAM5, CEACAM5 mit CEACAM6 und CEACAM6 mit CEACAM8 können auch heterophile Bindungen eingehen (Singer et al. 2014, Sadarangani et al. 2011, Gray-Owen und Blumberg 2006, Oikawa et al. 1992, Oikawa et al. 1989). Humanes CEACAM3 stellt diesbezüglich eine Ausnahme dar, da es keine Zell-Zell-Adhäsion unterstützt, sondern die Oponin-unabhängige Erkennung und Eliminierung von human-spezifischen gramnegativen Bakterien vermittelt (Sadarangani et al. 2011, Schmitter et al. 2004, Billker et al. 2002).

CEACAM1 und 3 besitzen eine transmembranöse Domäne mit einem *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* (ITIM) oder einem *immunoreceptor tyrosine-based activator motif* (ITAM), die Signalkaskaden mithilfe von Phosphorylierungsvorgängen aktivieren oder supprimieren können (Kim et al. 2019, Tchoupa et al. 2014, Gray-Owen und Blumberg 2006, Pils et al. 2008, Schmitter et al. 2004, Scholzel et al. 2000). CEACAM5 (*carcinoembryonic antigen*, CEA, CD 66e), CEACAM6 (*nonspecific cross-reacting antigen*, NCA, CD66c) und CEACAM7 (*CEA gene family member 2*, CGM2), welche auf Epithelien vorkommen, sind mit der Membran über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)- Anker verbunden (Frangmyr et al. 1999, Hammarström 1999).

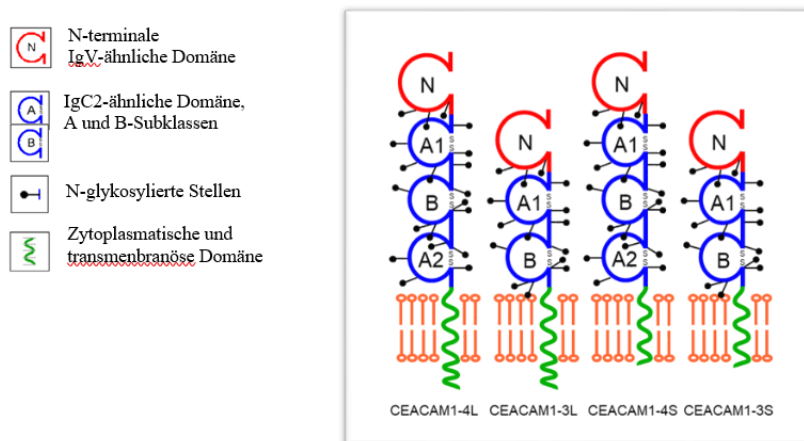
## **CEACAM1**

Humanes CEACAM1 wurde erstmalig 1976 von Svenberg in der humanen Galle als Biliary glycoprotein (Bgp) beschrieben (Svenberg 1976). CEACAM1, auch als CD66a (cluster of differentiation 66a) bekannt, zeigt die weiteste Verbreitung von den humanen CEACAM-Rezeptoren innerhalb des Körpers und kommt auf Epithelzellen verschiedener Gewebe, auf Endothelzellen und auf Leukozyten, wie beispielsweise Granulozyten, T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen, vor (Sadarangani et al. 2011, Gray-Owen und Blumberg 2006, Moller et al. 1996). CEACAM1 spielt eine entscheidende Rolle in der Neovaskularisation, beim Insulin-Metabolismus, der T-Zell-Regulation und der Tumorgenese (Kuespert et al. 2006, Gray-Owen und Blumberg 2006).

Von CEACAM1 existieren 12 Spleißvarianten, welche sich in der Anzahl der extrazellulären und zytoplasmatischen Domänen unterscheiden. Dadurch haben die Isoformen unterschiedliche Möglichkeiten, interzelluläre Bindungen und intrazelluläre Signalgebungen zu vermitteln (Kim et al. 2019, Tchoupa et al. 2014, Beauchemin und Arabzadeh 2013, Gray-Owen und Blumberg 2006,

Kuespert et al. 2006). CEACAM1-4 besitzt vier extrazelluläre Domänen und weist entweder einen kurzen (CEACAM1-4S) oder einen längeren zytoplasmatischen Bereich (CEACAM1-4L) auf (Abbildung 2). Weitere häufig ko-exprimierte Isoformen sind CEACAM1-3S bzw. CEACAM1-3L mit drei extrazellulären Domänen (Kim et al. 2019, Beauchemin und Arabzadeh 2013, Tchoupa et al. 2014, Gray-Owen und Blumberg 2006). Die langen Isoformen besitzen zwei *immunoreceptor tyrosin-based inhibition motifs* (ITIM) und können im Gegensatz zur kurzen Isoform an zwei Tyrosinresten phosphoryliert werden, was weitere CEACAM1-abhängige Signalkaskaden aktivieren kann (Sadarangani et al. 2011, Singer et al. 2010, Gray-Owen und Blumberg 2006). Durch die Interaktion mit Kinasen und Phosphatasen am ITIM über Phosphorylierung und Dephosphorylierung kann somit ein intrazelluläres Signal vermittelt werden. Beispielsweise verursacht die Interaktion von CEACAM1 mit dem Pathogen *Moraxella catarrhalis* und *Neisseria meningitidis* eine über den Toll-like Rezeptor (TLR)-2 vermittelte NF- $\kappa$ B-abhängige verminderte Immunantwort auf Lungenepithelzellen. Hierbei werden die hemmenden Effekte durch die Tyrosinphosphorylierung am ITIM von CEACAM1 und durch die Rekrutierung der Phosphatase SHP-1 vermittelt, die die Toll-like-Rezeptor 2-abhängige Aktivierung des Phosphatidylinositol 3-OH-Kinase-Akt-Kinase-Signalwegs negativ reguliert (Singer et al. 2014, Slevogt et al. 2008).

CEACAM1 kommt in den Membranen als Monomer, Dimer oder als oligomere Mikrokluster vor. Diese Formen bestehen aus CEACAM1-S Homodimere, CEACAM1-L Homodimere sowie CEACAM1-S-CEACAM1-L Heterodimere. Das Vorkommen und Verhältnis dieser Formen bestimmt entscheidend die Funktion der Bindung von CEACAM1 zu intrazellulären Botenstoffen und somit die nachgeschaltete Signalkaskade (Tchoupa et al. 2014, Muller et al. 2009, Klaile et al. 2009, Singer et al. 2002).



**Abbildung 2** Darstellung der wichtigsten CEACAM1-Spleißformen

Es existieren 12 Isoformen von CEACAM1 durch alternatives Spleißen. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Anzahl an extrazellulären Domänen und ihrer Membranverankerung bzw. der Länge ihrer intrazellulären Domäne. Die Zahlen stehen für die unterschiedliche Anzahl an extrazellulären Domänen, die Buchstaben für die lange (L) oder die kurze (S) zyttoplasmatische Domäne. Die am häufigsten exprimierten Isoformen sind CEACAM1-4L, CEACAM1-4S, CEACAM1-3L und CEACAM1-3S. Abbildung verändert übernommen nach (Zimmermann 2011).

### CEACAM3

CEACAM3 (CD66c, CGM19) spielt eine entscheidende Rolle im angeborenen Immunsystem (Pils et al. 2008). Der Rezeptor weist als längste Isoform eine transmembranöse Domäne und ein intrazelluläres *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) auf und wird spezifisch auf Granulozyten exprimiert (Heinrich et al. 2016a, Pils et al. 2012). CEACAM3 ist ein phagozytischer Rezeptor des angeborenen Immunsystems, der die Erkennung und Eliminierung humanspezifischer Krankheitserreger, wie *Haemophilus*, *Neisseriae* und *Moraxella spp*, vermittelt (Heinrich et al. 2016a, Schmitter et al. 2004). CEACAM3 aktiviert Neutrophile und leitet durch die Bindung an das bakterielle Opa-Protein die Phagozytose ein. Allerdings kann CEACAM3 als Ausnahme der auf Neutrophilen exprimierten CEACAM-Rezeptoren die Adhäsion von Neutrophilen an das Endothel nicht stimulieren (Heinrich et al. 2016a, Panczyszyn und Wieczorek 2012).

### CEACAM5

Das hochmolekulare Glykoprotein, CEACAM5 (CEA, CD66e), ist ein weit verbreiteter Tumormarker. Neben seiner Funktion als Zelladhäsionsmolekül, ist CEACAM5 auch an der Inhibition der Zelldifferenzierung und der Inhibition der Zellapoptose im Kolon beteiligt. Des

Weiteren nimmt CEACAM5 eine Funktion bei der Zellpolarisations- und der Gewebestrukturveränderung ein (Beauchemin und Arabzadeh 2013).

### **CEACAM6**

CEACAM6 (NCA, CD66c) wird auch auf Granulozyten und Monozyten exprimiert (Tchoupa et al. 2014, Kuespert et al. 2006). Es hat vielseitige Funktionen, wie die Bindung mit anderen Mitgliedern der CEACAM-Familie (CEACAM1, CEACAM5, CEACAM8) auf Zellen des Wirtes und mit Bakterien, die eine wichtige immunregulatorische Funktion darstellt. Außerdem kann CEACAM6 eine heterotypische Bindung mit Integrinrezeptoren (z.B.  $\beta$ 1- und  $\beta$ 3- Integrin) eingehen (Johnson und Mahadevan 2015). Darüber hinaus spielt CEACAM6 eine Rolle in der Tumorgenese (Rizeq et al. 2018, Sharma et al. 2017, Johnson und Mahadevan 2015, Beauchemin und Arabzadeh 2013). CEACAM6 kann auf mukosalen Epithelien in drei unterschiedlichen Formen vorkommen: membrangebunden durch einen GPI-Anker auf der Zelloberfläche, löslich oder auf extrazellulären Vesikeln exprimiert (Muturi et al. 2013, Baranov et al. 1994). In Epithelzelllinien induziert die Behandlung mit IFN $\gamma$  signifikant die Zelloberflächenexpression von CEACAM6 (Fahlgren et al. 2003). Hingegen wurden keine Veränderungen bei der Expression von CEACAM6 bei Behandlung von Epithelzellen mit Bakterien nachgewiesen (Klaile et al. 2013, Ou et al. 2009). CEACAM6 wurde als Rezeptor für *adherent-invasive Escherichia coli* (AIEC) identifiziert (Barnich et al. 2007), welche bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen einhergehend mit einer epithelialen CEACAM6- Expressionserhöhung zu einer vermehrten Adhärenz und Invasion in epitheliale Zellen und einer erhöhten Kolonisation der Schleimhaut des Bakteriums an das Darmepithel führen kann (Palmela et al. 2018, Barnich et al. 2007). Die Interaktion zwischen AIEC und CEACAM6 über Adhäsine kann durch verschiedene Therapieansätze, wie Bakteriophagen, enterale Ernährung, *Saccharomyces cerevisiae* reduziert werden (Palmela et al. 2018, Galtier et al. 2017, Sivignon et al. 2015, Keenan et al. 2014).

### **CEACAM7**

CEACAM7 (CGM2) wird nur auf Epithelien der Bauchspeicheldrüse und des Kolorektums exprimiert, vor allem an der apikalen Oberfläche von differenzierten Intestinalzellen (Scholzel et al. 2000). Außerdem spielt CEACAM7 eine wichtige Rolle bei der Regulierung der zellulären Differenzierung und Proliferation. Von CEACAM7 existieren zwei Spleißformen, welche sich in der Anzahl der extrazellulären IgC2-ähnlichen Domänen unterscheiden und über deren unterschiedliche Funktion und Interaktion wenig bekannt ist (Ohlsson et al. 2006). Bisher konnte

keine Expressionserhöhung von CEACAM7 bei Intestinalzellen nach Behandlung mit pro-inflammatorischen Zytokinen wie IFN- $\gamma$  oder mit Bakterien detektiert werden (Ou et al. 2009).

Die Interaktion von fungalen Pathogenen, wie *C. albicans* mit CEACAMs wurde bisher nicht untersucht, weswegen es von besonderem Interesse ist, deren Interaktionspotential und die potenziellen Immunmodulation der *C. albicans* vermittelten CEACAM1-Phosphorylierung näher zu untersuchen.

---

### 3 Ziele der Arbeit

---

Durch *C. albicans* verursachte systemische Infektionen gehen mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher und zeigen im Verlauf der letzten Jahrzehnte eine ansteigende Inzidenz. Vor allem die systemische *C. albicans* Infektion bei Risikopatienten, wie bei Immungeschwächten, bei Frühgeborenen und auf der Intensivstation, stellen ein fortwährend wachsendes Problem dar. Das Verständnis der Pathophysiologie von Sepsis hat eine neue Definition der Leitlinien verursacht, die eine schnellere und einfachere Diagnostik beinhaltet, aber bisher die Fallzahlen nicht reduzieren konnte. Im menschlichen Darm vorkommende endogene Stämme von *Candida*, welche dort im gesunden Individuum als Kommensale und Bestandteil des humanen Mikrobioms vorkommen, sind die Hauptquelle für systemische *C. albicans* Infektionen. Zur Pathophysiologie der invasiven Candidiasis gehört die bessere Deutung von der Interaktion zwischen Pathogen und Wirt und die anschließende Immunantwort. Die folgende Arbeit beschäftigt sich daher mit einem besseren Verständnis der durch *C. albicans* verursachten Sepsis. Die Auslösung einer Immunantwort gegen *C. albicans* benötigt einen Erkennungsmechanismus von Oberflächenstrukturen (*pathogen-associated molecular pattern*) über sogenannte *pattern-recognition* Rezeptoren. CEACAM1 zeigte sich bei Vorarbeiten der Arbeitsgruppe als neuer potenzieller Rezeptor für *C. albicans*. CEACAM-Rezeptoren haben einen großen Einfluss auf unterschiedliche Mechanismen des angeborenen und adaptiven Immunsystems und lösen je nach Vorkommen in epithelialen Verbänden, T-Zellen und Neutrophilen unterschiedliche Immunantworten aus. *C. albicans* kann bei Risikopatienten, wie Immungeschwächten oder bei Epithelschäden, an mukosale Epithelien adhären über eine epithelgetrieben induzierte Endozytose oder eine in Enterozyten dominierende pilzgetriebene aktive Penetration über die Darmschleimhaut in den Blutstrom des Wirtes gelangen. Ein besseres Verständnis für die Interaktion von CEACAM-Rezeptoren zu dem am häufigsten bei Sepsis vorkommenden fungalen Pathogen *C. albicans* und die Immunantwort des Wirts, könnte einen Beitrag zur Verbesserung der Diagnostik und therapeutischen Vorgehensweise bei Candidämie leisten.

Im Rahmen der Doktorarbeit ergaben sich auf Grund der gesundheitlichen Relevanz der invasiven Candidiasis folgende Fragestellungen:

1. Wie ist das Bindungsverhalten von CEACAM-Rezeptoren zu verschiedenen *Candida*-Stämmen und Hefen?



2. Welche Oberflächenstrukturen von *C. albicans* vermitteln die Bindung zu CEACAM-Rezeptoren? Ist eine Interaktion zwischen CEACAM-Rezeptoren und *C. albicans* absättigbar?
3. Induziert *C. albicans* auf mukosalen Epithelien eine Expressionserhöhung von CEACAM-Rezeptoren?
4. Beeinflussen sich CEACAM6-Rezeptoren und CEACAM1-Rezeptoren bei der Interaktion gegen *C. albicans*?
5. Hat die CEACAM-Expression einen Einfluss auf die Adhäsion von *C. albicans* an Darmepithelien?
6. Findet eine transiente Phosphorylierung am ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based motif*) des CEACAM1-Rezeptor nach *C. albicans* Infektion statt, welche eine Immunantwort induzieren kann?
7. Verändert sich die Permeabilität von Epithelzellen in Folge einer *C. albicans* Infektion? Welchen Einfluss hat die CEACAM1-Expression auf die Permeabilität bei *C. albicans* Infektion?
8. Ist CEACAM1 obligat für eine pro-inflammatorische Immunantwort in Darmepithelzellen nach *C. albicans* Infektion? Wird die CEACAM1-vermittelte Immunantwort durch von Darmepithelien sekretierten löslichen Proteinen nach einer Infektion von *C. albicans* beeinflusst? Beeinflusst CEACAM6 die Immunantwort von CEACAM1 auf die *C. albicans* Infektion?

## 4 Materialien

Im folgenden Kapitel werden die Materialien aufgeführt, die für die Forschungsarbeit relevant sind.

### 4.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
<b>Zellkultur</b>	
10 cm Zellkulturschalen, 12-well-Transwell-Einsätze, Polycarbinat 3 µm Poren	VWR International GmbH (Corning), Darmstadt, Deutschland
Absauggerät VACUSAVE	Integra Biosciences
BD BioCoat™ 25cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	BD Biosciences, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
BD BioCoat™ 6well- und 48well- Platten	BD Biosciences, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
CO <sub>2</sub> - Inkubator Galaxy 170S	NewBrunswick Eppendorf AG
Millipore Amicon Ultra-4 ml Ultracel-3 membrane,3 kDa; (Filtration)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Neubauer Zählkammer	VWR International GmbH, Dresden, Deutschland
Ausschwingrotor A-4-81	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sicherheitswerkbank Maxisafe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Stereomikroskop Primo Vert	Carl Zeiss MicroImaging GmbH
Wasserbad TW20	Julabo Labortechnik GmbH
<b>Bakterien- und Hefekultur</b>	
10 cm Petrischale	BD Falcon
Biophotometer 6132 plus	Eppendorf AG (OD-Messung von Bakterien und Hefesuspensionen)
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERA cell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einmal Impfösen 10µl, steril	VWR International GmbH
Haereus Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific Inc.
Inkubationsschüttler I26	New Brunswick Eppendorf AG
Petrischalenspatel Delta, steril	Carl Roth GmbH
Sicherheitswerkbank HERA safe	Thermo Fisher Scientific Inc.
Sterile Wattestäbchen	NOBA Verbandmittel Danz GmbH Co KG
UV-Iluminator UVC500 Crosslinker	Amersham BioScience UK Ltd.
<b>Molekularbiologische Methoden</b>	
Corbett Rotor-Gene 6000	Corbett Life Science, Qiagen GmbH
NanoDrop D-1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc
Pipettierroboter CAS-1200	CorbettLife Science, Qiagen GmbH
S1000TM Thermal Cycler	BioRad Laboratories
<b>Durchflusszytometrie</b>	
Attune® Cytometer	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

FACS Aria II	BD Biosciences
<b>Sonstiges</b>	
Autoklav Varioklav 135 S	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA
Drehrad-Rotator SB3	Stuart-Equipment, UK
Epithelial-Volt-Ohm-Meter EVOM2	WPI, Welt-Präzisionsinstrumente, Berlin, Deutschland
Falcon (15 ml/50 ml) cellstar tubes, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Infinite <sup>®</sup> M200 (Adsorptions- und Lumineszenzmessungen)	Tecan Group Ltd.
Nitrozellulose-Transfermembran	Thermo Fisher Scientific Inc
NuncImmunoMaxisorp-96well-Flachbodenplatte	VWR International GmbH
Pipetboy	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Pipetten Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (10/20 µl, 200 µl, 1000 µl)	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Polymax 2040 (Taumelnder Plattformschüttler)	Heidolf Instruments GmbH & Co.KG
Powerpac <sup>TM</sup> HC Power Supply (Stromversorgung in Acrylamidgel- und Agarosegelelektrophorese)	BioRad Laboratories, Inc
Präzisionswaage EWB 620-2M	Sartorius
Thermomixer COMPACT_5350 (Aufkochen von Proben)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge D-6015	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Tubes (1.5 ml) Safe-Lock	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
UV- Transluminator Fusion Fx7 (Chemilumineszenzmessung, Western Blot und Fluoreszenzmessung in Agarosegelen)	PeQlab Biotechnologie GmbH
Verschlussfolien für Mikrotiterplatten (ELISA)	VWR International GmbH (Corning), Darmstadt, Deutschland
Vortexer, Vortex Genuis 3	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Western Blot Equipment (Mini-Protean Tetra Gel, Mini-Trans- Blot Electrophoretic Transfer Cell, Mini-Protean TGX Gels 4-15%, 15well)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zellheber	VWR International GmbH (Corning), Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge 5418 R und 5804 R	Eppendorf AG

## 4.2 Software

Tabelle 2 Software

Software	Verwendung	Hersteller
Adobe Photoshop CS2	Bearbeitung der Western Blots	Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland
Attune® cytometric software Attune v2.1	Analyse der FACS-Analyse	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BD FACS Aria II	Analyse der FACS-Analyse	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
FlowJo V10	Analyse der FACS-Analyse	FLOWJO, LLC, Ashland, OR, USA
Fusion FX7 imager FX7	Chemilumineszenzmessung, Western Blot und Fluoreszenzmessung in Agarosegelen	PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland
GraphPad Prism 5.04	Statistikauswertung	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Image Studio Light Software V5.2	Auswertung Western Blot	LI-COR Biosciences GmbH

## 4.3 Chemikalien, Medien und weitere Materialien

Bei allen nicht aufgeführten Chemikalien handelt es sich um standardmäßig eingesetzte Substanzen von den Firmen Sigma Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland), Merck-Milipore Chemikalien GmbH (Darmstadt, Deutschland) oder Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland). Diese entsprechen alle den analytischen Reinheitsgraden. Die Medien, Zusätze und weitere Materialien stammen, wenn nicht anders erwähnt, von Gibco, Invitrogen GmbH (Carlsbad, USA) zugehörig zu Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), Lonza Group Ltd. (Basel, Schweiz) und AMS Biotechnology Europa Limited (Abington, UK).

## 4.4 Stammlösungen, Puffer, Medien, Zusätze

Tabelle 3 Medien und Zusätze für Zell-, Bakterien- und Hefekulturen

C2BBe1-Zellen	Komponenten
Vollmedium zur Kultivierung	DMEM (beinhaltet 4 mM L-Glutamin, 4500 mg/L Glukose), 20% FCS (hitzeinaktiviert, Biochrom AG), 1mM Na-Pyruvat, 1500 mg/L NaHCO <sub>3</sub> , 0.01 mg/ml humanes Transferrin, 50 U/ml Penicillin/Streptomycin
Starvierungsmedium	DMEM

Kryokonservierung	Vollmedium DMEM, 5 % DMSO
<b>HeLa-Zellen</b>	
Vollmedium zur Kultivierung	RPMI-Medium, 10% FCS (fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert), 1:100 Penicillin/Streptomycin
Kryokonservierungsmedium	RPMI-Medium, 10% FCS, 5% DMSO
<b>HEK293-Zellen</b>	
Vollmedium zur Kultivierung	DMEM, 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin/Streptomycin
<b>Hefen (<i>C. albicans</i> SC5314, 28a; <i>C. glabrata</i>, <i>S. cerevisiae</i>)</b>	
YPD-Medium und Agar zur Hefekultivierung	20 g/L Pepton, 10g/l Hefeextrakt, 20 g/L Glukose, mit VE-Wasser aufgefüllt, pH-Wert zwischen 5,5-6,0, autoklaviert. Für Kulturplatten zusätzlich 15 g/l Agar.
<b>Bakterien (<i>E. coli</i> DHF<math>\alpha</math>)</b>	
LB (Luria Bertani) -Medium und Agar zur Bakterienkultivierung	Trypton 10g/L, Hefeextrakt 5 g/L, 5 g/L Natriumchlorid, mit VE-Wasser aufgefüllt, pH-Wert 7.0, autoklaviert. Für Kulturplatten zusätzlich 15 g/l Agar

Tabelle 4 Substanzen und Lösungen für Zell-, Bakterien- und Hefekulturen

Lösung/Substanz	Komponenten	Verwendungszweck
1x Lämmli-Puffer	5X-Puffer verdünnen/ 20 mM DTT (1M Stock)	Herstellung von reduzierenden Bedingungen
5x reduzierender Probenpuffer (Lämmli-Puffer)	14.5 % SDS (w/v), 0.3M Tris-HCl pH 6.8, 50 % Glycerol, 0.015 % Bromphenolblau (w/v), 20 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT)	Herstellung von reduzierenden Bedingungen
Ampicillin	Konzentration 100 $\mu$ g/ml	Selektionsantibiotika für Bakterienkulturen
FACS-Puffer	DBPS ohne CaCl <sub>2</sub> /MgCl <sub>2</sub> , 2% BSA	FACS-Analyse
Geneticin	10 Tage 1mg/ml dann 0,5mg/ml	Selektionsantibiotika für stabil transfizierte C2BBel- und HeLa-Zellen
HEPES gepufferte Lösung (HBSM)	20mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub>	Spüllösung für Zellen
PBS-EDTA	DPBS ohne CaCl <sub>2</sub> /MgCl <sub>2</sub> , 0,5 g/l EDTA, pH 7,0-7,2	Waschlösung/Neutralisation der Trypsinlösung bei Zellen

Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)	137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in dH <sub>2</sub> O, pH 7.4	Spülen der Zellen
Proteinase K	7,5µg in 500µl (2*10 <sup>8</sup> <i>C. albicans</i> Zellen)	Vorbehandlung von <i>C. albicans</i> (Novagen® Merck KGaA)
Zymolyase	3 mg in 500µl nassem <i>C. albicans</i> Pellet	Vorbehandlung von <i>C. albicans</i> (AMS Biotechnology (Europe) Limited, Abington, UK)

Tabelle 5 Pull-Down-Assay, Phosphorylierungs-Assay, SDS-Page, Western Blot und Färbungen

Puffer/Substanzen/Lösungen	Komponenten
10x Laufpuffer für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	0,25 M, 30.3 g/L Tris Base, 1,92 M, 144.1 g/L Glycin, 1%, 10 g/L SDS, Auffüllen mit A. dest., pH 8.8
10x Transferpuffer	1,5 M Glycin, 0,2 M Tris, A. dest., pH 8,3,
1x Transferpuffer für Immunoblot (Immer frisch ansetzen)	10%, 100 ml/L 10x Transferpuffer, 700 ml A. dest., 20%, 200 ml/L Ethanol
10x TBS Waschpuffer	1,5 M, 12.1 mg/L Natriumchlorid, 0,1 M, 87.7 mg/L Tris, A. dest., pH 7,6
TBS-T Waschpuffer	(100ml 10x TBS-Puffer in 900 ml A. dest.)1000ml 1x TBS, 0,1%, 1ml/L Tween20
Blockierlösung	5% Milchpulver (w/v) in 1xTBS
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Ratio 1:1 (Thermo Fisher Scientific)
PageRuler Plus Protein Ladder	2µ l/Tasche (Thermo Fisher Scientific)
Lysepuffer für Phosphorylierungs-Assay	HBSM-Puffer (20 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> ), 1% TritonX-100, 1 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)), 1X Protease Inhibitor-Cocktail EDTA-free, 1X Phosphatase Inhibitor Cocktail (beide Sigma Aldrich), 1 mM Na-Pyrophosphat, 1 mM Na-Pervanadat, 100 mM Na-Orthovanadat
<b>Silberfärbung</b>	
Fixierlösung	50% H <sub>2</sub> O, 40% Ethanol, 10% Essigsäure),
Waschlösung	70% H <sub>2</sub> O, 30% Ethanol
Sensitizerlösung	0.02% Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O (w/w)),
Ag-Lösung	100 mM AgNO <sub>3</sub> , 0.02% (v/v) Formaldehyd
Entwickler-Lösung	2% NaCO <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O (w/w), 0.04% (v/v) Formaldehyd

Stopplösung	5% (v/v) Essigsäure, 0.9% EDTA
<b>Coomassie-Brilliant-Blue Färbung R-250</b>	
Färbelösung	0,1% (w/v) Servablau R-250, 30% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure),
Entfärbelösung	30% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure

#### 4.5 Antikörper

Alle in der FACS-Analyse und im Western Blot verwendeten Antikörper werden in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Ein Großteil der Antikörper wurde freundlicherweise von B.B. Singer (Universitätsklinikum Essen) zu Verfügung gestellt.

Tabelle 6: Antikörper

Antikörper	Verwendung	Hersteller
<b>Maus-monoklonale Antikörper</b>		
Maus-anti-humanes CEACAM1 B3-17	FACS-Analyse	B.B. Singer, Essen, Deutschland
Maus-anti-humanes CEACAM1 C5-1X	Western Blot	B.B. Singer, Essen, Deutschland
Maus-anti-humanes CEACAM3/5 308-3-3	FACS-Analyse	B.B. Singer, Essen, Deutschland
Maus-anti-humanes CEACAM6 1H74B	FACS-Analyse	B.B. Singer, Essen, Deutschland
Maus-anti-humanes CEACAM7 BAC2	FACS-Analyse/Western Blot	B.B. Singer, Essen, Deutschland
Maus-anti-humanes CEACAM8 6-40/c	FACS-Analyse	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Deutschland
Maus-anti-pan-humanes CEACAM1/3/4/5/6/8	Western Blot	B.B. Singer, Essen, Deutschland
Anti-Ratte CEACAM1 Be 9.2	Western Blot	B.B. Singer, Essen, Deutschland
Anti-Maus CEACAM1 MSCC1-MAB	Western Blot	B.B. Singer, Essen, Deutschland
Maus-anti-Phospho-Tyrosin 4G10	Western-Blot	Millipore, Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Maus IgG1 Isotyp Kontroll Antikörper	FACS-Analyse	Antibodies-online GmbH, Aachen, Deutschland

Maus-anti humanes TOM20 (FL-145)	Western-Blot (Marker für mitochondriale Außenmembran; Ladungskontrolle)	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Deutschland
Anti- CD 63 (MX-49.129.5)	Western Blot (Marker für extravasikuläre Vesikel)	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Deutschland
<b>Polyklonale Antikörper</b>		
Kaninchen-anti CEA IgG (pan humanes CEACAM)	Western Blot	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Rabbit anti- <i>Candida</i> Antikörper	Western Blot	BP1006; Acris Antibodies Herford, Deutschland
<b>Sekundärer Antikörper</b>		
Ziege-anti-Maus IgG H+L PE-konjugiert	FACS-Analyse	Antibodies-online GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ziege-anti-Maus IgG-HRPO	Western Blot	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Ziege-anti-Kaninchen IgG-HRPO	Western Blot	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

#### 4.6 Rekombinante Proteine

Rekombinantes humanes CEACAM5-Fc wurde von Sino Biological Inc. (Beijing, P.R. China), humanes CEACAM7-His von Abcam plc (Cambridge, UK) und Maus-CEACAM1-His (moCC1) von Hölzel Diagnostika GmbH (Köln, Deutschland) bezogen. Alle weiteren rekombinanten Proteine wurden freundlicherweise durch Bernhard B. Singer (Universitätsklinikum Essen) in HEK293-Zellen produziert und mithilfe von Protein G Kolumnen (GE Healthcare, München, Deutschland) gereinigt. Hierbei wurden die jeweiligen extrazellulären Domänen des Rezeptors: humanes CEACAM1, humanes CEACAM1-dN (fehlende *N-terminal IgV-like domain*), humanes CEACAM3, humanes CEACAM6, humanes CEACAM8 und RatteCEACAM1 (ratCC1) mit der konstanten Region von humanen IgG verbunden. Die Methode wird ausführlich in (Heinrich et al. 2016b, Singer et al. 2014, Klaile et al. 2009) beschrieben.

#### 4.7 Sets und Kits

##### ELISA

Das IL-8 ELISA wurde mit dem humanen IL-8 ELISA Set von BD Biosciences durchgeführt. Hierbei wurde eine Beschichtungslösung (0,1 M Carbonatpuffer pH 9,5, 4,2 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>), 1,78 g Natriumcarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), ad 500 ml A. dest),



ein Waschpuffer (99,95 % DPBS, 0,05% TWEEN20, ein Blockpuffer (90% DPBS, 10% FBS (Biochrom AG)), das TMB ELISA Substrate Solution (eBioscience, Inc.), Stopplösung (1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> oder 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und humaner Fc-Rezeptor-Block (eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet.

## Materialien für Transformation und Transfektion

Tabelle 7: Materialien für Transformation und Transfektion von Zellen

Kit/Substanz	Verwendung	Hersteller
Midi-Prep Kit	Reinigung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i>	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
SOC-Medium	Transformationeffizienzsteigerung bei <i>E. coli</i>	Invitrogen GmbH, Thermo Fisher Scientific Inc.
Lipofectamin LTX & Plus Reagenz	Transfektion von HeLa- und C2BBel-Zellen	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
OptiMem	Medium zur Nutzung während Transfektion	Gibco, Invitrogen GmbH, Thermo Fisher Scientific Inc.

## Materialien für RNA-Extraktion, RT-PCR und qPCR

Tabelle 8 Materialien für RNA-Extraktion, RT-PCR und qPCR

Kit/Substanz/Puffer	Verwendet für	Hersteller
RNeasy Mini Kit	RNA-Extraktion	#74106, Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
RNase free DNase Set	Abbau DNA während RNA-Extraktion	#79254, Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Reverse Transkription (RT-PCR)	#4374967, Applied Biosciences® Life Technologies
RNase- und DNase-freies A. dest.	RT-PCR	Ambion GmbH, life technologies
TE-Puffer, DNase/RNase-frei (10mM Tris-Hcl, 1mM EDTA, pH 7,4, Fluka)	Verdünnung der cDNA	Sigma Aldrich GmbH
SensiMix SYBR No-ROX Master Mix	Analyse qPCR	#QT650, Bioline GmbH
PerefectTaq Plus DNA Polymerase Kit	PCR	#2200075, 5-Prime GmbH

---

## 5 Methode

---

Teile der in der Arbeit verwendeten Methoden wurden bereits ähnlich in (Klaile et al. 2017) publiziert.

### 5.1 Zell- und Mikrobiologische Methoden

Im folgenden Kapitel werden die in der Arbeit verwendeten zell- und mikrobiologischen Methoden beschrieben.

#### 5.1.1 C2BBel-Zellkultur

Die verwendeten C2BBel-Zellen (humane epitheliale kolorektale Adenokarzinomzellen) stammen aus der American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). Es wurden die Passagen 8 bis 26 verwendet. Alle Arbeiten mit der Zellkultur wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% Kohlendioxid und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in mit Kollagen beschichteten Kulturgefäßen im Brutschrank kultiviert.

Als Kulturmedium wurde das Vollmedium auf Basis von DMEM, wie in Tabelle 3 aufgeführt, verwendet. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

Die Passagen der Zellen fanden bei einer Subkonfluenz von ungefähr 80% statt, um eine Kontaktinhibition zu vermeiden und erfolgte durch enzymatisch-proteolytisches Ablösen mit TrypLE Select (10X), no Phenol Red (Life Technologies GmbH). Die Zellen wurden als erstes mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-EDTA, Tabelle 4) gewaschen, um Serumrückstände auf den Zellen zu entfernen, welche zu einer späteren Proteaseinhibition führen könnte. Zudem wurde den Zellen durch das calciumfreie PBS-EDTA Calcium entzogen, was zu einer Lockerung der Zell-Zell-Verbände führte.

Im Anschluss wurde das PBS entfernt, die Zellen wurden mit 10X TrypLE Select für 5-10 min bei 37°C inkubiert und dann möglichst vollständig abgelöst. Die Zellsuspension wurde in Kulturmedium überführt, um die Proteolyse zu reduzieren. Dann wurde die Suspension für 5 Minuten bei Raumtemperatur (20°C) und 170 x g zentrifugiert (Zentrifuge: 5810R), der Überstand abgenommen und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert.

Die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:6 bis 1:10 auf BD Collagen 6 Well-Platten und – Flaschen oder auf 12 Well Transwell-Inserts ausgesät. Dazu wurde die Anzahl der Zellen mithilfe

einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und entsprechend der Dichte verteilt. Für die Experimente wurden die Zellen der 6 Well-Platten ( $10^6$  Zellen) bei 80% Subkonfluenz und der 12 Well Transwell-Inserts ( $10^5$  Zellen) bei 100% Konfluenz verwendet. Die Zellen wurden für die Versuche für 20-24 Tage differenziert, wenn es nicht anders beschrieben wurde.

### 5.1.2 CEACAM1-knockdown C2BBe1- Zelllinien

Für die Herstellung der CEACAM1-knock-down-Zelllinien wurden die C2BBe1-Zellen mit einem Kontrollvektor oder mit shRNA-Vektor (SureSilencing™ shRNA Plasmid for human CEACAM1, # KH00037N; SA Biosciences/Qiagen, Hilden, Deutschland) transfiziert. ShRNA (shorthairpinRNA) ist ein künstliches RNA-Molekül, welches durch eine Interferenz mit der RNA in einer Säugetier-Zelle gezielte Genexpressionen ausschalten kann (Paddison et al. 2002). Hierzu erfolgte zunächst eine Plasmidvermehrung in kompetenten *E. coli* DHF $\alpha$  (Invitrogen) und eine anschließende Plasmidpräparation zur Isolierung der Plasmid-DNA.

#### Vermehrung und Präparation der shRNA Plasmide

Zur Transformation von *E. coli* wurden 40 ng Plasmid-DNA und 50  $\mu$ l *E. coli*- DHF $\alpha$  für 30 Minuten auf Eis inkubiert, danach für 90 Sekunden auf 42°C erwärmt und anschließend für 5 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l SOC Medium und einstündiger Inkubation bei 37°C auf einem Schüttler erfolgte das Ausstreichen auf einer Agarplatte. Der Agar enthielt zur Selektion 50  $\mu$ g/ml Ampicillin. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

Eine Kolonie der bewachsenen Agarplatten vom Vortag wurde gepickt und in einer Übernachtkultur (50 ml LB-Medium plus Selektionsantibiotika 50 $\mu$ l/ml) im Schüttelinkubator bei 37°C unter Selektionsdruck vermehrt.

Die Bakterienkultur wurde bei 6000g für 15 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung der Plasmide nach Herstellerangaben mit dem Midi-Prep Kit von QIAGEN. Die Ausbeute wurde mit NanoDrop (ng/ $\mu$ l) bestimmt und die shRNA-Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamin LTX & Plus Reagenz. Die C2BBe1-Zellen und HeLa-Zellen wurden am Vortag trypsiniert und gezählt. Es wurden je Well einer 6-Well Platte  $2 \times 10^5$  Zellen in 2 ml Kulturmedium ausgesät, damit am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 80 % gegeben ist. Für jedes Well wurde 2,5 $\mu$ g shRNA-Plasmid bzw. DNA-Plasmid (HeLa-Zellen) in 100 $\mu$ l OptiMem pipettiert. Letzteren wurde mit einer Ratio von 1:1 zum Plasmid Plus Reagenz

hinzugefügt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das Lipofectaminreagenz in OptiMem verdünnt. Im Anschluss wurde die DNA-Solution mit der Lipofectamin-Solution mit einer Ratio von 1:1 zusammengefügt, gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Lipofectamin-DNA-Mix wurde kreisförmig und gleichmäßig auf den Platten verteilt mit einer Plasmidmenge von 2500 ng je Well.

Die Optimierung der Transfektion erfolgte durch Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels FACS. Die transfizierten Zellen wurden für 10 Tage in Kulturmedium mit 1mg/ml Geneticin (=G18; Neomycin) und im Anschluss mit 0,5 mg/ml Geneticin selektiert. Die optimale Antibiotikakonzentration wurde in Vortests über Konzentrationsreihen bestimmt. Nach 14 Tagen Selektionsdruck wurden die Zellen mithilfe von CEACAM1-Antikörper (B3-17/PE-konjugierter sekundärer Antikörper; vgl. Tabelle 6) markiert und mit einer FACS-Analyse gesortet (vgl. FACS-Analyse). CEACAM1 positive Zellen konnten anhand ihrer PE-Floureszenz eindeutig identifiziert werden. Die CEACAM1-negativen Zellen wurden von den positiven Zellen mit dem Gerät FACS Aria II Instrument sortiert. Es entstanden beim Sorten drei unterschiedliche Populationen mit einer deutlich reduzierten CEACAM-1-Expression und unterschiedlichen SH-Sequenzen: C2BBe1-SH2, C2BBe1-SH3 und C2BBe1-SH4 (Abbildung 15).

### 5.1.3 HeLa-Zellkultur

HeLa-Zellen sind humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms und die ersten humanen Zellen, welche als permanente Zelllinie etabliert wurde (Scherer et al. 1953). Die verwendeten HeLa-Zellen stammen aus dem Leibniz Institut DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Deutschland). Es wurden die Passagen 6 bis 22 verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% Kohlendioxid und 95% relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Das Kulturmedium wurde auf Basis von RPMI und wie in Tabelle 3 aufgezeigt, verwendet. Der Mediumwechsel erfolgt jeden zweiten Tag. Das Passagieren erfolgte wie bei der C2BBe1-Zelllinie mit 1X TrypleSelect.

#### Transfektion der HeLa-Zellen

Die HeLa-Zellen enthalten keine humanen CEACAM-Rezeptoren und wurden mit einem pRC/CMV-Vektor, welcher die cDNA von humanem CEACAM1-4L, humanem CEACAM1-4L-deltaN (fehlende *N-terminal IgV-like domain*), humanem CEACAM6 und einem Leervektor (Wolfgang Zimmermann, Universitätsklinikum, München, Deutschland) enthielt, transfiziert. Die

Transfektion wurde wie bei der C2BBel-Zelllinie durchgeführt, sodass nach der Selektion mithilfe des FACS-Gerätes vier Zelllinien identifiziert und gesortet werden konnten (Abbildung 12).

#### 5.1.4 Hefekulturen und deren Vorbehandlungen

In den Versuchen wurden zwei unterschiedliche Stämme von *C. albicans* (Berkhout; Stamm SC5314 und C28a/ATCC 10231), *Candida glabrata* (Meyer & Yarrow; Stamm ATCC 2001) und *S. cerevisiae* (BY4741/ATCC 4006913) verwendet. Diese wurden freundlicherweise von Bernhard Hube (Leibniz Institut für Natural Product Research and Infection Biology Hans Knöll Institut (HKI), Jena, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Alle Arbeiten mit *C. albicans* wurden unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt, da dieser Pilz fakultativ humanpathogen ist und in die Sicherheitsstufe 2 eingeordnet wird. Alle Hefen wurden 3-7 Tage vor den Infektionsversuchen auf YPD-Kulturplatten ausgestrichen und für 2 Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Für Übernacht-Kulturen wurde eine Kolonie von den beimpften YPD-Platten in flüssigem YPD-Medium (Tabelle 3) im Falcon oder Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 30°C und 180 rpm im Schüttelinkubator über Nacht angezüchtet. In den Versuchen wurde *C. albicans* Wildtypstamm SC5314 verwendet, außer anders erwähnt.

#### Vorbehandlungen der *C. albicans* Hefezellen

Zur Herstellung von *C. albicans*-Keimschläuchen wurde eine Kolonie von einer YPD-Platte in RPMI-Medium im Erlenmeyerkolben bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator angeimpft. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde die Keimschlauchbildung bis zu einer Länge von 10-20µm bis zu 2,5 Stunden Dauer durchgeführt.

Für die UV-Inaktivierung wurde 5 ml Übernachtkultur in der Zentrifuge bei 3000g pelletiert und mit PBS gereinigt. Im Anschluss wurden die Pilze in 20 ml PBS in einer 15 cm Schale im UV-Illuminator mit 2 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt.

*C. albicans* Zellen wurden zur Hitzeinaktivierung mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS bei 65°C und 1200 rpm 5 min in einem Heizblock erhitzt. Lebende und inaktivierte Zellen wurden vor den Versuchen zweimal mit PBS gereinigt.

Proteinase K ist eine unspezifische Protease und wurde in unseren Versuchen zur näheren Betrachtung des Bindungsverhaltens von CEACAM-Rezeptoren zu den proteinären Oberflächenstrukturen von *C. albicans* verwendet. 2\*10<sup>8</sup> *C. albicans* Zellen wurden nach einer Reinigung mit PBS mit 7,5µg Proteinase K in 500 µl für 1 Stunde bei 37°C behandelt und im

Anschluss dreimal mit PBS gewaschen. Zymolyase hat einen starken lytischen Effekt auf die Zellwände von lebenden Hefen (Kitamura et al. 1971) und hydrolysiert mithilfe eines Enzyms lineare Glukosepolymere an beta1,3-Verbindungen, weswegen es in unseren Experimenten zur Deglykosylierung verwendet wurde (Kitamura und Yamamoto 1972). In unseren Versuchen wurden 500µl nasse *C. albicans* Pellets in 1 ml PBS gelöst und entweder unbehandelt oder mit 3 mg Zymolyase für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Hefezellen wurden in einer Zentrifuge bei 3000 x g für 2 min abzentrifugiert und die Überstände abgenommen. Diese wurden nochmals weiter mit einer Ultrazentrifuge bei 16.000 x g für 10 min bei 4°C aufgereinigt. Die gesäuberten Überstände wurden im Anschluss für 8 min unter reduzierenden Bedingungen (Lämmli-Puffer: Tabelle 4) bei 99°C im Wasserbad erhitzt. 15 µl wurden auf einem 15 Well Mini-Protean TGX Gel 4-15% laufen gelassen und entweder auf Nitrocellulosemembranen mit einem polyklonalen rabbit anti- *Candida albicans* (Tabelle 6) mit Western-Blot analysiert, mit Coomassie Brilliant Blau Färbung oder Silberfärbung (Tabelle 5) untersucht.

#### 5.1.5 Analyse von C2BBel Zellkulturüberstand, Mukusfraktion und Zellysate

Die Zellen wurden für 21 Tage in 6-Well Zellkulturplatten angezüchtet (siehe C2BBel-Zellkultur) und in 2 ml Medium aufgenommen. Es wurde Phenolrot-freies Medium verwendet, um die nachfolgende Ultrazentrifugationsanalyse nicht zu stören. Die C2BBel-Zellen wurden anschließend für 72 Stunden mit *C. albicans* stimuliert. Nach der Inkubation wurde der Zellkulturüberstand (ZKÜ) vorsichtig ohne Zerstörung der Schleimschicht (Mukusschicht) entfernt. Die Zellen wurden zweimal gründlich mit 1 ml vorgewärmter phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen (PBS, 37°C) und die beiden Waschfraktionen (Mukusfraktion) wurden gesammelt und zusammengeführt. ZKÜ und Mukusfraktion wurden von Zelltrümmern und Zellabfällen durch Zentrifugation bei 16.000xg für 10 min bei 4 ° C gereinigt. Die Überstände wurden in neue Röhrchen überführt und entweder direkt zur Analyse verwendet oder ultrazentrifugiert. Die direkte Analyse umfasst Experimente mit Western Blot und IL-8 ELISA. Für die Ultrazentrifugation wurden die Proben mit PBS bis zu einem Endvolumen von 5 ml aufgefüllt und anschließend für 90 min bei 100.000 xg zentrifugiert. Die Überstände wurden in Amicon Ultra- Zentrifugen-Filtereinheiten überführt und in einem Schwingbecher-Rotor bei 3.500 xg vor der Western-Blot-Analyse konzentriert. Die Pellets wurden direkt in 1x reduzierendem Probenpuffer (Tabelle 4) gelöst. Die Zellen wurden in 300 µl eiskaltem Lysepuffer (Tabelle 5) aufgenommen, homogenisiert und nach Zugabe von einem Protease-Inhibitor (Roche cOmplete™, EDTA-freie homogenisiert Cocktail-Tabletten Protease-Inhibitor; Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

Steinheim, Deutschland) für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben bei 4° C für 10 min durch Zentrifugation bei 16.000xg gereinigt und für die Western-Blot-Analyse verwendet.

#### 5.1.6 Durchflusszytometrie und FACS-Analyse

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften und wurde in unseren Versuchen zur Bestimmung der Oberflächenexpression von CEACAMs auf C2BBel-Zellen und HeLa-Zellen verwendet. Die verschiedenen Zelllinien wurden vor der hier beschriebenen Analyse mittels FACS (fluorescence-activated cell sorting) auf das Vorhandensein/Abhandensein der gewünschten CEACAMs hin angereichert.

Für die durchflusszytometrische Analyse der mit einem pRC/CMW Vektor transfizierten HeLa-Zellen (CEACAM1-4L, CEACAM,1-4L mit fehlender N-terminalen IgV-ähnlichen Domäne, CEACAM6, Leervektor) wurden konfluente in 75 cm-Flaschen gewachsene HeLa-Zellen verwendet. Vor dem Ablösen wurden die  $10^6$  Zellen der Zellkulturflaschen mit 10 ml PBS-EDTA (0,5 g/l EDTA; 37°C) gewaschen und mit 4 ml 1x TrypLE Select (1:10, 10x TrypLE Select: PBS-EDTA) für 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit einer Pipette vereinzelt, die abgelösten Zellen in 6 ml RPMI-Medium aufgenommen und für 2 min bei 180xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in kaltem FACS-Puffer (Tabelle 4) aufgenommen und alle folgenden Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Für die zytometrische Analyse wurde eine 96-Well Mikrotiterplatte mit konischem Boden verwendet und in jedes verwendete Well 100 µl des entsprechenden Primärantikörpers mit einer Konzentration von 10µg/ml in FACS-Puffer vorgelegt. Zu den vorgelegten Antikörpern wurde 100µl der jeweiligen Zelllinie hinzupipettiert ( $2 \times 10^5$  Zellen in 100µl FACS-Puffer). Die Zellen wurden zuvor mithilfe der Neubauerkammer gezählt und auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in FACS-Puffer eingestellt. Als Isotyp-Kontrolle wurde in allen durchflusszytometrischen Analysen der Maus-IgG1κ-Kontroll-Antikörper verwendet. Als nächstes erfolgte eine Inkubation der Primärantikörper für 1 Stunde bei 4°C, wobei darauf geachtet werden musste, dass die Proben alle 15 min durch Pipettieren vermischt wurden, damit die Antikörper an alle Zellen gelangen und binden können. Im Anschluss wurde die Platte bei 180xg für 2 min zentrifugiert, die Überstände abgenommen und die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Im folgenden Schritt wurden die Zellen in 200 µl Sekundärantikörper-Lösung aufgenommen. Diese bestand aus dem Ziege-anti-Maus IgG PE-gekoppelten Antikörper, welcher 1:300 in FACS-Puffer aufgenommen wurde. Danach wurden die Zellen wieder für 1 Stunde bei 4°C inkubiert und währenddessen auf eine mehrmalige

Durchmischung der einzelnen Wells geachtet. Nun wurde die 96-Well Mikrotiterplatte bei 170xg für 2 min zentrifugiert, die Überstände abgenommen, die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Mikrotiterplatte wurde mit Attune Cytometer analysiert. Hierfür erfolgte die Grundeinstellung mit ungefärbten und unbehandelten Zellen und die anschließende Auswertung und Darstellung mit der Software Attune Cytometric (Tabelle 2).

Die durchflusszytometrische Analyse der C2BBel-Zelllinien (Wildtyp, Vektorkontrolle, CEACAM1-knock-down SH2, SH3 und SH4) auf ihre CEACAM-Oberflächenexpression erfolgte nach einer Kultivierung von 21 Tagen in der Zellkulturschale und nach dem gleichen Protokoll, aber unter Verwendung der humanen monoklonalen Primärantikörper CEACAM1(B3/17), CEACAM5 (308-3-3) und CEACAM6 (1H7-4B) und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus IgG-PE (Tabelle 6, Tabelle 9). Des Weiteren wurde die C2BBel-Zelllinie vom Wildtyp 14 Tage in der Zellkulturschale kultiviert und eine durchflusszytometrische Analyse von CEACAM1 (B3/17), CEACAM5 (308-3-3) und CEACAM6 (1H7-4B) und CEACAM7 (BAC2) und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus IgG-PE (vgl. Tabelle 6, Tabelle 9) unbehandelt, mit 100ng/ml IFN $\gamma$  oder mit 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach 48 Stunden Stimulationszeit durchgeführt. Hierbei erfolgten zwei Stimulationen zum Zeitpunkt 0 und nach 24 Stunden.

Tabelle 9 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper der FACS-Analyse von verschiedenen HeLa-Zelllinien und C2BBel-Zellen

HeLa-Zellen	Primär-Ak	Sekundär-Ak
Leervektor	6G5J (anti-CEACAM1/3/4/5/6/8)	Ziege-anti-Maus IgG-PE
CEACAM1-4L	B3/17 (CC1)	
CEACAM1-dN	Polyklonaler panCEA (anti-CEACAM1/3/4/5/6/8)	
CEACAM6	1H7-4B (anti-CEACAM6)	
CEACAM7	BAC2	
Unbehandelte Zellen	keinen	

### 5.1.7 Adhäsionsassay mit HeLa- und C2BBel-Zellen

Bei diesem Nachweisverfahren wurde getestet, ob *C. albicans* an HeLa-Zellen oder an C2BBel-Zellen bei unterschiedlichen CEACAM-Expressionen adhäreren. Die unterschiedlich transfizierten HeLa-Zelllinien: Leervektor, humanes CEACAM1-4L, humanes CEACAM1-dN, humanes CEACAM6 oder Wildtyp wurden in Kollagen beschichteten 48-Well-Platten konfluent gezüchtet und 60 min lang mit 10<sup>4</sup> *C. albicans* Hefezellen inkubiert. Die C2BBel-Zellen wurden in einer 48-Well- Platte für 3 Tage differenziert und sorgfältig mit warmem Medium gewaschen, um den Mukus von den Enterozyten zu entfernen. *C. albicans* Hefezellen wurden entweder für 2



Stunden mit dem Zellkulturüberstand der unbehandelten C2BBel-Zellen vorbehandelt oder mit dem Zellkulturüberstand von C2BBel-Zellen, welche für 72 Stunden mit UV-behandelten *C. albicans* stimuliert wurden, vorbehandelt. Im Anschluss wurden die C2BBel-Zellen mit  $10^4$  *C. albicans* Hefezellen 30 min inkubiert. Die Zellen wurden nach der jeweiligen Inkubationszeit drei Mal mit warmen PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurde in jedes Well 200µl PBS/0,5% TX100 zugegeben, um adhärenzte *C. albicans*-Zellen löslich zu machen. Gelöste Zellen wurde auf YPD-Platten ausgestrichen, für 24- 48 Stunden im Brutschrank bei 30°C inkubiert und im Anschluss wurden die Kolonien der Platten ausgezählt.

### 5.1.8 FITC-Dextran Translokation

Um Unterschiede in Zellpermeabilität und Zelltransport von den unterschiedlichen C2BBel-Zelllinien (Wildtyp, Vektorkontrolle, CEACAM1-knock-down SH2, SH3, SH4) zu untersuchen, wurde die Substanz FITC-Dextran eingesetzt. Hierzu wurden C2BBel-Zellen in dreifacher Ausführung in 12-Well Transwell-Filtern angezüchtet. Die Verwendung von phenolrotfreiem Medium reduziert Störungen bei der nachfolgenden nm-Messung. In der oberen Kammer (apikale Seite) wurde eine Flüssigkeitsmenge von 500µl eingesetzt und in der unteren ein Volumen von 1500µl. Es wurden 0.5 mg FITC-Dextran (4kDa) zur apikalen Zellseite bzw. zur oberen Kammer hinzugefügt und für 24 Stunden inkubiert. Die Proben wurden von der basalen Zellseite bzw. aus der unteren Kammer eingesammelt. Im Anschluss wurde den Proben 1/10 Volumen Tris-HCl, pH 8.0 hinzugefügt, um den pH-Wert so einzustellen, dass die Fluoreszenzintensität des FITC-Dextran nicht zu stark variiert. Die Proben wurden mit einem Tecan INFINITE M200 Mikrotiterplattenreader auf ihre Fluoreszenz analysiert (Anregung 493 nm, Emission 518 nm; Messbereich: 0.016 bis 200 µ/ml).

### 5.1.9 TEER-Messung

Wildtyp-Zellen, Vektorkontrollzellen und CEACAM1-knock-down C2BBel-Zellen wurden auf 12-Well-Transwell-Einsätzen in Vollmedium oder phenolrotfreiem Vollmedium kultiviert. In der oberen Kammer der Transwell-Einsätze wurde 500µl Medium und in der unteren Kammer 1500µl Medium eingesetzt. Der epitheliale elektrische Widerstand (TEER) wurde in unbehandelten Zellen und in mit UV-inaktivierte *C. albicans* Hefezellen behandelten Zellen gemessen. Der TEER wurde mit einem Epithelial-Volt-Ohm-Meter EVOM2 (WPI, Welt-Präzisionsinstrumente, Berlin, Deutschland) gemessen. Für die Analyse der TEER-Werte wurde ein Blindfilterwiderstand (100 Ω) subtrahiert. Alle Messungen wurden mindestens an drei verschiedenen Wells durchgeführt.

## 5.2 Molekularbiologische Methoden

Im folgenden Kapitel werden die in der Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Methoden erläutert.

### 5.2.1 Methoden zum Nachweis von Proteinen

#### CXCL8 (IL-8) ELISA

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, welches mithilfe eines enzymatischen Immunadsorptionsverfahren (EIA) humanes IL-8 nachweisen kann.

Im ersten Versuchsabschnitt wurden die C2BBel-Zellen entweder unbehandelt gelassen oder 72 Stunden mit UV-behandelten *C. albicans* inkubiert. Hierbei wurden C2BBel Wildtypzellen, Vektorkontrollzellen und die drei CEACAM1-knockdown Zelllinien (SH2-Zellen, SH3-Zellen und SH4-Zellen) verwendet. Diese wurden in Zellkulturplatten und Transwell-Filtern kultiviert. Transwell-Filter bieten den Vorteil einen unabhängigen Zugang zu beiden Seiten der Zellschicht zu ermöglichen, damit können zum Beispiel *in-vitro* Transportvorgänge näher analysiert werden. Die Inkubation der Zelllinien mit *C. albicans* UV-behandelt erfolgte in den Transwell-Filtern apikal und das Medium wurde nach 72 Stunden aus der unteren Kammer entnommen.

Im zweiten Versuchsabschnitt wurde überprüft, ob die C2BBel-knockdown CEACAM1-Zellen SH2, SH3 und SH4 IL-8 noch sekretieren können. Hierzu wurde alle Zelllinien inklusive Wildtyp und Vektorkontrolle mit einem Zytokinmix (25 ng/ml IL-1  $\beta$ , 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , und 50 ng/ml IFN- $\gamma$ ) stimuliert.

Im dritten Versuchsabschnitt wurde der Einfluss von löslichen Faktoren ausgeschüttet von C2BBel-Zellen nach Infektion mit *C. albicans* untersucht. C2BBel-Zellen wurden in Zellkulturplatten kultiviert und für die IL-8-Analyse unbehandelt, mit UV-behandelten *C. albicans* SC5314, mit Medium von mit lebenden *C. albicans* SC5314 vorbehandelten C2BBel-Zellen (konditioniertes Medium) oder mit konditioniertem Medium und UV-behandelten *C. albicans* für 96 Stunden inkubiert.

Im vierten Versuchsabschnitt wurde der Einfluss von löslichem rekombinanten CEACAM6-Fc auf die IL-8 Ausschüttung durch *C. albicans* getestet. Es wurden C2BBel-Zellen vom Wildtyp in Zellkulturplatten kultiviert. Diese wurden unbehandelt, mit UV-behandelten *C. albicans* SC5314 Hefezellen, mit UV-behandelten *C. albicans* SC5314 Hefezellen und 30  $\mu$ g/ml CEACAM6-Fc oder mit UV-behandelten *C. albicans* SC5314 Hefezellen und 30  $\mu$ g/ml CEACAM8-Fc inkubiert. Nach 52 Stunden wurde der Überstand entnommen und es erfolgte die Messung der IL-8-

Konzentration. Überstände wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und auf CXCL8 Konzentrationen durch ELISA getestet.

Für den ELISA wurde in einer 96-Well BD Falcon Platte 100µl "capture" Antikörper je Well verteilt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Wells 3 Mal gewaschen, wobei jedes Mal zwischen den Waschschritten die komplette Flüssigkeit aus den Wells entfernt wurde. Im nächsten Schritt wurden zur Blockierung in jedes Well 200µl Assay Diluent (Blockpuffer) pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der folgende Schritt umfasste wiederum ein dreimaliges Aspirieren und Waschen. In jedes Well wurde im Anschluss 100µl des Überstands oder der Standardlösung pipettiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der nächste Wasch- und Aspirationsschritt umfasste eine 5-fache Wiederholung. Es wurde anschließend 100 µl Detektions-Antikörper und Sav-HRP in jedes Well pipettiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde jedes Well 7 Mal gewaschen und aspiriert, wobei bei den Waschschritten die Wells 30 Sekunden-1 Minute mit der Waschlösung einwirken sollten. Nun wurde in jedes Well 100 µl Substrat Solution (Tetramethylbenzidine: TMB und Hydrogenperoxid) pipettiert und für maximal 30 min bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubiert. Hierbei musste auf den Farbumschlag geachtet werden, um dann in jedes Well 50 µl Stop Solution zu pipettieren und die Proben im ELISA-Reader bei 450 nm innerhalb von 30 min zu analysieren. Hierbei sollte eine  $\lambda$ -Korrektion bei 570 nm erfolgen.

### 5.2.2 Methoden zum Nachweis von RNA und DNA

Die CEACAM-Expression von auf Zellkulturplatten gezüchteten 21 Tage differenzierte C2BBel-Zellen wurde mittels qPCR (quantitative Real-Time PCR) analysiert. Es wurde die Expression von humanem CEACAM5, CEACAM6, CEACAM 7 (keine Unterscheidung zwischen den beiden Isoformen) und die vier großen CEACAM1 Isoformen (1-4L, 1-4S, 1-3L, 1-3S) bestimmt. Hierzu erfolgte eine RNA-Extraktion, eine Reverse Transkription, Primerdesign, Test der Primereffizienz und eine qPCR. Zur Kontrolle wurden Pepitidylprolylisomerase B (PPIB) und Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) verwendet. Die Methode wurde wie in (Klaile et al. 2013) beschrieben, durchgeführt und Materialien, wie in Tabelle 8 verwendet.



**Abbildung 3:** Schema der Analyse der CEACAM-Oberflächenexpression von C2BBel-Zellen und HeLa-Zellen mittels RNA

### 5.3 Proteinbiochemische Methoden

Im folgenden Kapitel werden proteinbiochemische Methoden, welche in den Versuchen Anwendung fanden, beschrieben.

#### 5.3.1 Pull-down Bindungs Assay

Das *Pull-down* Assay ist eine *in-vitro* Methode zu Detektion von physikalischen Interaktionen zwischen zwei oder mehr Proteinen. In unseren Versuchen wurde die Bindung von verschiedenen Hefearten,-formen und Vorbehandlungen zu verschiedenen CEACAM-Rezeptoren untersucht. Pull-down-Assays wurden mit  $2 \times 10^8$  lebenden Pilzzellen in Hefe- oder Keimschlauchform von Übernachtskulturen durchgeführt. Die verschiedenen Vorbehandlungen sind im Kapitel 6.1.4 aufgeführt. Die eingesetzten rekombinanten Proteine bestehen aus der entsprechenden extrazellulären Domäne des CEACAM-Rezeptors (humanes CEACAM1-Fc, CEACAM1-dN-Fc mit einer fehlenden *N-terminal IgV-like domain*, CEACAM3-Fc, CEACAM5-Fc, CEACAM6-Fc, CEACAM7-His, CEACAM8-Fc, MausCEACAM1-His, RatteCEACAM1-Fc) fusioniert mit der IgG-Region. Von jedem rekombinanten Protein wurde  $1 \mu\text{g}$  eingesetzt und mit 1 Volumen 100 mM Glycine pH 2.2 vorbehandelt, gevortext und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dies dient zur Spaltung von potenziellen CEACAM-Homodimeren. Nach der Inkubationszeit wurde der pH durch das Hinzufügen von 1 Volumen M Tris-HCl pH 8.0 wiederhergestellt. Die rekombinanten Proteine wurden mit den Pilzzellen (*C. albicans*, *C. glabrata*, *S. cerevisiae*) 2 Stunden auf dem Drehrad bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS/0,1 % Tween20 gewaschen. Hierzu musste zwischen den Waschsritten eine Zentrifugation bei 3000 g, 5 min und Raumtemperatur erfolgen. Die Proben wurden in  $40 \mu\text{l}$  100 mM Glycine pH 2.2 eluiert und  $10 \mu\text{l}$  5x reduzierender Lämmli-Puffer (Tabelle 4) hinzu pipettiert. Die Proben wurden im Anschluss für 5 min bei  $95^\circ\text{C}$  erhitzt. Von jeder Probe wurde ein Volumen von  $20 \mu\text{l}$  für die weitere Analyse über Western Blot, um die Präsenz der rekombinanten Proteine zu analysieren, eingesetzt.

### 5.3.2 Phosphorylierungs-Assay mit C2BBe1-Zellen

Die C2BBe1-Zellen wurden für 7 Tage in mit Kollagen beschichteten 100 mm-Schalen in PBS mit einer Endkonzentration von 0,01% (Kollagenlösung aus Rinderhaut 0,3%; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) differenziert. Die  $10^6$  Zellen wurden in 10 ml serumfreiem DMEM für mindestens 2 Stunden starviert. Während des Starvierens wurde die *C. albicans* Übernachtskultur bei 3000 xg abzentrifugiert und in der Neubaukammer gezählt und auf eine geeignete Zellkonzentration gebracht. Zusätzlich wurden *C. albicans* Keimschläuche hergestellt. Die C2BBe1-Zellen wurden mit einer MOI (multiplicity of infection) von 100 ( $10^9$ ) für max. 3 Stunden stimuliert. Hierbei gab es Stimulationslängen von 2 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min 120 min und 180 min für *C. albicans* Hefezellen und Inkubationslängen von 15 min, 30 min und 90 min für *C. albicans* Keimschlauch. Als Negativ-Kontrolle wurden unbehandelte Zellen ohne *C. albicans* Stimulation verwendet und als Positiv-Kontrolle für die Phosphorylierung 5 min vorbehandelte C2BBe1-Zellen mit 1:500 Pervanadate.

Nach der Stimulation wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Zellen in 1 ml eiskaltem Lyse-Puffer (20 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% TritonX-100, 1 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid), 1X Protease Inhibitor-Cocktail EDTA-free, 1X Phosphatase Inhibitor Cocktail (beide Sigma Aldrich), 1 mM Na-Pyrophosphat, 1 mM Na-Pervanadate, 100 mM Na-Orthovanadat) ohne vorherigen Waschschrift lysiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt, mit einer Pipette homogenisiert und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurden die Lysate bei 16,000 xg 10 min bei 4°C abzentrifugiert.

### 5.3.3 Immunpräzipitation

Die Lysate der C2BBe1-Zellen wurden entweder frisch aufgetaut und vorbereitet oder nach der Phosphorylierung gleich weiterverarbeitet. Die Immunpräzipitation mit CEACAM1-spezifischen Antikörpern erfolgt durch Bindung des Fc-Teils des Immunglobulins an ein Protein G, welches dabei an Sepharose-Beads gekoppelt wurde. Dadurch kann CEACAM1 aus dem Lysat selektiert werden. Je Probe wurden wurden 25 µl Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Life Science) verwendet, welche vor Verwendung drei Mal mit PBS gewaschen wurde, um den Ethanol-haltigen Puffer zu entfernen. Zu der Protein G Sepharose wurden 2 µg des spezifischen Antikörpers von CEACAM1 (B3-17) hinzugefügt. Die Suspension wird für ca. 30 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert, damit der Antikörper sich verteilt und an Protein G binden kann. Aufgetaute Lysate wurden erneut für 10 min bei 16,000 xg abzentrifugiert und die Überstände in

ein neues Reaktionsgefäß überführt. Als Kontrolle dient rabbit-IgG-Isotyp. Die Zellysate wurden mit dem Antikörper/Protein G Sepharose-Gemisch zusammengeführt und für 3- 5 Stunden unter permanenten Drehen bei 4°C inkubiert. Dies ist zur Bindung des CEACAM1-Antikörpers an die C2BBel-Zelloberfläche notwendig. Um unspezifische Proteinbindungen zu entfernen, wurden die Sepharose-Beads drei Mal mit Lyse-Puffer gewaschen. Hierzu wurden die Sepharose-Beads nach Zufügen des Puffers 30 s bei 1000 xg abzentrifugiert, der Überstand erneut abgenommen und der Waschschrift noch zwei Mal wiederholt. Nach dem letzten Waschen wurden die Proben noch einmalmal 30 s bei 1000 xg abzentrifugiert und mithilfe der Hamilton-Spritze alle restlichen Flüssigkeiten entfernt. Die Sepharose-Pellets wurde nach Zugabe von 20 µl 1x reduzierendem Probenpuffer (Tabelle 4) für 5 min bei 95°C und 1300 rpm gekocht und entweder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert oder im Western-Blot (siehe SDS und Western-Blot) auf die Anwesenheit von Phosphotyrosine (4G10-Antikörper) untersucht. Die Membranen wurden danach noch einmal mit polyklonalem pan-CEACAM Antikörper entwickelt.

#### 5.3.4 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Probenanalyse wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Hierzu wurden vorgefertigte 4-15% Polyacrylamid-Gele (15 Well Mini-Protean TGX Gele, Bio-Rad) verwendet. Die Proben liefen unter reduzierenden Konditionen für ca. 40 min bei 200 V durch das Gel (5x reduzierender Probenpuffer) und wurden nach dem Vortexen zu je 20µl aufgetragen. Von dem Marker "PageRuler Prestained Protein Ladder" wurden 2 µl eingesetzt.

#### 5.3.5 Western Blot

Die im SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden im Tank-Blot Verfahren in eiskaltem Wasser bei 280 mA pro Tank für 2 Stunden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und im Anschluss mit 10 % Milchpulver in TBS für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einer Wippe blockiert. Dies diente zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran. Die Milch wurde mit TBS-T gewaschen und der entsprechende primäre Antikörper (Tabelle 6) wurde mit einer Endkonzentration von 0,1µg/ml (in TBS) zur Membran gegeben. Dieser wurde über Nacht auf der Wippe bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung von nicht gebundenem primärem Antikörper wurde die Membran mehrfach mit 1xTBS-T gewaschen und der sekundäre HRP-konjugierte IgG-Antikörper in einer 1:10.000 Verdünnung in TBS hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei 4°C auf der Wippe und wurde anschließend mit 1x TBS-T gewaschen. Der letzte Waschschrift

wird mit TBS durchgeführt, da TWEEN die Aktivität der Peroxidase einschränkt. Zur Ergebnisauswertung wurden die Membranen mit ECL-Substrat (Enhanced Chemiluminescence Substrat, SuperSignal West Pico, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) gleichmäßig benetzt. Das Peroxidasesubstrat setzt sich aus einer Mischung mit der Ratio 1:1 aus Luminol Enhancer Solution und Peroxide Solution zusammen. Die Visualisierung erfolgt durch eine Oxidierung zu  $H_2O_2$  am sekundären Antikörper mit der gekoppelten Meerrettichperoxidase, wodurch das Luminol reduziert wird und die Chemilumineszenz mithilfe des Fusion FX7 Imager (Tabelle 2) unter einer bestimmten Belichtungszeit detektiert werden kann. Die Bilder wurden Photoshop CS2 (Adobe) bearbeitet. Die Analyse der Grafiken erfolgte mit Image Studio Lite Software (V5.2; <http://www.licor.com/bio/blog/software-and-accessories/free-download-image-studio-lite-software>). Hierbei wurde die Leuchtstärke der Banden quantifiziert und mit Microsoft Excel Verhältnisse der Leuchtstärke ausgewertet und dargestellt. Bei der Auswertung des Phosphorylierungsversuchs wurden die Leuchtstärken der Phosphotyrosin-Banden (Blot mit Antikörper 4G10) und der CEACAM1-Banden (Re-Blot mit polyklonalem panCEACAM Antikörper) bei unbehandelten Zellen als 100% Marke gesetzt. Die unterschiedlichen Stimulationszeiten von *C. albicans* Hefezellen und Keimschläuchen wurden auf ihre CEACAM1-Phosphorylierungsmenge analysiert und die relative CEACAM1-Phosphorylierung über den Vergleich zu der gesamten CEACAM1-Menge (unbehandelte Zellen) mit Microsoft Excel bestimmt. Nach diesem Prinzip wurde auch der *Adhäsions-Assay* und der kompetitive Bindungsversuch von CEACAM6 und CEACAM8 zu CEACAM1 ausgewertet. Bei einem Re-Blot wurde die Membran vor Verwendung eines neuen primären Antikörpers mehrere Male mit TBS-T gewaschen.

### 5.3.6 Silberfärbung (Ag-Färbung)

In der Silberfärbung bilden Ag-Ionen Komplexe mit Glutamin-, Asparagin- und Cystin- Resten der Proteine. Die Ag-Komplexe werden durch alkalisches Formaldehyd zu Ag reduziert. Die Silberfärbung ist eine sehr empfindliche Methode zur Detektion von geringen Proteinmengen, die untere Grenze liegt bei 10 ng pro Bande, somit ist sie 100fach sensibler als die Coomassie-Färbung. Sie weist auch Kohlenhydrate, RNA und DNA nach. In unseren Experimenten wurde die Färbung für die mit Zymolyase vorbehandelten *C. albicans* Zellkulturüberstände verwendet. Das Gel wird mindestens 30 min in Fixierlösung gebadet und anschließend mindestens zweimal 20 min in Waschlösung geschwenkt und dann 30 Minuten in A. dest. geschwenkt, wobei hierbei ein Wechsel des A. dest. alle 10 min erfolgen sollte. Die folgenden Arbeitsschritte sollten im

Kühllabor stattfinden. Das Gel 1 min mit Sensitizer-Lösung und dann zweimal 30 sec in A. dest. behandeln. Dann erfolgt eine 20-minütige Inkubation des Gels mit Ag-Lösung, die im Anschluss vollständig entfernt wird und dann dreimal zu je 15 sec in A. dest. gewaschen wird. Nun wird das Gel in Entwickler-Lösung geschwenkt bis die gewünschte Intensität erreicht ist, zum Abstoppen des Färbeprozesses kurz mit A. dest. gespült und 5 min in 5% essigsäurehaltiger Stopplösung inkubiert (Tabelle 5).

### 5.3.7 Coomassie-Brilliant-Blue Färbung

Die Coomassie-Brilliant-Blue Färbung dient der Kontrolle der Proteinbestimmung des Überstands von *C. albicans* Hefezellen bei Vorbehandlung mit Zymolyase. Dafür wurden die Proteingele 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Coomassie-Brilliant-Blue-Färbelösung gefärbt. Die anschließende Inkubation in Entfärber-Lösung machte die Banden im Gel sichtbar. Die Methode hat eine geringere Nachweisgrenze als die Silberfärbung (Tabelle 5).

## 5.4 Statistiken

Die Daten werden als einzelne Datenpunkte dargestellt und die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung werden durch Balken abgebildet. Ein Minimum von drei unabhängigen Experimenten wurde für jeden Datensatz durchgeführt und analysiert. Gepaarte oder ungepaarte zweiseitigen t-Tests bzw. OneWay-Anova Analysen wurden unter Verwendung von GraphPad Prism Version 5.04 für Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt und ein Wert von  $P < 0,05$  als signifikant angesehen. Die Auswertung von Western-Blot und qPCR wird in den jeweiligen Abschnitten beschrieben.



---

## 6 Ergebnisse

---

Teile dieser Ergebnisse wurden bereits in (Klaile et al. 2017) publiziert.

### 6.1 Humane-CEACAM-Rezeptoren binden *C. albicans* und andere Hefen

Bisher ist eine Bindungsspezifität zwischen dem Fungus *C. albicans* und CEACAM-Rezeptoren nicht nachgewiesen. Für die nachfolgenden Experimente sollte überprüft werden, ob eine solche Bindung zustande kommen kann. Eine Bindung mit potenziell folgender Zellaktivierung kann Auswirkungen auf pro-inflammatorische Zellmechanismen haben, wie zum Beispiel die Ausschüttung von Interleukinen. Um die Bindungsspezifität von CEACAM-Rezeptoren zu *C. albicans* und anderen Hefen zu testen, wurden *Pull-Down-Assays* (*in-vitro* Bindungs-Assay) durchgeführt.

Hierbei wurden 1 µg rekombinante Proteine, die aus der betreffenden extrazellulären Domäne von CEACAM bestanden (huCEACAM1, huCEACAM1dN, huCEACAM3, huCEACAM5, huCEACAM6, huCEACAM7, huCEACAM8, MausCEACAM1 und RatteCEACAM1) eingesetzt und deren Bindungsverhalten mit verschiedenen Hefearten und -formen untersucht. Für die nachfolgenden *Pull-Down-Assays* wurden die gleiche Anzahl an Keimschlauchzellen und Hefezellen von zwei unterschiedlichen *C. albicans* Stämmen (*SC5314* und *C28a*), *Candida glabrata* Hefezellen (Stamm 2001) und *S. cerevisiae* verwendet.

In drei unabhängigen *Pull-down* Versuchsdurchläufen konnte anhand von Western-Blots gezeigt werden, dass vier der rekombinanten Proteine, welche humanes CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6 enthielten, die zwei unterschiedlichen *C. albicans* Stämme und Formen (Hefe und Keimschlauch), die *C. glabrata* Hefezellen und *S. cerevisiae* binden (Abbildung 4, (Klaile et al. 2017)). In der ersten Reihe der Abbildung 4A des Western Blots befindet sich die Positivkontrolle, welche aus 5% des Inputs (50ng) der CEACAM-Proteine besteht. Die extrazellulären Domänen von humanem CEACAM7 und CEACAM8 zeigten in der Western-Blot-Analyse keine Bindung zu allen hier getesteten Hefezellen und -formen (Abbildung 4, (Klaile et al. 2017)).

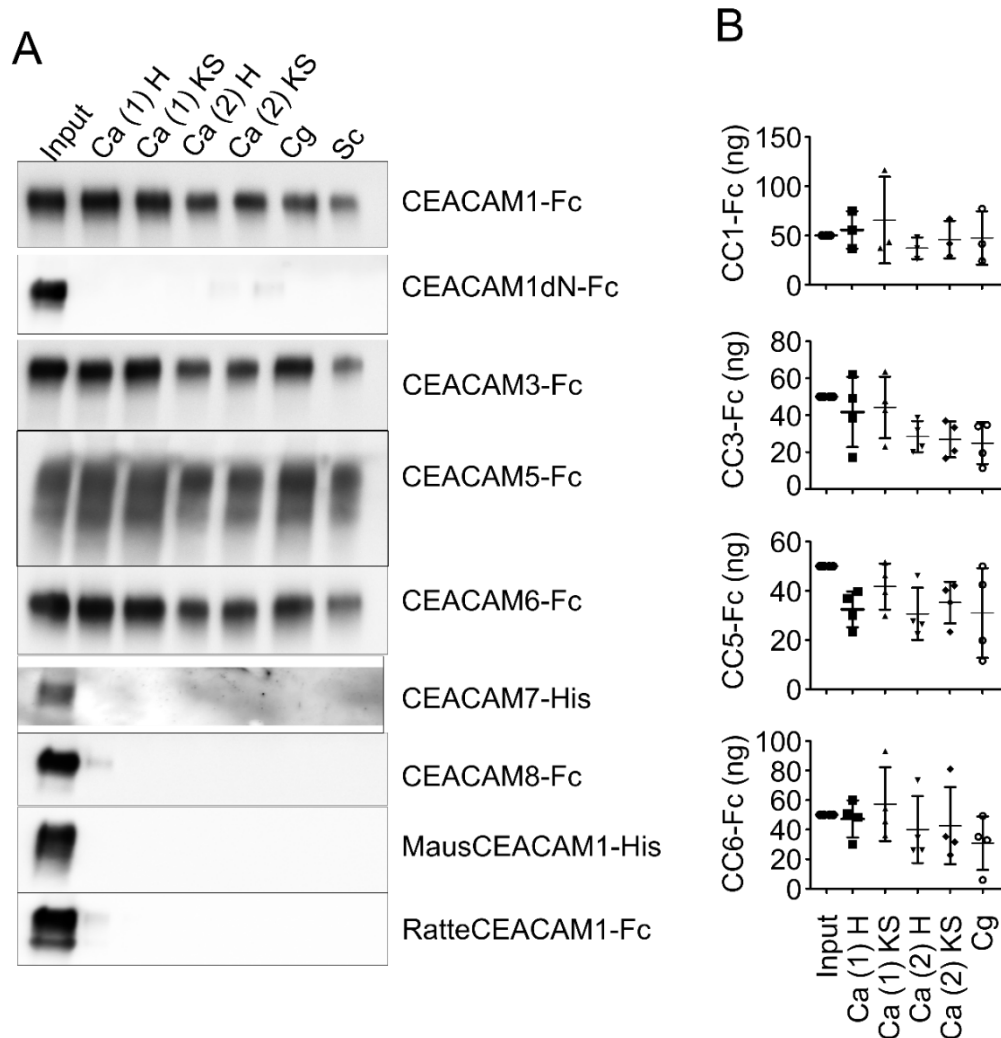
Die Bindung von der extrazellulären Domäne des CEACAM1 erwies sich als human-spezifisch, da die homologen Fusionsproteine RatteCEACAM1 und MausCEACAM1 keine Bindung zu allen getesteten Hefezellen und -formen zeigten (Klaile et al. 2017).

Die meisten Bindungen von Pathogenen zu CEACAMs werden über die *N-terminal IgV-like domain* vermittelt. Aus diesem Grund wurde ein rekombinantes humanes CEACAM1-Fc Protein

eingesetzt, dessen N-terminale Region deletiert wurde (CEACAM1dN-Fc), um die Interaktion von CEACAM1 mit *C. albicans* zu analysieren. In Abwesenheit dieser N-terminalen Domäne konnte keine spezifische Bindung mit den getesteten Formen und Stämmen von *C. albicans* und *C. glabrata*, sowie *S. cerevisiae*, nachgewiesen werden (Abbildung 4A, (Klaile et al. 2017)). Die *N-terminal IgV-like domain* ist somit für die *C. albicans*-CEACAM Interaktion obligat.

Die Keimschlauchform von *C. albicans* weist eine zur Hefeform dominierende Bindungsaffinität bei CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6 auf (Abbildung 4 B).

Insgesamt konnten wir mithilfe der *Pull-Down-Assays* nachweisen, dass humane extrazelluläre Domänen von CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 und CEACAM6- Rezeptoren *C. albicans* und andere Hefen spezifisch binden, wobei die Bindung von CEACAM1 zu den Hefen über die N-terminale Domäne vermittelt wird. Es konnte keine Bindung zwischen humanem CEACAM7, MausCEACAM1 und RatteCEACAM1 zu den Hefen nachgewiesen werden. In den nachfolgenden Experimenten wurde die Bindung zwischen CEACAM-Rezeptoren und *C. albicans* weitergehend untersucht. Es wurde, wenn nicht anders erwähnt, in allen weiteren Versuchen der Stamm SC5314 und die Hefezellform (Abbildung 4: Ca(1)H) verwendet und werden nachfolgend mit *C. albicans* bezeichnet.



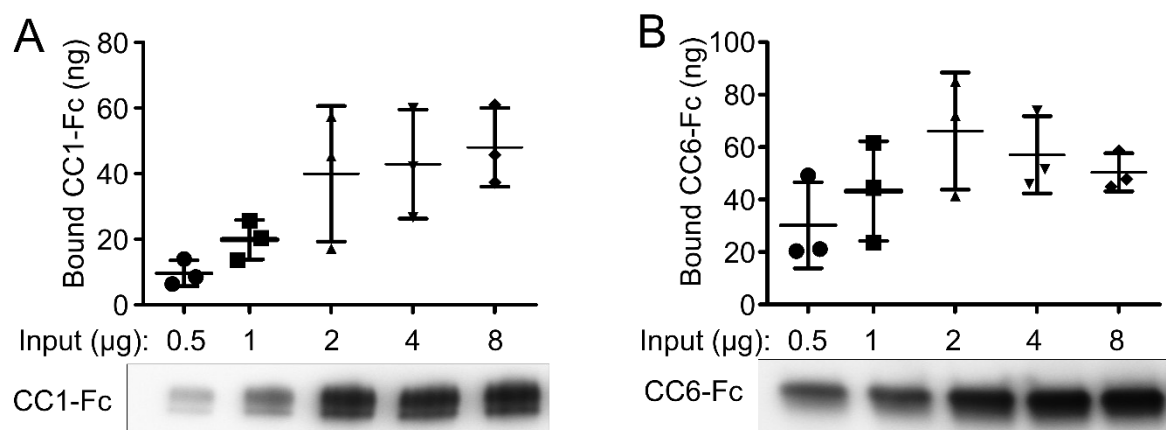
**Abbildung 4:** Humane rekombinante CEACAM-Rezeptoren binden unterschiedliche *Candida*spezies und Formen.

(A), (B) Für die *Pull-Down-Assays* wurde die gleiche Zahl an Hefe (H) und Keimschlauchzellen (KS) von *C. albicans* SC5314 (Ca1) oder *C. albicans* C28a (Ca2), *C. glabrata* 2001 Hefezellen (Kumar et al.) und *S. cerevisiae* (Sc) mit 1µg des spezifischen rekombinanten CEACAM-Protein inkubiert. (A) Gebundene CEACAM-Proteine auf der *Candida*oberfläche wurden mithilfe von Western-Blot analysiert. In der ersten Reihe befindet sich die Positivkontrolle, welche aus 5% des Inputs (50ng) der CEACAM-Proteinen besteht. (B) Quantifizierungen von Western Blots der *Pull-Down-Assays* aus Grafik A unter Verwendung relativer Signalintensitäten, die auf den Input normiert sind. Horizontale Balken= Mittelwert und vertikale Balken= Standardabweichungen. Punkte stellen Einzelwerte von unabhängigen Experimenten dar, Abbildung angelehnt an (Klaile et al. 2017).

## 6.2 Bindung von CEACAM1 und CEACAM6 zu *C. albicans* kann abgesättigt werden

In den folgenden Experimenten wurden die Bindungseigenschaften von *C. albicans* zu CEACAM1 und CEACAM6 näher analysiert. Im speziellen sollte untersucht werden, ob die Bindung abgesättigt werden kann. Um zu testen, ob bei gleichem Einsatz von *C. albicans* Hefezellen ( $2 \cdot 10^8$  Zellen) die Bindungen mit rekombinanten Proteinen von humanen CEACAM1

und humanen CEACAM6 ab einer bestimmten Menge abgesättigt werden können, wurden weitere *Pull-Down-Assays* durchgeführt. Es wurden aufsteigende CEACAM-Proteinmengen verwendet (0,5µg, 1µg, 2µg, 4µg, 8µg). An Oberflächenstrukturen des *C. albicans* gebundene Fusionsproteine wurden mit Western- Blot analysiert (Abbildung 5, Grafik unten) und die Banden quantifiziert. Eine signifikante Zunahme der Bindungskapazität konnte zwischen 0.5 und 2µg nachgewiesen werden (Abbildung 5, (Klaile et al. 2017)). Eine Menge von 4 µg oder 8 µg CEACAM-Protein wies keine Erhöhung der gebundenen Fraktion an *C. albicans* auf. CEACAM6-Fc zeigt in der Präzipitationsbande bereits bei kleineren Mengen von rekombinantem Protein eine höhere Menge an *C. albicans* gebundenem CEACAM6-Fc. Die gebundene Menge von CEACAM6-Fc bleibt auch bei größeren Mengen an verwendetem Rezeptor dominierend im Vergleich zu CEACAM1-Fc (Abbildung 5). Die Bindungskapazität und Absättigung verhielt sich bei beiden rekombinanten Proteinen CEACAM1-Fc und CEACAM6-Fc nahezu identisch. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Bindung beider rekombinanter Fusionsproteine an Oberflächenstrukturen von *C. albicans* absättigbar ist (Klaile et al. 2017).



**Abbildung 5:** Bindung von CEACAM1-Fc und CEACAM6-Fc zu Oberflächenstrukturen von *C. albicans* sind absättigbar.

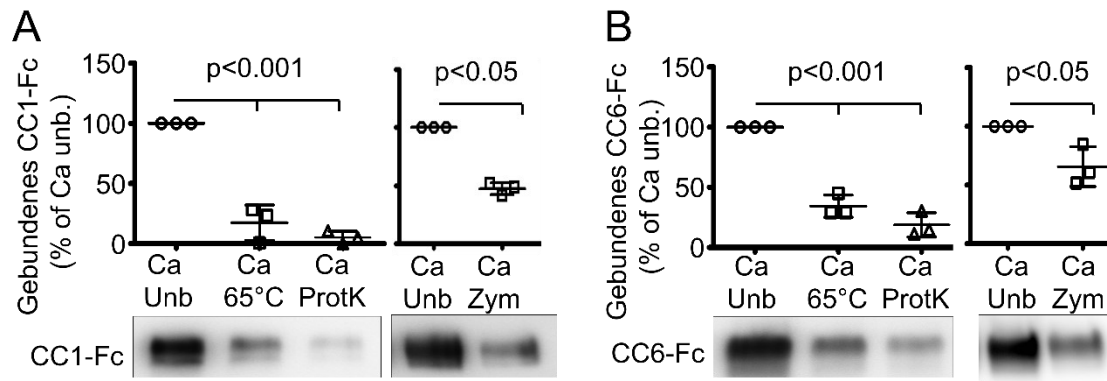
*C. albicans* wurden mit der angegebenen Menge von rekombinanten CEACAM1-(A) und CEACAM6-Protein(B) inkubiert. An Oberflächenstrukturen des *C. albicans* Pilzes gebundene CEACAMs wurden mit Western-Blot analysiert (Grafik unten), die Banden quantifiziert und deren Menge in ng in den oberen Graphen dargestellt. Die Statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen gepaarten t-Test durchgeführt: horizontale Balken= Mittelwert und vertikale Balken= Standardabweichungen. Punkte stellen Einzelwerte von unabhängigen Experimenten dar, Abbildung aus (Klaile et al. 2017).

### 6.3 Die Interaktion von extrazellulären CEACAM-Domänen mit *C. albicans* benötigt intakte Zellwandproteine

Es gibt verschiedene Oberflächenstrukturen auf *C. albicans* die zur Bindung an CEACAM-Rezeptoren beitragen können. Hierzu gehören verschiedene Oberflächenstrukturen, wie

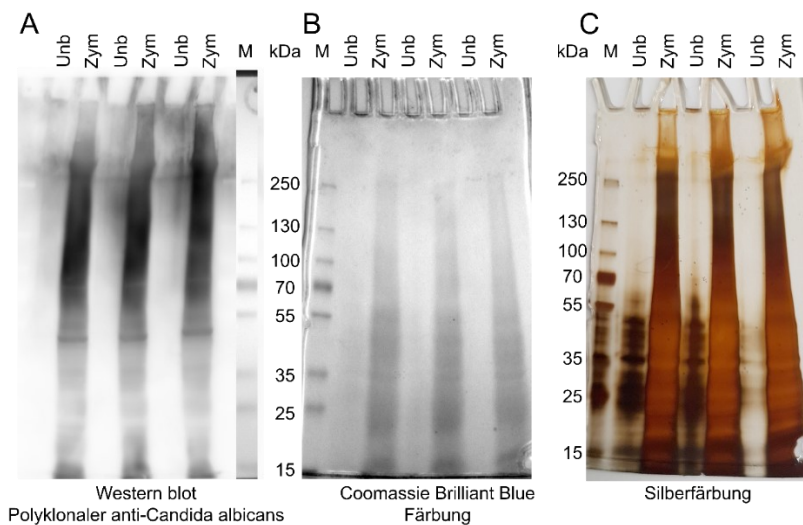
Mannoseproteine, Glucane und Glykoproteine. In unseren Vorversuchen konnte demonstriert werden, dass *C. albicans* verschiedene humane CEACAM-Rezeptoren bindet. In den folgenden Experimenten sollte die Art der Bindung näher untersucht werden. Anhand verschiedener Vorbehandlungen der *C. albicans*-Hefen können bestimmte Oberflächenstrukturen zerstört werden. Die dadurch veränderten Bindungsinteraktionen zwischen *C. albicans* und CEACAM-Proteinen können im Anschluss mit *Pull-Down-Assays* nachgewiesen werden.  $2 \cdot 10^8$  *C. albicans*-Hefezellen wurden bei 65°C in einem Wasserbad für eine Stunde hitzeinaktiviert oder mit 7,5µg Proteinase K bei 37°C zur Spaltung von proteinären Oberflächenstrukturen vorbehandelt. Für eine Stunde bei Raumtemperatur wurde 3 mg Zymolyase eingesetzt, um Oberflächenstrukturen zu deglycosylieren. Die Western-Blot Analyse zeigte eine Reduktion der Interaktion zwischen immunpräzipitierten CEACAM1-Fc und CEACAM6-Fc bei Vorbehandlung der Hefe mit Hitze oder Proteinase K (Abbildung 6A und B, (Klaile et al. 2017)). Eine Vorbehandlung von Zymolyase zur Deglykosylierung von *C. albicans* führte auch zu einer Verminderung der Bindung (Abbildung 6A und B, (Klaile et al. 2017)). Zymolyase übt eine stark lytische Wirkung auf lebende Hefezellwandbestandteile aus. Ein essentielles Enzym für die lytische Aktivität der Zymolyase ist die  $\beta$ -1,3-Glukan Laminaripentohydrolyase, die eine Hydrolyse von  $\beta$ -1,3-Verknüpfungen katalysiert und eine Freisetzung von vielen Zellwandproteinen verursacht (Abbildung 7). Hierzu gehört auch die Zerstörung von glykosylierten Oberflächenproteinen. Für diesen Nachweis wurde *C. albicans* unbehandelt oder mit Zymolyase inkubiert und die Zellkulturüberstände nach Zentrifugation unter reduzierenden Bedingungen erhitzt und anschließend auf einem Mini-Protean TGX Gel aufgetrennt. Anschließend wurde mit Western Blot *C. albicans* Anteile im Zellkulturüberstand nachgewiesen sowie mit einer Coomassie-Brilliant-Blue Färbung Proteine und mit einer Silberfärbung Proteine, Kohlenhydraten und DNA im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Abbildung 7 zeigt, dass die Behandlung von *C. albicans* mit Zymolyase eine Freisetzung von Proteinen, Kohlenhydraten und DNA verursacht (Klaile et al. 2017).

Zusammenfassend zeigte die Versuchsreihe eine Verringerung der Bindung zwischen humanem CEACAM1 und CEACAM6 mit hitzeinaktivierten, mit Zymolyase vorbehandelten und mit Proteinase K vorbehandelten *C. albicans*.



**Abbildung 6:** Bindung von CEACAM1-Fc und CEACAM6-Fc benötigt intakte Zellwand von *C. albicans*

Western Blot-Analysen zeigen die Ergebnisse von *Pull-Down-Assays* mit CEACAM1-Fc (A) oder CEACAM6-Fc (B) mit verschiedenen Vorbehandlungen, wie Hitze (Ca 65°C), Proteinase K (CaProtK) und Zymolyase (CaZym) von *C. albicans*. Die Menge von gebundenem CEACAM1-Fc (A) und CEACAM6-Fc (B) wurde quantifiziert und die betreffenden Mengen mit der Menge von unbehandelten *C. albicans* (=100%) verglichen (siehe obere Graphen). Die Statistische Analyse wurde jeweils mit einem zweiseitigen gepaarten t-Test im Vergleich zu unbehandelten Zellen durchgeführt: horizontale Balken= Mittelwert und vertikale Balken= Standardabweichungen. Punkte stellen Einzelwerte von unabhängigen Experimenten dar. Abbildung aus (Klaile et al. 2017).



**Abbildung 7:** Zymolyase setzt Proteine aus der Zellwand von *C. albicans* frei.

*C. albicans* wurde unbehandelt oder mit Zymolyase inkubiert und die Zellkulturüberstände nach Zentrifugation mit einem Gel aufgetrennt. (A) Western Blot mit Verwendung eines anti-*Candida-albicans* Antikörper zeigen einen Nachweis von *C. albicans* Anteilen bei Zymolyasebehandlung. (B) Coomassie-Brilliant-Blue Färbung zum Anfärben von Proteinen weist Proteine nach Zymolyase behandelte *C. albicans* auf. (C) Silberfärbung zum Anfärben von Proteinen zeigt einen positiven Nachweis bei Zymolyasebehandlung. Abbildung aus (Klaile et al. 2017).

#### 6.4 Differenzierungsstufen und stimulusabhängiges Expressionsverhalten von CEACAMs in C2BBel-Zellen

C2BBel-Zellen, ein Klon der Caco-2 Zelle, formen aus Enterozyten ein intestinales Epithel und stammen aus dem Kolonbereich (kolorektales Adenokarzinom). Der Klon wurde aufgrund morphologischer Homogenität und ausschließlicher apikal lokalisierter Villi selektiert und formt polarisierte zweidimensionale Zellrasen mit einem apikalen Bürstensaum, ähnlich dem des humanen Kolons (Peterson und Mooseker 1992). Die Zellen wachsen zunächst als zweidimensionaler Zellrasen und können sich durch verlängerte Kultivierung spontan differenzieren (Abbildung 8). Dabei bilden die Zellen ähnliche morphologische und funktionelle Eigenschaften zu ausgereiften Enterozyten aus (Sambuy et al. 2005). Die Ausbildung einer Domformation ist ein Nachweis, dass die Zellen eine Konfluenz erreicht haben, denn sie bildet sich erst einige Tage nach Konfluenz aus (Abbildung 8). Caco-2-Zellen exprimieren je nach Differenzierung, wie ihre Klonzelle C2BBel, eine variierende Menge von CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6 auf ihrer Zelloberfläche (Ou et al. 2009). Um die verschiedenen Differenzierungsstadien zu analysieren wurden die C2BBel-Zellen auf 6 Well-Platten und auf Transwell-Filtern kultiviert und nach 7 Tagen, 14 Tagen und 21 Tagen auf deren CEACAM-Expression mithilfe von FACS, Western Blot und qPCR untersucht. Die Transwell-Filter werden verwendet, um einen Zugangsweg zu den C2BBel-Zellen luminal und apikal zu ermöglichen. Es wurde bereits gezeigt, dass die Stimulation mit IFN- $\gamma$  die Expression von den CEACAM-Rezeptoren 1, 5 und 6 auf epithelialen Zellen verstärkt induziert, nicht jedoch die Expression von CEACAM7 (Klaile et al. 2013). IFN- $\gamma$  ist an Entzündungsprozessen beteiligt, hat eine antivirale und immunstimulierende Funktion und kann im Rahmen der angeborenen Immunantwort die Expression von CEACAM-Rezeptoren auf Darmepithelien verändern (Schroder et al. 2004, Fahlgren et al. 2003). Aus diesem Grund wurde in unseren Versuchen die Stimulation für 48 Stunden mit 100 ng/ml IFN- $\gamma$  auf C2BBel-Zellen als Positiv-Kontrolle untersucht, um eine Aussage über die Funktionalität der Zellen zu machen. Auch 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit zwei Stimulationszeitpunkten beim Zeitpunkt 0 und nach 24 Stunden dient als Positiv-Kontrolle und kann die CEACAM7-Expression auf Epithelien beeinflussen (Ou et al. 2009).

Bei einer Kultivierung von 7 Tagen auf den 6 Well-Platten werden die CEACAM-Rezeptoren 1, 5 und 6 exprimiert (Abbildung 9A, (Klaile et al. 2017)). Die Western Blot-Analyse zeigt, dass CEACAM7 nicht exprimiert wird und ist auch bei der Stimulation IFN $\gamma$  im Western Blot nicht detektierbar. CEACAM5 zeigt eine minimale Expression im Gegensatz zu CEACAM1 und

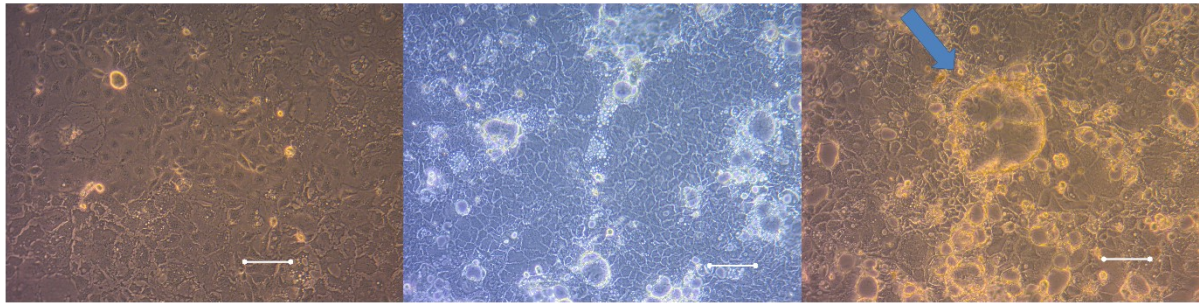
CEACAM6. Die Stimulation mit IFN $\gamma$  zeigt bei CEACAM1, 5 und 6 eine stark erhöhte Expression im Western Blot.

Bei einer Differenzierung von 14 Tagen auf Zellkulturplatten differenzierten C2BBel-Zellen können in der FACS-Analyse bei unbehandelten C2BBel-Zellen CEACAM1-Rezeptoren, CEACAM5-Rezeptoren und CEACAM6-Rezeptoren nachgewiesen werden, welche im Vergleich zur Stimulation mit den Positiv-Kontrollen IFN- $\gamma$  und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geringer exprimiert werden. Bei der Stimulation mit IFN- $\gamma$  und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte sich bei genannten CEACAM-Rezeptoren ein erhöhtes Expressionslevel. Eine erhöhte CEACAM7-Expression wurde nur nach Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachgewiesen und nicht nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  (Abbildung 9B, (Klaile et al. 2017)).

Nach 21 Tagen Differenzierung sind keine CEACAM5-Rezeptoren vorhanden und CEACAM1 und CEACAM6-Rezeptoren zeigen eine Verminderung der Expression. Die Western Blot-Analyse zeigt eine geringere Expression von CEACAM1 und CEACAM6 bei den Zellkulturen der Transwell-Filter im Vergleich zu den 6-Well-Platten (Abbildung 9 A, (Klaile et al. 2017)). Die differenzierten Darmepithelzellen reagierten nach Behandlung mit IFN- $\gamma$  mit einer erhöhten Expression von CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6 (Abbildung 9A und B, (Klaile et al. 2017)). Die qPCR-Analyse zeigt das Expressionsmuster von 21 Tage in Zellkulturplatten differenzierte C2BBel-Zellen. Für die qPCR-Analyse wurden spezifische Primer verwendet und RNA-Extraktion, Reverse Transkription, die Datenauswertung, wie in (Klaile et al. 2013) beschrieben, durchgeführt. Als Referenzgene wurde Hypoxanthine-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) und Peptidylprolyl isomerase B (PPIB) verwendet. Es wurden mit den spezifischen Primern 4 Isoformen von CEACAM1 (4L, 4L, 3L, 3S), CEACAM5, CEACAM6 und CEACAM7 (keine Unterscheidung zwischen beiden Isoformen) detektiert und als cycle of treshold (CT) in Abbildung 9C dargestellt. Hierbei zeigten sich bei den langen Isoformen von CEACAM1 (4L, 3L) die niedrigsten mRNA Expressionslevel. CEACAM6 zeigte die höchsten Expressionslevel. Obwohl unbehandelte differenzierte C2BBel-Zellen keine CEACAM7-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren, konnte CEACAM7 mRNA nachgewiesen werden. Für alle weiteren Experimente wurden, wenn nicht anders erwähnt, 21 Tage lang differenzierte C2BBel- Zellen verwendet.



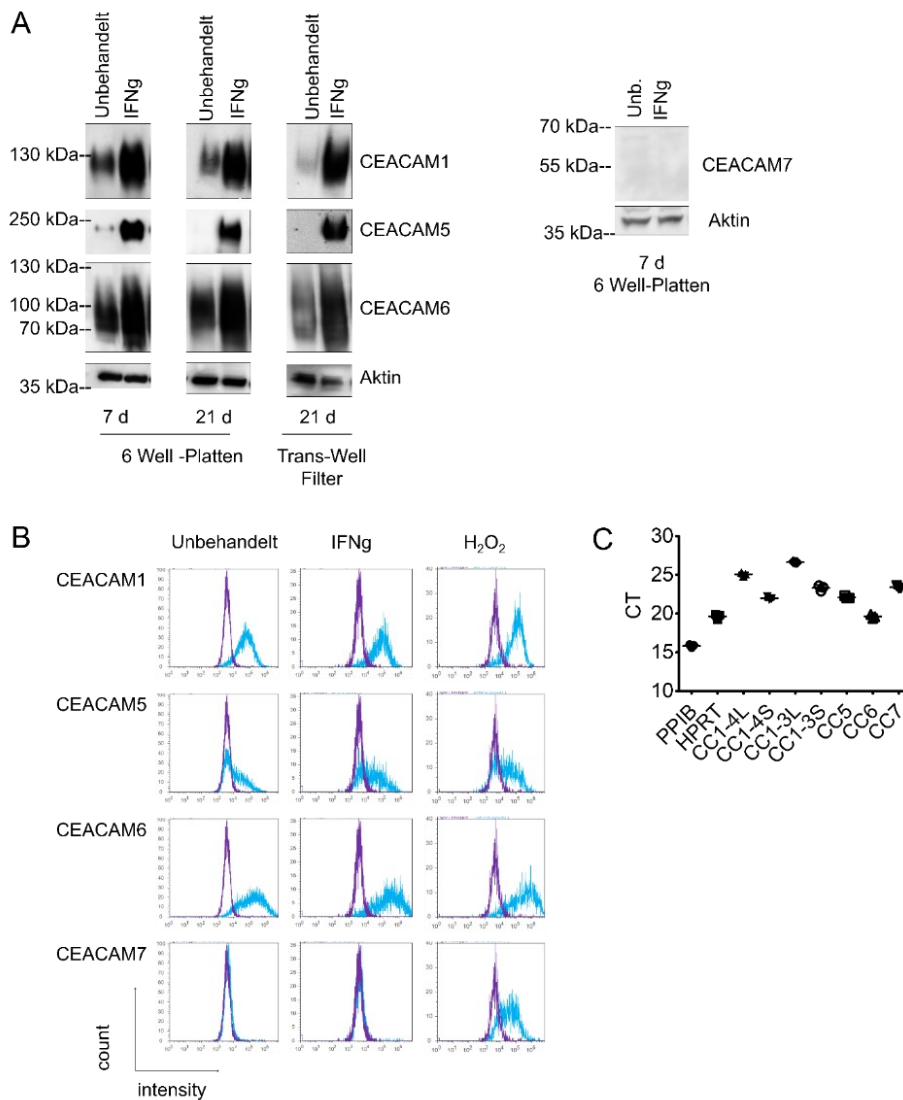
A



0 d Konfluenz 10 x, Skalierung 20  $\mu\text{m}$    3 d Konfluenz 10 x, Skalierung 20  $\mu\text{m}$    5 d Konfluenz 10 x, Skalierung 20  $\mu\text{m}$

**Abbildung 8:** C2BBel1-Zellen zu unterschiedlichen Differenzierungsstadien.

Dargestellt ist eine mikroskopische Aufnahme von C2BBel1-Zellen bei unterschiedlichen Konfluenzstadien von 0 Tagen, über 3 Tage bis zu 5 Tagen Konfluenz. Der blaue Pfeil markiert eine Domformation, welche bei Konfluenz erreicht wird.



**Abbildung 9:** Unterschiedliche CEACAM-Expression auf C2BBE1-Zellen je nach Differenzierungsgrad und Stimulus.

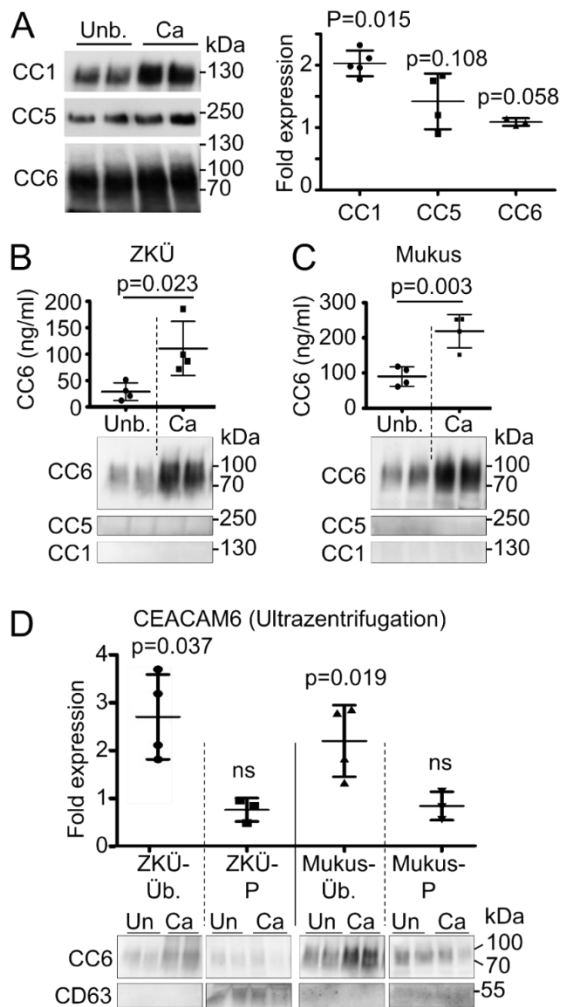
(A) Dargestellt sind die Western Blot Analysen von 7 oder 21 Tage auf Zellkulturplatten oder für 21 Tage auf Transwell-Filtern differenzierten C2BBE-Zellen unbehandelt oder als Positiv-Kontrolle mit IFN- $\gamma$ . Die Western Blot Analysen erfolgten in zwei unabhängigen Experimenten. (B) Dargestellt sind die CEACAM-Expressionen mithilfe von FACS-Analysen von 14 Tagen auf Zellkulturplatten differenzierten C2BBE1-Zellen. Als Positiv-Kontrolle zur Induktion der CEACAM-Expression wurden die Stimulanzen IFN- $\gamma$  oder H $_2$ O $_2$  eingesetzt. Die Expression von CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 und CEACAM7 wurde in zwei unabhängigen repräsentativen Experimenten untersucht. (C) QPCR-Analysen von CEACAM1-Isoformen (1-4L, 1-4S, 1-3L, 1-3S), CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7 (keine Unterscheidung zwischen beiden Isoformen) als cycle of treshold (CT) von unbehandelten C2BBE1-Zellen, die 21 Tagen in Zellkulturplatten differenzierten wurden. Als Referenzgene wurde Hypoxanthine-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) und Peptidylprolyl isomerase B (PPIB) verwendet. Die Analyse erfolgte in 3 unabhängigen Experimenten, die als CT-Wert dargestellt werden. Abbildung aus (Klaile et al. 2017).

## 6.5 C2BBel-Darmepithelzellen exprimieren auf der Zelloberfläche verstärkt CEACAM1 und CEACAM6 bei *C. albicans* Infektion

In den vorangegangenen *Pull-Down* Assays konnte eine Bindung von rekombinanten Proteinen CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6 zu *C. albicans* nachgewiesen werden. Frühere Arbeiten unserer Gruppe haben gezeigt, dass verschiedene bakterielle Pathogene die Expression von CEACAM-Rezeptoren auf epithelialen Zellen beeinflussen können (Klaile et al. 2013). Es sollte daher vertiefend analysiert werden, ob eine Bindung von *C. albicans* zu intestinalen Zellen die CEACAM-Rezeptoren in ihrer Expression beeinflusst. Hierzu wurden C2BBel-Zellen differenziert und für 72 Stunden mit UV-bestrahlten *C. albicans* Hefen inkubiert. Die vorherige UV-Behandlung inaktiviert die Hefezellen und dient zum Schutz der C2BBel-Zellen vor dem Absterben, wobei alle Oberflächen- und Proteinstrukturen der Hefezellen erhalten bleiben. Die Infektion mit UV-behandelten *C. albicans* auf C2BBel-Zellen verursacht eine erhöhte Expression von membrangebundenen und löslichen CEACAMs (Abbildung 10, (Klaile et al. 2017)). Die Zelllysate geben Auskunft über die Expression von membrangebundenen CEACAMs, Zellkulturüberstand und Mukus über lösliche oder extravasikulär vorhandenen CEACAMs. In den Zelllysaten zeigte sich im Western Blot eine signifikante zweifache Erhöhung von CEACAM1 nach *C. albicans* Infektion (Abbildung 10 A, (Klaile et al. 2017)). Hingegen zeigte sich die Expression von CEACAM5 und CEACAM6 im Zelllysate nach Inkubation mit *C. albicans* nicht verändert. Unbehandelte C2BBel-Zellen wiesen nach 72 Stunden im Zellkulturüberstand eine Menge von 12-51 ng/ml an löslichem CEACAM6 auf, wohingegen lösliches CEACAM1 und CEACAM5 nicht nachgewiesen werden konnte (Abbildung 10 B, (Klaile et al. 2017)). Bei C2BBel-Zellen, welche 72 Stunden mit *C. albicans* inkubiert wurden, zeigte sich eine 2-3fache erhöhte Freisetzung von CEACAM6 im Zellkulturüberstand. Im Mukus zeigten die C2BBel-Zellen nach 72 Stunden eine Menge von 21-121 ng/ml lösliches CEACAM6 und wiesen kein lösliches CEACAM1 und CEACAM5 auf (Abbildung 10 C, (Klaile et al. 2017)). Nach 72 Stunden Inkubation mit *C. albicans* wurde eine verdoppelte Freisetzung von CEACAM6 in der Mukusfraktion detektiert (Abbildung 10 C, (Klaile et al. 2017)). Die Fragestellung, ob CEACAM6 in diesen Fraktionen löslichen oder extravasikulären Ursprungs ist, konnte mit einer Ultrazentrifugation und Western-Blot weiter untersucht werden (Abbildung 10 D). Die nach der Ultrazentrifugation entstandenen Pellets und Überstände wurden mithilfe von CD 63, einem Marker, der auf extravasikulären Membranen vorkommt, untersucht. Dieser konnte darüber Auskunft geben, ob CEACAM6 löslichen Ursprungs (Überstand nach Zentrifugation, CD63 negativ) ist oder aus extravasikulären Vesikeln (Pellets, CD63 positiv) stammt. Die Western Blot

Analysen zeigten, dass CEACAM6 im Zellkulturüberstand und im Mukus in höheren Mengen in löslicher Form vorhanden ist und nur geringe Mengen von positiv gekennzeichneten EV-gebundenen CEACAM6 in den Pellets nachweisbar sind. Des Weiteren ist in den Überständen nach *C. albicans*-Infektion (lösliches CEACAM6) eine Erhöhung der CEACAM6-Freisetzung detektierbar, wohingegen keine Erhöhung von CEACAM6 in der Pelletfraktion (extravesikuläres CEACAM6, CD63 positiv) vorhanden ist (Abbildung 10 D). Im Western Blot von Zelllysaten, Mukus- und Zellkulturüberstandfraktionen wurde CEACAM6 mit einem molekularen Gewicht von 70- 100 kDa (Abbildung 10 A, B, C, (Klaile et al. 2017)) detektiert, was auf eine hohe Glykosylierung hinweist.

Zusammenfassend weisen C2BB<sub>1</sub>-Zellen eine erhöhte Expression von membrangebundenen CEACAM1 und eine Freisetzung von löslichen hochglykosylierten CEACAM6 nach Infektion mit *C. albicans* auf. Exosomal exprimiertes membrangebundenes CEACAM6 wird nicht durch *C. albicans* reguliert.



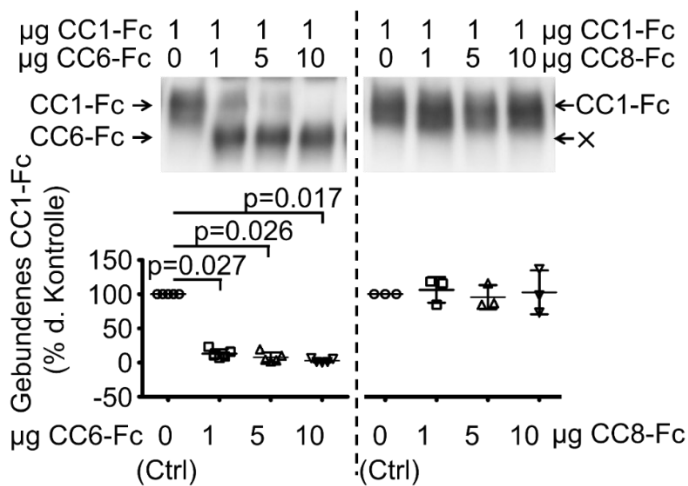
**Abbildung 10:** *C. albicans* induziert eine Sekretion von löslichem CEACAM6 und eine Expressionerhöhung von membrangebundenem CEACAM1 in C2BBel-Zellen

Dargestellt ist die Western Blot- Analyse und deren Quantifizierung von (A) Zelllysaten, (B) Zellkulturüberstand (ZKÜ) und (C) Mukus von 21 Tagen auf Zellkulturplatten differenzierten C2BBel-Zellen. Diese wurden unbehandelt (Unb.) oder mit *C. albicans* UV-behandelt (Ca) in Duplikaten inkubiert. A) Die linke Grafik zeigt den repräsentativen Western Blot von Zelllysaten zweier biologischer Duplikate eines Versuches auf die Expression von CEACAM1 (N=5), CEACAM5 (N=4) und CEACAM6 (N=4) und die rechte Grafik die Mittelwerte der Quantifizierung der Western Blot-Banden der unabhängigen Versuche. (B, C) CEACAM1 (N=3), CEACAM5 (N=3) und CEACAM6 (N=4) wurden mit Western-Blot Analysen auf ihre Expression im Zellkulturüberstand (ZKÜ) und Mukus untersucht (repräsentativer Versuch, untere Grafik). CEACAM6-Banden wurden von biologischen Duplikaten quantifiziert und der Mittelwert von deren Konzentration analysiert und dargestellt (obere Grafik). (D) Untersuchung von ZKÜ und Mukus auf die Vorkommensart von CEACAM6 löslich (ZKÜ- Üb.; Mukus- Üb.) oder extravasikulär an Membran gebunden (ZKÜ- P.; Mukus- P.). Hierzu wurden ZKÜ und Mukus bei 100.000 x g für 2 Stunden ultrazentrifugiert. Die dabei entstandenen Überstände und Pellets wurden im Western Blot auf die Präsenz von CEACAM6 und CD63 (EV-Marker) untersucht (Grafik unten). CEACAM6-Banden der mit *C. albicans* behandelten Proben wurden quantifiziert und die durchschnittliche Erhöhung von 4 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in der oberen Grafik dargestellt. Die Statistische Analyse wurde bei (A, D) mit einem zweiseitigen gepaarten t-Test und bei (B, C) mit einem zweiseitigen ungepaarten t-Test durchgeführt: horizontale Balken= Mittelwert und vertikale Balken= Standardabweichungen. Punkte stellen Einzelwerte von unabhängigen Versuchen dar. Abbildung aus (Klaile et al. 2017).

## 6.6 Zunehmende Mengen von CEACAM6 unterbindet die CEACAM1-Bindung zu Epitopen der Zelloberfläche von *C. albicans*

CEACAM6 (Oikawa et al. 1992) und CEACAM8 (Singer et al. 2002) können beide an die extrazelluläre *Ig-V-like domain* von CEACAM1 binden. Unsere bisherigen Analysen demonstrierten eine Bindung von CEACAM6 zu Oberflächenstrukturen der *C. albicans* Hefe, aber keine Bindung von CEACAM8 zu *C. albicans* (Abbildung 4). Da in vorhergehenden Experimenten mit C2BBel-Zellen deutlich wurde, dass lösliches CEACAM6 durch Behandlung von *C. albicans*-UV-behandelt stark anstieg (Abbildung 10), wollten wir in den folgenden Experimenten den Einfluss von CEACAM6 auf das Bindungsverhalten von CEACAM1 zu Oberflächenstrukturen von *C. albicans* untersuchen. Um diese Fragestellung zu beantworten wurden kompetitive *Pull-Down-Assays* durchgeführt. Hierzu wurden  $2 \cdot 10^8$  Zellen von *C. albicans* mit  $1 \mu\text{g}$  CEACAM1 inkubiert und entweder in Abwesenheit oder mit einer ansteigenden Menge von CEACAM6-Fc oder CEACAM8-Fc ( $0 \mu\text{g}$ ,  $1 \mu\text{g}$ ,  $5 \mu\text{g}$ ,  $10 \mu\text{g}$ ) analysiert (Abbildung 11). Bei keiner zugegebenen Menge von rekombinanten CEACAM8-Fc zu CEACAM1-Fc, wurde im Western-Blot ein Effekt auf die Bindung von CEACAM1-Fc zu Oberflächenstrukturen von *C. albicans* Zellen detektiert (Abbildung 11, rechte Seite der Grafik, (Klaile et al. 2017)). Hingegen nahm bei vermehrter Zugabe von rekombinanten CEACAM6-Fc zu CEACAM1-Fc die nachgewiesene Menge von CEACAM1-Fc in der Western-Blot Analyse ab. Bei einem Verhältnis von 1:1 von CEACAM6-Fc zu CEACAM1-Fc zeigte sich eine um ca. 90% reduzierte Oberflächenbindung von CEACAM1-Fc zu Oberflächenepitopen der *C. albicans* Hefezellen (Klaile et al. 2017). Höhere Mengenzugaben von CEACAM6-Fc zu CEACAM1-Fc verstärkten diese Tendenz. Bei einem Verhältnis von 1:10 von CEACAM1-Fc zu CEACAM6-Fc konnten fast keine CEACAM1-Fc Rezeptoren gebunden an *C. albicans* mithilfe von *Pull-Down-Assays* nachgewiesen werden (Abbildung 11, linke Seite der Grafik, (Klaile et al. 2017)).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass CEACAM6 im Gegensatz zu CEACAM8 die CEACAM1-Bindung zu Oberflächenepitopen von *C. albicans* schon bei geringen Mengen reduziert.



**Abbildung 11:** CEACAM6 verhindert die Bindung von CEACAM1 an Oberflächenepitopen von *C. albicans*

Dargestellt sind Western- Blot Analysen von kompetitiven *Pull-Down-Assays* (obere Grafik). Hierfür wurde *C. albicans* mit 1 µg des rekombinanten CEACAM1-Rezeptors und in Gegenwart der jeweils angegebenen Menge (0µg, 1µg, 5µg, 10µg) von CEACAM6-Fc (N=5) oder CEACAM8-Fc (N=3) inkubiert. Die CEACAM1-Banden wurden quantifiziert und die relativen Mengen von gebundenem CEACAM1 verglichen zu CEACAM1-Fc in Abwesenheit von CEACAM6-Fc bzw. CEACAM8-Fc (=100%, untere Grafik). Als statistische Auswertung wurde ein zweiseitiger gepaarter t-Test verwendet. Alle horizontalen Balken stellen den Mittelwert dar, alle vertikalen Balken die Standardabweichung. Punkte stellen Einzelwerte von unabhängigen Experimenten dar. Abbildung aus (Klaile et al. 2017).

## 6.7 CEACAM-Expression hat keinen Einfluss auf die Adhäsion von *C. albicans* zu Epithelzellen

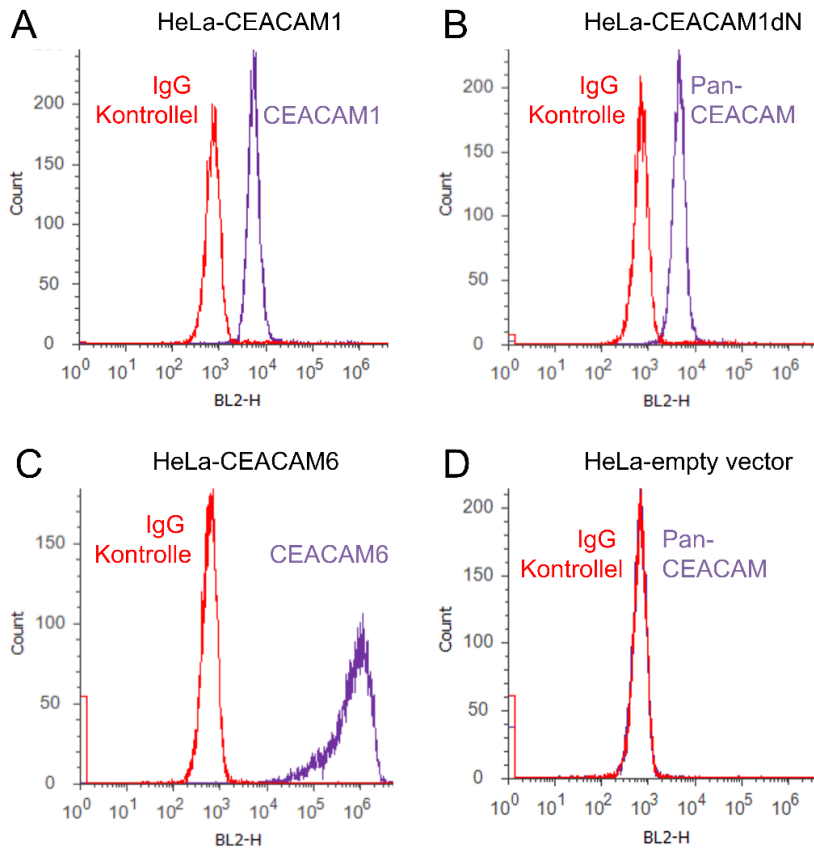
Es ist noch nicht bekannt, ob eine vermehrte epitheliale CEACAM-Expression von CEACAM1, CEACAM5 und CEACAM6 die Adhäsion von *C. albicans* beeinflussen kann. Dies ist bereits für bakterielle Pathogene beschrieben (Tchoupa et al. 2014). Um zu überprüfen, ob die CEACAM1 und CEACAM6-Expression auf epithelialen Geweben Auswirkungen auf die Adhäsion von *C. albicans* Hefezellen zu epithelialen Monolayern hat, wurden in den folgenden Experimenten Adhäsionsassays durchgeführt. Hierzu wurden HeLa- Zellen, Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, verwendet, da diese keine CEACAM-Expression aufweisen und ein gutes Modellsystem darstellen, um CEACAM-Rezeptoren einzeln unter kontrollierten Bedingungen durch Transfektion zu überexprimieren. Die HeLa-Zelllinie ist die erste in Kultur etablierte menschliche Zelllinie (Gey 1952), welche eine weit verbreitete Modellzelllinie für das Studium der menschlichen Zell- und Molekularbiologie ist (Landry et al. 2013). Diese wurden in vorhergehenden Arbeitsschritten mit CEACAM1-4L, CEACAM6 oder dem nicht *C. albicans* bindenden CEACAM1 Mutanten CEACAM1-4L-deltaN transfiziert (Abbildung 12). *C. albicans* wurden mit den verschiedenen konfluent gewachsenen HeLa-Zelllinien inkubiert und

adhärierende *C. albicans* Zellen wurden ausplattiert und die KBE (=Koloniebildende Einheiten) gezählt. Die Auszählung zeigte, dass keiner der CEACAM-Rezeptoren eine Auswirkung auf die Adhäsion von *C. albicans* zu HeLa-Zelllinien hat (Abbildung 13, (Klaile et al. 2017)).

Weiterhin wurde getestet, ob die ansteigende Menge von löslichem CEACAM6 im Zellkulturüberstand von C2BBel-Zellen nach *C. albicans* UV-Behandlung eine Auswirkung auf die Adhäsion von *C. albicans* Zellen zu epithelialen Oberflächen der C2BBel-Zelllinie hat. Hierzu wurden C2BBel-Zellen vorsichtig gewaschen, um die Mukusschicht von dem Zellmonolayer zu entfernen. Es wurde unkonditioniertes Medium oder Medium mit *C. albicans* UV-behandelten vorbehandelten Zellen auf die Adhäsion von *C. albicans* untersucht. Die adhärierten *C. albicans* Zellen wurden ausplattiert. Die ausgezählten KBE zeigten eine nahezu identische Anzahl an *C. albicans* (Abbildung 13, (Klaile et al. 2017)).

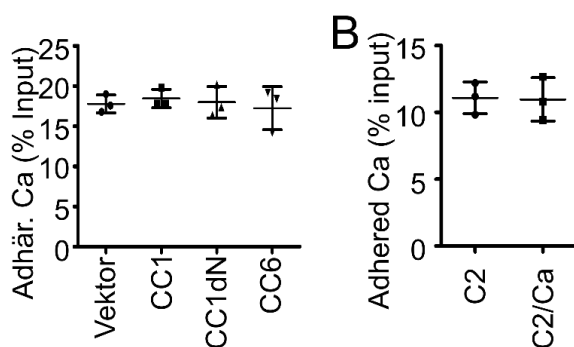
Insgesamt zeigte sich bei diesen Experimenten, dass die CEACAM-Überexpression auf Epithelien keinen Einfluss auf die Adhärenz von *C. albicans* zu den Epithelien zeigt (Klaile et al. 2017). Aus diesem Grund soll in folgenden Kapiteln untersucht werden, ob die *C. albicans*-Bindung zu CEACAM1 auf epithelialen Zellen eine Auswirkung auf *downstream/nachfolgende* Signalkaskaden hat, die das Bindungsverhalten von *C. albicans* zu Epithelien beeinflussen könnte.





**Abbildung 12:** Expressionsnachweis von HeLa-Zellen mittels FACS-Analyse

HeLa-Zellen wurden mit unterschiedlichen Vektoren transfiziert: (A) huCEACAM1-4L (CEACAM1), (B) huCEACAM1-4L mit fehlender *N-terminal IgV-like domain* (CEACAM1dN), (C) huCEACAM6, (D) Leervektor. CEACAMs wurden mithilfe von FACS-Analyse nach indirekter Immunfluoreszenzfärbung mit folgenden Antikörpern und entsprechenden IgG Kontrollen analysiert: (A) B3/17 (Anti-CEACAM1), (B) polyklonale panCEA (Anti-CEACAM1/3/4/5/6/8), (C) 1H7-4B (Anti-CEACAM6) und (D) 6G5J (Anti-CEACAM1/3/4/5/6/8). Abbildung aus (Klaile et al. 2017).



**Abbildung 13:** CEACAM-Expression auf Epithelien hat keinen Effekt auf Adhärenz von *C. albicans* Hefezellen zu epithelialen Zellen.

(A) HeLa-Zellen wurden mit Leervektor, humanem CEACAM1-4L, humanem CEACAM6 und deletiertem humanem CEACAM1-4L, welcher eine fehlende *N-terminal IgV-like domain* aufweist, transfiziert und mit *C. albicans* Hefezellen für 60 min inkubiert. In der Grafik werden die adhärennten Zellen in % des Inputs dargestellt. Das Experiment wurde in 3 unabhängigen Durchgängen durchgeführt. (B)

*C. albicans* wurden entweder mit Medium von unbehandelt C2BBel-Zellen (C2) oder mit Medium von C2BBel-Zellen mit 72 Stunden vorbehandelten UV-behandelten *C. albicans* (C2/Ca) präinkubiert und im Anschluss für 30 min mit den C2BBel-Zellen in Gegenwart von *C. albicans* inkubiert. In der Grafik werden die adhären Zellen in % des Inputs dargestellt. Das Experiment wurde in 3 unabhängigen Durchgängen durchgeführt. Die Statistische Analyse wurde mit einem zweiseitigen gepaarten t-Test durchgeführt: horizontale Balken= Mittelwert und vertikale Balken= Standardabweichungen. Punkte stellen Einzelwerte von unabhängigen Versuchen dar. Abbildung aus (Klaile et al. 2017).

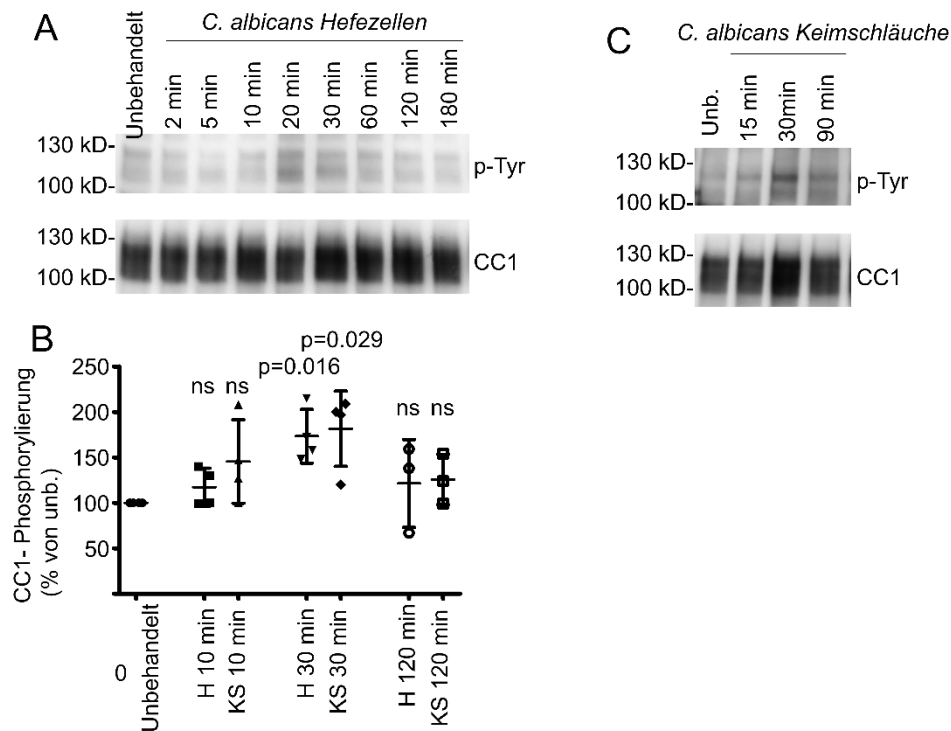
### 6.8 *C. albicans* Stimulation von C2BBel-Zellen induziert eine vorübergehende CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung

CEACAM1 nimmt mithilfe seines *C-terminalen immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) bei der intrazellulären Signaltransduktion teil und hat somit einen Einfluss auf zellmodulatorische Funktionen in unterschiedlichen Zelltypen, wie z.B. epithelialen Zellen (Huber et al. 1999). Es stellt sich die Frage, ob eine Bindung von CEACAM1 in der epithelialen C2BBel-Zelllinie zu unterschiedlichen Formen von *C. albicans* eine transiente Phosphorylierung auslöst und somit Einfluss auf die intrazelluläre Signaltransduktion nehmen kann.

In den Experimenten wurde untersucht, ob die Bindung von *C. albicans* zu extrazellulären Domänen von CEACAM1 auf Enterozyten eine Phosphorylierung der intrazellulären *C-terminalen immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) induzieren kann. C2BBel Zellen exprimieren die zwei ITIM-haltigen CEACAM1-Isoformen, CEACAM1-4L und CEACAM1-3L (oberer Blot Abbildung 14, A und C). Die C2BBel-Zellen wurden entweder unbehandelt oder mit lebenden *C. albicans* Hefezellen oder lebenden *C. albicans* Keimschläuchen in unterschiedlichen Zeitlängen inkubiert und im Anschluss lysiert. Immunpräzipitate von CEACAM1 wurden mithilfe von Western-Blot auf eine Tyrosinphosphorylierung analysiert. Es wurde zur Verifizierung ein Re-Blot mit einem CEACAM1-kreuzreagierenden Antikörper durchgeführt (unterer Blot, Abbildung 14 A und C), welcher alle CEACAM1-Spleißformen detektiert. Um eine Aussage über die relative CEACAM1-Phosphorylierung treffen zu können, wurde eine Quantifizierung der Bandenstärke vorgenommen, wobei zu unbehandelten Zellen normalisiert wurde (Abbildung 14 B),

Die Ergebnisse zeigten bei der Stimulation von *C. albicans* Hefezellen in beiden langen CEACAM1-Isoformen (CEACAM1-4L, CEACAM1-3L) eine deutliche transiente Phosphorylierung mit einer maximalen Induktion bei 20- 30 min (ca. 170% bei 30 min), welche bei längerer Stimulation von *C. albicans* Hefezellen abnahm (Abbildung 14, A und B, (Klaile et al. 2017)). Die Ergebnisse der Stimulation der beiden CEACAM1-Isoformen mit *C. albicans* Keimschläuchen demonstrierten ähnliche Zeitwerte mit einer maximalen Induktion der transienten

Phosphorylierung nach ca. 20 -30 min (ca. 180% bei 30 min) und einer nachfolgenden Abnahme der Phosphorylierung (Abbildung 14, B und C, (Klaile et al. 2017)). Die Quantifizierung von Phosphotyrosin der Western-Blot Analysen zeigte bei einer Induktionszeit von 30 min ein Maximum bei Vorbehandlung von *C. albicans* in Hefezellen- und Keimschläuchzellenform.



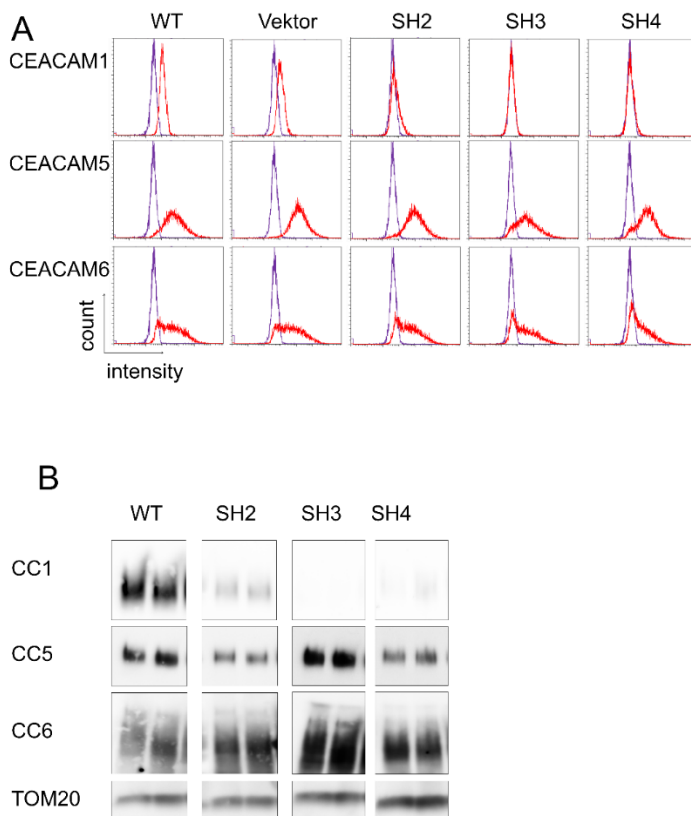
**Abbildung 14:** Stimulation von *C. albicans* auf C2BBel-Zellen verursacht eine transiente CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung.

(A, B, C) *C. albicans* Hefezellen (H) oder Keimschläuche (KS) wurden mit C2BBel-Zellen in der angegebenen Zeit inkubiert, um die CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung zu untersuchen (N=4). Sie wurden mit Western Blot auf Phosphotyrosin (p-Tyr.) und CEACAM1 (CC1) analysiert. (A, C) In der oberen Grafik zeigt sich eine Phosphorylierung der beiden Isoformen mit langer cytoplasmatischer Domäne. Das obere p-Tyr Band zeigt die CEACAM1-4L Isoform und das untere p-Tyr Band die CEACAM1-3L Isoform. Die untere Grafik detektiert den CEACAM1-Rezeptor. Ein Maximum der p-Tyr.-Bande ist bei beiden *Candida*-Behandlungen bei 20-30 min zu sehen. (B) Der Graph zeigt die Signale des quantifizierten Phosphotyrosins nach *C. albicans* Stimulation verglichen mit den unbehandelten Zellen (=100%). Zur statistischen Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test verwendet. Die horizontale Balken stellen den Mittelwert dar, vertikale Balken die Standardabweichung. Punkte stellen Einzelwerte von unabhängigen Versuchen dar. Abbildung aus (Klaile et al. 2017).

## 6.9 Validierung von shRNA-vermittelten CEACAM1-knock-down in C2BBel-Zellen

Im vorherigen Kapitel zeigte sich, dass die Stimulation von unterschiedlichen *C. albicans* Formen einen Einfluss auf die transiente Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1-L (CEACAM1-4L, CEACAM1-3L) hat. Um herauszufinden, welche zellmodulatorischen Auswirkungen die intrazelluläre Aktivierung von CEACAM1 durch *C. albicans* auf C2BBel-Zellen haben kann,

wurden drei unterschiedliche shRNA-vermittelte CEACAM1-knock-down Zelllinien (SH2, SH3, SH4) hergestellt. Die CEACAM1-negativen Populationen wurden mithilfe von FACS sortiert. Zusätzlich zu den drei unterschiedlichen shRNA-vermittelten CEACAM1-knock-down Zelllinien, wurden C2BBel Vektorkontrollen hergestellt. Die CEACAM1-knock-down Zelllinien zeigten in der FACS-Analyse eine vergleichbare Expression von CEACAM5 und CEACAM6 (Abbildung 15 A). Weiterhin wiesen die SH2- Zellen bei der FACS-Analyse eine geringfügige CEACAM1-Oberflächenexpression auf, wohingegen SH3- und SH4-Zellen keine ermittelbare CEACAM1-Expression auf deren Oberfläche erkennen lassen (Abbildung 15 A). Die Immunblotanalysen zeigten auch eine minimale CEACAM1-Expression bei den SH2-Zellen, wohingegen bei den SH3- und SH4-Zellen keine CEACAM1-Expression detektiert werden konnte. Auch bei der Western Blot-Analyse zeigten alle Zelllinien ein nahezu identisches Expressionslevel an CEACAM5 und CEACAM6 (Abbildung 15 B).



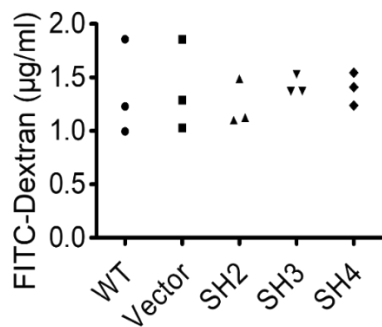
**Abbildung 15:** Beschreibung shRNA-vermittelter CEACAM1-knock-down in C2BBel-Zellen.

(A) Die FACS-Analyse zeigt die Oberflächenexpression der CEACAM1-, CEACAM5- und CEACAM6-Rezeptoren in unterschiedlichen CEACAM1-knock-down C2BBel-Zelllinien (SH2, SH3, SH4), Wildtypzellen (WT) und Vektorkontrollzellen (Vektor). Rote Linien: CEACAM-spezifischer Antikörper; violette Linien: IgG-Kontrollantikörper. (B) Dargestellt ist die Western-Blot Analyse der Zelllysate der hergestellten Zelllinien auf die Oberflächenexpression von CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 und TOM-20 als Ladungskontrolle. Abbildung aus (Klaile et al. 2017).

#### 6.10 CEACAM1 knock-down verhindert Erhöhung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) mit *C. albicans*

Das intestinale Epithel formt eine feste Barriere, welche durch die parazelluläre Permeabilität durch Verschlusskontakte (tight junctions) reguliert wird. Sie kann von verschiedenen Mikroorganismen, wie *C. albicans* durchquert werden und zu systemischen Infektionen führen (Zhu und Filler 2010). Hierbei kann die Infektion mit *C. albicans* einen Einfluss auf die Permeabilität und auf den trans-epithelialen elektrischen Widerstand (TEER) von intestinalen Epithelzellen nehmen (Bohringer et al. 2016). Auch die CEACAM1-Expression kann eine Veränderung der Permeabilität in endothel- und epithelialen Zellen verursachen (Jin et al. 2016, Najjar et al. 2013, Nouvion et al. 2010) und dadurch einen Einfluss auf eine Inflammation haben. In unseren Versuchen sollte getestet werden, ob sich die Barrierefunktion der C2BBel-Zellen durch die fehlende CEACAM1-Expression bei den knock-down-Zellen verändert, da eine erhöhte Permeabilität des Darmepithels die Entstehung von Sepsis begünstigt. Des Weiteren sollte getestet werden, ob das Vorhandensein von CEACAM1 einen Einfluss auf die epitheliale Penetration von *C. albicans* haben kann. Es wurden alle C2BBel-Zelllinien (Wildtyp, Vektorkontrolle, CEACAM1-knock-down: SH2, SH3, SH4) auf Transwell-Filtern kultiviert und auf deren Permeabilität mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-Dextran oder auf den TEER getestet.

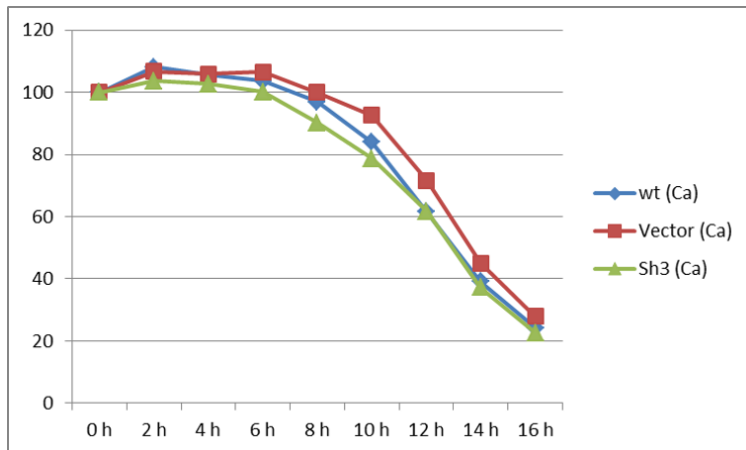
FITC-Dextran wurde der apikalen Zellseite hinzugefügt und nach 24 Stunden wurde die Konzentration von FITC-Dextran mithilfe eines Fluoreszenzlesers bei 520nm von der basalen Zellseite bestimmt. Die Analyse der parazellulären Translokation von FITC-Dextran zeigte bei allen CEACAM1-knock-down-, Wildtyp- und Vektorkontroll-Zelllinien keinen Unterschied nach einer Inkubation von 24 Stunden und somit eine unveränderte Zellpermeabilität (Abbildung 16, (Klaile et al. 2017)). Die Expression von CEACAM1 hat also keinen direkten Einfluss auf die Permeabilität von C2BBel-Zellverbänden.



**Abbildung 16:** FITC-Dextran zeigt eine unveränderte Permeabilität bei CEACAM1-knock-down-Zellen. Dargestellt sind basale Konzentration von FITC-Dextran von C2BBel-Zelllinien (Wildtyp=WT, Vektorkontrolle=Vector, CEACAM1-knock-down=SH2, SH3, SH4), welche auf Transwell-Filtern kultiviert wurden. Im Graph wurde ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten dargestellt. Punkte stellen Einzelwerte von unabhängigen Experimenten dar. Abbildung aus (Klaile et al. 2017).

Eine weitere Untersuchungsmethode zur Permeabilität erfolgte durch die Messung des trans-epithelialen elektrischen Widerstands (TEER) bei allen Zelllinien. Alle fünf getesteten Zelllinien zeigten abhängig von den Differenzierungsstadien einen Unterschied des TEER, welcher aber unabhängig von CEACAM1 war. Die Ergebnisse der TEER-Messung ergaben 280-500 Ohms/cm<sup>2</sup> bei 7 Tagen konfluenten Zellen, 350-700 Ohms/cm<sup>2</sup> bei 14 Tagen konfluenten Zellen und 850-1300 Ohms/cm<sup>2</sup> bei 21 Tagen konfluenten Zellen (Klaile et al. 2017). Mit zunehmender Differenzierung wurde also eine Verringerung der Permeabilität festgestellt.

Um die Auswirkung von CEACAM1 auf die epitheliale Barrierefunktion bei epithelialer Penetration von *C. albicans* zu testen, wurden Wildtyp-, Vektor- und SH3-CEACAM1-knock-down-Zellen mit einer MOI von 100 mit lebenden *C. albicans* infiziert. Es zeigte sich bei allen drei getesteten Zelllinien eine CEACAM1-unabhängige Abnahme des TEER nach 6 Stunden infolge einer zunehmenden Zerstörung der epithelialen Barriere der C2BBel-Zellen (Abbildung 17, (Klaile et al. 2017)).

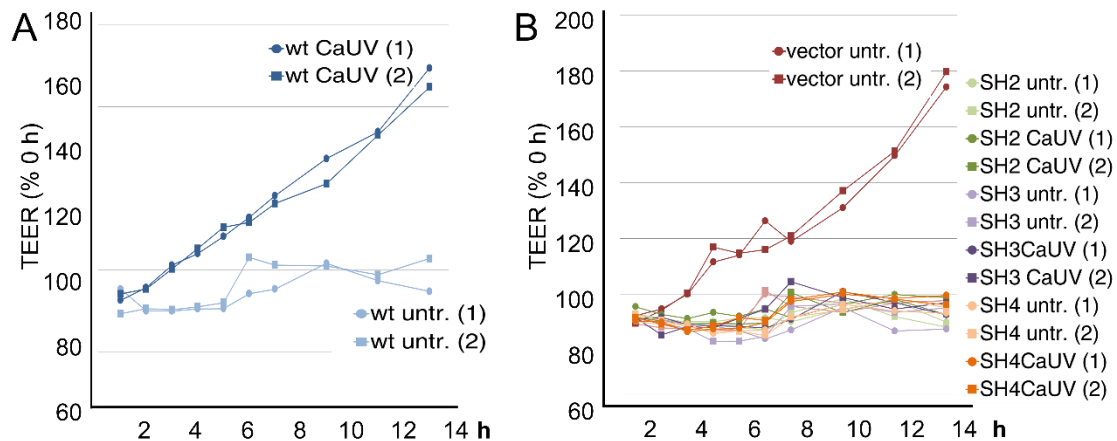


**Abbildung 17:** lebende *C. albicans* induziert eine Reduktion des transepithelialen elektrischen Widerstands

Die Grafik zeigt die TEER-Messung (*transepithelial electrical resistance*) über einen Zeitverlauf von 16 Stunden von drei unterschiedlichen C2BBE1-Zelllinien (Wildtyp=wt, Vektorkontrolle=Vector, CEACAM1-knock-down=SH3), welche für 21 Tage auf Transwell-Filtern differenziert wurden und mit einer MOI von 100 mit lebenden *C. albicans* infiziert wurden. Der relative TEER wird als % der TEER-Messung zum Zeitpunkt 0 angegeben. Der Graph stellt den Mittelwert der Messungen von zwei Wells (Duplikat) dar und stellt ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Versuchen dar. Abbildung aus (Klaile et al. 2017).

Weitergehend wurde untersucht, ob eine Bindung von UV-behandelten *C. albicans* an C2BBE1-Zellen eine Auswirkung auf die Permeabilität haben kann. Hierzu wurden die Zelllinien in Bezug auf eine Änderung des TEER nach verschiedenen Inkubationszeiten mit UV-behandelten *C. albicans* im Vergleich zu unbehandelten Zellen getestet. Die Infektion von *C. albicans* UV-behandelt ergab bei den Wildtyp-Zellen und bei den Vektorkontroll-Zellen eine signifikante Erhöhung des TEER, wohingegen die CEACAM1-knock-down-Zelllinien (SH2, SH3, SH4) nach einer Stimulation mit *C. albicans* UV-behandelt keine signifikante Erhöhung des TEER zeigten (Abbildung 18, (Klaile et al. 2017)). Somit kann das Vorhandensein von CEACAM1 auf C2BBE1-Zellen die Permeabilität nach einer Interaktion mit inaktivierten *C. albicans*, durch die keine aktive Penetration des Monolayers mehr stattfinden kann, erniedrigen und modulieren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass ohne Infektion mit *C. albicans* die Permeabilität von C2BBE1-Zellen unabhängig von CEACAM1 moduliert wird und die CEACAM1-Expression keinen Einfluss auf die epitheliale Penetration und den Abbau der Barriere durch lebende *C. albicans* hat. Allerdings kann auf C2BBE1-Zellen exprimiertes CEACAM1 die Permeabilität durch Bindung von inaktivierten *C. albicans* an C2BBE1-Zellen modulieren und zu einer Permeabilitätserniedrigung führen.



**Abbildung 18:** CEACAM1 reguliert Veränderungen des transepithelialen Widerstands bei *C. albicans* Infektion von C2BBel-Zellen

(A) Es wurden Wildtypzellen (wt) und (B) alle CEACAM1- knock-down Zelllinien (SH2, SH3, SH4) für 21 Tage in Transwell-Filtern kultiviert und untr. oder mit *C. albicans* UV-behandelt (CaUV) stimuliert. Es wurde über einen Zeitverlauf von 14 Stunden der TEER-Wert bestimmt und der relative TEER- Wert in % des TEER-Wertes zum Zeitpunkt 0 des jeweiligen Wells angegeben. Der Graph stellt den Wert der Messungen von zwei Wells (Duplikat) dar und stellt ein repräsentatives Ergebnis aus drei Wiederholungen dar. Abbildung aus (Klaile et al. 2017).

### 6.11 CEACAM1 ist obligat für die *C. albicans*-induzierte IL8-Freisetzung

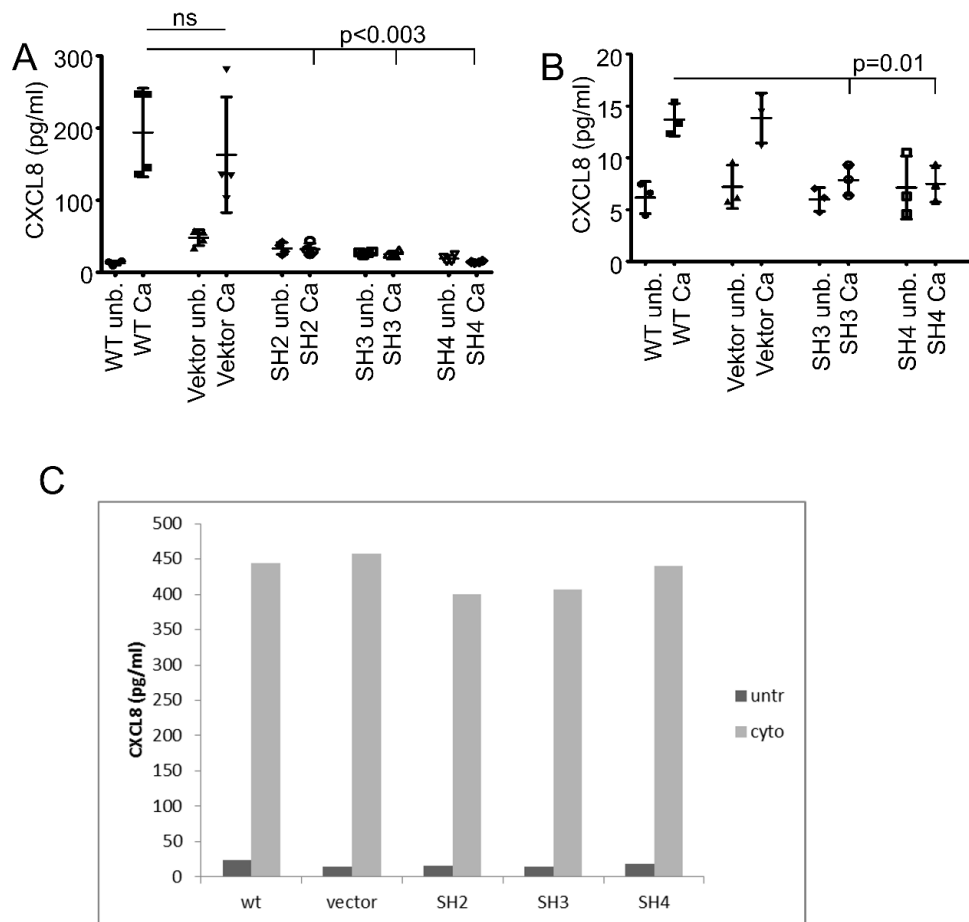
CEACAM1-Rezeptoren können *C. albicans* binden und die Bindung kann eine transiente Phosphorylierung des Rezeptors am C-terminalen ITIM bewirken. Um die epitheliale Immunantwort der Intestinalzellen gegen *C. albicans*- Infektionen näher zu untersuchen, wurde nachfolgend die IL-8 Sekretion und Konzentration unter verschiedenen Bedingungen analysiert. IL-8 ist ein Entzündungsmediator, welcher bei der chemotaktischen Rekrutierung von Leukozyten involviert ist und beispielsweise von Endothel- und Epithelzellen freigesetzt wird (Orozco et al. 2000, Eckmann et al. 1993). Die Bindung von CEACAM1 zu *H. pylori* verursacht beispielsweise die Freisetzung vom pro-inflammatorischen Mediator IL-8 (Javaheri et al. 2016a). Um der Frage auf den Grund zu gehen, ob CEACAM1-Expression und deren *C. albicans* Erkennung und Bindung eine Auswirkung auf die epitheliale Immunantwort haben kann, wurde die IL-8 Konzentration nach *C. albicans* UV-behandelt bei verschiedenen C2BBel-Zelllinien getestet. Die C2BBel-Zelllinien, welche in Zellkulturplatten kultiviert wurden, zeigten nach Behandlung mit UV-behandelten *C. albicans* Hefezellen bei den Zelllinien vom Wildtyp und bei der Vektorkontrolle eine erhöhte IL-8 Sekretion in den Zellkulturüberständen (Abbildung 19, (Klaile et al. 2017)). Dahingegen wiesen die CEACAM1-knock-down Zellen SH2, SH3 und SH4 nach Inkubation mit UV-behandelten *C. albicans* Hefezellen keine IL-8 Sekretion auf. Auch die untr. behandelten Zellen aller C2BBel-Zelllinien zeigten keine Erhöhung der IL-8 Produktion



(Abbildung 19 A, (Klaile et al. 2017)). Die Fähigkeit der IL-8-Sekretion der CEACAM1-knock-down Zelllinien, wurde über einen Stimulationstest mit einem Zytokinmix (25ng/ml IL-1 $\beta$ , 50 ng/ml TNF- $\alpha$ , 50 ng/ml IFN- $\gamma$ ) mit allen C2BBe1-Zelllinien durchgeführt. Der Test zeigte bei allen C2BBe1-Zelllinien (Wildtyp, Vektorkontrolle, CEACAM1-knockdown SH2, SH3 und SH4) eine annähernd gleiche Menge an freigesetztem IL-8 nach der pro-inflammatorischen Zytokinbehandlung (Abbildung 19 C, (Klaile et al. 2017)).

Auf Transwell-Filtern kultivierte C2BBe1-Zellen zeigen nach der Differenzierung eine verminderte CEACAM1-Expression (Abbildung 9). Die verminderte CEACAM1-Expression der stärker differenzierten C2BBe1-Zellen auf Transwell-Filtern wurde ebenso in Bezug auf die IL-8 Sekretion untersucht. Die Ergebnisse offenbaren eine IL-8 Sekretion bei C2BBe1 Wildtyp- und Vektorkontrollzellen nach Inkubation mit UV-behandelten *C. albicans* Hefezellen. Auch die auf den Transwell-Filtern differenzierten CEACAM1-knock-down Zellen SH2, SH3 und SH4 zeigten nach der *C. albicans* Behandlung keine IL-8 Sekretion. Vergleicht man die Konzentrationen des sekretierten IL-8 von C2BBe1-Wildtyp- und Vektorkontrollzellen, welche in Zellkulturplatten (136-247 pg/ml) kultiviert wurden mit den Zellen, welche in Transwell-Filtern (12-15 pg/ml) kultiviert wurden, fällt ein großer Konzentrationsunterschied auf, der mit der verringerten CEACAM1-Expression der Filter-differenzierten C2BBe1-Zellen übereinstimmt (Klaile et al. 2017).

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass eine Interaktion von CEACAM1 mit *C. albicans* Hefezellen eine pro-inflammatorische Reaktion in Form einer Sekretion von IL-8 in C2BBe1-Zellen verursacht und CEACAM1 für diese Reaktion obligat ist (Klaile et al. 2017).



**Abbildung 19:** CEACAM1 wird für die pro-inflammatorische IL-8 Freisetzung in C2BBE1-Zellen nach Stimulation mit *C. albicans* benötigt.

Die Grafiken stellen die Analyse der IL-8 Konzentration mit ELISA bei auf (A) Zellkulturplatten oder auf (B) Transwell-Filtern kultivierten C2BBE1-Zelllinien nach Stimulation mit *C. albicans* dar. Es wurden C2BBE1 Wildtypzellen (WT), Vektorkontrollzellen (Vector), shRNA CEACAM1 knock-down Zelllinien (SH2, SH3, SH4) kultiviert und entweder unbehandelt (unb.) oder mit UV-behandelten *C. albicans* Hefezellen (A, Ca; N=4;) in Zellkulturplatte oder apikal im Transwell-Filter (B, Ca; N=3) inkubiert. Nach 72 Stunden wurden die IL-8 Konzentration via ELISA aus Überständen von Zellkulturplatten (A) oder aus Medium der unteren Kammer von Transwell-Filtern (B) ermittelt. Zur statistischen Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test verwendet. Die horizontale Balken stellen den Mittelwert dar, vertikale Balken die Standardabweichung. Punkte stellen Einzelwerte von unabhängigen Versuchen dar. (C) Die Grafik stellt die Analyse der IL-8 Konzentration über ELISA bei auf Zellkulturplatten kultivierten C2BBE1-Zelllinien nach Stimulation mit Zytokinen dar. Die Zellen wurden entweder unbehandelt (unb.) oder mit Zytokinmix (cyto) inkubiert. Alle Überstände der Zelllinien wurden nach 48 Stunden geerntet und auf ihre IL-8 Konzentration mithilfe von ELISA analysiert. Die mittlere Konzentration eines repräsentativen Experiments (Triplikat) von zwei Durchführungen ist dargestellt. Abbildung aus (Klaile et al. 2017).

### 6.12 *C. albicans* induzierte IL-8 Sekretion benötigt eine Bindung zu C2BBE1-Zellen

Im folgenden Experiment sollte die pro-inflammatorische Antwort von C2BBE1-Zellen, vermittelt über die Freisetzung von IL-8 auf Einflussfaktoren untersucht werden. Hierzu ergab sich die Frage, ob die Immunantwort über ausgeschüttete lösliche Substanzen der C2BBE1-Zellen durch Infektion

mit *C. albicans* oder von der *C. albicans*-Interaktion mit der epithelialen Membran ausgelöst wird. Dazu wurde die IL-8 Sekretion von C2BBel-Zellen mit verschiedenen *C. albicans* Formen und mit verschiedenen Vorbehandlungen untersucht.

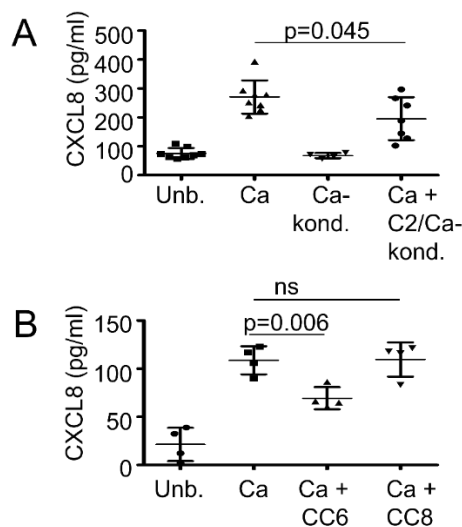
Um herauszufinden, ob die Immunreaktion durch ausgeschüttete lösliche Substanzen von C2BBel-Zellen durch *C. albicans* Infektion ausgelöst wird, wurden C2BBel-Zellen unbehandelt, mit UV-behandelten *C. albicans* Hefezellen, mit konditioniertem Medium (DMEM/20% FBS), welches von mit UV-inaktivierten *C. albicans* Hefezellen infizierten C2BBel-Zellen stammt und mit besagtem konditioniertem Medium zusammen mit UV-behandelten *C. albicans* Hefezellen für 96 Stunden inkubiert. Die abgenommenen Überstände wurden auf IL-8 getestet. Hierbei ergab sich keine Erhöhung der IL-8-Freisetzung bei Inkubation mit C2BBel-*Candida* konditioniertem Medium allein (Abbildung 20 A, (Klaile et al. 2017)). Es zeigte sich eine erhöhte Freisetzung von IL-8 bei Inkubation mit UV-behandelten *C. albicans* Hefezellen von ca. 280 pg/ml (Klaile et al. 2017). Im Gegensatz dazu wurde eine ca. 30 % geringere IL-8- Konzentration bei Zusatz von konditioniertem Medium, welches von C2BBel-Zellen mit UV-behandelten *C. albicans* Zellen stammt, zu C2BBel-Zelle mit Infektion von UV-behandelten *C. albicans* analysiert (Abbildung 20 A, (Klaile et al. 2017)).

In unseren Versuchen wurde herausgefunden, dass lösliches CEACAM6 im Zellkulturüberstand von C2BBel-Epithelzellen nach einer Stimulation mit *C. albicans*, welches UV-behandelt wurde, ansteigt (Abbildung 10). Des Weiteren unterbindet die CEACAM6 Interaktion mit Oberflächenstrukturen von *C. albicans* die CEACAM1-Bindung mit *C. albicans* im Gegensatz zu CEACAM8 (Abbildung 11). Der CEACAM1-Rezeptor verursacht nach Stimulation von *C. albicans* eine IL-8 Freisetzung (Abbildung 19). Es sollte daher getestet werden, welche Auswirkung lösliches CEACAM6 in C2BBel-Zellen nach *C. albicans* Behandlung auf die IL-8 Freisetzung hat.

Die Ergebnisse der Versuche ergaben eine IL-8 Freisetzung von ca. 110 pg/ml bei C2BBel-Zellen, welche mit UV-behandelten *C. albicans* für 52 Stunden inkubiert wurden (Klaile et al. 2017). Es konnte eine Reduktion der IL-8 Freisetzung um ca. 36% aus C2BBel-Zellen detektiert werden, wenn diese in Gegenwart von löslichen rekombinanten CEACAM6-Fc mit UV-behandelten *C. albicans* für 52 Stunden stimuliert wurden (Abbildung 20 B, (Klaile et al. 2017)). Zur Kontrolle wurden C2BBel-Zellen auch in Gegenwart von rekombinanten CEACAM8-Fc Rezeptoren unter Stimulation von UV-behandelten *C. albicans* Hefezellen untersucht. Die Gegenwart von

rekombinanten CEACAM8-Fc zeigte keinen Effekt auf die IL8- Freisetzung in C2BBel-Zellen (Abbildung 20 B, (Klaile et al. 2017)).

Vergleicht man die unterschiedlichen Inkubationsdauern von UV-behandelten *C. albicans* Hefezellen auf C2BBel-Zellen, zeigt sich eine Dynamik in der Zunahme der IL8-Ausschüttung von Enterozyten. Bei 52 Stunden Inkubation zeigt sich ein Wert von ca. 110 pg/ml  $\pm$  15 pg/ml, bei 72 Stunden 191,5 pg/ml  $\pm$  55,5 pg/ml und bei 96 Stunden ein Wert von 270 pg/ml  $\pm$  60 pg/ml (jeweils "WT Ca" bzw. "Ca", Abbildung 19 A, Abbildung 20 A und B, (Klaile et al. 2017)).



**Abbildung 20:** *C. albicans* induzierte IL-8 Sekretion benötigt eine Bindung zu C2BBel-Zellen

(A) C2BBel-Zellen wurden entweder unbehandelt (unb.; N=8), mit UV-behandelten *C. albicans* Hefezellen (Ca; N=8), mit konditioniertem Medium von C2BBel-Zellen infiziert mit lebenden *C. albicans* Hefezellen (Ca-kond; N=4) oder mit konditioniertem Medium und UV-behandelten *C. albicans* Hefezellen inkubiert (Ca+C2/Ca-kond.; N=7). Überstände wurden nach 96 Stunden auf ihre IL-8 Konzentration mithilfe eines ELISA getestet. (B) C2BBel-Zellen wurden entweder unbehandelt (unb.), mit UV-behandelten *C. albicans* Hefezellen (Ca) oder mit UV-behandelten *C. albicans* Hefezellen in Gegenwart von 30 $\mu$ g/ml rekombinanten CEACAM6-Fc (Ca+CC6) oder CEACAM8-Fc (Ca+CC8) behandelt. Alle Überstände wurden nach 52 Stunden eingesammelt und mithilfe von ELISA die jeweilige IL-8 Konzentration bestimmt. Hierzu wurde als statistische Auswertung ein zweiseitiger ungepaarter t-Test verwendet. Alle horizontalen Balken stellen den Mittelwert dar  $\pm$  Standardabweichung als vertikale Balken dargestellt. Punkte stellen Einzelwerte von unabhängigen Versuchen dar. Abbildung aus (Klaile et al. 2017).

Teile dieser Diskussionspunkte wurden bereits in (Klaile et al. 2017) publiziert.

### 7.1 Humane-CEACAM-Rezeptoren binden *C. albicans* und andere Hefen

In den Versuchen wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Pilzerreger *C. albicans* und *C. glabrata* an humanes CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 und CEACAM6 spezifisch binden können (Klaile et al. 2017). Ähnlich wie bei vielen bakteriellen Erregern war die Bindung auf Mitglieder der humanen CEACAM-Familie beschränkt (Zebhauser et al. 2005), denn in keiner der Bindungsanalysen wurde eine Bindung zwischen CEACAM1 von Ratten oder Mäusen nachgewiesen. Des Weiteren konnten wir für humanes CEACAM1 zeigen, dass die Bindung hauptsächlich durch die *N-terminal IgV-like domain* vermittelt wird (Klaile et al. 2017). Auch für bakterielle Erreger wurde gezeigt, dass die Bindung der Pathogene über die *N-terminal IgV-like domain* vermittelt wird (Kelleher et al. 2019, Sadarangani et al. 2011, Klaile et al. 2009). Unsere Ergebnisse zeigen, dass CEACAM1, 3, 5 und 6 *C. albicans* in Hefe und Keimschlauchform binden, was vermuten lässt, dass die Bindungsinteraktion von einer Oberflächenstruktur ausgeht, welche bei beiden Erscheinungsformen vorhanden ist.

In unserer Versuchsreihe konnte auch eine Bindung von CEACAM1, 3, 5 und 6 zu *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass *S. cerevisiae* die durch *AIEC*-Bakterien (*adherent-invasive Escherichia coli*) induzierte Colitis in CEACAM6-überexprimierenden Mäusen reduzieren (Sivignon et al. 2015). Dies lässt vermuten, dass *S. cerevisiae* in diesem Fall mit *AIEC* um die Bindungsstelle zu CEACAM6 kompetitiv konkurriert. Es ist daher nicht auszuschließen, dass eine Interaktion von *S. cerevisiae* und *C. albicans* zur Homöostase innerhalb des Darms beitragen kann. Um hierüber eine Aussage zu erhalten, benötigt es weitere Versuche mit *Saccharomyces cerevisiae* und *C. albicans*.

### 7.2 *C. albicans* bindet CEACAM1 und CEACAM6 über spezifische Oberflächenstrukturen und ist absättigbar

Bisher veröffentlichten Ergebnissen zeigen, dass die Interaktionen von CEACAMs mit Pathogenen über bakterielle oder virale Oberflächenproteine vermittelt werden (Kim et al. 2019, Sadarangani et al. 2011). Die bisher beschriebene Erkennung von *C. albicans* durch das angeborene Immunsystem hängt von mehreren pathogenassoziierten Molekularmustern (PAMPs) in der Zellwand von *C. albicans* ab (Netea et al. 2015, Netea et al. 2008). Die Bindung von *C.*

*albicans* zu epithelialen Zellen wird über eine Interaktion von fungalen Zellwandbestandteilen oder Oberflächenproteinen mit Rezeptoren des Wirts vermittelt (Naglik et al. 2017). Experimentell induzierte Veränderungen der Oberflächenstrukturen von *C. albicans* hatten eine Reduktion der gebundenen CEACAMs zu Folge. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass CEACAMs für eine Bindungsinteraktion mit *C. albicans* eine intakte Zellwand mit nicht-denaturierten Zellwandbestandteilen benötigen. Eine Vorbehandlung von *C. albicans* mit Zymolyase, um Glykane auf deren Rolle in der Bindungsinteraktion zwischen *C. albicans* und CEACAMs zu untersuchen, lässt keine eindeutige Aussage zu. Dies ist darin zu begründen, dass Zymolyase ein Enzym ist, welches zum Aufschluss von Hefezellwänden führt und neben Zuckerstrukturen auch daran verankerte Proteine aus den Zellwänden freisetzt. In den Ergebnissen der aufgeführten Blots (Western-Blot, Coomassie-Brilliant-Blue, Silberfärbung) zeigt sich ein Nachweis von Proteinen. Aus diesem Grund kann hier keine klare Aussage darüber gegeben werden, ob die Bindungsreduktion von mit Zymolyase vorbehandelter *C. albicans* zu CEACAM1-Fc und CEACAM6-Fc direkt von glykosylierten Strukturen abhängig ist oder ob Protein-Protein-Interaktionen mit freigesetzten Glykoproteinen eine Rolle spielen. Es lässt sich insgesamt vermuten, dass die Interaktion durch eine proteinartige Komponente von *C. albicans* vermittelt wird, da Hitze-Inaktivierung, Proteinase-K-Behandlung und Zymolyase-Behandlung von *C. albicans* die Bindung zu CEACAM1 und CEACAM6 vermindert und alle Vorbehandlungen proteinäre Oberflächenstrukturen denaturieren, zerstören oder entfernen (Klaile et al. 2017). Um die bindenden Strukturen auf der Oberfläche von *C. albicans* zu CEACAM-Rezeptoren identifizieren zu können, bedarf es weiterer Versuche. In unseren Versuchen verhielt sich die Bindungstendenz und Absättigung bei beiden rekombinanten Proteinen CEACAM1-Fc und CEACAM6-Fc zu *C. albicans* nahezu identisch (Klaile et al. 2017). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die maximale Bindungskapazität für die Proteine CEACAM1 und CEACAM6 von der Dichte der bindenden Oberflächenstrukturen der Wirtszelle *C. albicans* bestimmt wird und somit die Anzahl der exprimierten CEACAMs auf Darmepithelien oder in löslicher Form eine Rolle auf die Wirts-Pathogen Interaktion haben kann.

### 7.3 *C. albicans* kann die Expression von CEACAM1 und CEACAM6 in Darmepithelien modulieren

Die unterschiedliche Expression der verschiedenen Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) ist ein wichtiger Mechanismus für die zelltypspezifische Reaktion auf *C. albicans*. Die Reaktion auf einen spezifischen Erreger ist von den beteiligten PRRs und deren Zusammenspiel abhängig

(Netea et al. 2015, Netea et al. 2008). Es konnte mithilfe von Western-Blot, FACS-Analysen und qPCR gezeigt werden, dass C2BBe1-Zellen je nach Differenzierungsstadium, wie ihre Mutterklonzelle Caco-2, eine variierende Menge von CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 und CEACAM7 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (Abbildung 9 und (Ou et al. 2009)). Diese wurden als Immunrezeptoren in dieser Arbeit untersucht. IFN- $\gamma$  hat eine antivirale und immunstimulierende Funktion (Schroder et al. 2004) und kann im Rahmen der angeborenen Immunantwort bei einer Blutstrominfektion, wie einer Candidämie, ausgeschüttet werden (Gozalbo et al. 2014). Hierbei erhöht das Zytokin die Expression CEACAM1-L, CEACAM5 und CEACAM6 auf Darmepithelien (Fahlgren et al. 2003). C2BBe1-Zellen zeigen in unseren Versuchen auch die Fähigkeit auf IFN- $\gamma$  mit einer erhöhten Expression von CEACAM1, 5 und 6 zu reagieren (Klaile et al. 2017), sodass davon auszugehen ist, dass sie zu einer Immunantwort fähig sind. Weiterhin wäre es von Interesse, ob eine IL-8 Sekretion aus Darmepithelzellen, welche bei unseren Versuchen nach Behandlung mit *C. albicans* ausgeschüttet wurde, auch die CEACAM-Expression und weitere Zytokine beeinflussen kann, denn viele pro-inflammatorische Zytokine können zu einer CEACAM-Expressionserhöhung führen (Sadarangani et al. 2011, Fahlgren et al. 2003). In Lungenepithelzelllinien zeigt sich bei Stimulation von IFN- $\gamma$ , LPS (Lipopolysacchariden) und Bakterien keine Expressionserhöhung von CEACAM6 (Klaile et al. 2013). Dies könnte ein Hinweis sein, dass Epithelien unterschiedlich auf Pathogene und Entzündungsmediatoren reagieren und das Zusammenspiel der CEACAMs somit beeinflussen und helfen können das Pathogen gezielt zu bekämpfen. In Darmepithelien werden im Rahmen von Barrierestörungen, wie sie bei chronisch entzündlicher Darmerkrankung vorkommen, membrangebundene CEACAM6-Rezeptoren erhöht exprimiert, was in diesem Fall zum Eindringen von Pathogenen führen (Kelleher et al. 2019, Barnich et al. 2007) und somit eine Immunevasionsstrategie des Pathogens sein kann. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gehört zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und kann im Rahmen von Sepsis oxidativen Stress mit zytotoxischer Wirkung verursachen (Cepinskas und Wilson 2008). Bei Sepsis-Patienten/-innen konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress durch eine IL-6 Suppression zu einer erhöhten Anfälligkeit von Pilzinfektionen führt (Hoetzenecker et al. 2011). In der Analyse von C2BBe-Zellen liegt nach Behandlung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine Expressionserhöhung aller CEACAM-Rezeptoren inklusive CEACAM7 vor. Dies könnte einer Situation entsprechen, welche bei Sepsis durch erhöhten oxidativen Stress auf Darmepithelien vorliegt, was wiederum zu einer erhöhten Anfälligkeit von Pilzen führen könnte.

In Lungenepithelzellen wird CEACAM1, nicht aber CEACAM6, nach Infektion mit *Moraxella catarrhalis* erhöht exprimiert (Klaile et al. 2013). Die Ergebnisse der Versuche auf Darmepithelien zeigen eine erhöhte Expression von membrangebundenen CEACAM1 und löslichen CEACAM6 nach Infektion mit *C. albicans* (Klaile et al. 2017). Das Molekulargewicht von 70-100 kDa von CEACAM6 bei Western Blot-Analysen in Zelllysaten, Mukus- und Zellkulturüberstandfraktion zeigt, dass es sich bei der erhöhten Freisetzung nach Infektion mit *C. albicans*, um eine lösliche hochglykosylierte Form von CEACAM6 handeln muss und keine extravasikulär GPI-membrangebundene Form (Thompson et al. 1991). Die inhomogene sehr starke Glykosylierung bewirkte die Verteilung in der Western-Blot-Analyse über mehrere kDa. Es zeigte sich, dass auch exosomal membrangebundenes CEACAM6 vorhanden ist, welches jedoch nicht durch *C. albicans* reguliert wird. Die Sekretion von löslichem hochglykosyliertem CEACAM6 in C2BBel-Zellen wird vermutlich durch *C. albicans* induziert. Zusammenfassend kommt CEACAM6 bei mukosalen Epithelzellen in unterschiedlichen Formen vor (Muturi et al. 2013, Baranov et al. 1994). Hierzu gehört die membranverankerte GPI-Form, welche in extrazellulären Vesikeln oder in epithelialen Zellen exprimiert werden kann und die lösliche Form, die bei uns im Mukus und Darmlumen (Zellkulturüberstand) detektierbar war. Bei Infektion mit dem Pathogen *C. albicans*, konnte eine erhöhte Expression von löslichem CEACAM6 in Mukus und Darmlumen analysiert werden (Klaile et al. 2017). Dies spricht für die Hypothese von Baranov (Baranov et al. 1994), dass Kolon-Epithelzellen CEACAMs als Teil der unspezifischen Abwehr gegen Mikroorganismen in Form von Vesikeln freisetzen. Diese unspezifische Abwehr in Form einer Ausschüttung von löslichem CEACAM6, ist auch bei chronisch entzündlicher Darmerkrankung nach Substitution von enteraler Ernährung oder *S. cerevisiae* beschrieben (Sivignon et al. 2015, Keenan et al. 2014). Alle Formen von CEACAM6 können unterschiedliche Funktionen regulieren, da CEACAM6 heterophile Interaktionen mit Integrinrezeptoren (Johnson und Mahadevan 2015), mit CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 und CEACAM8 (Beauchemin und Arabzadeh 2013) sowie mit unterschiedlichen Pathogenen (Tchoupa et al. 2014) eingehen kann.

*Helicobacter pylori*, welcher mit Ulzera und Krebs des Magens in Zusammenhang steht, bindet CEACAM1 über die N-Domäne, was zu einer pro-inflammatorische IL-8-Ausschüttung führt und die Translokation des Virulenzfaktors CagA in die Wirtszellen ermöglicht (Javaheri et al. 2016b). *C. albicans* induziert auch eine erhöhte Expression von membrangebundenem CEACAM1 in C2BBel-Zellen (Klaile et al. 2017). In Abschnitt 7.5 wird ausführlich diskutiert, dass die



Interaktion von *C. albicans* mit CEACAM1 nicht in die Translokation des Pathogens in die Wirtszelle involviert ist.

Das Weiteren ist nicht auszuschließen, dass die Expressionserhöhung von CEACAM-Rezeptoren nach *C. albicans* Infektion durch das ausgeschüttete Zytokin IL-8 hervorgerufen wird, wie es in Lungenepithelzellen gezeigt wurde. Hier führt IL-8 zu einer CEACAM6-Expressionserhöhung (Han et al. 2016). Es wird allerdings nicht zwischen den Formen von CEACAM6 differenziert und die CEACAM6-Expressionserhöhung führt auf den Lungenepithelzellen zu einer erhöhten Adhäsion von *E. coli* (Han et al. 2016), wie auch bei Darmepithelien von Crohn-Patienten/-innen (Barnich et al. 2007), weswegen es sich hierbei vermutlich um eine membranverankerte Form des Rezeptors handelt. Es wäre daher von Interesse, in weiteren *in-vitro* Analysen den Einfluss von IL-8 auf die CEACAM6-Expression zu untersuchen, da eine CEACAM1-vermittelte IL-8 Ausschüttung zu einer verstärkten CEACAM6-Expression führen könnte. Schlussfolgernd kann weiterhin vermutet werden, dass lösliches CEACAM6 einen protektiven Einfluss auf die Homöostase im Darm haben kann (Keenan et al. 2014) und die Pathogene vor der Bindung zu membrangebunden Rezeptoren, welche das Eindringen in die Enterozyten wahrscheinlicher machen, schützt und sie über die Fäkalien ausscheidet (Matsuoka et al. 1990). In zukünftigen Analysen könnte bei CEACAM1-knock-down C2BBel-Zellen, die kein IL-8 ausschütten, getestet werden, ob eine Infektion mit *C. albicans* die Expression von löslichem CEACAM6 erhöht. Außerdem sollte getestet werden, ob IL-8 die CEACAM6-Expression auf C2BBel-Zellen erhöht, da nicht auszuschließen ist, dass sowohl die *C. albicans* Infektion als auch die IL-8 Ausschüttung sich gegenseitig verstärken.

#### 7.4 CEACAM6 beeinflusst CEACAM1

CEACAM8 kann wie CEACAM6 an CEACAM1 binden (Singer et al. 2014), ist aber im Gegensatz zu CEACAM6 nicht fähig mit *C. albicans* zu interagieren. CEACAM6 zeigte in den Ergebnissen, dass es die CEACAM1-Bindung zu *C. albicans* stark reduziert (Klaile et al. 2017). CEACAM8 hatte hingegen keinen Einfluss auf die Bindung von CEACAM1 an *C. albicans*. Es lässt sich daher vermuten, dass entweder eine Bindung zwischen CEACAM1 zu CEACAM6 stärker ist als die CEACAM1-Bindung zu *C. albicans* oder dass CEACAM1 und CEACAM6 das gleiche Epitop auf *C. albicans* zur Bindungsinteraktion nutzen und dass CEACAM6 mit einer höheren Affinität als CEACAM1 bindet (Klaile et al. 2017).

CEACAM6 wird auch bei Patienten/-innen mit der entzündlichen Morbus-Crohn-Erkrankung im Gastrointestinaltrakt erhöht exprimiert. Hier kann der Rezeptor über Typ-1 pili-abhängige Bindung von *adherent invasive Escherichia coli* (AIEC) eine Inflammation und eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität bedingen (Kelleher et al. 2019, Barnich et al. 2007). Eine enterale Ernährung wird bei Kindern als Therapie zur Induktion einer Remission bei aktivem Morbus Crohn eingesetzt (Ashton et al. 2019). Eine Studie untersuchte auf Caco2-Zellen die Auswirkung von polymeric formula (PF= enterale Ernährungssubstanz) auf die Expression von CEACAM6 und die anschließende veränderte Adhäsion von *adherent-invasive Escherichia coli* (AIEC). PF erhöht die Expression von löslichem CEACAM6 und vermindert die Adhäsion von AIEC auf dem Darmepithel, sodass vermutet werden kann, dass CEACAM6 an Epitope von AIEC bindet, die epitheliale Bindung und Immunantwort reduziert und somit zum Schutz des Darmes dienen könnte (Keenan et al. 2014). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch die Expressionserhöhung von löslichem CEACAM6 auf C2BBel-Zellen in Folge einer Infektion von *C. albicans* bedeuten. Damit ist gemeint, dass die vermehrte Freisetzung von löslichem CEACAM6 in Folge einer Infektion mit *C. albicans* zu einer verringerten Bindung von *C. albicans* an CEACAM1 führen kann, da CEACAM6 Epitope von *C. albicans* besetzt, welche auch für die Bindung an CEACAM1 notwendig sind. Somit würde die CEACAM1-vermittelte Immunantwort durch IL-8 nicht überschießend stattfinden und weniger Neutrophile rekrutiert werden. Solch ein entzündungshemmender Mechanismus ist in der Literatur auch bei *S. cerevisiae* beschrieben (Sivignon et al. 2015). Menschen scheiden außerdem über ihre Fäkalien CEACAM5 und CEACAM6 aus (Matsuoka et al. 1990), was auch ein Beitrag zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Darm bedeuten könnte und an einem *C. albicans* infizierten CEABAC10 Mausmodell weiter untersucht werden könnte. In Lungenepithelzelllinien verursacht die Infektion mit Bakterien, LPS und IFN- $\gamma$  keine Erhöhung von CEACAM6 (Klaile et al. 2013), sodass Pathogene direkt an CEACAM1 binden können, welches in Lungenepithelzelllinien bei Bindung von *Moraxella catharralis* eine TLR2-vermittelte immunsuppressive Wirkung zeigt (Slevogt et al. 2008). Sowohl der Mechanismus in der Lungenepithelzelllinie, als auch die IL-8 Reduktion durch die Ausschüttung von löslichem CEACAM6 in den Darmepithelien, könnte eine Immunevasionsstrategie der Pathogene sein. Aus diesem Grund wäre es interessant, die Auswirkung einer *C. albicans* Infektion auf Lungenepithelzelllinien zu untersuchen.

### **7.5 CEACAM-Expression hat keinen Einfluss auf die Adhäsion von *C. albicans* zu Epithelzellen**

Bakterien weisen eine erhöhte Adhärenz zu Epithelien bei CEACAM-Expressionserhöhung auf und können dadurch erleichtert in Epithelzellen eindringen (Kc et al. 2017, Sadarangani et al. 2011, Barnich et al. 2007). Dieser Mechanismus ist bei *C. albicans* nicht vorhanden. Die CEACAM-Expression auf Epithelien hat in zwei verschiedenen epithelialen Zellsystemen, HeLa und C2BBel, keinen Einfluss auf die Adhärenz von *C. albicans* zu den Epithelien (Klaile et al. 2017). Transfizierte HeLa-Zellen sind ein anerkanntes System und wurden bereits seit den 1990er Jahren für Bindungsanalysen mit bakteriellen Pathogenen verwendet werden (Gray-Owen et al. 1997). Aus diesem Grund lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die Bindung von *C. albicans* zu CEACAMs primär nicht zu einer Invasion der Hefe führen, sondern zu einer Immunantwort über zum Beispiel die Freisetzung von IL-8 oder die Erhöhung des TEER. Dennoch ist dabei zu bedenken, dass eine CEACAM-Expressionserhöhung im Darm zu einer Adhäsion und Translokation von Bakterien über das Schleimhautepithel in den Blutkreislauf führen kann und somit eine Bindung von *C. albicans* an das Darmepithel auch zu einer erhöhten bakteriellen Infektionsgefahr oder allgemein stärkeren Entzündungserscheinungen führen kann. Dies könnte in weiteren Versuchen getestet werden, indem C2BBel-Zellen zunächst eine Infektion mit *C. albicans* erhalten und im Anschluss eine Infektion mit pathogenen CEACAM-bindenden Darmbakterien, wie *Salmonella spp* (Kelleher et al. 2019). *C. albicans* Hyphen binden ähnlich stark wie Hefezellen (Abbildung 4) an CEACAMs, könnten aber durch ihre veränderten Oberflächenstrukturen dennoch eine andere Stimulation an CEACAMs verursachen, da teilweise andere weitere Immunrezeptoren (PRRs) aktiviert werden als durch Hefe-Formen (Zheng et al. 2015, Yan et al. 2013, Sudbery 2011). Daher sollte die Auswirkung der Adhäsion von *C. albicans* in Hyphenform in weiteren Versuchen getestet werden.

### **7.6 *C. albicans* Stimulation von Darmepithelien induziert eine vorübergehende CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung**

Die langen Isoformen besitzen zwei *immuno-receptor tyrosin-based inhibition motifs* (ITIM) und können an zwei Tyrosinresten phosphoryliert werden, was weitere CEACAM1-abhängige Signalkaskaden aktivieren kann (Sadarangani et al. 2011, Singer et al. 2010, Gray-Owen und Blumberg 2006). Durch die Interaktion mit Kinasen und Phosphatasen am ITIM über Phosphorylierung und Dephosphorylierung kann somit ein intrazelluläres Signal vermittelt werden. Beispielsweise verursacht die Interaktion von CEACAM1 mit den Pathogenen *Moraxella catarrhalis* und *Neisseria meningitides* eine über den Toll-like Rezeptor (TLR)-2 vermittelte NF-

$\kappa$ B-abhängige verminderte Immunantwort auf Lungenepithelzellen (Singer et al. 2014, Slevogt et al. 2008). Die Ergebnisse zeigten bei der Stimulation von *C. albicans* Hefezellen und bei *C. albicans* Keimschläuchen in beiden langen CEACAM1-Isoformen (CEACAM1-4L, CEACAM1-3L) eine deutliche transiente Phosphorylierung mit einer maximalen Induktion bei 20-30 min (Klaile et al. 2017). Beide *Candida*-formen zeigen ein ähnliches Phosphorylierungsmuster von CEACAM1-L über die Zeit. Somit ist davon auszugehen, dass *C. albicans* eine nachfolgende Signalkaskade aktivieren kann.

### **7.7 CEACAM1 vermittelt Modulation der Darmepithelpermeabilität nach Bindung von *C. albicans***

Die CEACAM1-Expression kann eine Veränderung der Permeabilität in Endothel- und Epithelialen Zellen verursachen (Jin et al. 2016, Najjar et al. 2013, Nouvion et al. 2010) und dadurch einen Einfluss auf eine Inflammation haben. In der Permeabilitätsuntersuchung von C2BBel-Zellen zeigte sich, dass die CEACAM1-Expression keinen direkten Einfluss auf die Permeabilität von C2BBel-Zellen bei unbehandelten Zellen hat, wobei hierbei zu berücksichtigen ist, dass bei Verwendung von Transwell-Filter nur eine minimale Menge an CEACAM1 nachweislich ist und die unbehandelte Zelllinie, wie ihre Mutterzelllinie, keine Überexpression an CEACAM1 aufweist (Ou et al. 2009). Die Permeabilität wird bei allen unbehandelten Zelllinien (Wildtyp, CEACAM1-knock-down und Vektor-Kontrolle) mit steigendem Differenzierungsstadium niedriger, was einer stärkeren Barriere des Enterozytenlayers entspricht.

In der Literatur wird ein Einfluss von *C. albicans* bei epithelialer Penetration auf die Permeabilität und auf den trans-epithelialen elektrischen Widerstand (TEER) von intestinalen Epithelzellen beschrieben (Bohringer et al. 2016), was sich auch in unseren Versuchsergebnissen widerspiegelt, denn bei Infektion von lebenden *C. albicans* zeigt sich eine Barrierezerstörung durch epitheliale Penetration unabhängig von der CEACAM1-Expression (Klaile et al. 2017).

Einflüsse der CEACAM1-Expression auf die Darmpermeabilität werden in der Literatur beschrieben. Bei Morbus Crohn, eine Erkrankung, die mit entzündlichen Prozessen, erhöhter Infektionsgefahr und Darmbarrierstörungen einhergeht, wird eine Reduktion von CEACAM1-Rezeptoren beschrieben (Roda et al. 2009). Eine Forschungsgruppe untersuchte ein Mausmodell mit Natriumsulfat (DSS)-induzierter Colitis, welches nach Induzierung eine Überexpression von CEACAM1 im Darm zeigte. Daraus resultierte eine Permeabilitätserniedrigung durch eine Erhöhung von Expression von tight-junction-Proteinen (Jin et al. 2016). In einem Mausmodell mit

fehlenden CEACAM1 zeigen vaskulären Endothelien eine Permeabilitätserhöhung (Nouvion et al. 2010). Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigten, dass eine Bindung von UV-behandelten *C. albicans* an C2BBel-Zellen mit CEACAM1-Expression den TEER erhöht, wohingegen der TEER bei fehlender CEACAM1-Expression nicht ansteigt (Klaile et al. 2017). Dies lässt vermuten, dass eine auf Darmepithelien vorhandene CEACAM1-Expression eine Auswirkung auf die zelluläre Modulation in Form einer Permeabilitätserniedrigung haben kann und dies über eine Bindung von *C. albicans* an CEACAM1 bedingt sein kann. Zusammengenommen trägt CEACAM1 vermutlich im Darmtrakt zur Regulation der epithelialen Barrierefunktion bei und dient somit zum Schutz vor eindringenden Pathogenen. Hierbei muss *C. albicans* zunächst durch die Mukusschicht gelangen, im Anschluss an das Darmepithel binden und CEACAM1 aktivieren/hochregulieren, um den Wirt vor Pathogenen durch eine Permeabilitätserniedrigung zu schützen. In weiteren Analysen wäre es von Interesse in einem Mausmodell die CEACAM1-Expression und deren Einfluss auf den TEER *in-vivo* auf Darmepithelien nach Behandlung mit *C. albicans* zu untersuchen.

#### **7.8 CEACAM-Rezeptoren und Einflüsse der mukosalen Immunität bei *C. albicans* Infektion**

Jedes Liganden-Rezeptor-System aktiviert spezifische intrazelluläre Wege und dies hat unterschiedliche Konsequenzen für die Aktivierung unterschiedlicher Immunantworten (Netea et al. 2008). Laut aktuellem Forschungsstand wird durch eine Infektion von *C. albicans* eine Immunantwort durch pro-inflammatorische Mechanismen ausgelöst, wozu die Ausschüttung von IL-8 mit Rekrutierung von Leukozyten in epithelialen Zellen gehört (Naglik et al. 2017, Naglik et al. 2011, Weindl et al. 2007). Unsere Versuche zeigten, dass die Interaktion von C2BBel-Zellen mit *C. albicans* Hefezellen eine pro-inflammatorische Reaktion durch IL-8 Sekretion verursacht und dass CEACAM1 für diese Reaktion obligat ist (Klaile et al. 2017). Somit ist davon auszugehen, dass CEACAM1 eine Immunantwort in epithelialen Zellen hervorruft.

Es zeigte sich, dass die IL-8 Freisetzung eine direkte Interaktion von *C. albicans* zu C2BBel-Zellen benötigt. Nach Stimulation von C2BBel-Zellen mit *C. albicans* wird ein löslicher Faktor von C2BBel-Zellen in das Zellkulturmedium ausgeschüttet, welcher die pro-inflammatorische Reaktion in Form einer IL-8 Ausschüttung der C2BBel-Zellen gegenüber *C. albicans* reduziert (Klaile et al. 2017). Da gezeigt werden konnte, dass erhöhte Mengen an löslichem CEACAM6 in den konditionierten Zellkulturüberständen, wurde auch der Einfluss durch die Zugabe von rekombinantem CEACAM6 getestet. Auch das gereinigte lösliche CEACAM6 verringert die IL-

8 Sekretion von C2BB<sub>1</sub>-Zellen bei Infektion mit *C. albicans* (Klaile et al. 2017). Es ist somit wahrscheinlich, dass lösliches CEACAM6 die Immunantwort des CEACAM1-Rezeptors zu *C. albicans* beeinflusst. Im Gegensatz zu löslichem CEACAM8, welches die CEACAM1-Immunantwort nicht veränderte. Auch zeigt die IL-8 Freisetzung von C2BB<sub>1</sub>-Zellen durch *C. albicans* Infektion eine kontinuierliche Zunahme zu den untersuchten Zeitpunkten von 52 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden.

Interessanterweise kann die Bindung von *Helicobacter pylori* in Magenepithelzellen über die Bindung von CEACAM1 ebenso eine IL-8 Freisetzung induzieren. Die Unterbrechung der Interaktion zwischen *H. pylori* und CEACAM1 soll ein vielversprechender therapeutischer Angriffspunkt zur Bekämpfung der pathogenvermittelten Erkrankungen aufweisen (Javaheri et al. 2016b). Um herauszufinden, ob ein solcher therapeutischer Ansatzpunkt der Inhibition von CEACAM1-vermittelten *C. albicans*-Interaktion, wie er auch bei Bakterien diskutiert wird (Kc et al. 2017), bei bestimmten gefährdeten Patientengruppen sinnvoll ist, bedarf es weiterer Analysen. CEACAM1 hat im Körper unterschiedliche Funktionen und reguliert Immunantworten auf aktivierende oder suppressive Weise, letztere beispielsweise in Lungenepithelzellen über CEACAM1-Pathogeninteraktion mit einer folgenden Reduktion des TLR-2 vermittelten NF- $\kappa$ B-inflammatorischen Signals über die Phosphorylierung des ITIMs von CEACAM1 (Singer et al. 2014, Slevogt et al. 2008). CEACAM1 kann die Immunantwort auch aktivieren, wie auf CD-8<sup>+</sup>-T-Zellen, welche bei Infektion mit lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) CEACAM1 exprimieren, was zur Rekrutierung lymphozytenspezifischer Proteinkinase in den T-Zell-Rezeptor-Komplex führt und zur Bildung einer adäquaten Immunantwort und somit zur Verhinderung der Viruspersistenz (Khairnar et al. 2018). Es ist nicht auszuschließen, dass CEACAM1 im Darm unterschiedliche regulatorische Einflüsse, wie pro- und antiinflammatorisch Wirkung auf das Immunsystem ausübt und dies je nach Gastrointestinalabschnitt variieren kann. Die Funktion von CEACAM1 könnte je nach Epithelart und CEACAM1-Expressionsdichte beeinflusst werden. Aber auch die Länge oder Art der Entzündung könnte einen Einfluss haben (Kelleher et al. 2019). CEACAM1 übt seine immunmodulatorischen Funktionen meist über die Regulation der Aktivität anderer Immunrezeptoren aus (Singer et al. 2014, Tchoupa et al. 2014, Slevogt et al. 2008), weswegen die Kenntnis über Expressions- und Signaleigenschaften dieser Rezeptoren in den jeweiligen Geweben wichtig ist, da diese Auswirkungen auf die CEACAM1-Funktion haben können. Um zu analysieren, ob CEACAM1 weitere aktivierende oder suppressive Einflüsse im Gastrointestinaltrakt haben kann, sind weitere Analysen notwendig. Auch

verschiedene Reize, wie Zytokine (Klaile et al. 2013) oder oxidativer Stress (Hoetzenecker et al. 2011), Pathogene (Javaheri et al. 2016b, Slevogt et al. 2008) oder eine Dysbiose, kann die CEACAM1-Funktion unterschiedlich beeinflussen.

Insgesamt erschwert die häufig vorkommende Co-Expression von CEACAM-Rezeptoren auf humanen Epithelien (Tchoupa et al. 2014), die unterschiedlichen Spleißingvarianten von CEACAM1 (Gray-Owen und Blumberg 2006), die unterschiedlichen CEACAM6-Formen (Muturi et al. 2013, Baranov et al. 1994) sowie die Beschaffenheit der mukosalen Epitheloberfläche des Kolon, die exakte Entschlüsselung der einzelnen Funktionen und Interaktionen der CEACAM-Rezeptoren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die pro-inflammatorische Antwort von IL-8 durch *C. albicans* eine Bindung zu CEACAM1 auf den C2BB $\beta$ 1-Zellen benötigt und CEACAM6-Fc, nicht aber CEACAM8-Fc, die pro-inflammatorische IL-8 Freisetzung von C2BB $\beta$ 1-Zellen bei *C. albicans* Stimulation reduziert (Klaile et al. 2017). Die Freisetzung von IL-8 kann Neutrophile zum Infektionsort rekrutieren, welche zum angeborenen Immunsystem gehören und zum Schutz gegen Pathogene benötigt werden. Sie spielen eine Rolle in der Homöostase des Gastrointestinaltrakts und sind wichtig, damit sich *C. albicans* nicht außerhalb des Gastrointestinaltrakt verbreitet (Qin et al. 2016b, Zheng et al. 2015, Weindl et al. 2007). CEACAM1 kann Neutrophile über eine Pathogenbindung (Sarantis und Gray-Owen 2012, Sadarangani et al. 2011), lösliche Agonisten (Skubitz und Skubitz 2008) oder deren Adhäsion an Endothelien stimulieren (Panczyszyn und Wieczorek 2012) sowie einen Einfluss auf deren Lebensdauer nehmen (Singer et al. 2005). Dementsprechend kann lösliches CEACAM6, was bei einer Infektion mit *C. albicans* vermehrt ausgeschüttet wird und die IL-8 Sekretion von Darmepithelien reduziert, die Immunantwort der Neutrophilen beeinflussen. Lösliches CEACAM6 könnte an Epitope von *C. albicans*, welche auch für die CEACAM1-*C. albicans* Interaktion notwendig sind oder direkt an CEACAM1 binden und somit die Bindungsstelle für *C. albicans* blockieren. In beiden Fällen ist es wahrscheinlich, dass die pro-inflammatorische Immunantwort von IL-8 und somit die Aktivierung von Neutrophilen reduziert wird. Dies könnte eine Immunevasionsstrategie von *C. albicans* sein, aber es könnte auch zum Schutz und der Homöostase des Darms beitragen, indem eine Erhöhung von löslichem CEACAM6 die Invasion von Pathogenen wie CEACAM6-bindenden *AIEC* reduziert (Keenan et al. 2014).

In den Ergebnissen zeigte sich, dass CEACAM8 keine Bindung mit *C. albicans* und anderen Pilzen eingeht und CEACAM8 die Bindungsinteraktion von CEACAM1 zu *C. albicans* nicht reduziert

(Klaile et al. 2017). Auch die IL-8 Sekretion bei Zugabe von CEACAM8, veränderte die Immunantwort von CEACAM1 auf C2BB<sub>1</sub>-Zellen und Infektion von *C. albicans* nicht (Klaile et al. 2017). Die IL-8 Sekretion vermittelt durch CEACAM1, kann zu einer Rekrutierung von Granulozyten im humanen Organismus führen (Naglik et al. 2017). Granulozyten können über eine durch bakterielle DNA hervorgerufene TLR9-Signalkaskade vermehrt CEACAM8 ausschütten, welches an CEACAM1 binden kann. Diese Bindung führt in Lungenepithelzellen zu einer reduzierten TLR2-abhängigen Entzündungsreaktionen (Singer et al. 2014). Da auch die Infektion von *C. albicans* eine erhöhte Expression von TLR9 und TLR2 auf mukosalen Epithelien bedingt (Zheng et al. 2015), könnte es möglich sein, dass Granulozyten, welche vermehrt CEACAM8 ausschütten können, eine verminderte Entzündungsreaktion im Verlauf der Infektion hervorrufen. *C. albicans* könnte somit die Immunantwort reduzieren. Um diese Vermutung aufzuklären, benötigt es weitere *in-vitro* und *in-vivo* Analysen. Allerdings legen die Ergebnisse unserer Analysen nahe, dass CEACAM8 mit CEACAM1 an einem Epitop Bindungen eingeht, welche schwächer als die Interaktion zwischen *C. albicans* und CEACAM1 ist, da unabhängig der zugefügten Menge an CEACAM8 die gebundene Menge an CEACAM1 mit *C. albicans* annähernd identisch bleibt (Klaile et al. 2017).

Sepsis hat eine ausgeprägte Wirkung auf das Darmmikrobiom (Dickson 2016). Dieses besteht unter anderem aus der bakteriellen Mikrobiota und dem Mycobiom, interagiert mit dem Immunsystem des Darms und kann einen Einfluss auf Gesundheit und Krankheit ausüben (Kruger et al. 2019, Polke et al. 2015). Dysbiosen im Darm von Patienten/-innen, welche zuvor hospitalisiert waren und anschließend eine Sepsis entwickelten, wurden in Zusammenhang gebracht. Dies deutet auf eine Korrelation zwischen der Zusammensetzung des Darmmikrobioms und der Sepsisanfälligkeit hin (Prescott et al. 2015). Präklinische Studien haben gezeigt, dass die Wirtsabwehr bei Sepsis durch eine Störung des Darmmikrobioms durch Breitbandantibiotika durch verschiedene Mechanismen beeinträchtigt werden können (Schuijt et al. 2016, Gauguet et al. 2015). Ergebnisse von humanen CEACAM1-transgenen Mäusen zeigen keine Veränderungen in der Wirtsreaktion zwischen den transgenen Mäusen und den Wildtyp-Geschwistern gegenüber Kolonisation oder Infektionen von *C. albicans* (Klaile et al. 2019). Allerdings weist die Reaktion von Neutrophilen von Mäusen, welche ein geschwächtes Mikrobiom haben, eine geringere Fähigkeit auf Entzündungssignale in Gewebe zu wandern (Karmarkar und Rock 2013). Eine Art und Weise, wie das bakterielle Mikrobiom das Mycobiom in Schach hält, ist die Produktion extrazellulärer Substanzen, die zum Beispiel die Hefe-Keimschlauch-Transformation von *C.*



*albicans* hemmen (Sam et al. 2017). Dieser hemmende Mechanismus fällt bei Antibiotikabehandlung zusätzlich weg. Probiotika hingegen können die Inzidenz schwerer Infektionen verringern (Bo et al. 2014). Auch *Saccharomyces cerevisiae* kann beispielweise eine durch *AIEC* induzierte Colitis verringern und eine Reduktion der eintretenden Pathogenen über die Darmschleimhaut verursachen (Sivignon et al. 2015). Eine ähnliche Wirkung könnte auch über eine Substitution von *C. albicans* bei mit Antibiotika behandelten Patienten vermittelt werden. Pathogene könnten über die Ausschüttung von löslichem CEACAM6 mit den Fäkalien ausgeschieden werden. Zusätzlich könnte über die Bindung von CEACAM1 eine Immunantwort mithilfe einer Rekrutierung von Neutrophilen über die CEACAM1-vermittelte IL-8 Freisetzung und die Reduktion der Permeabilität ausgelöst werden.

Insgesamt bleibt es weiterhin von großer Bedeutung neue therapeutische Ansätze für die Candidämie zu eruieren (van der Poll et al. 2017, Carpino et al. 2017, Kc et al. 2017). Somit sollte zukünftig der Einfluss von CEACAM-Rezeptoren zu *C. albicans* und der Einfluss von diesem Zusammenspiel mit und auf den Organismus untersucht werden, um die Mortalitätsraten von Sepsis, bei denen *C. albicans* ursächlich ist, zu reduzieren.

---

## 8 Schlussfolgerung

---

In dieser Studie konnten vier neue Bindungspartner, zugehörig zu der CEACAM-Familie, für den fakultativen Erreger *C. albicans* identifiziert werden. Diese Erkenntnisse tragen zur Aufklärung der Wirtsreaktion auf fungale Erreger bei und könnten eine Grundlage für ein verbessertes Management von *C. albicans* Infektionen darstellen.

CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 und CEACAM6 zeigen eine spezifische Bindungsinteraktion zu *C. albicans* in ihrer Hefe- und Keimschlauchform, zu *Candida glabrata* und zu *S. cerevisiae*. Des Weiteren binden sie die Pilze, wie auch Bakterien, über eine *N-terminal IgV-like domain*. Die Bindung zu *C. albicans* ist humanspezifisch und ist nicht nachweisbar in phylogenetisch eng verwandten Spezies, wie etwa Mäusen oder Ratten. Die Bindung von CEACAM1 und CEACAM6 zu *C. albicans* benötigt intakte Zellwandproteine und ist absättigbar.

Durch eine Infektion mit *C. albicans* auf der Darmepithelzelllinie C2BBel werden CEACAM-Rezeptoren in ihrer Expression hochreguliert. CEACAM6 wird in seiner löslichen Form erhöht ausgeschüttet und CEACAM1 in membrangebunden Form vermehrt exprimiert.

Interessanterweise hat eine erhöhte CEACAM-Expression auf C2BBel-Zellen keinen Einfluss auf die Adhäsion von *C. albicans*. Bakterien hingegen weisen eine erhöhte Adhäsion zu Epithelien bei CEACAM-Expressionserhöhung auf und können somit in Epithelzellen erleichtert eindringen. Die Bindung von CEACAMs zu *C. albicans* führt vermutlich primär nicht zu einer Invasion der Hefe, sondern zu einer Immunantwort über zum Beispiel die CEACAM1-vermittelte Freisetzung von IL-8 oder die Erhöhung des TEER. Die durch *C. albicans* verursachte Erhöhung der CEACAM-Expression auf Darmepithelzellen kann Bakterien jedoch die Translokation in den Blutstrom erleichtern.

CEACAM6 reduziert die Bindung zwischen *C. albicans* und CEACAM1. Dies ist von besonderem Interesse, da die Bindung von *C. albicans* zu CEACAM1 zu einer Phosphorylierung des ITIM (*immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif*) führt und somit verschiedene nachfolgende Signalkaskaden regulieren kann. Hierzu gehört die CEACAM1-vermittelte pro-inflammatorischen IL-8 Sekretion in Darmepithelien nach Bindung von *C. albicans*. Die IL-8 Sekretion kann zur weiteren Rekrutierung von Neutrophilen führen und somit zu einer lokalen Inflammation. Außerdem wird der transepitheliale Widerstand bei Bindung von CEACAM1 zu *C. albicans* erhöht, was auf eine Permeabilitätserniedrigung hindeutet und ein Eindringen des Pilzes in den Blutstrom erschweren kann. Das lösliche CEACAM6 kann die Interaktion von *C. albicans* mit

CEACAM1 auf der Zelloberfläche kontrollieren und somit deren Signalgebung und folgende Immunantwort reduzieren. Lösliches CEACAM6 könnte einen protektiven Effekt für den Wirt haben, indem es an schädliche Pathogene bindet und mit den Fäkalien ausgeschieden wird. Mit CEACAM6 gebundene Pathogene können außerdem die Bindungsmöglichkeit an epitheliale CEACAM1-Rezeptoren reduzieren und somit die Immunantwort indirekt regulieren. Diese Mechanismen können zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Darmmikrobioms beitragen und den Wirt vor eindringenden Pathogenen über die Darmschleimhaut schützen.

CEACAM-Rezeptoren spielen vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase zwischen der mukosalen Oberfläche des Darms und *C. albicans*. CEACAMs könnten somit einen Einfluss auf die Pathophysiologie der Candidämie haben. Es benötigt weitere Studien, um herauszufinden, wie die Interaktion zwischen *C. albicans* und CEACAMs zur Homöostase innerhalb des Gastrointestinaltrakts führt und welche Bedingungen *C. albicans* zu einer Invasion in den Blutstrom nutzen könnte.

Es ist von großer Bedeutung die Pathogenese und neue therapeutische Ansätze für die Candidämie zu erforschen, um die Mortalitätsraten von Sepsis, bei denen *C. albicans* einen Einfluss ausübt, zu reduzieren. Aus diesem Grund sollte zukünftig der Einfluss von CEACAM-Rezeptoren zu *C. albicans* und der Einfluss dieses Zusammenspiels mit und auf den Organismus untersucht werden.

---

## 9 Literatur- und Quellenverzeichnis

---

2016. Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intensive Care Med*, 42 (12):1980-1989.
- Angus DC, Pereira CA, Silva E. 2006. Epidemiology of severe sepsis around the world. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 6 (2):207-212.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 29 (7):1303-1310.
- Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*, 50 (2):197-263.
- Arsenault AB, Bliss JM. 2015. Neonatal Candidiasis: New Insights into an Old Problem at a Unique Host-Pathogen Interface. *Curr Fungal Infect Rep*, 9 (4):246-252.
- Ashton JJ, Gavin J, Beattie RM. 2019. Exclusive enteral nutrition in Crohn's disease: Evidence and practicalities. *Clin Nutr*, 38 (1):80-89.
- Baggiolini M, Clark-Lewis I. 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS letters*, 307 (1):97-101.
- Baranov V, Yeung M, Hammarström S. 1994. Expression of Carcinoembryonic Antigen and Nonspecific Cross-Reacting 50-kDa Antigen in Human Normal and Cancerous Colon Mucosa: Comparative Ultrastructural Study with Monoclonal Antibodies. *Cancer research*, 54:3305-3314.
- Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantschke P, Allez M, Peeters H, Bommelaer G, Desreumaux P, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. 2007. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest*, 117 (6):1566-1574.
- Beauchemin N, Arabzadeh A. 2013. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 32 (3-4):643-671.
- Becker KL, Ifrim DC, Quintin J, Netea MG, van de Veerdonk FL. 2015. Antifungal innate immunity: recognition and inflammatory networks. *Semin Immunopathol*, 37 (2):107-116.
- Billker O, Popp A, Brinkmann V, Wenig G, Schneider J, Caron E, Meyer TF. 2002. Distinct mechanisms of internalization of *Neisseria gonorrhoeae* by members of the CEACAM receptor family involving Rac1- and Cdc42-dependent and -independent pathways. *Embo j*, 21 (4):560-571.
- Blencowe H, Cousens S, Chou D, Oestergaard M, Say L, Moller A-B, Kinney M, Lawn J, the Born Too Soon Preterm Birth Action G. 2013. Born Too Soon: The global epidemiology of 15 million preterm births. *Reproductive Health*, 10 (1):S2.
- Bo L, Li J, Tao T, Bai Y, Ye X, Hotchkiss RS, Kollef MH, Crooks NH, Deng X. 2014. Probiotics for preventing ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database Syst Rev*, (10):Cd009066.
- Bohringer M, Pohlers S, Schulze S, Albrecht-Eckardt D, Piegsa J, Weber M, Martin R, Hunniger K, Linde J, Guthke R, Kurzai O. 2016. *Candida albicans* infection leads to barrier breakdown and a MAPK/NF-kappaB mediated stress response in the intestinal epithelial cell line C2BBel. *Cell Microbiol*, 18 (7):889-904.

- Böhringer M, Rakin A, Neubauer H, Sprague LD. 2018. Development of a flow cytometry based assay to determine the invasion of enteropathogenic *Yersinia* into C2BBel cells. *Journal of Microbiological Methods*, 149:29-35.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101 (6):1644-1655.
- Boulton IC, Gray-Owen SD. 2002. Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nat Immunol*, 3 (3):229-236.
- Brown GD, Denning DW, Levitz SM. 2012. Tackling Human Fungal Infections. *Science*, 336 (6082):647-647.
- Carpino N, Naseem S, Frank DM, Konopka JB. 2017. Modulating Host Signaling Pathways to Promote Resistance to Infection by *Candida albicans*. *Front Cell Infect Microbiol*, 7:481.
- Cepinskas G, Wilson JX. 2008. Inflammatory response in microvascular endothelium in sepsis: role of oxidants. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 42 (3):175-184.
- Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. 1988. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res*, 48 (7):1936-1942.
- Chou EH, Mann S, Hsu TC, Hsu WT, Liu CC, Bhakta T, Hassani DM, Lee CC. 2020. Incidence, trends, and outcomes of infection sites among hospitalizations of sepsis: A nationwide study. *PLoS One*, 15 (1):e0227752.
- Cohen R, Roth FJ, Delgado E, Ahearn DG, Kalser MH. 1969. Fungal Flora of the Normal Human Small and Large Intestine. *New England Journal of Medicine*, 280 (12):638-641.
- D. Haller GH. 2015. *Darmgesundheit und Mikrobiota, essentials*. Springer Fachmedien Wiesbaden.
- da Silva Dantas A, Lee KK, Raziunaite I, Schaefer K, Wagener J, Yadav B, Gow NAR. 2016. Cell biology of *Candida albicans*–host interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 34 (Supplement C):111-118.
- Dalle F, Wachtler B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, Labruere C, Bonnin A, Hube B. 2010. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol*, 12 (2):248-271.
- Dickson RP. 2016. The microbiome and critical illness. *The Lancet Respiratory medicine*, 4 (1):59-72.
- Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. 1993. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun*, 61 (11):4569-4574.
- Eggimann P, Pittet D. 2014. *Candida* colonization index and subsequent infection in critically ill surgical patients: 20 years later. *Intensive Care Medicine*, 40 (10):1429-1448.
- Eggimann P, Garbino J, Pittet D. 2003. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*, 3 (11):685-702.
- Fahlgren A, Baranov V, Frangmyr L, Zoubir F, Hammarstrom ML, Hammarstrom S. 2003. Interferon-gamma tempers the expression of carcinoembryonic antigen family molecules in human colon cells: a possible role in innate mucosal defence. *Scand J Immunol*, 58 (6):628-641.
- Farrant BM, White SW, Shepherd CCJ. 2019. Trends and predictors of extreme preterm birth: Western Australian population-based cohort study. *PloS one*, 14 (3):e0214445-e0214445.
- Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K. 2016. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med*, 193 (3):259-272.

- Frangsmyr L, Baranov V, Hammarstrom S. 1999. Four carcinoembryonic antigen subfamily members, CEA, NCA, BGP and CGM2, selectively expressed in the normal human colonic epithelium, are integral components of the fuzzy coat. *Tumour Biol*, 20 (5):277-292.
- Galtier M, De Sordi L, Sivignon A, de Vallee A, Maura D, Neut C, Rahmouni O, Wannerberger K, Darfeuille-Michaud A, Desreumaux P, Barnich N, Debarbieux L. 2017. Bacteriophages Targeting Adherent Invasive Escherichia coli Strains as a Promising New Treatment for Crohn's Disease. *J Crohns Colitis*, 11 (7):840-847.
- Gauguet S, D'Ortona S, Ahnger-Pier K, Duan B, Surana NK, Lu R, Cywes-Bentley C, Gadjeva M, Shan Q, Priebe GP, Pier GB. 2015. Intestinal Microbiota of Mice Influences Resistance to Staphylococcus aureus Pneumonia. *Infection and immunity*, 83 (10):4003-4014.
- Gey GO. 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res*, 12:264-265.
- Gozalbo D, Maneu V, Gil ML. 2014. Role of IFN-gamma in immune responses to Candida albicans infections. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 19:1279-1290.
- Gray-Owen SD, Blumberg RS. 2006. CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol*, 6 (6):433-446.
- Gray-Owen SD, Lorenzen DR, Haude A, Meyer TF, Dehio C. 1997. Differential Opa specificities for CD66 receptors influence tissue interactions and cellular response to Neisseria gonorrhoeae. *Mol Microbiol*, 26 (5):971-980.
- Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. 2003. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis*, 37 (9):1172-1177.
- Hack CE, Hart M, van Schijndel RJ, Eerenberg AJ, Nuijens JH, Thijs LG, Aarden LA. 1992. Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators. *Infection and immunity*, 60 (7):2835-2842.
- Hammarstrom S, Baranov V. 2001. Is there a role for CEA in innate immunity in the colon? *Trends Microbiol*, 9 (3):119-125.
- Hammarström S. 1999. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Seminars in cancer biology*, 9 (2):67-81.
- Han B, Li M, Xu Y, Islam D, Khang J, Del Sorbo L, Lee W, Szaszi K, Zhong N, Slutsky AS, Li Y, Zhang H. 2016. Tsr Chemoreceptor Interacts With IL-8 Provoking E. coli Transmigration Across Human Lung Epithelial Cells. *Scientific Reports*, 6 (1):31087.
- Heinrich A, Heyl KA, Klaile E, Muller MM, Klassert TE, Wiessner A, Fischer K, Schumann RR, Seifert U, Riesbeck K, Moter A, Singer BB, Bachmann S, Slevogt H. 2016a. Moraxella catarrhalis induces CEACAM3-Syk-CARD9-dependent activation of human granulocytes. *Cell Microbiol*, 18 (11):1570-1582.
- Heinrich A, Heyl KA, Klaile E, Muller MM, Klassert TE, Wiessner A, Fischer K, Schumann RR, Seifert U, Riesbeck K, Moter A, Singer BB, Bachmann S, Slevogt H. 2016b. Moraxella catarrhalis induces CEACAM3-Syk-Card9-dependent activation of human granulocytes. *Cell Microbiol*.
- Hoetzenecker W, Echtenacher B, Guenova E, Hoetzenecker K, Woelbing F, Brück J, Teske A, Valtcheva N, Fuchs K, Kneilling M, Park J-H, Kim K-H, Kim K-W, Hoffmann P, Krenn C, Hai T, Ghoreschi K, Biedermann T, Röcken M. 2011. ROS-induced ATF3 causes susceptibility to secondary infections during sepsis-associated immunosuppression. *Nature medicine*, 18 (1):128-134.

- Huber M, Izzi L, Grondin P, Houde C, Kunath T, Veillette A, Beauchemin N. 1999. The carboxyl-terminal region of biliary glycoprotein controls its tyrosine phosphorylation and association with protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 in epithelial cells. *J Biol Chem*, 274 (1):335-344.
- Janeway CA. 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology Today*, 13 (1):11-16.
- Javaheri A, Kruse T, Moonens K, Mejias-Luque R, Debraekeleer A, Asche CI, Tegtmeyer N, Kalali B, Bach NC, Sieber SA, Hill DJ, Koniger V, Hauck CR, Moskalenko R, Haas R, Busch DH, Klaile E, Slevogt H, Schmidt A, Backert S, Remaut H, Singer BB, Gerhard M. 2016a. Erratum: *Helicobacter pylori* adhesin HopQ engages in a virulence-enhancing interaction with human CEACAMs. *Nat Microbiol*, 2:16243.
- Javaheri A, Kruse T, Moonens K, Mejias-Luque R, Debraekeleer A, Asche CI, Tegtmeyer N, Kalali B, Bach NC, Sieber SA, Hill DJ, Koniger V, Hauck CR, Moskalenko R, Haas R, Busch DH, Klaile E, Slevogt H, Schmidt A, Backert S, Remaut H, Singer BB, Gerhard M. 2016b. *Helicobacter pylori* adhesin HopQ engages in a virulence-enhancing interaction with human CEACAMs. *Nat Microbiol*, 2:16189.
- Jin Y, Lin Y, Lin L, Sun Y, Zheng C. 2016. Carcinoembryonic antigen related cellular adhesion molecule 1 alleviates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice. *Life Sci*, 149:120-128.
- Johnson B, Mahadevan D. 2015. Emerging Role and Targeting of Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6 (CEACAM6) in Human Malignancies. *Clinical cancer drugs*, 2 (2):100-111.
- Jouault T, Ibata-Ombetta S, Takeuchi O, Trinel P-A, Sacchetti P, Lefebvre P, Akira S, Poulain D. 2003. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *The Journal of infectious diseases*, 188 (1):165-172.
- Karmarkar D, Rock KL. 2013. Microbiota signalling through MyD88 is necessary for a systemic neutrophilic inflammatory response. *Immunology*, 140 (4):483-492.
- Kc R, Shukla SD, Walters EH, O'Toole RF. 2017. Temporal upregulation of host surface receptors provides a window of opportunity for bacterial adhesion and disease. *Microbiology*, 163 (4):421-430.
- Keenan JI, Hooper EM, Tyrer PC, Day AS. 2014. Influences of enteral nutrition upon CEACAM6 expression by intestinal epithelial cells. *Innate Immun*, 20 (8):848-856.
- Kelleher M, Singh R, O'Driscoll CM, Melgar S. 2019. Carcinoembryonic antigen (CEACAM) family members and Inflammatory Bowel Disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 47:21-31.
- Khairnar V, Duhan V, Patil AM, Zhou F, Bhat H, Thoens C, Sharma P, Adomati T, Friendrich S-K, Bezgovsek J, Dreesen JD, Wennemuth G, Westendorf AM, Zelinsky G, Dittmer U, Hardt C, Timm J, Göthert JR, Lang PA, Singer BB, Lang KS. 2018. CEACAM1 promotes CD8<sup>+</sup> T cell responses and improves control of a chronic viral infection. *Nature Communications*, 9 (1):2561.
- Kim WM, Huang YH, Gandhi A, Blumberg RS. 2019. CEACAM1 structure and function in immunity and its therapeutic implications. *Semin Immunol*, 42:101296.
- Kinugasa T, Kuroki M, Takeo H, Matsuo Y, Ohshima K, Yamashita Y, Shirakusa T, Matsuoka Y. 1998. Expression of four CEA family antigens (CEA, NCA, BGP and CGM2) in normal and cancerous gastric epithelial cells: up-regulation of BGP and CGM2 in carcinomas. *Int J Cancer*, 76 (1):148-153.
- Kitamura K, Yamamoto Y. 1972. Purification and properties of an enzyme, zymolyase, which lyses viable yeast cells. *Arch Biochem Biophys*, 153 (1):403-406.

- Kitamura K, Kaneko T, Yamamoto Y. 1971. Lysis of viable yeast cells by enzymes of *Arthrobacter luteus*. *Arch Biochem Biophys*, 145 (1):402-404.
- Klaile E, Vorontsova O, Sigmundsson K, Muller MM, Singer BB, Ofverstedt LG, Svensson S, Skoglund U, Obrink B. 2009. The CEACAM1 N-terminal Ig domain mediates cis- and trans-binding and is essential for allosteric rearrangements of CEACAM1 microclusters. *J Cell Biol*, 187 (4):553-567.
- Klaile E, Klassert TE, Scheffrahn I, Muller MM, Heinrich A, Heyl KA, Dienemann H, Grunewald C, Bals R, Singer BB, Slevogt H. 2013. Carcinoembryonic antigen (CEA)-related cell adhesion molecules are co-expressed in the human lung and their expression can be modulated in bronchial epithelial cells by non-typable *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, TLR3, and type I and II interferons. *Respir Res*, 14:85.
- Klaile E, Muller MM, Schafer MR, Clauder AK, Feer S, Heyl KA, Stock M, Klassert TE, Zipfel PF, Singer BB, Slevogt H. 2017. Binding of *Candida albicans* to Human CEACAM1 and CEACAM6 Modulates the Inflammatory Response of Intestinal Epithelial Cells. *MBio*, 8 (2).
- Klaile E, Müller MM, Zubiría-Barrera C, Brehme S, Klassert TE, Stock M, Durotin A, Nguyen TD, Feer S, Singer BB, Zipfel PF, Rudolphi S, Jacobsen ID, Slevogt H. 2019. Unaltered Fungal Burden and Lethality in Human CEACAM1-Transgenic Mice During *Candida albicans* Dissemination and Systemic Infection. *Frontiers in Microbiology*, 10 (2703).
- Kruger W, Vielreicher S, Kapitan M, Jacobsen ID, Niemiec MJ. 2019. Fungal-Bacterial Interactions in Health and Disease. *Pathogens*, 8 (2).
- Kuespert K, Pils S, Hauck CR. 2006. CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol*, 18 (5):565-571.
- Kumar G, Kumar N, Taneja A, Kaleekal T, Tarima S, McGinley E, Jimenez E, Mohan A, Khan RA, Whittle J, Jacobs E, Nanchal R. 2011. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). *Chest*, 140 (5):1223-1231.
- Landry JJM, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, Jauch A, Aiyar RS, Pau G, Delhomme N, Gagneur J, Korbel JO, Huber W, Steinmetz LM. 2013. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda, Md)*, 3 (8):1213-1224.
- Legrand M, Max A, Peigne V, Mariotte E, Canet E, Debrumetz A, Lemiale V, Seguin A, Darmon M, Schlemmer B, Azoulay E. 2012. Survival in neutropenic patients with severe sepsis or septic shock. *Crit Care Med*, 40 (1):43-49.
- Levy MM, Artigas A, Phillips GS, Rhodes A, Beale R, Osborn T, Vincent JL, Townsend S, Lemeshow S, Dellinger RP. 2012. Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis*, 12 (12):919-924.
- Lewis RE, Viale P, Kontoyiannis DP. 2012. The potential impact of antifungal drug resistance mechanisms on the host immune response to *Candida*. *Virulence*, 3 (4):368-376.
- Lowman DW, Greene RR, Bearden DW, Kruppa MD, Pottier M, Monteiro MA, Soldatov DV, Ensley HE, Cheng S-C, Netea MG, Williams DL. 2014. Novel structural features in *Candida albicans* hyphal glucan provide a basis for differential innate immune recognition of hyphae versus yeast. *The Journal of biological chemistry*, 289 (6):3432-3443.
- Lucka L, Fernando M, Grunow D, Kannicht C, Horst AK, Nollau P, Wagener C. 2005. Identification of Lewis x structures of the cell adhesion molecule CEACAM1 from human granulocytes. *Glycobiology*, 15 (1):87-100.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 348 (16):1546-1554.



- Matsuoka Y, Matsuo Y, Sugano K, Ohkura H, Kuroki M, Kuroki M. 1990. Characterization of carcinoembryonic antigen-related antigens in normal adult feces. *Jpn J Cancer Res*, 81 (5):514-519.
- Mayer FL, Wilson D, Hube B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4 (2):119-128.
- Mayr FB, Yende S, Angus DC. 2014. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*, 5 (1):4-11.
- Mech F, Wilson D, Lehnert T, Hube B, Thilo Figge M. 2014. Epithelial invasion outcompetes hypha development during *Candida albicans* infection as revealed by an image-based systems biology approach. *Cytometry A*, 85 (2):126-139.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91 (3):295-298.
- Miyazato A, Nakamura K, Yamamoto N, Mora-Montes HM, Tanaka M, Abe Y, Tanno D, Inden K, Gang X, Ishii K, Takeda K, Akira S, Saijo S, Iwakura Y, Adachi Y, Ohno N, Mitsutake K, Gow NAR, Kaku M, Kawakami K. 2009. Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by Deoxynucleic acids from *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 77 (7):3056-3064.
- Moller MJ, Kammerer R, Grunert F, von Kleist S. 1996. Biliary glycoprotein (BGP) expression on T cells and on a natural-killer-cell sub-population. *Int J Cancer*, 65 (6):740-745.
- Mora-Montes HM, Netea MG, Ferwerda G, Lenardon MD, Brown GD, Mistry AR, Kullberg BJ, O'Callaghan CA, Sheth CC, Odds FC, Brown AJP, Munro CA, Gow NAR. 2011. Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. *Infection and immunity*, 79 (5):1961-1970.
- Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. 2005. Delaying the Empiric Treatment of *Candida* Bloodstream Infection until Positive Blood Culture Results Are Obtained: a Potential Risk Factor for Hospital Mortality. *Antimicrob Agents Chemother*, 49 (9):3640-3645.
- Moyes DL, Naglik JR. 2011. Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. *Clin Dev Immunol*, 2011:346307.
- Moyes DL, Runglall M, Murciano C, Shen C, Nayar D, Thavaraj S, Kohli A, Islam A, Mora-Montes H, Challacombe SJ, Naglik JR. 2010. A biphasic innate immune MAPK response discriminates between the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* in epithelial cells. *Cell host & microbe*, 8 (3):225-235.
- Muller MM, Klaile E, Vorontsova O, Singer BB, Obrink B. 2009. Homophilic adhesion and CEACAM1-S regulate dimerization of CEACAM1-L and recruitment of SHP-2 and c-Src. *J Cell Biol*, 187 (4):569-581.
- Muturi HT, Dreesen JD, Nilewski E, Jastrow H, Giebel B, Ergun S, Singer BB. 2013. Tumor and Endothelial Cell-Derived Microvesicles Carry Distinct CEACAMs and Influence T-Cell Behavior. *PLOS ONE*, 8 (9):e74654.
- Nagaishi T, Chen Z, Chen L, Iijima H, Nakajima A, Blumberg RS. 2008. CEACAM1 and the regulation of mucosal inflammation. *Mucosal Immunol*, 1 Suppl 1 (0 1):S39-42.
- Naglik JR, Gaffen SL, Hube B. 2019. Candidalysin: discovery and function in *Candida albicans* infections. *Current Opinion in Microbiology*, 52:100-109.
- Naglik JR, Moyes DL, Wachtler B, Hube B. 2011. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect*, 13 (12-13):963-976.
- Naglik JR, Konig A, Hube B, Gaffen SL. 2017. *Candida albicans*-epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. *Curr Opin Microbiol*, 40:104-112.
- Najjar SM, Ledford KJ, Abdallah SL, Paus A, Russo L, Kaw MK, Ramakrishnan SK, Muturi HT, Raphael CK, Lester SG, Heinrich G, Pierre SV, Benndorf R, Kleff V, Jaffa AA, Lévy E, Vazquez G, Goldberg IJ, Beauchemin N, Scalia R, Ergün S. 2013. Ceacam1

- deletion causes vascular alterations in large vessels. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 305 (4):E519-529.
- Nather K, Munro CA. 2008. Generating cell surface diversity in *Candida albicans* and other fungal pathogens. *FEMS microbiology letters*, 285 (2):137-145.
- Netea MG, Marodi L. 2010. Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. *Trends Immunol*, 31 (9):346-353.
- Netea MG, Van der Meer JWM, Kullberg BJ. 2006. Role of the dual interaction of fungal pathogens with pattern recognition receptors in the activation and modulation of host defence. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12 (5):404-409.
- Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NAR. 2008. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology*, 6 (1):67-78.
- Netea MG, Joosten LA, van der Meer JW, Kullberg BJ, van de Veerdonk FL. 2015. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 15 (10):630-642.
- Nouvion AL, Oubaha M, Leblanc S, Davis EC, Jastrow H, Kammerer R, Breton V, Turbide C, Ergun S, Gratton JP, Beauchemin N. 2010. CEACAM1: a key regulator of vascular permeability. *J Cell Sci*, 123 (Pt 24):4221-4230.
- Ohlsson L, Hammarström ML, Israelsson A, Näslund L, Oberg A, Lindmark G, Hammarström S. 2006. Biomarker selection for detection of occult tumour cells in lymph nodes of colorectal cancer patients using real-time quantitative RT-PCR. *British journal of cancer*, 95 (2):218-225.
- Oikawa S, Imajo S, Noguchi T, Kosaki G, Nakazato H. 1987. The carcinoembryonic antigen (CEA) contains multiple immunoglobulin-like domains. *Biochem Biophys Res Commun*, 144 (2):634-642.
- Oikawa S, Kuroki M, Matsuoka Y, Kosaki G, Nakazato H. 1992. Homotypic and heterotypic Ca<sup>++</sup>-independent cell adhesion activities of biliary glycoprotein, a member of carcinoembryonic antigen family, expressed on CHO cell surface. *Biochem Biophys Res Commun*, 186 (2):881-887.
- Oikawa S, Inuzuka C, Kuroki M, Matsuoka Y, Kosaki G, Nakazato H. 1989. Cell adhesion activity of non-specific cross-reacting antigen (NCA) and carcinoembryonic antigen (CEA) expressed on CHO cell surface: homophilic and heterophilic adhesion. *Biochem Biophys Res Commun*, 164 (1):39-45.
- Orozco AS, Zhou X, Filler SG. 2000. Mechanisms of the Proinflammatory Response of Endothelial Cells to *Candida albicans* Infection. *Infect Immun*, 68 (3):1134-1141.
- Ou G, Baranov V, Lundmark E, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. 2009. Contribution of intestinal epithelial cells to innate immunity of the human gut--studies on polarized monolayers of colon carcinoma cells. *Scand J Immunol*, 69 (2):150-161.
- Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, 16 (8):948-958.
- Palmela C, Chevarin C, Xu Z, Torres J, Sevrin G, Hirten R, Barnich N, Ng SC, Colombel J-F. 2018. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*, 67 (3):574-587.
- Panczyszyn A, Wieczorek M. 2012. [Role of CEACAM in neutrophil activation]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 66:574-582.
- Pantelic M, Kim YJ, Bolland S, Chen I, Shively J, Chen T. 2005. *Neisseria gonorrhoeae* kills carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 (CD66a)-expressing human B cells and inhibits antibody production. *Infect Immun*, 73 (7):4171-4179.

- Pappas PG. 2006. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am*, 20 (3):485-506.
- Peterson MD, Mooseker MS. 1992. Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2BBE clones of the human intestinal cell line, Caco-2. *J Cell Sci*, 102 ( Pt 3):581-600.
- Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche H-U, Quan S-P, Horn D. 2012. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004–2008. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 74 (4):323-331.
- Pfaller MA, Castanheira M. 2016. Nosocomial Candidiasis: Antifungal Stewardship and the Importance of Rapid Diagnosis. *Medical mycology*, 54 (1):1-22.
- Pils S, Gerrard DT, Meyer A, Hauck CR. 2008. CEACAM3: an innate immune receptor directed against human-restricted bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*, 298 (7-8):553-560.
- Pils S, Kopp K, Peterson L, Delgado Tascon J, Nyffenegger-Jann NJ, Hauck CR. 2012. The adaptor molecule Nck localizes the WAVE complex to promote actin polymerization during CEACAM3-mediated phagocytosis of bacteria. *PLoS One*, 7 (3):e32808.
- Polke M, Hube B, Jacobsen ID. 2015. Candida survival strategies. *Adv Appl Microbiol*, 91:139-235.
- Prescott HC, Dickson RP, Rogers MAM, Langa KM, Iwashyna TJ. 2015. Hospitalization Type and Subsequent Severe Sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 192 (5):581-588.
- Qin Y, Zhang L, Xu Z, Zhang J, Jiang YY, Cao Y, Yan T. 2016a. Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. *Virulence*, 7 (5):512-526.
- Qin Y, Zhang L, Xu Z, Zhang J, Jiang Y-Y, Cao Y, Yan T. 2016b. Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. *Virulence*, 7 (5):512-526.
- Rizeq B, Zakaria Z, Ouhtit A. 2018. Towards understanding the mechanisms of actions of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 in cancer progression. *Cancer Sci*, 109 (1):33-42.
- Roda G, Dahan S, Mezzanotte L, Caponi A, Roth-Walter F, Pinn D, Mayer L. 2009. Defect in CEACAM family member expression in Crohn's disease IECs is regulated by the transcription factor SOX9. *Inflamm Bowel Dis*, 15 (12):1775-1783.
- Ruoslahti E, Obrink B. 1996. Common principles in cell adhesion. *Exp Cell Res*, 227 (1):1-11.
- Sadarangani M, Pollard AJ, Gray-Owen SD. 2011. Opa proteins and CEACAMs: pathways of immune engagement for pathogenic *Neisseria*. *FEMS Microbiol Rev*, 35 (3):498-514.
- Sam QH, Chang MW, Chai LYA. 2017. The Fungal Mycobiome and Its Interaction with Gut Bacteria in the Host. *International journal of molecular sciences*, 18 (2):330.
- Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol*, 21 (1):1-26.
- Sarantis H, Gray-Owen SD. 2012. Defining the roles of human carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecules during neutrophil responses to *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun*, 80 (1):345-358.
- Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. 1953. STUDIES ON THE PROPAGATION IN VITRO OF POLIOMYELITIS VIRUSES : IV. VIRAL MULTIPLICATION IN A STABLE STRAIN OF HUMAN MALIGNANT EPITHELIAL CELLS (STRAIN HELA) DERIVED FROM AN EPIDERMOID CARCINOMA OF THE CERVIX. *J Exp Med*, 97 (5):695-710.
- Schmitter T, Agerer F, Peterson L, Munzner P, Hauck CR. 2004. Granulocyte CEACAM3 is a phagocytic receptor of the innate immune system that mediates recognition and elimination of human-specific pathogens. *J Exp Med*, 199 (1):35-46.

- Scholzel S, Zimmermann W, Schwarzkopf G, Grunert F, Rogaczewski B, Thompson J. 2000. Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *Am J Pathol*, 156 (2):595-605.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75 (2):163-189.
- Schuijt TJ, Lankelma JM, Scicluna BP, de Sousa e Melo F, Roelofs JJ, de Boer JD, Hoogendijk AJ, de Beer R, de Vos A, Belzer C, de Vos WM, van der Poll T, Wiersinga WJ. 2016. The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut*, 65 (4):575-583.
- Sharma N, Srivastava S, Kern F, Xian W, Yeoh KG, Ming T, McKeon F, Ho KY. 2017. CEACAM 6, a novel marker for the diagnosis of Barrett's esophagus. *Dis Esophagus*, 30 (7):1-5.
- Shoham S, Marwaha S. 2010. Invasive fungal infections in the ICU. *J Intensive Care Med*, 25 (2):78-92.
- Singer BB, Scheffrahn I, Heymann R, Sigmundsson K, Kammerer R, Obrink B. 2002. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression and signaling in human, mouse, and rat leukocytes: evidence for replacement of the short cytoplasmic domain isoform by glycosylphosphatidylinositol-linked proteins in human leukocytes. *J Immunol*, 168 (10):5139-5146.
- Singer BB, Scheffrahn I, Kammerer R, Suttorp N, Ergun S, Slevogt H. 2010. Deregulation of the CEACAM expression pattern causes undifferentiated cell growth in human lung adenocarcinoma cells. *PLoS One*, 5 (1):e8747.
- Singer BB, Klaile E, Scheffrahn I, Muller MM, Kammerer R, Reutter W, Obrink B, Lucka L. 2005. CEACAM1 (CD66a) mediates delay of spontaneous and Fas ligand-induced apoptosis in granulocytes. *Eur J Immunol*, 35 (6):1949-1959.
- Singer BB, Opp L, Heinrich A, Schreiber F, Binding-Liermann R, Berrocal-Almanza LC, Heyl KA, Muller MM, Weimann A, Zweigner J, Slevogt H. 2014. Soluble CEACAM8 interacts with CEACAM1 inhibiting TLR2-triggered immune responses. *PLoS One*, 9 (4):e94106.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour C, et al. 2016. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA*, 315 (8):801-810.
- Sivignon A, de Vallee A, Barnich N, Denizot J, Darcha C, Pignede G, Vandekerckove P, Darfeuille-Michaud A. 2015. *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 prevents colitis induced by AIEC bacteria in the transgenic mouse model mimicking Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 21 (2):276-286.
- Skubitz KM, Skubitz AP. 2008. Interdependency of CEACAM-1, -3, -6, and -8 induced human neutrophil adhesion to endothelial cells. *J Transl Med*, 6:78.
- Slevogt H, Zabel S, Opitz B, Hocke A, Eitel J, N'Guessan P D, Lucka L, Riesbeck K, Zimmermann W, Zweigner J, Temmesfeld-Wollbrueck B, Suttorp N, Singer BB. 2008. CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells. *Nat Immunol*, 9 (11):1270-1278.
- Snarr BD, Qureshi ST, Sheppard DC. 2017. Immune Recognition of Fungal Polysaccharides. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 3 (3):47.
- Sudbery PE. 2011. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol*, 9 (10):737-748.
- Svenberg T. 1976. Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile. Isolation and partial characterization. *Int J Cancer*, 17 (5):588-596.

- Tchoupa AK, Schuhmacher T, Hauck CR. 2014. Signaling by epithelial members of the CEACAM family - mucosal docking sites for pathogenic bacteria. *Cell Commun Signal*, 12:27.
- Teglund S, Olsen A, Khan WN, Frangsmyr L, Hammarstrom S. 1994. The pregnancy-specific glycoprotein (PSG) gene cluster on human chromosome 19: fine structure of the 11 PSG genes and identification of 6 new genes forming a third subgroup within the carcinoembryonic antigen (CEA) family. *Genomics*, 23 (3):669-684.
- Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W. 1991. Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal*, 5 (5):344-366.
- van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. 2017. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*, 17 (7):407-420.
- Vazquez JA, Sobel JD. 2002. Mucosal candidiasis. *Infect Dis Clin North Am*, 16 (4):793-820, v.
- Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K. 2009. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama*, 302 (21):2323-2329.
- Vincent JL, Marshall JC, Namendys-Silva SA, Francois B, Martin-Loeches I, Lipman J, Reinhart K, Antonelli M, Pickkers P, Njimi H, Jimenez E, Sakr Y. 2014. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med*, 2 (5):380-386.
- Vitenshtein A, Weisblum Y, Hauka S, Halenius A, Oiknine-Djian E, Tsukerman P, Bauman Y, Bar-On Y, Stern-Ginossar N, Enk J, Ortenberg R, Tai J, Markel G, Blumberg RS, Hengel H, Jonjic S, Wolf DG, Adler H, Kammerer R, Mandelboim O. 2016. CEACAM1-Mediated Inhibition of Virus Production. *Cell Rep*, 15 (11):2331-2339.
- Watt SM, Teixeira AM, Zhou GQ, Doyonnas R, Zhang Y, Grunert F, Blumberg RS, Kuroki M, Skubitz KM, Bates PA. 2001. Homophilic adhesion of human CEACAM1 involves N-terminal domain interactions: structural analysis of the binding site. *Blood*, 98 (5):1469-1479.
- Weindl G, Wagener J, Schaller M. 2010. Epithelial cells and innate antifungal defense. *J Dent Res*, 89 (7):666-675.
- Weindl G, Naglik JR, Kaesler S, Biedermann T, Hube B, Korting HC, Schaller M. 2007. Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling. *J Clin Invest*, 117 (12):3664-3672.
- Yan L, Yang C, Tang J. 2013. Disruption of the intestinal mucosal barrier in *Candida albicans* infections. *Microbiol Res*, 168 (7):389-395.
- Zebhauser R, Kammerer R, Eisenried A, McLellan A, Moore T, Zimmermann W. 2005. Identification of a novel group of evolutionarily conserved members within the rapidly diverging murine Cea family. *Genomics*, 86 (5):566-580.
- Zheng NX, Wang Y, Hu DD, Yan L, Jiang YY. 2015. The role of pattern recognition receptors in the innate recognition of *Candida albicans*. *Virulence*, 6 (4):347-361.
- Zhu W, Filler SG. 2010. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 12 (3):273-282.
- Zimmermann W. 2011. CEA Homepage- the carcinoembryonic antigen homepage. <http://www.carcinoembryonic-antigende>.

**10.1 Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung von CEACAM1, CEACAM3, CEACAM6, CEACAM7 und CEACAM8. ....	13
<b>Abbildung 2</b> Darstellung der wichtigsten CEACAM1-Spleißformen .....	16
<b>Abbildung 3:</b> Schema der Analyse der CEACAM-Oberflächenexpression von C2BBel-Zellen und HeLa-Zellen mittels RNA.....	39
<b>Abbildung 4:</b> Humane rekombinante CEACAM-Rezeptoren binden unterschiedliche <i>Candida</i> spezies und Formen.....	46
<b>Abbildung 5:</b> Bindung von CEACAM1-Fc und CEACAM6-Fc zu Oberflächenstrukturen von <i>C. albicans</i> sind absättigbar.....	47
<b>Abbildung 6:</b> Bindung von CEACAM1-Fc und CEACAM6-Fc benötigt intakte Zellwand von <i>C. albicans</i> .....	49
<b>Abbildung 7:</b> Zymolyase setzt Proteine aus der Zellwand von <i>C. albicans</i> frei.....	49
<b>Abbildung 8:</b> C2BBel-Zellen zu unterschiedlichen Differenzierungsstadien.....	52
<b>Abbildung 9:</b> Unterschiedliche CEACAM-Expression auf C2BBel-Zellen je nach Differenzierungsgrad und Stimulus. ....	53
<b>Abbildung 10:</b> <i>C. albicans</i> induziert eine Sekretion von löslichem CEACAM6 und eine Expressionerhöhung von membrangebundenem CEACAM1 in C2BBel-Zellen.....	56
<b>Abbildung 11:</b> CEACAM6 verhindert die Bindung von CEACAM1 an Oberflächenepitopen von <i>C. albicans</i> .....	58
<b>Abbildung 12:</b> Expressionsnachweis von HeLa-Zellen mittels FACS-Analyse .....	60
<b>Abbildung 13:</b> CEACAM-Expression auf Epithelien hat keinen Effekt auf Adhärenz von <i>C. albicans</i> Hefezellen zu epithelialen Zellen. ....	60
<b>Abbildung 14:</b> Stimulation von <i>C. albicans</i> auf C2BBel-Zellen verursacht eine transiente CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung. ....	62

<b>Abbildung 15:</b> Beschreibung shRNA-vermittelter CEACAM1-knock-down in C2BBel-Zellen. .....	63
<b>Abbildung 16:</b> FITC-Dextran zeigt eine unveränderte Permeabilität bei CEACAM1-knock-down-Zellen .....	65
<b>Abbildung 17:</b> lebende <i>C. albicans</i> induziert eine Reduktion des transepithelialen elektrischen Widerstands.....	66
<b>Abbildung 18:</b> CEACAM1 reguliert Veränderungen des transepithelialen Widerstands bei <i>C. albicans</i> Infektion von C2BBel-Zellen .....	67
<b>Abbildung 19:</b> CEACAM1 wird für die pro-inflammatorische IL-8 Freisetzung in C2BBel-Zellen nach Stimulation mit <i>C. albicans</i> benötigt.....	69
<b>Abbildung 20:</b> <i>C. albicans</i> induzierte IL-8 Sekretion benötigt eine Bindung zu C2BBel-Zellen .....	71

## 10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	21
Tabelle 2 Software .....	23
Tabelle 3 Medien und Zusätze für Zell-, Bakterien- und Hefekulturen.....	23
Tabelle 4 Substanzen und Lösungen für Zell-, Bakterien- und Hefekulturen .....	24
Tabelle 5 Pull-Down-Assay, Phosphorylierungs-Assay, SDS-Page, Western Blot und Färbungen .....	25
Tabelle 6: Antikörper .....	26
Tabelle 7: Materialien für Transformation und Transfektion von Zellen .....	28
Tabelle 8 Materialien für RNA-Extraktion, RT-PCR und qPCR.....	28
Tabelle 9 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper der FACS-Analyse von verschiedenen HeLa-Zelllinien und C2BBel1-Zellen .....	35



### 10.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit wahrnehmen, den vielen Menschen zu danken, die mich auf dem Weg zur Promotion auf die unterschiedlichsten Arten unterstützt haben und stets hinter mir standen.

In erster Linie möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Slevogt für die Bereitstellung des Themas und die Ermöglichung diese medizinische Doktorarbeit bei Host Septomics durchzuführen, danken. Auch danke ich ihr für die Koordination der Arbeit, ihre Hilfestellungen und Mühen sowie die Bereitstellung der Materialien.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine mikrobiologische Doktormutter Frau Dr. rer. nat. Esther Klaile, die mir stets mit der größten Geduld die faszinierende Welt der CEACAM-Rezeptoren, der Zellkulturen und der labortechnischen Methoden mit fundiertem fachlichem Wissen und einer breiten methodisch-praktischen Erfahrung näherbringen konnte. Ich danke ihr, dass sie für jede meiner Fragen offen war, mir immer wieder hilfreiche und konstruktive Impulse gab und mich über den Tellerrand hat blicken lassen.

Außerdem möchte ich dem kompletten Arbeitskreis Host Septomics für den regelmäßigen Ideenaustausch danken. Vor allem Simone Tänzer und Moira, die mich bei methodischen Durchführungen stets unterstützen konnten und mich der FACS-Methode näherbrachten. Des Weiteren gilt mein Dank Dr. rer. nat. Tilmann Klassert, welcher mir die qPCR-Methode in einer ausführlichen und verständlichen Form erklären konnte und mir stets das hessische Fernweh nahm. Ich danke Sabina Feer, die mich während der gesamten Zeit bei vielen Versuchen und der Herstellung von Zellkulturen unterstützte.

Ein großes Dankeschön geht an meine Familie und meine Freunde, vor allem dafür, dass wir auch in herausfordernden Lebenssituationen zusammenhalten und uns gegenseitig unterstützen. Ich danke allen für das genaue Korrekturlesen und die konstruktive Kritik. Auch möchte ich die Unterstützung meines Partners Benjamin erwähnen, der mir über all die Jahre eine mentale Stütze war, mir immer wieder Motivation geben konnte und mich bei Formatierungsschwierigkeiten unterstützte.

#### 10.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. E. Klaile, Dr. H. Slevogt, S. Tänzer, Dr. M. Müller, A. Clauder, S. Feer S, K. Heyl, Dr. M. Stock, Dr. Tilmann Klassert, Dr. P. Zipfel, Dr. B. Singer, Dr. S. Schäfer und B. Röhm,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift der Verfasserin