

Molekulare Mechanismen
einer
Yersinia enterocolitica
induzierten Wirtszellaktivierung

Dissertation

der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt von
Yvonne Schmid
aus Ruit / Ostfildern

2005

| | |
|-----------------------------|----------------------------|
| Tag der mündlichen Prüfung: | 12. September 2005 |
| Dekan: | Prof. Dr. F. Schöffl |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. I. B. Autenrieth |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. V. Braun |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|----|
| 1. | Einleitung | 5 |
| 1.1. | Das Bakterium <i>Yersinia enterocolitica</i> | 5 |
| 1.2. | Pathogenese von <i>Yersinia enterocolitica</i> Infektionen | 5 |
| 1.3. | Pathogenitätsfaktoren von <i>Yersinia enterocolitica</i> | 6 |
| 1.4. | Bakterielle Adhäsine | 8 |
| 1.5. | Nicht-fimbrielle Adhäsine | 9 |
| 1.6. | Das äußere Membran Protein <i>Yersinia</i> Adhäsin A | 10 |
| 1.7. | YadA als Prototyp eines Typ-V-Sekretion Systems | 11 |
| 1.8. | Das äußere Membran Protein Invasin | 13 |
| 1.9. | Infektionsablauf bei der murinen Yersiniose | 14 |
| 1.10. | Interaktion von <i>Yersinia enterocolitica</i> mit der Wirtszelle | 14 |
| 1.11. | NF- κ B und Regulation der IL-8 Expression | 16 |
| 1.12. | Toll-like Rezeptoren (TLR) | 18 |
| 1.13. | Ziel der Arbeit | 19 |
| 2. | Material und Methoden | 20 |
| 2.1. | Materialien | 20 |
| 2.1.1. | Geräte | 20 |
| 2.1.2. | Chemikalien | 21 |
| 2.1.3. | Antikörper | 23 |
| 2.1.4. | Verbrauchsmittel | 24 |
| 2.1.5. | Kommerzielle Kits | 26 |
| 2.1.6. | Größenstandards | 26 |
| 2.1.7. | Enzyme | 26 |
| 2.1.8. | Rekombinante Proteine | 27 |
| 2.1.9. | Zelllinien | 27 |
| 2.1.10. | Medien | 28 |
| 2.1.11. | Bakterienstämme | 28 |
| 2.1.12. | Bakterien-Nährmedien | 29 |
| 2.1.13. | Mausstämme | 29 |
| 2.1.14. | Puffer und Lösungen | 30 |
| 2.1.14.1. | Antibiotika-Lösungen | 30 |

| | |
|---|----|
| 2.1.14.2 Allgemeine Puffer | 30 |
| 2.1.15. Synthetische Oligonukleotide | 31 |
| 2.1.16. Vektoren | 33 |
| 2.2. Methoden | 35 |
| 2.2.1. Molekularbiologische Methoden | 35 |
| 2.2.1.1. Präparation von Plasmiden | 35 |
| 2.2.1.2. Agarose-Gelelektrophorese | 35 |
| 2.2.1.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | 36 |
| 2.2.1.4. Restriktionsspaltung von DNA | 36 |
| 2.2.1.5. Ligation von DNA-Fragmenten | 37 |
| 2.2.1.6. Elution von DNA aus Agarosegelen | 37 |
| 2.2.1.7. Sequenzierung | 38 |
| 2.2.1.8. Austausch von Aminosäuren | 38 |
| 2.2.2. Proteinchemische und allgemeine biochemische Methoden | 39 |
| 2.2.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen | 39 |
| 2.2.2.2. Immunoblot (Western-Blot) | 40 |
| 2.2.2.3. Proteinbestimmung | 41 |
| 2.2.2.4. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) | 42 |
| 2.2.2.4.1. IL-8 ELISA | 42 |
| 2.2.2.4.2. KC-ELISA | 43 |
| 2.2.2.5. EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) | 45 |
| 2.2.2.5.1 Markierung von Oligonukleotid-Sonden durch Phosphorylierung | 45 |
| 2.2.2.5.2 Bindungsreaktion | 46 |
| 2.2.2.5.3 Auftrennung der EMSA-Komplexe | 46 |
| 2.2.2.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration | 47 |
| 2.2.2.6. Bindung von Proteinen an Latex- Partikel | 47 |
| 2.2.2.7. Limulus-Amöbocyt Lysat (LAL) Assay | 48 |
| 2.2.3. Arbeiten mit Bakterien | 49 |
| 2.2.3.1. Herstellung kompetenter Bakterien nach der RbCl ₂ - Methode | 49 |
| 2.2.3.2. Transformation RbCl ₂ -kompetenter E. coli Zellen | 49 |
| 2.2.3.3. Herstellung elektrokompenter Bakterien | 50 |
| 2.2.3.4. Transformation durch Elektroporation | 50 |
| 2.2.3.5. Konservierung von Bakterienstämmen | 50 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.3.6. Vorbereitung von Bakterien zur Infektion von Zellen | 51 |
| 2.2.4. Arbeiten mit eukaryontischen Zellen | 52 |
| 2.2.4.1. Kultivierung und Lagerung der Gewebezellkulturen | 52 |
| 2.2.4.1.1. Kultivierung von Gewebekulturzellen | 52 |
| 2.2.4.1.2 Auftauen von Gewebekulturzellen | 52 |
| 2.2.4.1.3 Einfrieren von Gewebekulturzellen | 53 |
| 2.2.4.2 Bestimmung der Lebend-Zellzahl mit Trypan-Blau | 53 |
| 2.2.4.3 Infektion von Zellen mit Bakterien | 54 |
| 2.2.4.4 Stimulation von Zellen mit löslichen oder Latex-Partikel gebundenen GST- Fusionsproteinen | 54 |
| 2.2.4.5 Adhäsionsassay | 55 |
| 2.2.4.6 Invasionsassay | 55 |
| 2.2.4.7 Doppelimmunfluoreszenz | 56 |
| 2.2.4.8 Immunfluoreszenzfärbung von Bakterien | 57 |
| 2.2.4.9 Untersuchung von Zellen mittels Durchflusszytometrie | 57 |
| 2.2.5. Tierexperimentelle Methoden | 59 |
| 2.2.5.1. Präparation von Milzzellen aus der Maus | 59 |
| 2.2.5.2. Präparation von dendritischen Zellen aus der Maus | 59 |
| 3. Ergebnisse | 60 |
| 3.1. YadA vermittelt Adhäsion und stimuliert die Ausschüttung von IL-8 in HeLa Zellen. | 60 |
| 3.1.1. Klonierung von yadA in den Expressionsvektor pNIV136 | 60 |
| 3.1.2. Kontrolle der Expression von Inv und YadA | 61 |
| 3.1.3. Untersuchung der YadA- und Inv- vermittelten Adhäsion an HeLa Zellen | 62 |
| 3.1.4. Durchflusszytometrische Analyse der verwendeten Zellen auf die Expression von β 1-Integrinen | 64 |
| 3.1.5. β 1-Integrin abhängige Adhäsion von YadA exprimierenden Bakterien an Zellen | 65 |
| 3.1.6. Untersuchung der Invasivität von <i>E. coli</i> pInv1914 und <i>E. coli</i> YadA ^{O:8} in Epithelzellen | 66 |
| 3.1.7. Untersuchung der IL-8- Induktion durch <i>E. coli</i> YadA ^{O:8} | 67 |
| 3.1.8. Einfluss der NSVAIG-S Motive von YadA auf die Fähigkeit der Adhäsion | 68 |
| 3.1.9. Einfluss der NSVAIG-S Motive von YadA auf die IL-8 Induktion in HeLa Zellen | 70 |

| | |
|--|-----|
| 3.1.10. Expression von YadA und YadA- Mutanten | 72 |
| 3.1.11. Untersuchung der Beteiligung von β 1-Integrinen bei der Stimulation der IL-8 Sekretion | 73 |
| 3.1.12. Untersuchung der β -1 Integrin abhängigen IL-8 Induktion durch β -1 Integrin blockierende Antikörper | 73 |
| 3.1.13. YadA induziert die Expression von IL-8 durch Aktivierung von NF- κ B | 76 |
| 3.1.14. Untersuchung der Signalkaskade in eukaryontischen Zellen | 77 |
| 3.2. Aktivierung der β 1-Integrin unabhängigen IL-8 Induktion durch Invasin | 81 |
| 3.3. Mutation einer Aminosäure im Membrananker von YadA von <i>Yersinia enterocolitica</i> | 88 |
| 3.3.1. Konstruktion von pYadAO:8 G389A | 89 |
| 3.3.2. Überprüfung der Expression von YadA und YadA G389A | 89 |
| 3.3.3. Immunfluoreszenzfärbung der YadA und YadA G389A exprimierenden Bakterien | 90 |
| 3.3.4. Funktionelle Untersuchung der IL-8 Induktion von YadA G389A in HeLa Zellen | 91 |
| 3.3.5. Konstruktion weiterer Mutanten mit größeren destruktiven Effekten | 92 |
| 3.3.6. Klonierung der Mutanten in einen Anhydrotetracyclin (AHT)- induzierbaren Vektor pASK-IBA2 | 95 |
| 4. Diskussion | 99 |
| 4.1. YadA vermittelt die IL-8 Induktion in Epithelzellen | 99 |
| 4.2. Gibt es eine Inv-vermittelten proinflammatorischen Antwort über einen β 1- Integrin unabhängigen Weg? | 103 |
| 4.3. Mutationsanalysen der Membranankerdomäne von YadA | 107 |
| 5. Zusammenfassung | 112 |
| 6. Abkürzungen | 114 |
| 7. Literaturverzeichnis | 116 |
| 8. Veröffentlichungen | 130 |
| 9. Danksagung | 131 |
| 10. Lebenslauf | 132 |

1. Einleitung

1.1. Das Bakterium *Yersinia enterocolitica*

Die Gattung *Yersinia* gehört zur Familie der Enterobacteriaceae und kann in nicht-humanpathogene und humanpathogene Spezies eingeteilt werden. Zu den humanpathogenen Spezies zählen *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica*. Diese drei bakteriellen Spezies sind unterschiedlich stark virulent, haben aber die Gemeinsamkeit sich in lymphatischen Geweben zu vermehren und alle drei besitzen Mechanismen um sich der Immunabwehr des Wirtes zu entziehen (Grosdent et al. 2002). *Yersinia enterocolitica* kommt am häufigsten im Menschen vor und ist ein weit verbreitetes, gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium, welches fäkal-oral oder über kontaminiertes Trinkwasser bzw. Nahrungsmittel auf den Menschen übertragen werden kann. Sie sind pleomorph, psychrophil, nicht sporenbildend, fakultativ anaerob und wachsen optimal bei 27–30°C. Die Art *Y. enterocolitica* wird darüber hinaus in verschiedene Serotypen eingeteilt, welche Unterschiede in der Virulenz aufweisen. Aufgrund von elektronenmikroskopischen Untersuchungen und zellbiologischen Versuchen gilt *Y. enterocolitica* als extrazelluläres Pathogen (Autenrieth and Firsching 1996; Hanski et al. 1989; Devenish and Schieman 1981) tritt in einigen Fällen aber auch intrazellulär auf (Koornhof, Smego and Nicol 1999).

1.2. Pathogenese von *Yersinia enterocolitica* Infektionen

Im Gastrointestinaltrakt des Menschen kann *Y. enterocolitica* eine akute Enteritis, Enterocolitis, mesenteriale Lymphadenitis (Bottone 1997; Smego, Freaan and Koornhof 1999) und terminale Ileitis auslösen. Die Schwere der Erkrankung hängt im wesentlichen vom jeweiligen Serotyp ab. Während *Y. enterocolitica* Serotyp O:8 einen fatalen Verlauf der Erkrankung manchmal sogar bis zum Tod (Bottone 1997) nach sich ziehen kann, sind die Serotypen O:3 und O:9 wesentlich milder im Verlauf und im Gastrointestinaltrakt weniger destruktiv. Bei systemischen Infektionen sind Leber, Milz und Nieren betroffen. Disseminierende Infektion mit *Y. enterocolitica* sind beim Menschen selten und treten meist bei Immunsuppression oder bei Patienten mit Eisenüberladung auf. Chronisch persistierende

Yersiniosen kommen eher selten vor (Hoogkamp Korstanje, de Koning, and Heesemann 1988). Die Infektion verläuft zum größten Teil selbstlimitierend. In 5-20 können als Spätfolge weitere Komplikationen, vor allem bei Patienten mit HLA-B27 Typ, auftreten und es kann zu einer sterilen reaktiven Arthritis, einem Erythema nodosum oder einer Uveitis kommen.

1.3. Pathogenitätsfaktoren von *Y. enterocolitica*

Wenn Yersinien, die üblicherweise über kontaminierte Lebensmittel aufgenommen werden, in den Wirt gelangen muss das Pathogen zunächst seine Oberflächenantigene an die Umgebungstemperatur (37°C) anpassen. Diese Oberflächenantigene sind zum Großteil auf einem 64-75kb großen Virulenzplasmid kodiert, welches in avirulenten Stämmen nicht vorkommt (Gemski 1980; Portnoy et al. 1981). In der Anwesenheit des Virulenzplasmids, das sogenannte pYV-(*Yersinia* Virulenz) Plasmid (Portnoy et al. 1981) werden einige Virulenzfaktoren von *Yersinien*, temperaturabhängig d.h. bei 37°C, aber nicht bei 25°C exprimiert (Bottone 1997). Die pYV Plasmide der humanpathogenen Yersinienstämme sind stark konserviert (Perry et al. 1998). *Y. enterocolitica* besitzt verschiedene Virulenzfaktoren, die entweder chromosomal oder auf dem pYV Virulenzplasmid kodiert sind. Chromosomal kodiert sind zum Beispiel die Gene von Inv (Invasin) (Isberg and Leong 1990; Pepe and Miller 1990; Young et al. 1992) und AIL (Adhesion and Invasion Locus) (Miller and Falkow 1988; Miller et al. 1989) und dem Enterotoxin Yst, während andere wichtige Virulenzfaktoren z. B. YadA (*Yersinia* Adhäsion A) (Bliska et al. 1993; Emödy et al. 1989; Heesemann and Gräter 1987; Schulze-Koops et al. 1992; Yang and Isberg 1993) und die Yops (*Yersinia* outer proteins) auf dem Plasmid kodiert sind. Unter dem Begriff Yops versteht man neben den Strukturproteinen für den Aufbau des Typ III- Sekretionssystems auch noch die sogenannten Effektor- Yops, welche durch das Sekretionssystem in die Wirtszellen eingeschleust werden. Dort wirken sie in unterschiedlicher Weise auf die Wirtszelle und deren Signalweiterleitung ein. Die verschiedenen Virulenzfaktoren sind in Tabelle 1 aufgelistet (Tab. 1).

Neben den hier aufgeführten bekannten Virulenz-Faktoren von *Y. enterocolitica* gibt es noch viele Andere, über die noch wenig bekannt ist und über die es noch viel zu erforschen gibt (Darwin and Miller 1999; Gort and Miller 2000; Nelson, Young and Miller 2001).

Tab.: 1 Übersicht über einige der chromosomal- und plasmidkodierte Pathogenitätsfaktoren von *Y. enterocolitica*.

| Chromosomal kodiert | Funktion | Referenzen |
|----------------------------|--|---|
| Inv | Invasin, Adhäsion, Transzytose durch M- Zellen durch Bindung an β 1- Integrine, Internalisation in epitheliale Zellen und Aktivierung der Sekretion von IL-8, aktiviert B- und T-Lymphozyten zur Proliferation oder Zytokin-Sekretion, induziert bei T-Lymphozyten die Bildung von Pseudopodien und vermittelt hapto- und chemotaktische Wirkung. | (Isberg and Leong 1990; Schulte et al. 2000b; Pepe and Miller 1993; Schulte et al. 1998; Kampik et al. 2000; Brett et al. 1993; Ennis et al. 1993; Lundgren et al. 1996, Arencibia et al. 1997) |
| Ail | Vermittelt neben der Adhäsion an und der Invasion in Epithel-Zellen auch Serum-Resistenz. | (Miller and Falkow 1988; Bliska and Falkow 1992, Pierson and Falkow 1990) |
| LPS | Virulenz bei Serotyp O:8, Serumresistenz und Virulenz bei Serotyp O:3. | (Zhang et al. 1997; Biedzka-Sarek et al.2005) |
| Myf | Fimbrien, die möglicherweise als intestinaler Kolonisierungsfaktor zusammen mit Yst Diarrhöe auslösen. | (Iriarte et al. 1993) |
| RovA | Regulator von Inv und anderen chromosomalen Virulenzgenen, beeinflusst Entzündungsreaktion in den Peyer'schen Plaques (PP). | (Revell and Miller 2000; Dube et al. 2003) |
| SodA | Detoxifiziert von polymorphnukläeren Neutrophilen (PMNs) gebildete Sauerstoff-Radikale. Vermittelt Virulenz bei Besiedelung von Leber und Milz, aber nicht bei Kolonisierung der PP. | (Roggenkamp et al. 1997) |
| Yst | Hitzestabiles Enterotoxin, das die Guanylat-Zyklase intestinaler Epithel-Zellen stimuliert und Diarrhö erzeugt. | (Delor and Cornelis 1992; Ramamurthy et al. 1997; Robins-Browne et al. 1979) |
| HPI | Kodiert für das Siderophor Yersiniabactin und für damit assoziierte Gene und vermittelt Aufnahme von Eisen. Hat möglicherweise immunsupprimierende Wirkung auf B- und T- Zellen, Makrophagen und PMNs. | (Haag et al. 1993, Autenrieth et al. 1995, Autenrieth et al. 1994) |
| plasmidkodierte | Funktion | Referenzen |
| YopT | Zerstörung der Aktin- Filamente und Veränderungen des Zytoskeletts. Modifikation von RhoA, dadurch Umverteilung von RhoA von der Membran ins Zytosol. Nicht in allen <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Stämmen. | (Iriarte and Cornelis 1998; Zumbhil et al. 1999) |
| YopH | Protein- Tyrosin Phosphatase, dephosphoryliert Proteine des fokalen Adhäsions- Komplexes. Verhindert durch Auflösung der fokalen Adhäsions-Komplexe Phagozytose durch Makrophagen und Granulozyten. Suppression von <i>oxidative burst</i> und Monozyten Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) Produktion in Makrophagen. In B- und T-Lymphozyten Inhibition der Antigen-Rezeptor assoziierten Signaltransduktionskaskaden. Hemmt Proliferation von T- Zellen. | (Guan and Dixon 1990; Blacka and Bliska 1997; Black and Bliska 1995; Ruckdeschel et al. 1996; Yao et al. 1999) |
| YopE | Zytotoxin, interagiert mit Rho, Rac, Cdc42 und wahrscheinlich noch anderen Molekülen, blockiert Phagozytose, zerstört Aktin-Filamente. | (Rosqvist et al. 1991 ; Black and Bliska 2000; Pawel-Rammingen et al. 2000) |
| YopM | Agglutination von Plasma, Homologie zum von-Willebrand-Faktor. Wird in den Nukleus transportiert. Interagiert mit den eukaryontischen Kinasen PRK2 und | Leung et al. 1990, Leung and Straley 1989; Skrzypek et al. 1998) |

| | | |
|-------------|---|--|
| | RSK1 und aktiviert sie. | |
| YopO (YpkA) | Zerstörung des Aktin- Zytoskeletts, dadurch Abrundung von Zellen. Protein- Kinase, durch Aktin aktiviert, katalysiert Autophosphorylierung von Serin-Resten. Interagiert mit RhoA und Rac1. | (Juris et al. 2000, Galyov et al. 1993 ; Barz et al. 2000) |
| YopP (YopJ) | Induktion von Apoptose in murinen Makrophagen. Reduktion der TNF α - Sekretion in Makrophagen. Cystein- Protease, die die Caspase- Kaskade aktiviert und durch Interaktion mit MAPKK und IKK β die MAP Kinase- und NF- κ B- abhängigen Signaltransduktionswege blockiert. Hemmt Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 und TNF- α sowie Präsentation von ICAM-1 und E-Selektin auf endothelialen Zellen. | (Denecker et al. 2001, Boland and Cornelis 1998; Orth et al. 2000; Ruckdeschel et al. 2001) |
| YadA | Vermittelt Adhärenz an epitheliale Zellen und professionelle Phagozyten. Bindet an Kollagen, zelluläres Fibronectin, Laminin. Vermittelt Phagozytoseresistenz und Schutz gegen Komplement- vermittelte Lyse und Defensine. | (Heesemann and Grüter 1987, Roggenkamp et al. 1996, Roggenkamp et al. 1995; Schulze-Koops et al. 1993 Tamm et al. 1993; China et al. 1993) |
| LcrV | Supprimiert die Expression von TNF α und IFN- γ . Inhibiert Chemotaxis von Neutrophilen. Induziert in Makrophagen die Produktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10. | (Nakajima et al. 1995; Welkos et al. 1998 ; Sing et al. 2002) |

1.4. Bakterielle Adhäsine

Die Haut und die Schleimhäute wirken als mechanische Barriere gegen das Eindringen von Mikroorganismen in tiefere Gewebeschichten. Bakterielle Adhäsine sind für pathogene Keime notwendig, um sich an den ersten Ort der Infektion anheften zu können und so erste unspezifische Barrieren des Immunsystems (z. B. Sekretfluß an Schleimhäuten) zu überwinden. Adhäsine auf der Bakterienoberfläche binden normalerweise an natürlich vorkommende Rezeptoren an der Wirtszelle. Diese Bindung des Pathogens an einen Wirtszellrezeptor kann zur Aktivierung komplexer Signaltransduktions-Kaskaden in der Wirtszelle führen und somit z. B. zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Des weiteren kann die Bindung an solche Rezeptoren auch auf bakterieller Ebene zu Aktivierung der Expression neuer Gene führen, welche dann für das Überleben oder die Vermehrung des Pathogens wichtig sind. In vielen Fällen handelt es sich bei Adhäsinen um Pili oder Fimbrien, manchmal sind die bakteriellen Adhäsine aber auch direkt mit der mikrobiellen Zelloberfläche, bei sogenannten nicht-fimbriellen Adhäsinen, assoziiert (Soto and Hultgren 1999).

1.5. Nicht-fimbrielle Adhäsine

Nicht- fimbrielle Adhäsine sind monomere oder oligomere Proteine, die in der äußeren Membran verankert (Hultgren et al. 1993) und nicht zu einer pilusartigen Struktur zusammengelagert sind.

Am Beispiel von *Yersinia* Adhäsine A (YadA) von *Y. enterocolitica* und UspA1 und UspA2 von *Moraxella catarrhalis* wurde eine neue Klasse der nicht- fimbriellen Adhäsine beschrieben, die oligomere Komplexe bilden und in der äußeren Membran verankert sind (Hoicyk et al. 2000). Kennzeichen dieser Adhäsine ist ihr modularer Aufbau. Sequenzvergleiche ergaben, dass eine ganze Reihe sowohl frei lebender als auch pathogener Proteobakterien Proteine mit dem gleichen Aufbau besitzen, die teilweise als Virulenzfaktoren beschrieben sind, und denen allen vermutlich eine entscheidende Funktion bei der Anpassung an eine bestimmte ökologische Nische zukommt. Einige nicht-fimbrielle Adhäsine mit bekannten Funktionen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Nicht- fimbrielle Adhäsine kommen auch bei nicht humanpathogenen Bakterien vor wie z. B. XadA von *Xanthomonas oryzae*. Dabei handelt es sich im Gegensatz zu den oben beschriebenen humanpathogenen Spezies um ein Pflanzenpathogen. Damit scheinen nicht-fimbrielle Adhäsine konservierte Virulenzfaktoren von pflanzen- und humanpathogenen Bakterien zu sein.

Tab.: 2 Übersicht über nicht-fimbrielle Adhäsine verschiedener human- und pflanzen-pathogener Bakterien.

| Adhäsine | Spezies | Funktion | Literatur |
|----------|--------------------------------|---|--|
| YadA | <i>Yersinia enterocolitica</i> | Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine, Epithelzellen und professionelle Phagozyten, Autoagglutination, Serumresistenz, Phagozytoseresistenz | (Heesemann und Gräter 1987; Roggenkamp et al. 1996; Schulze-Koops 1992; Schulze-Koops 1993; Pilz et al. 1992; Skurnik et al. 1984) |
| NadA | <i>Neisseria meningitidis</i> | Wirtszelladhärenz, immunogen | (Comanducci et al. 2002) |
| UspA1 | <i>Moraxella catarrhalis</i> | Wirtszelladhärenz | (Aebi et al. 1998) |
| UspA2 | <i>Moraxella catarrhalis</i> | Serumresistenz | (Aebi et al. 1998) |
| Hia, Hsf | <i>Haemophilus influenzae</i> | Wirtszelladhärenz | (Barenkamp and St.Geme 1996; St.Geme 1996) |
| XadA | <i>Xanthomonas oryzae</i> | nötig für optimale Virulenz und normale Koloniemorphologie | (Ray et al. 2002) |
| BadA | <i>Bartonella henselae</i> | Proangionetische Wirtzellantwort | (Riess et al. 2004) |

1.6. Das äußere Membran Protein *Yersinia* Adhäsins A

Yersinia Adhäsins A ist ein wichtiger Virulenzfaktor von *Y. enterocolitica*. *YadA* wird vom *yadA* Gen, welches sich auf dem pYV-Plasmid befindet, kodiert. Für die Virulenz von *Y. pseudotuberculosis* ist *YadA* weniger wichtig als für *Y. enterocolitica*. Bei *Y. pestis* hat das *yadA* Gen eine Verschiebung im Leseraster, wird demnach nicht exprimiert, und ist somit ein Pseudogen. Wird das *YadA* Protein von *Y. pseudotuberculosis* in *Y. pestis* exprimiert verliert *Y. pestis* sogar an Virulenz (Skurnik and Wolf-Watz 1989; el Tahir et al. 2000).

YadA lässt sich in verschiedene Domänen wie Kopf, Hals, Stamm und Membrananker einteilen. Der N-Terminus formt einen globulären Kopf, der Stamm wird durch eine „coiled-coil“ Struktur gebildet und der C-Terminus ist in der äußeren Membran verankert. Das „Lollipop“-förmige Protein bedeckt die komplette Oberfläche des Bakteriums und verleiht ihr hydrophobe Eigenschaften (el Tahir et al. 2000). Die Membrananker-Domäne, die nach Strukturvorhersagen aus einem kurzem „coiled-coil“-Segment und vier Transmembran- β -Faltblattstrukturen besteht, ist in dieser Klasse der nicht-fimbriellen Adhäsine konserviert (Hoiczky et al. 2000). Durch eine Struktur-Funktionsanalyse von *YadA* (Roggenkamp et al. 2003) und die Untersuchung der Kristallstruktur des Kopf- und Hals- Bereichs (Nummelin et al. 2004) wurde gezeigt, dass *YadA* Trimere bildet. Sekretierte Proteine und äußere Membran- Proteine, die alle nötigen Informationen für ihren Transport zur äußeren Membran und die Translokation durch die Membran enthalten, werden als Autotransporter bezeichnet (Henderson et al. 1998). Der Aufbau von *YadA* entspricht allen Kriterien eines Autotransporters, somit stellt *YadA* vermutlich das erste Beispiel eines Autotransporters dar, der Trimere in der äußeren Membran bildet (Roggenkamp et al. 2003).

Das Protein *YadA* vermittelt Autoagglutination (Ballingand et al. 1985; Kapperud and Namork 1987) und ist das Hauptadhäsins für die Anheftung von *Yersinien* an eukaryontische Zellen. *YadA* kann an eine Reihe eukaryontischer Extrazellulärer-Matrix-(ECM) Proteine und zellulärer Oberflächen Moleküle binden, wie z. B. Fibronectin, Kollagen und Laminin (Emody et al. 1989; Flügel et al. 1994; Schulze-Koops et al. 1992; Schulze-Koops et al. 1993, Terti et al. 1992) *YadA* vermittelt außerdem Serumresistenz und schützt die Bakterien vor dem Abtöten durch polymorphnuklären neutrophilen Granulozyten (PMN) (Martinez et al. 1989; Visser et al. 1996). Diese Fähigkeit ist auf die Bindung von *YadA* an den Faktor H zurück zu führen, welcher zur Inaktivierung von C3b (einem Faktor des Komplementsystems)

und somit zur Abnahme der Opsonisierung der Bakterien führt (China et al. 1993; Pilz et al. 1992).

Die Adhäsion an eukaryontische Zellen durch YadA ist die Voraussetzung zur Übertragung der Effektor-Yops bei *Y. enterocolitica* (Heesemann and Gräter 1987; Kapperud et al. 1987).

Die Expression von YadA ist temperatur-abhängig und wird durch den VirF/LcrV Komplex reguliert, der die Expression von YadA bei 37°C, aber nicht unter 30°C zulässt. Das Protein kann schon wenige Minuten nach einem Temperaturwechsel auf der Bakterienoberfläche nachgewiesen werden. Die Expression ist nicht Ca^{2+} abhängig, wie bei anderen VirF/LcrV Regulon Genen gezeigt wurde (Bölin et al. 1982; Skurnik 1985; Skurnik et al. 1984).

YadA scheint essentiell für eine Etablierung einer Infektion zu sein, da *yadA*- defiziente Stämme in Mäusen avirulent sind (Pepe et al. 1995).

1.7. YadA als Prototyp eines Typ-V-Sekretion Systems

Im Gegensatz zu Gram-positiven Bakterien, die nur eine biologische Membran, nämlich die Zytoplasmamembran besitzen, ist die Zellhülle der Gram-negativen Bakterien aus zwei Einheiten aufgebaut, der Zytoplasmamembran und der äußeren Membran. Um als pathogenes Bakterium existieren zu können, ist es wichtig, die Fähigkeit zu besitzen, einen Wirt zu infizieren, sich in ihm oder in Kontakt mit ihm zu vermehren und zu überleben. Das hängt im wesentlichen davon ab, ob das Bakterium in der Lage ist, Virulenzfaktoren wie Adhäsine, Toxine, Enzyme oder aber auch Moleküle, die die Bewegungsfähigkeit verändern, zu sekretieren.

Die Tatsache, dass überhaupt Sekretion stattfindet, impliziert, dass es ein System geben muss, um Moleküle aus der Zellhülle auszuschleusen und legt nahe, dass die sekretierten Proteine eine definierte Information besitzen müssen, damit sie zur Zytoplasmamembran geleitet werden. In Gram-positiven Bakterien ist der Transport über die Zytoplasmamembran die „Sekretion“ aus dem Bakterium. Bei Gram-negativen Bakterien ist der Transport über die Zytoplasmamembran lediglich die Sekretion des Proteins ins Periplasma. Zum Export aus dem Bakterium benötigt es einen weiteren Mechanismus, um den Transport über die äußere Membran zu ermöglichen. In gram-negativen Bakterien wurden bis jetzt fünf Sekretionssysteme beschrieben (Tabelle 3).

Tab.: 3 Übersicht über die verschiedenen, bis jetzt bekannten Sekretionssysteme bei gram-negativen Bakterien.

| Name | Beispiel | Beschreibung |
|---------------------------------|---|---|
| Typ I Sekretionssystem (TOSS) | HylA Haemolysin von <i>E. coli</i> | Oligomerer Komplex aus drei Komponenten, der sich über innere und äußere Membran erstreckt, braucht die Substratbindung damit sich die Komponenten erfolgreich zusammenlagern |
| Typ II Sekretionssystem | PulA, Pullanase Enzym <i>Klebsiella oxytoca</i> | Zunächst Sekretion ins Periplasma über Sec System, Transport über äußere Membran erfolgt über Secreton Sekretionsapparat, bestehend aus 12-16 Proteinen |
| Typ III Sekretionssystem (TTSS) | TTSS Yersinia | Komplex umspannt die innere und äußere Membran, Injektion von Proteinen direkt in eukaryontische Wirtszellen, Injectisome |
| Typ IV Sekretionssystem (TFSS) | IV _a Typ; IV _b Typ; | Verwandt mit Systemen die am konjugativen Transfer von DNA beteiligt sind |
| Typ V Sekretionssystem | YadA; <i>Y. enterocolitica</i> und <i>Y. pseudotuberculosis</i> | einfachster Sekretionsapparat, die Pore über die die Proteine ausgeschleust werden, wird von einer „β-barrel“ Struktur gebildet, die selbst im Protein enthalten ist |

Autotransporter bilden die wichtigste Gruppe sekretierter Proteine. In allen Fällen ist die Primärstruktur modular und wird aus den drei Domänen Signalsequenz, Passenger-Domäne und Translokationseinheit zusammengesetzt. Das Protein wird im Zytoplasma des Bakteriums gebildet, die Signalsequenz am N-Terminus leitet das Protein an die innere Zytoplasmamembran und sorgt für den Transport ins Periplasma. Die Translokationseinheit befindet sich am C-Terminus und sorgt für die Translokation über die äußere Membran. Dabei hängt es vom jeweiligen Autotransporter ab ob das Protein vom „β-barrel“ abgespalten wird oder mit der Domäne assoziiert bleibt. Unter dem Begriff Autotransporter werden weiterhin „Zwei-Partner-System“ (TPS) und die Oca- (oligomeric coiled coils adhesin) Familie (Barenkamp et al. 1996; Cope et al. 1999; Elkins, Morrow and Olsen 2000) zusammengefasst. Im Gegensatz zum Autotransporter-System werden beim TPS zwei Proteine gebildet, ein Exoprotein, welches exportiert wird und ein Protein welches die Pore in der äußeren Membran formt. Die Oca-Familie wurde kürzlich als eine Unterfamilie der Oberflächen-assoziierten oligomeren Autotransporter beschrieben und YadA gilt als eine Art Prototyp dieser Familie. Auch hier formt der C-Terminus eines Proteins, der aus vier β-Strängen besteht zusammen mit zwei weiteren YadA Molekülen eine „β-barrel“ Pore in der äußeren Membran, die dann aus insgesamt 12 β-Strängen besteht. Der N-Terminus wird dann durch diese Pore ausgeschleust.

1.8. Das äußere Membran Protein Invasin

Das äußere Membran-Protein Invasin (Inv) ist vor allem in der frühen Phase der Infektion für die effiziente Adhäsion an M-Zellen und damit für die Kolonisierung der Peyerschen Plaques wichtig (Pepe and Miller 1993). Es wird bei 27°C maximal exprimiert. Das Inv Protein von *Yersinia* weist eine hohe Ähnlichkeit zu den Proteinen der Intimin Familie auf. (Yu and Kaper 1992; McGraw et al. 1999). Die Inv-Proteine der enteropathogenen Stämme *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* sind bis auf die Homomultimerisierungsdomäne, die dem *Y. enterocolitica*-Inv fehlt, zu einem hohen Prozentsatz homolog (69%) (Dersch and Isberg 1999; Dersch and Isberg 2000, Hamburger et al. 1999). Das Inv Protein von *Y. pseudotuberculosis* besteht aus 986 Aminosäuren, während das Homolog in *Y. enterocolitica* aus 835 Aminosäuren besteht. Das Protein ist mit dem N-Terminus in der äußeren Membran lokalisiert und der C-Terminus ist somit extrazellulär. Der extrazelluläre Teil von Inv besteht bei *Y. pseudotuberculosis* aus fünf Domänen. Die Domäne D2, die für die Multimerisierung des Proteins sorgt, fehlt bei *Y. enterocolitica*. Die C-terminalen 192 Aminosäuren sind notwendig und ausreichend für die Bindung an verschiedene β 1- Integrine der Wirtszellen. Integrine sind Zellrezeptoren, die als Heterodimere aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind. Natürliche Liganden der β 1- Integrine sind Fibronectin, Kollagen, Laminin und *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1. Inv bindet an α 3 β 1-, α 4 β 1-, α 5 β 1-, α 6 β 1- und α v β 1-, jedoch nicht an α 2 β 1-, β 2- Integrine oder an den Vitronectinrezeptor α v β 3 (Isberg and Leong 1990). Die Bindung von *Y. enterocolitica* an die Wirtszellen spielt eine entscheidende Rolle bei der *Yersinia*-induzierten Produktion von Interleukin-8 (IL-8). Allein die Adhäsion ist für die IL-8 Induktion erforderlich, die Aufnahme der Bakterien spielt hingegen keine Rolle (Schulte et al. 1998).

1.9. Infektionsablauf bei der murinen Yersiniose

Y. enterocolitica nicht nur humanpathogen sondern kann auch in Nagern eine Yersiniose auslösen, wobei der Verlauf und die Symptomatik in beiden Fällen sehr ähnlich sind (Carter 1975a; Carter 1975b). Aus diesem Grund kann das Tiermodell (Ratten, Mäuse) zur Klärung der Pathogenitätsmechanismen der Yersiniose herangezogen werden (Heesemann et al. 1993). Das Mausmodell ist hierbei besonders gut charakterisiert.

Nach oraler Infektion stellen die M-Zellen im Follikel-assoziierten Epithel der Peyer'schen Plaques des Dünndarms die primären Ziele von *Y. enterocolitica* dar (Autenrieth and Firschning 1996, Grutzkau et al. 1990, Hanski et al. 1998). Das Bakterium durchdringt durch Transzytose die M-Zellen und vermehrt sich in den Peyer'schen Plaques (Autenrieth et al. 1996).

Nach dieser Vermehrungsphase disseminieren die Bakterien zu den mesenterialen Lymphknoten und Organen des retikulo-endothelialen Systems wie Leber und Milz. Diese Ausbreitung geschieht möglicherweise zellvermittelt, indem migrierende polymorphnukleäre Leukozyten (PMN) (Russmann et al. 1996), B-Lymphozyten (Lundgren et al. 1996) oder dendritische Zellen (Schoppet et al. 2000) als Vehikel benutzt werden. Die systemische Infektion führt zu Abszessen in Milz, Leber und Lunge, in denen Yersinien, Phagozyten und Lymphozyten beobachtet werden können (Autenrieth et al. 1993).

1.10. Interaktion von *Yersinia enterocolitica* mit der Wirtszelle

Epitheliale Zellen als Abschluss mukosaler Oberflächen erfüllen drei wichtige Funktionen. Zum einen trennen sie das interne Milieu des Wirtes von der äußeren Umwelt. Die Mikroorganismen der Umwelt, z.B. Darmbakterien des distalen Gastrointestinaltraktes, dringen nicht in Epithelzellen ein. Neben dieser mechanischen Barriere nehmen Epithelzellen spezifische Funktionen der verschiedenen Organsysteme wahr. Im Gastrointestinaltrakt beispielsweise bewerkstelligen sie den Ionentransport sowie die Flüssigkeitsaufnahme und -sekretion. Außerdem besitzen Epithelzellen eine wesentliche Funktion innerhalb des angeborenen Immunsystems. Auf Grund ihrer Barrierefunktion sind sie diejenigen Zellen, die als Erste mit eventuellen Pathogenen in Kontakt treten. Diese Interaktion kann Epithelzellen dazu stimulieren z.B. Zytokine zu sekretieren, die auf die Zellen des Immunsystems eine aktivierende Wirkung haben. Weitere immunologische Eigenschaften von Epithelzellen sind in Abb. 1 dargestellt. Somit fungieren Epithelzellen als die primären Sensoren für mikrobielle Pathogene, als sogenannte „Wachhunde des Immunsystems“ (Eckmann et al. 1995).

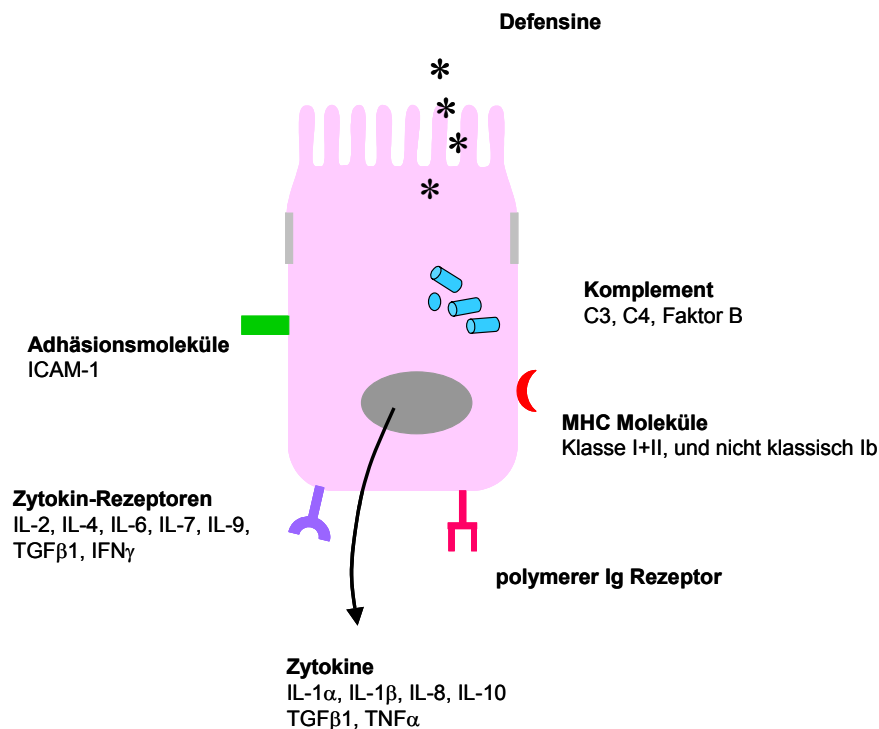


Abb. 1: Immunologische Eigenschaften von Epithelzellen

Nach oraler Infektion stellen die M-Zellen im Follikel-assoziierten Epithel der Peyerschen Plaques des Dünndarms die primären Ziele von *Y. enterocolitica* dar (Autenrieth and Firschning 1996, Grutzkau et al. 1990, Hanski et al. 1998). Die Bakterien dringen durch Transzytose über die M-Zellen in die Peyerschen Plaques ein und vermehren sich dort (Abb. 2) (Autenrieth et al. 1996). Durch Interaktion mit Epithel-Zellen wird die Sekretion von IL-8, IL-1 β , IL-6, *tumor necrosis factor* (TNF)- α , *monocyte chemoattractant Protein 1* (MCP)-1 und *granulocyte/macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) induziert (Kampik et al. 2000). Dadurch kommt es zu einer Einwanderung von polymorphnukleären Leukozyten (PMNs) und Monozyten sowie zur Bildung von Mikroabszessen unterhalb des Follikel-assoziierten Epithels (Autenrieth and Firschning 1996). *Y. enterocolitica* kann diese erste Verteidigungslinie der unspezifischen Immunantwort teilweise überwinden, indem es mittels der Virulenzfaktoren YopH, YopE, YadA und SodA eine Eliminierung durch PMNs vermeidet (Ruckdeschel et al. 1996, Roggenkamp et al. 1997), Makrophagen durch YopE und YopH an der Phagozytose hindert und bei diesen durch YopP Apoptose induziert (Black and Bliska 2000; Fallmann et al. 1995; Rosqvist et al. 1988; Mills et al. 1997; Monack et al. 1997; Denecker et al. 2001). Dadurch wird die Disseminierung zu mesenterialen Lymphknoten und Organen des retikuloendothelialen Systems wie Leber und Milz möglich. Diese Ausbreitung

geschieht möglicherweise zellvermittelt, indem migrierende PMNs (Russmann, Ruckdeschel and Heesemann 1996), B-Lymphozyten (Lundgren et al. 1996) oder dendritische Zellen (Schoppet et al. 2000) als Vehikel genutzt werden. Die systemische Infektion führt zu Abszessen in Milz, Leber und Lunge, in denen Yersinien, Phagozyten, Lymphozyten und Monozyten nachgewiesen werden können (Autenrieth et al. 1993).

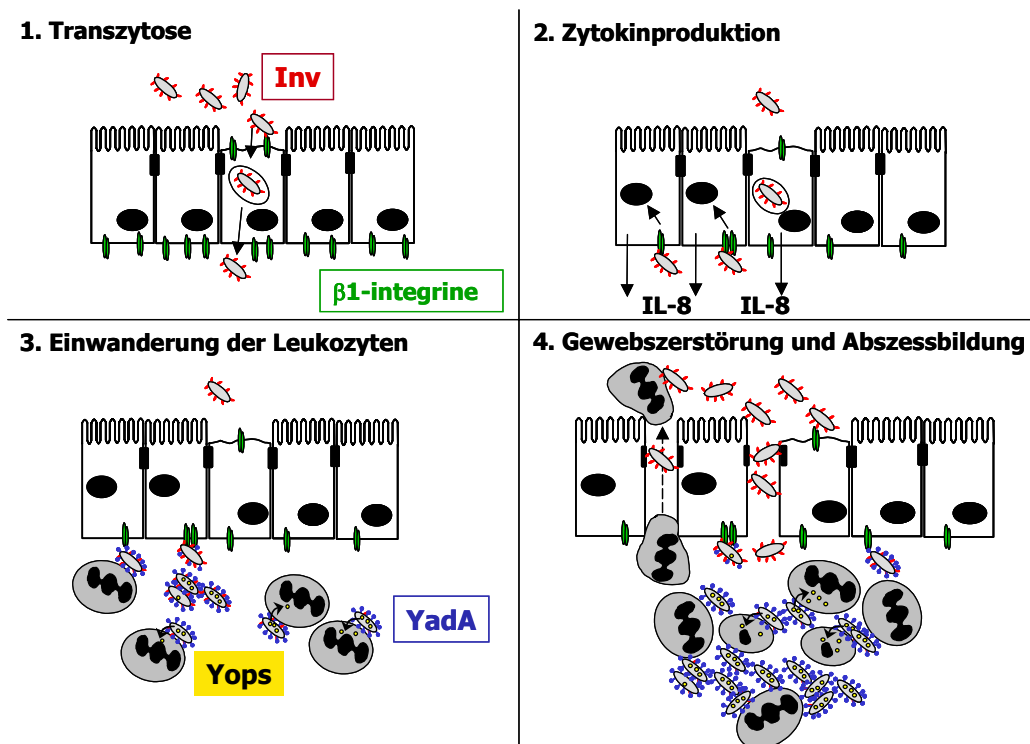


Abb. 2: Hypothetischer Ablauf der frühen Phase einer Yersinien-Infektion. (1) Die Yersinien werden durch die M-Zellen in die Peyerschen Plaques transloziert. (2) Durch Bindung der Bakterien über das Invasin an die $\beta 1$ -Integrine der Epithelzellen wird die Produktion von Zytokinen induziert. (3) Dadurch kommt es zu einer Einwanderung von Leukozyten. YadA und die Yops verhindern die Phagozytose und (4) es kommt zu Gewebszerstörung und Abszessbildung.

1.11. NF- κ B und Regulation der IL-8 Expression

Das chemotaktische Zytokin IL-8 gehört zur Familie der CXC Chemokine. Es ist ein wirksamer Chemoattraktant und Aktivator für Neutrophile. Die Signalwege, die nach Stimulation mit den Zytokinen IL-1 und TNF- α zur IL-8 Expression in Epithelzellen führen, sind gut untersucht (Abb. 3) (Kyriakis and Avruch 2001; Wallachet al. 1999; O'Neill 2000). Die IL-1-induzierte IL-8 Produktion wird durch diverse *mitogen activated protein* (MAP) Kinase Kaskaden sowohl auf transkriptioneller Ebene durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, als auch auf posttranskriptioneller Ebene durch Erhöhung der mRNA-

Stabilität (Krause et al. 1998) reguliert. Für die transkriptionelle Regulation ist eine Sequenz erforderlich, die die Nukleotide (nt) –133 bis –1 im 5' Promotorbereich des humanen IL-8 Gens umspannt (Mukaida et al. 1994). Dieser Bereich enthält Bindungsmotive für mehrere Transkriptionsfaktoren wie CCAAT *enhancer binding protein* (C/EBP), *nuclear factor* (NF)- κ B, *activatorprotein* (AP)-1 und Octamer-Bindungsproteine (Mukaida et al. 1994). Die Aktivierung von NF- κ B ist für die Transkription des IL-8 Gens essentiell.

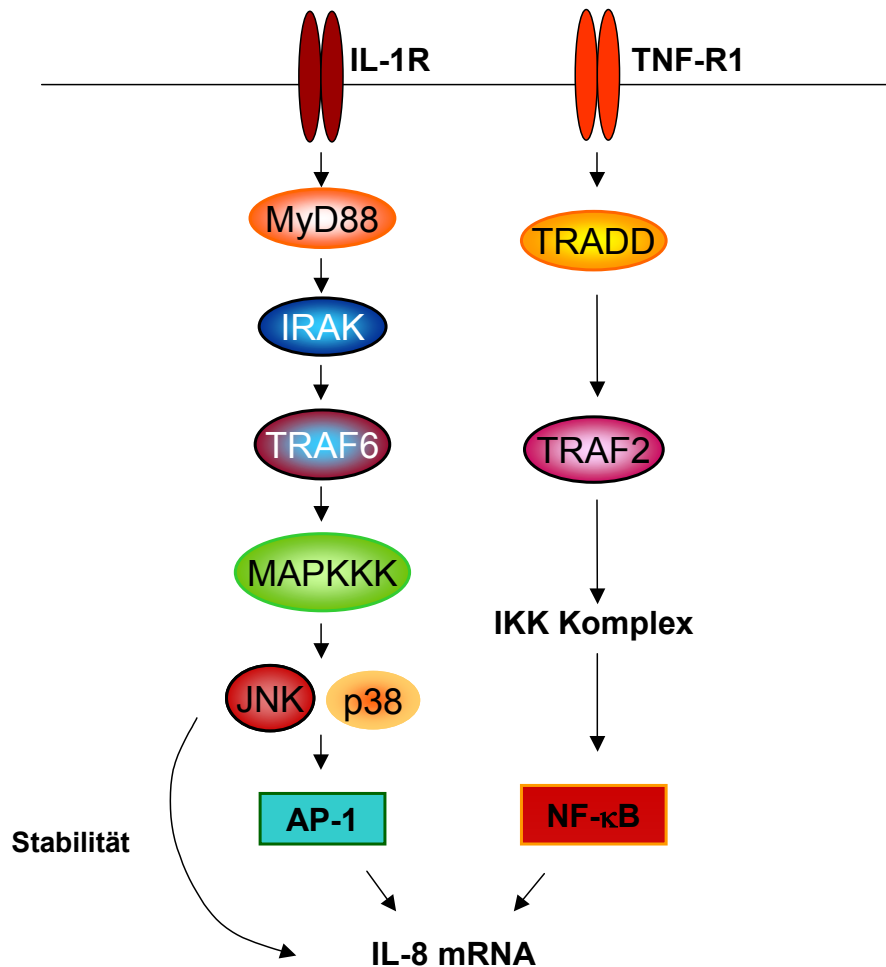


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der IL-1- und TNF- α -induzierten IL-8 Expression. IL-1 bindet an seinen Rezeptor (IL-1R). IRAK (IL-1 *receptor associated kinase*) bindet über das Adapter-Molekül MyD88 (*myeloid differentiation factor*) an den Rezeptor und phosphoryliert TRAF6 (TNF *receptor associated factor*). Dann wird NF- κ B über den I- κ B Kinase (IKK) Komplex und AP-1 über die MAP Kinasen aktiviert, wodurch das IL-8 Gen transkribiert wird. Die p38 MAP Kinase stabilisiert die IL-8 mRNA und verstärkt so die IL-8 Produktion. TNF- α bindet an den Rezeptor (TNF-R1) und TRAF2 bindet über den Adapter TRADD (TNF *receptor associated death domain*) und wird aktiviert. Ab hier verläuft die Signalkaskade wie bei IL-1 Induktion über MAP Kinasen und IKK.

Die NF- κ B Familie umfasst fünf Untereinheiten, nämlich p50, p52, p65, c-Rel und RelB. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist als Dimer aus einer Kombination dieser Untereinheiten

aufgebaut. Je nach Nukleotidsequenz der NF- κ B Motive binden unterschiedliche NF- κ B Komplexe an den Promotor. Durch Bindung an seinen spezifischen Inhibitor I- κ B wird inaktives NF- κ B im Zytoplasma zurückgehalten. Phosphorylierung von I- κ B durch den I- κ B Kinase (IKK)-Komplex resultiert in dessen Ubiquitinylierung und rascher Degradation durch das Proteasom. Das nun freigesetzte NF- κ B wandert in den Zellkern (Rothwarf and Karin 1999). Dieser Prozess ist für die NF- κ B Aktivierung essentiell. Die transkriptionelle Aktivität kann weiterhin durch Phosphorylierung seiner Untereinheiten, sowie durch Bindung von Ko-Aktivatoren feinreguliert werden (Baeuerle and Baltimore 1996; Schmitz et al. 2001). So können z.B. C/EBP und AP-1 die Transkription des IL-8 Gens synergistisch mit NF- κ B verstärken (Mukaida et al. 1990; Yasumoto et al. 1992; Matsusaka et al. 1993; Holtmann et al. 1999). NF- κ B wird durch eine Reihe von Substanzen wie verschiedene Zytokine, doppelsträngige RNA, Phorbolster und einige Viren aktiviert (Baeuerle 1998; Mercurio and Manning 1999). In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass die Infektion von Wirtszellen mit pathogenen Bakterien wie *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhimurium* oder enteropathogenen *Escherichia coli* (EPEC) zur Aktivierung von NF- κ B und Induktion von IL-8 führt (Sharma et al. 1998; Savkovic et al. 1997; Munzenmaier et al. 1997; Eaves-Pyles et al. 1999; Elewaut et al. 1999). Auf welchen Signalwegen NF- κ B und IL-8 durch die Bakterien induziert werden, ist jedoch noch wenig untersucht.

1.12. Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Die angeborene Immunität ist wichtig für den Organismus, weil sie schnell ist und dadurch mikrobielle Pathogene früh erkannt werden (Robert and Modlin 2002). Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems und sind für die erste Erkennung von Pathogenen zuständig, und werden auf allen Zellen einer Klasse exprimiert z.B. auf allen Makrophagen. Es gibt keine klonalen Unterschiede (Robert and Modlin 2002).

Durch die TLRs werden essentielle Komponenten von Pathogenen erkannt z.B. LPS bei Gram-negativen Bakterien, LTA bei Gram-positiven Bakterien, Lipoproteine von Bakterien und Parasiten, Glycolipide von Mycobakterien, Mannan von Hefen, bakterielle DNA und doppelsträngige RNAs von Viren. Dabei handelt es sich oft, aber nicht immer um Oberflächenmoleküle der Pathogene. Bis heute sind elf unterschiedliche TLRs bekannt. TLRs wurden zunächst als Zellmembranrezeptoren beschrieben, mittlerweile sind aber auch zytoplasmatische Rezeptoren bekannt. Die Rezeptoren bestehen im Allgemeinen aus einer

zytoplasmatischen TIR Domäne am C-Terminus und die extrazelluläre Domäne besteht aus LRR („leucine rich repeats“) (Hallman et al. 2001). Homologe dieser Rezeptoren findet man bei den Toll Rezeptoren von *Drosophila* und dem humanen IL-1 Rezeptor.

Der Signalweg über die TLR Familie ist homolog zu dem Signalweg über den IL-1 Rezeptor (IL-1R). Beide TLRs und IL-1R binden über ihre TIR Domäne an das Adapterprotein MyD88. Wird MyD88 stimuliert wird die IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase (IRAK) zum Rezeptor rekrutiert. IRAK wird durch Phosphorylierung aktiviert und assoziiert dann mit TRAF6, was zur Aktivierung zweier Signalwege führt, den JNK und den NF- κ B Signalweg. Durch Phosphorylierung des I κ B Kinase Komplexes wird NF- κ B befähigt in den Kern zu wandern und als Transkriptionsfaktor die Transkription verschiedenster inflammatorischer Proteine zu bewirken.

1.13. Ziel der Arbeit

Bei der Interaktion zwischen pathogenen *Yersinien* und Wirtszellen kommt es durch die verschiedenen Pathogenitätsfaktoren von *Yersinia* wie YadA, Inv oder die Yops zur Aktivierung von proinflammatorischen und inhibitorischen Molekülen in der Wirtszelle. Das Verhältnis dieser Moleküle, entscheidet welche Folgen die Interaktion für den Infektionsablauf im Wirt hat.

Ziel dieser Arbeit war die molekularen Mechanismen dieser Prozesse, d.h. welche Signale auf welche Weise in den Wirtszellen übertragen werden, zu untersuchen. Für das äußere Membranprotein Invasin konnte bereits eine Bindung an β 1-Integrine und eine daraus resultierende proinflammatorische Wirtszellantwort gezeigt werden. Nach der Translokation durch die M-Zellen scheint dem äußeren Membranprotein YadA eine zentrale Rolle, bei der Kolonisierung der Peyerschen Plaques und der Persistenz von *Yersinia* in lymphoidem Gewebe, zuzukommen. Es sollte untersucht werden, ob YadA, so wie Inv, zu der proinflammatorischen Antwort der Wirtszelle beiträgt und welche Moleküle an diesem Prozess beteiligt sind. Es sollten funktionelle Domänen von YadA charakterisiert, mögliche zelluläre Rezeptoren für YadA auf Epithelzellen identifiziert und die Signaltransduktion nach Ligation dieses Rezeptors mit YadA sowie die Mechanismen der wahrscheinlichen NF- κ B Aktivierung aufgeklärt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

| | |
|--|-------------------------------|
| Agarose-Gel-Elektrophoresekammern | BioRad, München |
| Analysewaagen (R160P, PT 1200) | Sartorius, Göttingen |
| Bakterien-Brutschrank (B20) | Heraeus, Hanau |
| Drehschüttler (Rotator 220) | Bachofer, Reutlingen |
| Elektroporationsapparatur | BioRad, München |
| ELISA Reader | Tecan, Crailsheim |
| ELISA Washer | Tecan, Crailsheim |
| Entwicklermaschine: Curix 60 | AGFA, Köln |
| Eppendorf-Zentrifuge (Centrifuge 5417R) | Eppendorf, Hamburg |
| Fluor-S MultiImager | BioRad, München |
| Gasbrenner | Warteweg LB, Göttingen |
| Gelelektrophoreseapparatur PowerPac 1000 | BioRad, München |
| Gel-Schüttler | Ika Labortechnik, Staufen |
| Gelschüttler: Unimax 2010 | Heidolph, Kelheim |
| Heizblock (TR-L-288) | Eppendorf, Hamburg |
| Heizplatte (RCT basic) | Ika Labortechnik, Staufen |
| Immunoblotting-Apparatur (Mini Protean III) | BioRad, München |
| Mikroskop Axiovert 25, AxioLab | Zeiss, Jena |
| Mikroskop DMRE | Leica, Heidelberg |
| Mikroskop Konfokales Laser Scanning DMIRE2 | Leica, Heidelberg |
| Multistepper | Eppendorf, Hamburg |
| Neubauer-Zählkammer | Brand, Landshut |
| PCR-Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400) | Perkin Elmer, Weiterstadt |
| pH-Meter: Modell inoLab [®] Level 2 | WTW, Weilheim i. OB |
| Photometer Ultrospec 3000 pro | AmershamPharmacia Freiburg |
| Pipettierhilfen | Eppendorf, Hamburg |

| | |
|--|----------------------------------|
| Rotoren (SLA-3000, SS-34) | Sorvall, Hanau |
| Schüttelinkubatoren (Certomat BS-1) | Braun Biotech, Melsungen |
| SDS-PAGE-Kammern (Protean III; Mini Protean) | BioRad, München |
| Sicherheitswerkbank (BDK-S 1800) | BDK Luft- und Reinraumtechnik |
| Thermocycler | Biometra, Göttingen |
| Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg |
| UV-Transluminator BioDoc Analyse | Biometra, Göttingen |
| Vortexer mixer 7-2020 | neoLab, Heidelberg |
| Wasserbad | Memmert, Schwabach |
| Zellkultur-Brutschrank (BBD C220) | Heraeus, Hanau |
| Zentrifuge Eppendorf 5412 R, Minispin plus | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifuge Multifuge 3S-R | Heraeus, Hanau |
| Zentrifuge (Sorvall RC5c Plus) | DuPont, Bad Homburg |

2.1.2. Chemikalien

| | |
|--|--|
| Acrylamid / Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30) | Roth, Karlsruhe |
| Agarose | Eurobio, Les Iles Ulies, Frankreich |
| APS (Ammoniumpersulfat) | Merck, Darmstadt |
| Bacto-Agar | Difco, USA |
| Bacto Trypton | Difco, USA |
| BSA | Biomol, Hamburg |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Calciumchlorid CaCl ₂ | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Chloramphenicol | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Coomassie R-250 | Roth, Karlsruhe |
| Cytochalasin D | Sigma-Aldrich, |

| | |
|---|---------------------------------|
| dNTPs | Taufkirchen |
| ECL-Westernblotdetektionssystem | Roche, Mannheim |
| Essigsäure 100% p.a. | Amersham Pharmacia, Freiburg |
| Ethidiumbromid | Roth, Karlsruhe |
| Fötale Kälberserum (FKS) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Fluoprep | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Gentamicin | Biomérieux, France |
| Glucose | ICN, USA |
| Glycin | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Hefeextrakt | Roth, Karlsruhe |
| Kanamycin | ICN, USA |
| L-Glutamin | ICN, USA |
| Nalidixinsäure | Invitrogen, Karlsruhe |
| Natriumpyruvat | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| nicht essentielle Aminosäuren | Biochrom, Berlin |
| Paraformaldehyd (PFA) | Biochrom, Berlin |
| PBS Dulbecco | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco, Karlsruhe |
| PNPP (p-Nitrophenyl-Phosphat Dinatrium) | Biochrom, Berlin |
| Polymyxin-Agarose und Polymyxin | ICN, USA |
| Ponceau S Lösung | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Propidiumjodid | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| RPMI 1640 | Serva, Heidelberg |
| Rubidiumchlorid RbCl ₂ | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

| | |
|--|-------------------------------|
| SDS ultra pure | Roth, Karlsruhe |
| TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Tris | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Triton-X 100 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Trypan-Blau | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Trypsin-EDTA-Lösung | Gibco, BRL, Eggenstein |
| Trypton Peptone | ICN, USA |

Alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen und besitzen den Reinheitsgrad p.a.

2.1.3. Antikörper

ELISA

| | |
|----------------------------------|------------------------|
| anti-murines KC | TEBU, Offenbach |
| anti -murines KC, biotinyliert | R&D Systems, |
| anti -humanes IL-8 | Pharmingen, Heidelberg |
| anti -humanes IL-8, biotinyliert | Pharmingen, Heidelberg |

Immunfluoreszenz und Western Blot

| | |
|----------------------------------|------------------|
| Kaninchen anti -Invasin | AG Autenrieth |
| Kaninchen anti -P1.O8 (YadA O:8) | AG Autenrieth |
| Schwein anti -Kanichen-HRP | Dianova, Hamburg |

Anti- β 1-Integrin Antikörper

| | |
|---|------------------------|
| FITC-gekoppelter Hamster anti -Ratte/Maus CD29 (Ha2/5) | Pharmingen, Heidelberg |
| Maus -humanes- β 1-Integrin (DE9), IgG ₁ | Biomol, Hamburg |

anti- β 1-Integrin CD29, monoklonal Lia1/2
(für Blockierungsversuche)

BeckmanCoulter, Krefeld

Zweitantikörper

FITC-konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)

Dianova, Hamburg

Cy5- konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG F(ab')₂

Dianova, Hamburg

FITC-konjugierter Ziege anti-Maus

Becton Dickinson,
USA

Cy5-konjugierter Ziege anti-Maus IgG (H+L)

Dianova, Hamburg

Isotypen

Hamster IgM, λ isotyp standard (G235-1)

Pharmingen, Heidelberg

Maus IgG1

Biozol, Eching

Kaninchen IgG

Santa Cruz, USA

2.1.4. Verbrauchsmittel

Einmalküvetten

Sarstedt, Berlin

Elektroporationsküvetten

Eurogentech, Seraing,
Belgien

ELISA-Platten (Maxisorp)

Nunc, Roskilde,
Dänemark

Eppendorf-Gefäße

Eppendorf, Hamburg

FACS-Röhrchen

Becton Dickinson,
Heidelberg

Glaskolben und Flaschen

Schott Duran, Mainz

Impfösen (10 μ l)

Sarstedt, Berlin

Kanülen (Sterican 0,90 x 40 mm, 0,40 x 20 mm)

B. Braun, Melsungen

Membranen für Immunoblots (Cellulosenitrat)

Schleicher&Schuell,
Dassel

| | |
|---|---------------------------------|
| Mikrotiter-Platten (Spitzboden, Rundboden) | Greiner, Nürtingen |
| Parafilm „M“ | American National Can, USA |
| PCR-Gefäße | Fisher Scientific, Schwerte |
| Pasteurpipetten | WU, Mainz |
| pH-Indikatorpapier (pH 1 - 14) | Merck, Darmstadt |
| Pipetten (5ml, 10ml, 25ml, 50ml) | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Pipettenspitzen (10 µl) | Gilson, USA |
| Pipettenspitzen (200 µl) | Brand, Wertheim |
| Pipettenspitzen (1000 µl) | Sarstedt, Berlin |
| Plastik-Petrischalen | Greiner, Nürtingen |
| Rundboden-Röhrchen (13 ml) | Greiner, Nürtingen |
| Röntgenfilme (Kodak X-OMAT) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Skalpelle | B. Braun, Melsungen |
| Spitzboden-Röhrchen (15 ml, 50 ml) | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Spritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml) | B. Braun, Melsungen |
| Spritzenvorsatzfilter (0,20 µm, 0,45 µm, Celluloseacetat, Ø 26 mm) | Sartorius AG, Göttingen |
| Spritzenvorsatzfilter (0,22 µm, PVDF, Ø 13 mm,) | Millipore, Eschborn |
| Zellkulturflaschen (25, 80, 175 cm ²) | Nunc, Roskilde, Dänemark |
| Zellkulturplatten (24, 48, 96-Napf) | Nunc, Roskilde, Dänemark |
| Zellkulturschalen (100 mm) | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Zellschaber | Corning Inc, USA |

2.1.5. Kommerzielle Kits

| | |
|--|---|
| Nucleobond AX100 | Machery-Nagel, Düren |
| Qiagen Plasmid Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAquick PCR Purification Kit (Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten aus Agarosegelen) | Qiagen, Hilden |
| QCL-1000® Chromogenic Endpoint LAL Kit | Biowhittaker, Cambrex, Biozym, Hess. Oldendorf |
| Quickchange site directed mutagenesis kit | Stratagene |

Bei der Verwendung von Kits wurden die jeweils von der Herstellerfirma mitgelieferten Puffer verwendet und nach Herstelleranleitung vorgegangen.

2.1.6. Größenstandards

| | |
|---------------------------|-----------------------|
| DNA mass ladder | Invitrogen, Karlsruhe |
| 1 kb Plus DNA Ladder | Gibco, Karlsruhe |
| BenchMark™ Protein ladder | Invitrogen, Karlsruhe |

2.1.7. Enzyme

| | |
|---------------|-----------------------------------|
| <i>Bam</i> HI | New England Biolabs, Frankfurt |
| <i>Bgl</i> II | New England Biolabs, Frankfurt |
| <i>Dpn</i> I | New England Biolabs, Frankfurt |
| <i>Eco</i> RI | New England Biolabs, Frankfurt |
| <i>Eco</i> RV | New England Biolabs, |

| | |
|---------------------------|--|
| <i>HindIII</i> | Frankfurt New England Biolabs, Frankfurt |
| <i>NcoI</i> | New England Biolabs, Frankfurt |
| T4-DNA-Ligase | New England Biolabs, Frankfurt |
| <i>Taq</i> -Polymerase | Roche, Mannheim |
| <i>Pfu</i> DNA-Polymerase | Stratagene, Amsterdam, NL |

2.1.8. Rekombinante Proteine

| | |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| Rekombinantes humanes IL-8 | BD Biosciences, Heidelberg |
| Rekombinantes murines KC | Tebu, Offenbach |
| Glutathion-S-Transferase (GST) | AG Autenrieth |
| GST- Invasin Fusionsprotein (GST-Inv) | AG Autenrieth |

2.1.9. Zelllinien

Für Zellkulturexperimente wurden entweder HeLa Zellen oder die beiden murinen Zelllinien GD25 und GD25 β -1A verwendet.

HeLa Zellen sind humane epitheliale Zellen aus einem Zervixkarzinom und wurden ursprünglich von der American Type Culture Collection, MD, USA, bezogen (No. CCL-2) (www.atcc.org)

GD25 sind Zellen des embryonalen Stammzellklons G201 aus β 1-Integrin defizienten Mäusen (Fassler et al. 1995). Die Zelllinie GD25 β -1A ist aus der GD25 Zelllinie entstanden welche mit Wildtyp β 1- Integrin cDNA transfiziert wurde (Wennerberg et al. 1996).

2.1.10. Medien

DMEM/10% FKS/L-Glutamin: DMEM wurde als fertige Lösung (Gibco, Karlsruhe) bezogen. Dem Medium wurden steril 10% fötales Kälberserum (FKS) (Sigma), 1% L-Glutamin (200 mM) (Invitrogen, Karlsruhe) zugesetzt. Dieses Medium wurde zur Kultivierung von Fibroblasten-ähnlichen GD25 Zellen verwendet. Zur Kultivierung von GD25 β -1A wurde DMEM/ 10% FKS/L-Glutamin mit 1% Puromycin (10 μ g/ml) angereichert und verwendet.

RPMI 1640/10% FKS/L-Glutamin/Pen-Strep: RPMI 1640 wurde als fertige Lösung (Biochrom, Berlin) bezogen. Dem Medium wurden 10% fötales Kälberserum (FKS) (Sigma), 1% L-Glutamin (200 mM) (Invitrogen) zugesetzt. Das FKS wurde vor Zugabe für 30min bei 56°C inaktiviert. Dieses Medium wurde zur Kultivierung von HeLa-Zellen verwendet.

2.1.11. Bakterienstämme

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

| Stämme | Eigenschaften | Herkunft |
|----------------|---|-------------------------|
| <i>E. coli</i> | | |
| DH5 α | <i>endA1 hsdR17(r_{k-mk+}) supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1Δ (lacZYA-argF)U169 (Φ80lacZΔM15)</i> | (Hanahan 1983) |
| HB101 | <i>F- D(gpt-proA)62 leuB6 glnV44 ara-14 galK2 lacY1 D(mcrC-mrr) rpsL20(Str^r) xyl-5 mtl-1 recA13</i> | (Maniatis et al., 1989) |

Y. enterocolitica

| | | |
|-------------------|--|---------------------------|
| WA-314 | klinisches Isolat, mit Virulenzplasmid pYVO8; Nal ^R | (Heesemann et al. 1987) |
| pYV- | plasmidloses Derivat von WA-314; Nal ^R | (Heesemann, et al. 1987) |
| pYV- Δ inv | plasmidloses Derivat von WA-314, Deletion des Invasingens durch Kanamycinkassette; Kan ^R , Nal ^R | (Ruckdeschel et al. 1996) |

2.1.12. Bakterien-Nährmedien

Alle Medien wurden nach der Herstellung autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Für Selektivmedien wurden nach dem Autoklavieren geeignete Antibiotika zugesetzt, danach erfolgte die Lagerung bei 4°C.

| | | |
|------------|--------|-------------|
| LB-Medium: | 10 g/l | Trypton |
| | 5 g/l | Hefeextrakt |
| | 5 g/l | NaCl |
| | ad 1 l | A. dest. |
| | pH 7,5 | |

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde dem Medium 15g/l Agar hinzugefügt. Die fertigen Platten wurden bei 4°C gelagert.

2.1.13 Mäusstämme

| | | |
|------------------------------|------------------------------|------------------------|
| C3H/HeN | Wildtyp, Kontrollmäuse | AG Kirschning, München |
| C3H/HeJ | defizient in TLR-4 | AG Kirschning, München |
| C3H/HeJ TLR-2 ^{-/-} | defizient in TLR-4 und TLR-2 | AG Kirschning, München |

2.1.14. Puffer und Lösungen

2.1.14.1. Antibiotika-Lösungen

| | |
|--------------------------------------|--|
| Ampicillin-Stammlösung | 100 mg/ml in Wasser, stabil bei -20°C dem Medium 1:1000 zugesetzt |
| Chloramphenicol-Stammlösung | 50 mg/ml in Ethanol, stabil bei -20°C dem Medium 1:2000 zugesetzt |
| Gentamycin-Stammlösung | 10 mg/ml in Wasser, stabil bei -20°C dem Medium 1:100 zugesetzt |
| Kanamycin-Stammlösung | 50 mg/ml in Wasser, stabil bei -20°C dem Medium 1:2000 zugesetzt |
| Nalidixinsäure | 10 mg/ml in Wasser, stabil bei -20°C dem Medium 1:1000 zugesetzt |
| Penicillin-Streptomycin Stammlösung: | je 10 000 Units/ml, stabil bei -20°C dem Medium 1:100 zugesetzt |

2.1.14.2 Allgemeine Puffer

| | |
|----------------------------|---|
| PBS: | 4 mM KH_2PO_4 16 mM Na_2HPO_4 115 mM NaCl |
| 5 x TBE-Puffer (1 Liter) : | 54 g Tris-Base 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA pH-Wert 8,3 (eingestellt mit Essigsäure) |

Alle anderen Lösungen sind unter der zugehörigen Methode beschrieben.

2.1.15. Synthetische Oligonukleotide

Für die Klonierung und PCR wurden die in Tab. 2 aufgeführten synthetischen Oligonukleotide eingesetzt, die von Sigma-Aldrich, Taufkirchen synthetisiert wurden.

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

| Oligonukleotid | Sequenz in 5' → 3' - Richtung | | Eigenschaften |
|----------------------|---|------------------------|--------------------------|
| Roque for | gtcaggcattagcaattgcttctggctatcgtgtaa | Mutagenese | YadA Glycin zu Alanin |
| Roque back | atttacacgatagccagaagcaattgctaagcctgac | Mutagenese | YadA Glycin zu Alanin |
| YadA Gly zu His for | ctagtcaggcattagcaattcattctggctatcgtgtaa | Mutagenese | YadA Glycin zu Histidin |
| YadA Gly zu His back | ctcatttacacgatagccagaatgaattgctaagcctgactag | Mutagenese | YadA Glycin zu Histidin |
| YadA Gly zu Thr for | ctagtcaggcattagcaattacttctggctatcgtgtaa | Mutagenese | YadA Glycin zu Threonin |
| YadA Gly zu Thr back | ctcatttacacgatagccagaagtaattgctaagcctgactag | Mutagenese | YadA Glycin zu Threonin |
| YadA Gly zu Ser for | agtcaggcattagcaattagtcttctggctatcgtgtaa | Mutagenese | YadA Glycin zu Serin |
| YadA Gly zu Ser back | catttacacgatagccagaactaattgctaagcctgact | Mutagenese | YadA Glycin zu Serin |
| yadA O3 136 fw | <u>ccatggga</u> actaaagattttaagatcagtg | NcoI Schnittstelle | YadA O:8 in pNIV136 |
| yadA O3 136 re | <u>agatct</u> attaggattaatacagcgcag | BgIII Schnittstelle | YadA O:8 in pNIV136 |
| pNIV136 seq rev | gtcggaacgcattgc | Sequenzierung | Bindet im Vektor pNIV136 |
| pNIV136 seq for | acaggaaacagctatgac | Sequenzierung | Bindet im Vektor pNIV136 |
| Yad seq for 1 | gcaattggctccttaag | Sequenzierung | Bindet in YadA Sequenz |
| Yad seq for 2 | tggcactaaagacactg | Sequenzierung | Bindet in YadA Sequenz |

| | | | |
|---------------|------------------------------|---------------|---------------------------|
| Yad seq for 3 | acactcaa <u>atag</u> ttgtget | Sequenzierung | Bindet in YadA Sequenz |
| Yad seq for 4 | cagctt <u>gttcc</u> agcc | Sequenzierung | Bindet in YadA Sequenz |

Die unterstrichenen Nukleotide stellen die Erkennungssequenz der Restriktionsendonukleasen dar

2.1.16. Vektoren

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Vektoren

| Vektor | Beschreibung | Referenz |
|----------------------------|--|---|
| pEEV1 | Derivat von pTM100 mit zusätzlicher SacI Restriktionsschnittstelle | (Michiels et al. 1991) |
| pYMS4505 | <i>yadA</i> _{YeO3} wurde als 1753-bp PCR Fragment über die <i>Bam</i> HI Schnittstelle in pTM100 kloniert, Cm ^R ; <i>yadA</i> ist unter der Kontrolle des Promotors der zerstörten Tetracyclin Resistenzkassette | (Tahir et al. 2000) |
| pYMS4505-M6 | pYMS4505 exprimiert YadA-M6; YadA-M6 enthält drei Aminosäureaustausche (V156D, A157D, I158E), Cm ^R ; | (Tahir et al. 2000) |
| pYL8 | <i>yadA</i> _{Δ83-104} und die <i>lcrF</i> Gene von <i>Y. enterocolitica</i> O:3 wurden in den pTM100 kloniert, Cm ^R ; unter Kontrolle des natürlichen <i>yadA</i> Promoters und <i>lcrF</i> . | (Tamm et al. 1993) |
| pNIV136 | Derivat von pIN-III-ompA2, künstlicher Expressionsvektor (gi392964, AJ223122); Amp ^R | (Fauconnier et al. 1998; Schulte et al. 1998) |
| pInv1914 | Derivat von pNIV136, Inv von <i>Y. enterocolitica</i> O:9 wird unter Kontrolle eines IPTG induzierbaren <i>lpp</i> Promoters exprimiert, welcher eine lacUV5 Promoter-Operator Region enthält, Amp ^R | (Schulte et al. 1998) |
| pYadA ^{O:8} | Derivat von pNIV136, YadA ^{O:8} von <i>Y. enterocolitica</i> wird unter Kontrolle eines IPTG induzierbaren <i>lpp</i> Promoters exprimiert, welcher eine lacUV5 Promoter-Operator Region enthält, Amp ^R | diese Arbeit |
| pYadA ^{O:8} G389A | Derivat von pYadA ^{O:8} , Aminosäureaustausch G398A im Membrananker von YadA, Amp ^R | diese Arbeit |
| pYadA ^{O:8} G389S | Derivat von pYadA ^{O:8} , Aminosäureaustausch G398S im Membrananker von YadA, Amp ^R | diese Arbeit |
| pYadA ^{O:8} G389T | Derivat von pYadA ^{O:8} , Aminosäureaustausch G398T im Membrananker von YadA, Amp ^R | diese Arbeit |
| pYadA ^{O:8} G389H | Derivat von pYadA ^{O:8} , Aminosäureaustausch G398H im Membrananker von YadA, Amp ^R | diese Arbeit |
| pASK-IBA2 | Anhydrotetracyclin induzierbarer Expressionsvektor, Amp ^R | IBA GmbH, Göttingen |

| | | |
|-------------------------------------|---|--------------|
| pASK-IBA2 YadA ^{O:8} | YadAO:8 von <i>Y. enterocolitica</i> aus pYadA ^{O:8} über Restriktionsschnittstellen XbaI und SalI in pASK-IBA2 eingeführt; Amp ^R | diese Arbeit |
| pASK-IBA2 YadA ^{O:8} G389A | YadAO:8 von <i>Y. enterocolitica</i> aus pYadA ^{O:8} G389A über Restriktionsschnittstellen XbaI und SalI in pASK-IBA2 eingeführt; Amp ^R | diese Arbeit |
| pASK-IBA2 YadA ^{O:8} G389S | YadAO:8 von <i>Y. enterocolitica</i> aus pYadA ^{O:8} G389S über Restriktionsschnittstellen XbaI und SalI in pASK-IBA2 eingeführt; Amp ^R | diese Arbeit |
| pASK-IBA2 YadA ^{O:8} G389T | YadAO:8 von <i>Y. enterocolitica</i> aus pYadA ^{O:8} G389T über Restriktionsschnittstellen XbaI und SalI in pASK-IBA2 eingeführt; Amp ^R | diese Arbeit |
| pASK-IBA2 YadA ^{O:8} G389H | YadAO:8 von <i>Y. enterocolitica</i> aus pYadA ^{O:8} G389H über Restriktionsschnittstellen XbaI und SalI in pASK-IBA2 eingeführt; Amp ^R | diese Arbeit |

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Präparation von Plasmiden

Plasmide wurden mittels alkalischer Lyse und anschließender Anionenaustauschchromatographie entweder mit dem QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen oder mit dem Nucleobond Kit von Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers extrahiert.

2.2.1.2. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größen- und Konzentrationsabschätzung sowie zur präparativen Auftrennung von Nucleinsäuren wurden Gelelektrophoresen durchgeführt (Maniatis et al. 1989)

Für das Agarosegel wurde je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente eine Agarose-Konzentration von 0,7 % bis 1,5 % in 0,5x TBE eingestellt und die Suspension aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde das Gel in das Bett einer Horizontal-Gelelektrophorese-Kammer gegossen. Die DNA-Lösungen wurden mit 1/5 Volumen Farbmaler versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE verwendet. Die angelegte Spannung lag zwischen 70 und 120Volt. Zur Detektion Nucleinsäuren wurden die Gele 10min im Ethidiumbromid-Bad (10µg/ml A. dest.) gefärbt, für weitere 10min im Wasserbad entfärbt und unter UV-Licht (254nm) kontrolliert und fotografiert.

| | |
|-----------------|-----------------------------|
| DNA-Ladepuffer: | 0,05 % (w/v) Bromphenolblau |
| | 0,05 % (w/v) Xylencyanol |
| | 50 % (w/v) Glyzerin |
| | 0,1 mM EDTA |
| | in 1x TBE-Puffer |

2.2.1.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und freien Desoxynukleotiden, wurde ein DNA-Fragment (Matritze) zwischen zwei definierten, an Strang und Gegenstrang hybridisierenden Oligonukleotiden vervielfältigt. Die Reaktionsfolge bestand aus wiederholter, hitzeinduzierter Strangtrennung des DNA-Doppelstranges, Primer-Hybridisierung und zuletzt der DNA-Polymerisierung. Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das verwendete Temperaturprofil entsprachen folgendem Schema:

| Ansatz der PCR | Temperaturprofil: | |
|----------------------------|------------------------|----------------|
| 10-100 ng Plasmid-DNA | 1x 1min 94°C | Denaturierung |
| 20 µM 3`Oligonukleotid | 25-35x 1min 94 °C | Denaturierung |
| 20 µM 5`Oligonukleotid | 25-35x 45 sec 50-70 °C | Hybridisierung |
| 40 mM dNTPs | 25-35x 2 min 72 °C | Elongation |
| 2,5-5 U Polymerase | 1x 4 min 72 °C | Elongation |
| 10x Polymerase –Puffer | | |
| H ₂ O Millipore | | |

Die Hybridisierungstemperatur wurde der Schmelztemperatur der Oligonukleotide angepasst. Wurde das PCR-Produkt für Klonierungen verwendet, wurde der angegebene Standardansatz modifiziert. Man verwendete 2,5U Pfu-DNA-Polymerase. Es muss dabei berücksichtigt werden, dass die Elongationszeit bei Verwendung dieser Polymerase nur ca. 500bp/min beträgt. Die Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgte mit einem QIAquick-Kit entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.2.1.4. Restriktionsspaltung von DNA

Die Restriktion von DNA mit Endonukleasen wurde in den von den jeweiligen Herstellern empfohlenen Puffersystemen durchgeführt. Die Menge an Enzym und die Inkubationsdauer

richteten sich nach der eingesetzten DNA-Menge und der Anzahl der Schnittstellen im Plasmid. Das Gesamtvolumen des Restriktionsansatzes betrug mindestens das Zehnfache des Enzymvolumens. Die Inaktivierung der Enzyme wurde, falls möglich, nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Größe der erhaltenen DNA-Fragmente wurde auf 1%igen Agarosegelen kontrolliert oder erhaltene DNA-Fragmente aus 1%igen Agarosegelen eluiert (2.2.1.2.)

2.2.1.5. Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente können mit Hilfe der T4-DNA-Ligase kovalent verknüpft werden, sofern die Enden kompatibel sind. In die Ligation wurden jeweils 100-200ng Vektor mit Insert im molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden nach Anleitung des Herstellers (Boehringer, Mannheim) pipettiert und entweder über Nacht bei 16°C oder 4h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

2.2.1.6. Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel (2.2.1.2.) aufgetrennt wurde die DNA zunächst mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die zu isolierende Bande wurde unter möglichst kurzer UV-Bestrahlung (270nm) mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, gewogen und mit dem Gel-Extraktions-Protokoll des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers aus dem Gel eluiert. Ein spezieller Puffer solubilisiert das Agarosegelstück und stellt geeignete Bedingungen für die DNA-Bindung an eine Silica-Membran her (hohe Salzkonzentration und niedriger pH-Wert). Nach dem Waschen der Silica-Membran wurde die DNA mit sterilem A. dest. eluiert.

2.2.1.7. Sequenzierung

Die klonierten Plasmide (Tabelle 3) wurden zur Kontrolle durch die Firma 4base lab GmbH (Reutlingen) sequenziert.

2.2.1.8. Austausch von Aminosäuren

Zum Austausch einzelner Aminosäuren in einer Proteinsequenz wurde nach dem Quikchange site directed mutagenesis Kit von Stratagene vorgegangen. Dazu wurde der Vektor pYadA^{O:8} und die in Tabelle 2 angegebenen Oligonukleotide benutzt. Die Mutagenese wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.2. Proteinchemische und allgemeine biochemische Methoden

2.2.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Bei dieser Methode werden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Masse aufgetrennt. Die Proteine werden vor der Beladung auf das Gel mit SDS haltigen Ladepuffer versetzt. SDS ist ein anionisches, amphipathisches Detergenz und bindet im Verhältnis 1:1,4 pro Aminosäure an die kationischen Reste der Proteine. Durch die Bindung von SDS ist das Protein anschließend negativ geladen, welche sich proportional zu der Größe des Proteins verhält, somit kann die natürliche Ladung der Proteine vernachlässigt werden. Darüber hinaus nehmen alle SDS-denaturierten Proteine eine stäbchenförmige Konformation ein, was den Einfluss der nativen Oberflächenstruktur auf die Wanderungseigenschaften der Proteine aufhebt. Die Proteine wandern daher im elektrischen Feld zur Anode, wobei ihr Laufverhalten während der Elektrophorese ausschließlich von ihrer Größe abhängig ist. Der Trennbereich wird über die Acrylamid/ Bisacrylamid-Konzentrationen im Gel kontrolliert.

Für die Elektrophorese wurden kleine Gele (Trennstrecke ca. 5,5cm) in einer Bio-Rad Apparatur verwendet. Es wurden 8%- bis 12%ige Trenngele eingesetzt, um eine saubere Auftrennung im Bereich von bzw. 10– 220kD zu erreichen. Die Gießapparatur wurde nach Angaben des Herstellers zusammengesetzt. Die Gellösung wurde bis zu ca. $\frac{3}{4}$ des Endvolumens in die Gelkammer gegossen. Um am oberen Rand des Trenngels eine gleichmäßige Kante zu erhalten, wurde jedes Gel mit 70% Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren (ca. 10min) wurde das Isopropanol abgegossen. Die Sammelgellösung wurde aufgebracht und die Kämme eingesteckt. Nach Polymerisieren des Sammelgels (ca. 30 min) wurden die Proteinproben in die Taschen aufgetragen. Die Proben waren zuvor mit SDS-Probenpuffer (modifiziert nach Laemmli, 1970) versetzt und für 5min aufgeköcht worden.

Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS-Elektrophorese-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 30mA pro Gel für ca. 30min. Neben den Proteinproben wurde ein Molekulargewichts-Standard (Invitrogen) aufgetragen. Nach dem Lauf wurde das Gel gefärbt oder für den Immunoblot (s. 2.2.3.3) weiterbehandelt.

Zum Färben wurde das Gel unter leichtem Schütteln für 10-30min in Coomassie-Blue-Färbelösung inkubiert und anschließend durch 1-2h Inkubation in Entfärbelösung entfärbt.

Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele (2 Minigele):

| | Trenngel 8% | Trenngel 12 % | Sammelgel |
|----------------------------|---|---------------|-----------|
| AA/BA (30:0,8) | 2,7 ml | 4,0 ml | 0,5 ml |
| 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 | 2,5 ml | 2,5 ml | 0 ml |
| 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 | 0 ml | 0 ml | 380 µl |
| A. dest. | 4,6 ml | 3,3 ml | 2,1 ml |
| SDS-Lösung (10 %) | 100 µl | 100 µl | 30 µl |
| TEMED | 6 µl | 4 µl | 3 µl |
| APS (10 %) | 100 µl | 100 µl | 30 µl |
| 10 % APS: | 10 % (w/v) APS in A. bidest. | | |
| 10 % SDS: | 10 % (w/v) SDS in A. bidest. | | |
| AA/BA (30:0,8): | 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid | | |
| 10 x Elektrophoresepuffer: | 30 g Tris/HCl, 144,4 g Glycin, 100 ml 10 % SDS, ad 1 l A. bidest. | | |
| 5 x SDS-Probenpuffer: | 250 mM Tris/HCl (pH 6,8), 50 % (v/v) Glycerin, 10% (w/v) SDS, 500 mM DTT, 0,05 % Bromphenolblau | | |
| Coomassie-Blue-Lösung: | 1,25 g Coomassie R-250, 500 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, ad 1 l A. dest. | | |
| Entfärbelösung: | 25 % Ethanol, 8 % Essigsäure | | |

2.2.2.2. Immunoblot (Western-Blot)

Für den Nachweis von bestimmten Proteinen in Bakterienextrakten wurde nach der SDS-Gelelektrophorese die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Anschließend können geblottete Proteine durch eine spezifische, sehr sensitive Immunreaktion nachgewiesen werden (Immunoblot) (Towbin et al. 1979). Für den Transfer von Proteinen von SDS-Gelen auf eine Nitrocellulose-Membran wurden Gel und Membran übereinander gelegt und von beiden Seiten mit je einer Lage Whatman-Filterpapier und je einem Schwamm bedeckt. Diese Schichtung wurde in eine Mini Protean II-Kammer eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte in Blot-Puffer bei einer Stromstärke von konstant

300mA für 1h. Die erfolgreiche Übertragung der Protein auf die Membran wurde durch die reversible Färbung der Membran mit dem wasserlöslichen Farbstoff Ponceau S (Salinovich et al. 1986) überprüft und die Markerproteine des angefärbten Standards (Bio-Rad) markiert. Die Membran wurde anschließend zur Blockierung von freien Bindungsstellen über Nacht bei 4°C in Blockierungspuffer (TBST mit 5% Magermilchpulver) geschwenkt.

Die Inkubation mit einem gegen das zu detektierende Protein gerichteten Antikörper (1:1000 verdünnt in TBST mit 1% Magermilchpulver) erfolgte anschließend für 2h auf einem Gelschüttler. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST Waschpuffer wurde die Membran mit einem zweiten, gegen den ersten gerichteten Antikörper (1:5000 verdünnt in TBST mit 1% Magermilchpulver) für 2h auf einem Gelschüttler inkubiert. Der zweite Antikörper war mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal gewaschen und dann zwischen zwei Tageslichtprojektor-Folien mit ECL-Reagenz inkubiert. Zur Detektion der Chemolumineszenz wurde darauf im Dunkeln für 1-5 min ein Film gelegt, der anschließend entwickelt wurde.

TBST Waschpuffer: 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,2% Tween 20
pH 7,5

Blot Puffer: 3 g Tris + 14,44 g Glycin, ad 1 l A. dest.

2.2.2.3. Proteinbestimmung

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurden 10µl der zu bestimmenden Lösung mit 200µl Bio-Rad-Reagenz vermischt und 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Lösung bei 595nm bestimmt. Als Referenz dienten 200µl Bio-Rad-Reagenz mit 10µl H₂O_{Millipore}. Auf dieselbe Weise wurde mit bekannten Mengen Rinderserum-Albumin (BSA) eine Eichgerade erstellt, mit deren Hilfe über die Absorption der Proteinrohextrakt-Proben deren Proteinmenge bestimmt wurde.

2.2.2.4. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

2.2.2.4.1. IL-8 ELISA

Um in Zellkulturüberständen die Konzentration an sekretiertem humanen IL-8 zu bestimmen wurde ein Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt.

Dazu wurde in eine 96 Napf Mikrotiterplatte (NUNC, Maxisorp) pro Napf 50µl anti-IL-8 Primäantikörper (Endkonzentration 3µg/ml in Beschichtungspuffer) pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde vor jedem neuen Schritt vier mal mit 300µl pro Napf mit Waschpuffer gewaschen. Als nächstes wurden die freien Bindestellen auf der Plastikoberfläche für 2h bei Raumtemperatur mit 200µl Blockierungspuffer blockiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 100µl der Zellkulturüberstände und als Standard serielle Verdünnungen von rekombinanten IL-8 in Medium aufgetragen. Der Standard wurde in Zellkulturmedium verdünnt und je 100µl pro Napf der Konzentrationen 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 und 0pg/ml auf die Platte pipettiert. Standard und Proben wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit Waschpuffer gewaschen und biotinylierter Sekundäantikörper (Endkonzentration 0,5µg/ml) gegen humanes IL-8 in Blockierungspuffer mit 0,5µg/ml Tween20 verdünnt und je 100µl pro Napf für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 4,5µl der Lösung A und 4,5µl der Lösung B des Konjugats (Streptavidin-Biotin-alkalische Phosphatase) mit 491µl PBS vermischt und nach 30min Inkubation auf 25ml mit PBS aufgefüllt und je 50µl pro Napf auf die gewaschene Platte aufgetragen und für 1h bei 37°C inkubiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen der Mikrotiter-Platte wurden 50µl Entwickler-Lösung (1mg PNPP / ml Substratpuffer) pro Napf für ca. 20min bei 37°C inkubiert. Das durch die enzymatische Dephosphorylierung des Substrates p-Nitrophenyl-Phosphat-Dinatrium (PNPP) entstandene farbige Produkt konnte anschließend mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 405nm und einer Referenzwellenlänge von 490nm gemessen werden. Anhand des Standards konnte die IL-8 Konzentration in den Proben quantitativ bestimmt werden.

Beschichtungspuffer:

0,1 M Na₂PO₄

pH 9,0

Waschpuffer:

1 x PBS, 0,05 % (w/v) Tween20

Blockierungspuffer:

1x PBS, 10% FKS

Substratpuffer:

0,05 M NaHCO₃ pH8,09

0,05 M Na₂CO₃ pH 11,3

mischen bis pH 9,8

1 mM MgCl₂

2.2.2.4.2. KC-ELISA

Zum Nachweis der KC Proteinexpression von murine Zellen wurde ein Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt.

Dazu wurde in eine 96 Napf Mikrotiterplatte (NUNC, Maxisorp) pro Napf 100µl anti-Maus KC Primärantikörper (Endkonzentration 3µg/ml in Beschichtungspuffer) pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde vor jedem neuen Schritt vier mal mit 300µl pro Napf mit Waschpuffer gewaschen. Als nächstes wurden die freien Bindestellen auf der Plastikoberfläche für 2h bei 37°C mit 200µl Blockierungspuffer blockiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden je 100µl der Zellkulturüberstände und als Standard serielle Verdünnungen von rekombinanten murinem KC in Medium aufgetragen. Der Standard wurde in Zellkulturmedium verdünnt und je 100µl pro Napf der Konzentrationen 1250, 625, 312, 156, 78, 39 und 19 und 0pg/ml auf die Platte pipettiert. Standard und Proben wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit Waschpuffer gewaschen und biotinylierter Sekundärantikörper (Endkonzentration 0,2µg/ml) gegen murines KC in Blockierungspuffer verdünnt und je 100µl pro Napf für 1h bei 37°C inkubiert. In der

Zwischenzeit wurden 2µl der Lösung A und 2µl der Lösung B des Konjugats (Streptavidin-Biotin- Meerrettichperoxidase) mit 200µl PBS vermischt und nach 30min Inkubation wurden weitere 9,8ml PBS zugegeben und je 100µl pro Napf auf die gewaschene Platte aufgetragen und für 1h bei 37°C inkubiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen der Mikrotiter-Platte wurden 100µl Entwickler-Lösung (2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid ABTS-Puffer, 0,03% H₂O₂) pro Napf für ca. 20min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Durch die Meerrettichperoxidase wird ABTS oxidiert und das entstandene farbige Produkt konnte in einem ELISA Lesegerät (Tecan) bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen werden. Anhand der Standardkurve, die sich aus dem Standard ergibt konnte die Konzentration von KC in den Zellkulturüberständen ermittelt werden.

Beschichtungspuffer:

50 mM Na₂CO₃
pH 9,6

Waschpuffer:

1 x PBS, 0,05 % Tween20

Blockierungspuffer:

1 x PBS, 1% BSA, 0,05 % Tween20

Substratpuffer:

Lösung A: 0,1 M Citronensäure
Lösung B: 0,1 M Na₂HPO₄
mischen bis pH 4,2
2,5 mg/ml 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
ABTS

2.2.2.5. EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)

Die Interaktion von Kernproteinen und DNA-Sequenzen wurde durch einen *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) nachgewiesen. Bei dieser Methode werden als Sonde radioaktiv markierte synthetische Oligonukleotide eingesetzt. Die synthetischen Oligonukleotide entsprechen der Sequenz des zu untersuchenden DNA-Abschnittes. Zunächst wird die Sonde zu Doppelsträngen hybridisiert und dabei mit γ - ^{32}P -ATP radioaktiv markiert. Nachdem die Kernproteine aus den zu untersuchenden Zellen extrahiert wurden, wurden diese zusammen mit der Sonde inkubiert. Der Ansatz wird schließlich auf einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Besitzt die Sonde Bindungsstellen für im Kernextrakt enthaltene Proteine, so können diese an die DNA binden. Dabei entstehen DNA-Protein-Komplexe, die aufgrund des höheren Molekulargewichts im Gel langsamer wandern als die freie Sonde.

2.2.2.5.1 Markierung von Oligonukleotid-Sonden durch Phosphorylierung

Es wurden Oligomere mit glatten Enden (*blunt ends*) verwendet (NF- κ B Konsensus : 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'). Sie wurden durch Übertragung radioaktiver Phosphat-Gruppen durch die Polynukleotid-Kinase des Phagen T4 (T4-PNK) markiert.

Der Reaktionsansatz wurde 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Adenosin-Di- und Triphosphate mit einer „NucTrap[®] Probe Purification Column“ in Kombination mit den „Push Column Beta Shield Device“ abgetrennt. Die Sonde befand sich schließlich in ca. 100µl STE-Puffer (TE mit 0,1M NaCl).

| | | |
|----------------|-------|---------------------------------------|
| Kinase-Ansatz: | 2 µl | doppelsträngiges Oligomer (3 pmol/µl) |
| | 3 µl | 10x PNK-Puffer |
| | 4 µl | γ - ^{32}P -ATP |
| | 2 µl | T4-PNK (10 U/µl) |
| | 19 µl | H ₂ O |

2.2.2.5.2 Bindungsreaktion

Während der Bindungsreaktion erfolgt die Komplexbildung zwischen der radioaktiv markierten Sonde und den Kernproteinen an spezifischen DNA-Bindungsstellen.

| | | |
|-----------------|-----------|-------------------|
| Bindungsansatz: | 6 µg | Kernextrakt |
| | 40% (v/v) | Puffer C (Tab. 7) |
| | 93 mM | NaCl |
| | 30 kcpm | Sonde |
| | 1 µg | dIdC |
| | 10 mM | Tris-HCl, pH 7,5 |
| | 1 mM | EDTA, pH 8 |
| | 5% (v/v) | Glycerin |
| | 1 mM | DTT |
| | 0,03% | Bromphenolblau |

Das Gesamtvolumen betrug 15µl, die NaCl-Menge wurde auf 93mM eingestellt. Der Ansatz wurde vor Zugabe der Sonde 15min auf Eis inkubiert.

In Kompetitions- und Supershift-Ansätzen wurden zusätzlich 20-40ng unmarkierte Oligonukleotide mit intakten oder mutierten Konsensus-Sequenzen bzw. 1-2µl Antikörper-Reagenz eingesetzt. Nach Zugabe der Sonde folgte eine 15-30minütige Inkubation auf Eis.

2.2.2.5.3 Auftrennung der EMSA-Komplexe

Die Komplexe wurden in einem 5%igen nicht denaturierenden Polyacrylamidgel mit 0,5x TBE als Laufpuffer für 1h 40min bei 220V aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf Whatman 3mm-Papier (Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert und für mindestens 40min bei 80°C auf einem Vakuumgeltrockner getrocknet. Die Exposition von Röntgenfilmen (Kodak Scientific Imaging Film, 18 x 24 cm) und Phosphoimagerplatten erfolgte je nach Stärke der Signale entweder für 24h oder für mehrere Tage.

| | | |
|-----------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| 5%iges | nicht-denaturierendes | 10x TBE-Puffer: |
| Polyacrylamidgel: | | |
| 3 ml TBE (10x) | | 108 g Tris-Base |
| 10 ml Acrylamid-Stammlösung (30%) | | 55 g Borsäure |
| 500 µl APS (10%) | | 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 |
| 50 µl TEMED | | H ₂ O ad 1 l |
| 47 ml H ₂ O | | |

2.2.2.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Kernextrakten erfolgte durch die Bradford-Methode (Bradford et al. 1976). Die zu testenden Proben wurden mit destilliertem Wasser auf eine geeignete Konzentration verdünnt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine BSA-Verdünnungsreihe angesetzt. Je 10µl der Probe wurde mit 200µl BioRad- Reagenz gemischt und bei 595nm im ELISA Reader vermessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand der Eichkurve rechnerisch ermittelt.

2.2.2.6. Bindung von Proteinen an Latex- Partikel

Um die gereinigten GST- Fusions-Proteine nicht-kovalent an Latex- Partikel zu binden, wurden die Proteine in PBS zusammen mit den Partikeln inkubiert. Die Partikel wurden aufgeschüttelt und eine bestimmte Partikelmenge (4×10^9 Partikel) entnommen, 1x mit PBS gewaschen und in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (5min, 10.000rpm, 4°C) Die Partikel wurden in 1ml Protein-Lösung (0,5mg/ml) resuspendiert und für 3h bei RT unter ständiger Bewegung inkubiert. Nach Zentrifugieren und Entfernung der Protein-Lösung wurde eine BSA-Lösung (20mg/ml) in PBS hinzugefügt und für eine weitere Stunde inkubiert. Die Latex-Partikel wurden dann in PBS, welches 1mg/ml BSA enthielt gewaschen und bei 4°C aufbewahrt. Die Menge der gebundenen Proteine wurde mittels SDS-PAGE bestimmt.

2.2.2.7. Limulus-Amöbocyt Lysat (LAL) Assay

Zur Bestimmung der Konzentration von LPS in Proteinlösungen wurde ein LAL-Assay durchgeführt. Dazu wurde der QCL-1000® Chromogenic Endpoint LAL Kit von Biowhittaker (Cambrex) benutzt. Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3. Arbeiten mit Bakterien

2.2.3.1. Herstellung kompetenter Bakterien nach der RbCl₂- Methode

Es wurden 500ml LB-Medium mit 5 ml einer *E. coli* über Nacht- Kultur beimpft, bei 37°C unter Schütteln inkubiert und die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert (10min; 2500g; 4°C), sobald die Kultur eine oD₆₀₀ von 0.4-0.7 aufwies. Das Sediment wurde in 150ml TFB1-Puffer resuspendiert, 15min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (10min; 2500g ; 4°C). Das Sediment wurde in 20ml TFB2-Puffer resuspendiert und die Bakteriensuspension in 150µl Aliquots portioniert. Diese wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

| | |
|--------------|--------------------------|
| TFB1-Puffer: | 30 mM Kaliumacetat |
| | 50 mM MnCl ₂ |
| | 100 mM RbCl ₂ |
| | 15 % Glycerin |

| | |
|--------------|-------------------------|
| TFB2-Puffer: | 10 mM MOPS (pH 7,0) |
| | 10 mM RbCl ₂ |
| | 75 mM CaCl ₂ |

2.2.3.2. Transformation RbCl₂-kompetenter *E. coli* Zellen

Die Transformation von *E. coli* wurde nach einer modifizierten Anleitung von Hanahan (Hanahan et al. 1985) durchgeführt.

Zu 1-10µl DNA-Lösung mit etwa 100-500g DNA wurden 100µl kompetente Zellen gegeben und 30min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden 1min bei 42°C hitzebehandelt und danach sofort 10min auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von je 600µl LB-Medium 1h im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je 100µl dieser Zellsuspensionen auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten ausplattiert.

2.2.3.3. Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Es wurde 1ml einer Übernachtskultur von Bakterien in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika in 100ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C (*E. coli*-Stämme) bzw. 27°C (*Y. enterocolitica*- Stämme) so lange geschüttelt bis eine OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 erreicht wurde. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 2500g und 4°C für 20min geerntet und ab diesem Zeitpunkt bei 4°C gehalten. Zum Waschen wurden die Bakterien in 2 x 50ml A. bidest. aufgenommen und anschließend in sterilen Einmal-Zentrifugen-Röhrchen für 10min bei 4°C mit 2500g abzentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde nochmals wiederholt. Danach wurde das Pellet in einer 10%igen Glycerin-Lösung (mit A. bidest.) aufgenommen und unter den oben angegebenen Bedingungen zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in 2ml der 10%igen Glycerin-Lösung aufgenommen, in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.3.4. Transformation durch Elektroporation

Für die Elektroporation wurden die eingefrorenen Aliquots der elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit DNA vermischt und für 1min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Ansätze in vorgekühlte Elektroporationsküvetten gefüllt. Die Elektroporation wurde bei 25µF, 2,5kV und 200Ω durchgeführt. Die behandelten Zellen wurden anschließend in 1ml SOC-Medium bei 37°C (*E. coli*-Stämme) bzw. 27°C (*Y. enterocolitica*-Stämme) inkubiert und dann auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen.

2.2.3.5. Konservierung von Bakterienstämmen

Transformanten und Stämme wurden als Glycerin-Kryokulturen aufbewahrt. Dazu wurden üN-Kulturen durch Zentrifugation (5min; 4500rpm; RT) sedimentiert und in LB-Medium, das 15% Glycerin (v/v) enthielt, resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3.6. Vorbereitung von Bakterien zur Infektion von Zellen

Bakterien wurden bei 27 oder 37°C in LB mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht angezogen. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien 1:10 in LB überimpft und für weitere 2-3h bei der entsprechenden Temperatur angezogen. Wenn Bakterien Plasmide mit IPTG-induzierbaren Promotoren enthielten, wurden die Stämme eine halbe Stunde vor der Ernte mit 20µM IPTG induziert. Danach wurden 1-2ml der Kultur abgenommen und in einer Eppendorftischzentrifuge 2-3 mal bei 600g, 5min, RT abzentrifugiert und das Sediment jeweils wieder in 1ml PBS aufgenommen. Die Bakterienzahl wurde mittels OD_{600} ermittelt. Zuvor wurde mittels Ausplattieren von Verdünnungsreihen festgestellt, dass in einer Bakterienkultur mit der OD_{600} von 2 sich 1×10^9 Bakterien pro ml befinden. Die Bakterien wurden mit PBS 1:100 verdünnt, so dass sich in 100µl PBS 1×10^7 Bakterien befinden. Es wurden 100 Bakterien pro Zelle zur Infektion eingesetzt (Multiplicity of infection (MOI 100)).

2.2.4. Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

2.2.4.1. Kultivierung und Lagerung der Gewebezellkulturen

Alle Arbeiten erfolgten unter einer Sterilbank. Die verwendeten Materialien und Lösungen wurden bereits steril vom Hersteller bezogen oder sterilfiltriert.

2.2.4.1.1. Kultivierung von Gewebekulturzellen

Die Zellen wurden bei 37°C unter 7,5% CO₂-Atmosphäre in 10ml Medium/10% FKS in Zellkulturflaschen (80 cm²) kultiviert. Zwei bis dreimal wöchentlich wurden die zu 80-90% konfluenten Zellen durch Inkubation mit 1ml Trypsin/EDTA für 5-10 min bei RT abgelöst und mit 9ml DMEM/10% FKS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml Plastikröhrchen überführt und durch Zentrifugation (5min; 700rpm; RT) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 8-10ml Medium/10% FKS resuspendiert. Je 1ml dieser Zellsuspension wurde in je 9ml Medium/10% FKS resuspendiert und in zwei Zellkulturflaschen eingefüllt und wieder bei 37°C unter 7,5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert.

2.2.4.1.2 Auftauen von Gewebekulturzellen

Die in 2ml-Kryoröhrchen bei -80°C oder im Stickstofftank gelagerten Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein 50ml-Plastikröhrchen überführt. Um das DMSO zu entfernen, wurde die Zellsuspension mit 20ml Medium/10% FKS gemischt und die Zellen sedimentiert (5min; 700rpm; RT). Das Sediment wurde in 12ml Medium/10% FKS resuspendiert und in einer Zellkulturflasche kultiviert. Nach einem Tag wurde das Medium und darin enthaltene abgestorbene Zellen mit einer Pipette abgezogen und erneut 25ml Medium/10%FKS zugegeben. Nach zwei bis fünf Tagen waren die Zellen in der Kulturflasche zu 80% konfluent gewachsen und konnten zu weiteren Versuchen eingesetzt werden.

2.2.4.1.3 Einfrieren von Gewebekulturzellen

Zum Einfrieren von Gewebekulturzellen wurden die zu 80-90% konfluenten Zellen vom Boden einer 600ml-Kulturflaschen abgelöst. Das geschah durch Inkubation mit 3ml Trypsin/EDTA für 5-10min bei RT und wurde mit jeweils 17ml Medium/10% FKS resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden vereinigt und der Titer dieser Suspension in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde durch Zentrifugation sedimentiert (5min; 700rpm; RT). Das Zellsediment wurde in Kryomedium resuspendiert und auf einen Titer von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden in 1ml-Aliquots auf 2ml-Kryoröhrchen verteilt und zum gleichmäßigen Einfrieren einen Tag lang in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter bei -80°C inkubiert oder mehrere Stunden bei -20°C inkubiert, bevor sie für die langfristige Lagerung auf -80°C oder in einen Stickstofftank überführt wurden.

Kryomedium: 10% DMSO
 90% FKS

2.2.4.2 Bestimmung der Lebend-Zellzahl mit Trypan-Blau

Zur Bestimmung der Anzahl an lebenden Zellen pro Milliliter Medium wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit der zweifachen Menge an Trypan-Blau gemischt. Trypan-Blau kann nur in tote Zellen mit nicht mehr intakter Membran eindringen und diese blau anfärben. Die Zellsuspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer (0,100 mm, $0,0025 \text{ mm}^2$) gebracht und ausgezählt. Die Multiplikation der gemittelten Anzahl der nicht angefärbten Zellen in einem Großquadrat mit dem Kammerfaktor (1×10^4 Zellen/ml) und dem Verdünnungsfaktor ergab dann die Konzentration der Zellen in der ursprünglichen Zellsuspension (z.B. entsprechen 10 Zellen pro Großquadrat 1×10^6 Zellen pro ml)

2.2.4.3 Infektion von Zellen mit Bakterien

Zur Bestimmung der inflammatorischen Antwort von Zellkulturen auf bestimmte Bakterienstämme wurden 1×10^5 Zellen pro Napf in einer 24 Napf-Platte ausgesät und über Nacht bebrütet. Dazu wurde die Lebend-Zellzahl wie oben (2.2.4.2.) beschrieben bestimmt. Vor der Infektion mit den Bakterien wurde das antibiotikahaltige Medium abgesaugt die Zellen 2x mit PBS gewaschen und 1ml pro Napf neues Medium ohne Antibiotikum zugegeben. Nach 1-2h wurden die Bakterien zu den Zellen gegeben und die Platte zentrifugiert (400g, 5min, RT) um die Bakterien mit den Zellen in Kontakt zu bringen. Die Platte wurde 1h bei 37°C bebrütet und danach das Medium durch Medium mit Gentamycin (100µg/ml) ersetzt. Dadurch wurden die Bakterien abgetötet. Nach weiteren 3-7h Inkubation im 37°C Brutschrank wurden 200-500µl Überstand abgenommen und für weitere Analysen (ELISA 2.2.2.4.) bei -20°C aufbewahrt. Wenn nicht anders angegeben wurden mit einer MOI von 100 infiziert. Als Kontrolle wurde mit 50µg/ml TNF- α stimuliert.

Wenn die Zellen vor der Infektion mit Antikörpern oder Toxinen behandelt wurden, dann wurden die Zellen mit 0,4, 4 oder 10µg/ml anti- β 1-Integrin Antikörper 30min vor der Infektion inkubiert. Das *C. difficile* Toxin TcdB10463 wurde 24h vor der Infektion und die Inhibitoren SB202190, PD98059 oder SP600125 wurden 30min vor der Infektion zugegeben.

2.2.4.4 Stimulation von Zellen mit löslichen oder Latex-Partikel gebundenen GST- Fusionsproteinen

Zur Bestimmung der inflammatorischen Antwort von Zellen auf bestimmte Proteine wurden 1×10^5 Zellen pro Napf in einer 24 Napf-Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Vor der Stimulation wurde das Medium abgesaugt die Zellen 2x mit PBS gewaschen und 1ml pro Napf neues Medium zugegeben. Nach 1-2h wurden entweder Protein beschichtete Latex-Partikel (2.2.2.6.) in der MOI 4000 oder 5µg/ml lösliches Protein zu den Zellen gegeben und die Platte für 5min bei 400g zentrifugiert. Die Platten wurden 4-8h lang bei 37°C inkubiert und anschließend 200-500 µl Überstand abgenommen und für weitere Analysen (ELISA 2.2.2.4.) bei -20°C aufbewahrt. Als Kontrolle wurde mit 1000EU/ml LPS stimuliert. Zur Neutralisierung von LPS wurden 100U/ml Polymyxin eingesetzt. Als weitere Kontrolle wurde lösliches Protein für 2h bei 100°C inkubiert, um das Protein zu inaktivieren.

2.2.4.5 Adhäsionsassay

Um die Adhäsion bestimmter Bakterienstämme an Zellen zu bestimmen wurden 1×10^5 Zellen pro Napf über Nacht in einer 24 Napf-Platte bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden, nachdem das alte Medium durch Medium ohne Antibiotika ausgetauscht worden war, Bakterien mit einer MOI von 100 zugegeben. Die Bakterien wurden wie in (2.2.3.6.) beschrieben vorbereitet und die Zellzahl so eingestellt, dass in $100\mu\text{l}$ PBS eine Bakterienanzahl von 1×10^7 enthalten ist. Die Platte wurde für 5min bei 400g zentrifugiert und danach 15min bei 37°C inkubiert. Um die nicht adherenten Bakterien zu entfernen wurde jeder Napf dreimal mit warmen PBS gewaschen. Um die Zellen zu lysieren wurde für 5min je 1ml PBS / 1% Triton-X-100 zu den Zellen gegeben und die Zellen mit den Bakterien zusammen resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt um geeignete 1:10 Verdünnungen in PBS zu machen von denen dann je $100\mu\text{l}$ auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen wurden. Die LB-Agar-Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet und durch Auszählen die Menge an adherenten Bakterien ermittelt.

2.2.4.6 Invasionsassay

Um die Invasion bestimmter Bakterienstämme in Zellen zu bestimmen wurden zunächst 1×10^5 Zellen pro Napf über Nacht in einer 24 Napf-Platte bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden, nachdem alte das Medium durch Medium ohne Antibiotika ausgetauscht worden war, Bakterien mit einer MOI von 100 zugegeben. Die Bakterien wurden wie in (2.2.3.6.) beschrieben vorbereitet und die Zellzahl so eingestellt, dass in $100\mu\text{l}$ PBS eine Bakterienanzahl von 1×10^7 enthalten ist. Die Platte wurde für 5min bei 400g zentrifugiert und für 1h bei 37°C bebrütet. Anschließend wurde ein Mediumwechsel vorgenommen bei dem die Bakterien durch Medium mit Gentamycin ($100\mu\text{g/ml}$) abgetötet wurden. Die Platte wurde für weitere 2h bei 37°C bebrütet und danach wurden die Zellen für 5min mit je 1ml PBS / Triton-X-100 lysiert. Die Zellen wurden zusammen mit den Bakterien resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und geeignete Verdünnungen in PBS wurden auf

antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen. Die LB-Agar-Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet und durch Auszählen die Menge an intrazellulären Bakterien ermittelt.

2.2.4.7 Doppelimmunfluoreszenz

Um für bestimmte Proteine oder Bakterien zu bestimmen, ob sie von der Wirtszelle aufgenommen werden, wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Dazu wurden 5×10^4 Zellen pro Napf in eine 24-Napf-Platte gegeben in die zuvor in jeden Napf sterile runde Deckgläser gelegt worden waren. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und konnten sich die Zellen an die Deckgläser heften, so dass diese Deckgläser später zur Färbung der Zellen einfach aus dem Napf entnommen werden konnten.

Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Bakterien infiziert und wie bei einem Infektions- bzw. Stimulationsexperiment auf die Zellen zentrifugiert. Nach ein- bis vierstündiger Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 3% PFA/PBS fixiert.

Zur Untersuchung, ob die sich die Bakterien intra- oder extrazellulär befinden wurde eine Doppelfärbung durchgeführt. Zunächst wurden auf die noch im Napf liegenden Deckgläser zur Blockierung der freien Bindestellen je 1ml 10% FKS/PBS gegeben und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Zellen mit Bakterien wurden je nach zu untersuchendem Protein mit einem anti-Invasin oder anti-P1.O8 (YadA) 1:100 in PBS für 45 min inkubiert. Dazu wurden die Deckgläser aus dem Napf genommen und umgedreht in einen 30µl Tropfen (PBS und Antikörper) auf Parafilm in eine feuchten Kammer gelegt. Danach wurden die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen und mit einem zweiten Fluoreszenz-gekoppelten anti- Kaninchen Antikörper nach der gleichen Prozedur wie oben beschrieben ebenfalls für 45min inkubiert. Nach jedem nun folgendem weiteren Arbeitsschritt wurden die Deckgläser immer dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden als nächstes mit PBS/1% Triton X100 für 4 min bei RT permeabilisiert um die intrazellulären Bakterien oder Protein-gekoppelten Latex- Partikel anzufärben. Danach wurden wieder die freien Bindungsstellen mit 10% FKS/PBS abgesättigt und danach wieder mit anti-Invasin oder anti-P1.O8 (YadA) 1:100 in PBS für 45min inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde ein weiterer Fluoreszenz-gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper benutzt, der dieses Mal mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert war wie der im ersten

Färbeschritt benutze Zweitantikörper. Als letztes wurde das Zytoskelett der Zellen mit TRITC- gekoppelten Phalloidin angefärbt. Die Deckgläser wurden ein letztes Mal gewaschen, getrocknet und mit dem Eindeckmedium Fluoprep auf einem Objektträger fixiert.

Die Präparate konnten so über einen längeren Zeitraum im Dunkeln bei 4°C gelagert werden. Die Auswertung des Versuchs erfolgte entweder am Fluoreszenzmikroskop (DRME, Leica) oder am konfokalen Laserscan Mikroskop (DMIRE2, Leica).

2.2.4.8 Immunfluoreszenzfärbung von Bakterien

Zur Untersuchung ob Bakterien das äußere Membranprotein YadA exprimieren, wurden die Bakterien auf runde Deckgläser aufgebracht und mit 3% PFA über Nacht bei 4°C fixiert. Danach wurden die Deckgläser einmal mit PBS gewaschen und mit anti-P1.O8 (YadA) 1:100 in PBS für 45min inkubiert. Nachdem die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen worden waren wurden sie mit einem Fluoreszenz-gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper 1:100 in PBS für weitere 45min inkubiert. Als Kontrolle wurde jeweils ein unspezifischer Antikörper aus demselben Organismus wie der entsprechende Erstantikörper benutzt. Die Deckgläser wurden ein letztes Mal gewaschen, getrocknet und mit dem Eindeckmedium Fluoprep auf einem Objektträger fixiert.

Die Präparate konnten so über einen längeren Zeitraum im Dunkeln bei 4°C gelagert werden. Die Auswertung des Versuchs erfolgte entweder am Fluoreszenzmikroskop (DRME, Leica) oder am konfokalen Laserscan Mikroskop (DMIRE2, Leica).

2.2.4.9 Untersuchung von Zellen mittels Durchflusszytometrie

Für jede Färbung wurden 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen in den Napf einer 96er Mikrotiter-Spitzboden-Platte gegeben, für 5min bei 500g zentrifugiert und der Überstand durch einmaliges Ausschlagen der Platte entfernt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 200µl FACS-Puffer (PBS + 1% FKS) gewaschen und anschließend mit 50µl in FACS-Puffer verdünnter Antikörper-Lösung (nach Empfehlung des Herstellers) für 20min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in jeweils 0,5-1ml PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch vermessen. Tote Zellen wurden von der

Analyse ausgeschlossen, indem sie mit Propidiumiodid angefärbt wurden und so durch ihr starkes tiefrotes Signal außerhalb der eingegrenzten Untersuchungsmenge lagen.

2.2.5. Tierexperimentelle Methoden

2.2.5.1. Präparation von Milzzellen aus der Maus

Die aseptisch entnommenen Milzen der transgenen Mäuse wurden in Zellkulturmedium aufgenommen, mittels eines Stahlsiebes homogenisiert und für 5min bei 400g abzentrifugiert. Zur Erythrozytenlyse wurden die Zellen anschließend in 0,15M NH₄Cl-Lösung (pH7,2, 1ml pro Milz) resuspendiert und für 1-2min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit RPMI wurden die Zellen mittels Zählkammer gezählt und 5x10⁵ Zellen pro Napf in einer 24-Napf-Platte in RPMI mit 10% FKS bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag konnten die Zellen für Stimulationsversuche verwendet werden.

2.2.5.2. Präparation von dendritischen Zellen aus der Maus

Die aseptisch entnommenen Oberschenkelknochen der transgenen Mäuse wurden mit PBS mit Hilfe einer feinen Kanüle durchgespült. Die so gewonnenen Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden in RPMI mit 10% FKS resuspendiert und für 5min bei 400g in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Sediment wurde erneut in Medium aufgenommen und etwa 1-2x10⁶ Zellen pro Schale in 10cm- Petrischalen ausgesät. Die Zellen werden für 10 Tage bei 37°C in RPMI /10% FKS mit 200U/ml GM-CSF kultiviert. An Tag 3 wurden je 10ml RPMI/10%FKS mit 200U/ml GM-CFS zu den Petrischalen gegeben. An Tag 6 und 8 wurde die Hälfte des Kulturüberstandes abgenommen und bei 400g für 5min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10ml neuem RPMI/10%FKS mit 200U/ml GM-CFS aufgenommen und wieder in die gleiche Schale zurückgegeben. An Tag 10 wurden die Zellen gezählt, in 24 Napf- Platten ausgesät und für die Stimulationsversuche verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. YadA vermittelt Adhäsion und stimuliert die Ausschüttung von IL-8 in HeLa Zellen.

Das äußere Membranprotein Invasin von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* ist in der Lage an Epithelzellen zu adhären und dadurch proinflammatorische Antworten in der Wirtszelle auszulösen (Schulte et al. 1998; Schulte et al. 2000b; Schulte et al. 1996). Zu den proinflammatorischen Proteinen zählen unter anderem IL (Interleukin)-8, IL-1 α , IL-1 β , MCP-1 (Monozyten Chemoattractant Protein 1), GM-CSF (Granulozyten Makrophagen koloniestimulierender Faktor) und TNF- α (Tumor Nekrosis Faktor- alpha) (Kampik et al. 2000). Invasin vermittelt außer der proinflammatorischen Antwort auch die Aufnahme der Bakterien in Säugerzellen. (Isberg and Falkow 1985; Isberg et al. 1987).

Yersinia Adhäsion A (YadA) vermittelt die Aufnahme in und die Adhäsion an Wirtszellen (Eitel et al. 2002). YadA sollte mit Invasin in Bezug auf Adhäsion und Invasion verglichen werden. Außerdem sollte durch Infektion von Epithelzellen als Modellorganismus einer Wirtszelle geklärt werden, ob die Bindung des äußeren Membranproteins YadA an epitheliale Zellen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen zu induzieren vermag.

3.1.1. Klonierung von *yadA* in den Expressionsvektor pNIV136

Um die beiden äußeren Membranproteine YadA und Invasin (Inv) miteinander vergleichen zu können, wurden die beiden Gene im gleichen Vektor exprimiert. Für die Expression von Invasin war das Konstrukt pInv1914 vorhanden (Schulte et al. 1998), in dem ein 3157 bp großes Fragment aus pNIV1907 (Fauconnier et al. 1998) in pNIV136 unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *lpp* Promotors kloniert worden war. Für die Expression von YadA wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus dem pYV-Plasmid aus dem Stamm *Y. enterocolitica* WA-314 mit den Oligonukleotiden *yadAO3136fw* und *yadAO3136re* das *yadA* Gen amplifiziert, dann mit den durch die Oligonukleotide eingeführten Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BglIII* geschnitten und in den Vektor pNIV136 ligiert.

Somit war das *yadA* Gen ebenfalls unter Kontrolle des *lpp* Promotors und die IL-8 Stimulation durch YadA war somit gut mit der von Invasin vergleichbar.

Die Plasmide pNIV136, pInv1914 und pYadA^{O:8} wurden in *E.coli* HB101 transformiert und für die Experimente, wie in 2.2.3.6. beschrieben, vorbereitet. Abbildung 1 zeigt schematisch den Aufbau der verwendeten Plasmide.

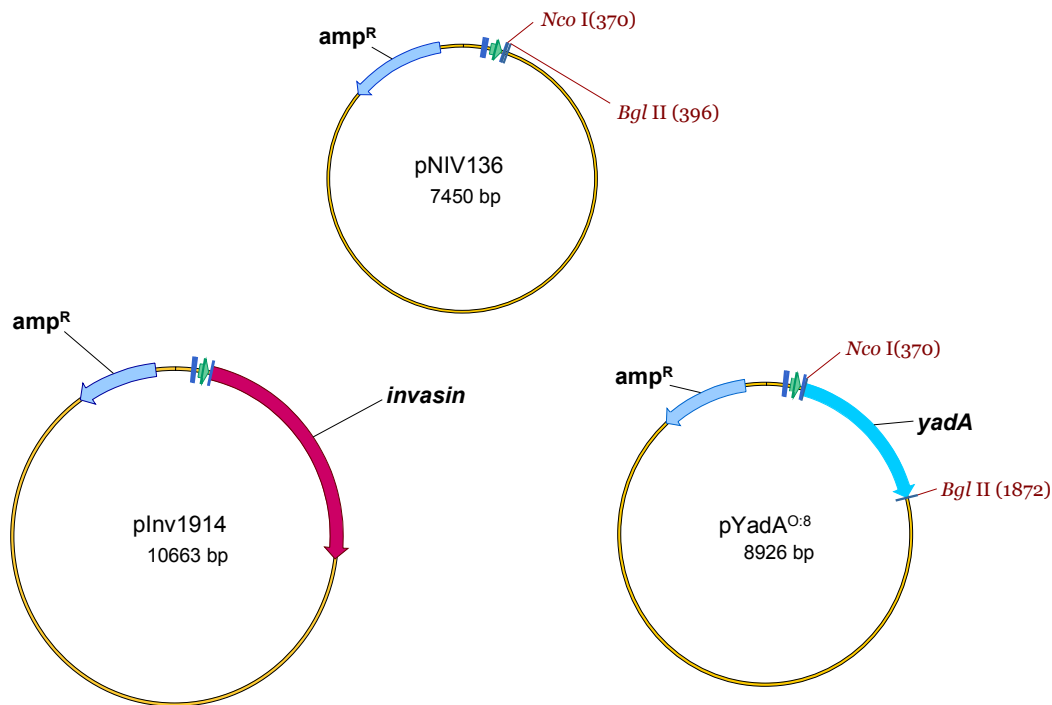


Abb. 1: Karte der Plasmide pNIV136, pYadA^{O:8} und pInv1914. *amp^R*: Resistenz gegen Ampicillin, *Nco*I und *Bgl*II: Restriktionsschnittstellen der Enzyme *Nco*I und *Bgl*II über die *yadA* in pNIV136 eingebracht wurde.

3.1.2. Kontrolle der Expression von Inv und YadA

Die Überexpression von Inv und YadA wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht (Abb. 2). Dazu wurden die Bakterienstämme *E. coli* pNIV136, *E. coli* pInv1914, *E. coli* YadA^{O:8} bei 37°C, *Y. enterocolitica* pVY⁻ Δ *inv* bei 27°C (YadA⁻ und Inv⁻), *Y. enterocolitica* pVY⁻ bei 27°C (Inv⁺⁺), *Y. enterocolitica* pVY⁻ bei 37°C (Inv⁺), *Y. enterocolitica* pVY⁺ bei 27°C (YadA⁻ und Inv⁺⁺) und *Y. enterocolitica* pVY⁺ bei 37°C (YadA⁺⁺ und Inv⁺) angezchtet. Die Bakterienanzahl wurde vor der Elektrophorese bestimmt, die Proben auf die gleiche Bakterienanzahl eingestellt und die Gesamtzelllysate auf ein denaturierendes SDS-PAGE aufgetragen. Nach anschließendem Übertragen der Proteine

auf eine Nitrozellulosemembran (2.2.2.2.) wurden, durch Inkubation der Membran mit den entsprechenden Antikörpern (2.1.3.), die Proteine detektiert. Wie in Abbildung 2 zu sehen waren die Banden 90 bzw. 220kD groß und entsprachen den zu untersuchenden Proteinen Inv bzw. YadA. Somit war die Expression dieser Proteine in den verwendeten Bakterienstämmen bestätigt. Als Ladekontrolle ist im unteren Teil des Bildes ein entsprechendes mit Coomassie gefärbtes SDS-PAGE zu sehen, dabei ist nur YadA als differenzielle Bande zu detektieren.

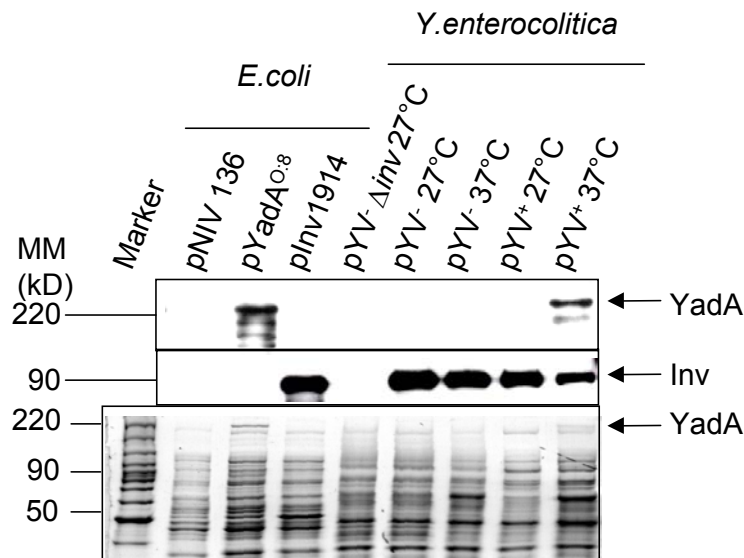


Abb. 2: Überexpression von Invasin und YadA. Mittels SDS-PAGE (2.2.2.1.) und anschließendem Western Blot (2.2.2.2.) mit anti-YadA (anti-P1.O8) und anti-Invasin (anti-Inv) Antikörpern wurde die Überexpression der beiden Proteine untersucht. Dazu wurden die Bakterien angezüchtet in Ladepuffer aufgenommen und auf das Gel aufgetragen. Die Bakterienanzahl wurde vor der Elektrophorese mittels Photometer bestimmt und die Proben auf die gleiche Bakterienanzahl eingestellt. Die Pfeile markieren die zu untersuchenden Proteine (oben). Coomassie gefärbtes SDS-PAGE als Ladekontrolle (unten). pYV Virulenzplasmid; 27°/37°C Anzuchttemperaturen der Bakterien

3.1.3. Untersuchung der YadA- und Inv- vermittelten Adhäsion an HeLa Zellen

Es ist bekannt, dass die Adhäsion an Zellen für die Induktion von IL-8 durch Inv entscheidend ist (Schulte et al. 1998). Deshalb wurde zunächst die durch YadA vermittelte Adhärenz an epitheliale Zellen bestimmt und mit der von Inv verglichen (Abb. 3). Dazu wurden HeLa Zellen mit *E. coli*, die den Leervektor (pNIV136) trugen oder mit *E. coli*, die entweder Inv (pInv1914) oder YadA (pYadA^{O:8}) exprimierten infiziert und nach 15min Inkubation wurden die Zellen zur Bakterienzahlbestimmung ausplattiert (2.2.4.5.). Die Adhäsion von *E. coli* pYadA^{O:8} und *E. coli* pInv1914 an HeLa Zellen war signifikant höher verglichen mit der Adhäsion von pNIV136. Die Adhäsion der YadA- exprimierenden *E. coli* war zweifach höher

als die der Inv- exprimierenden Bakterien. Somit ist die adhäsive Eigenschaft von YadA, höher als die von Inv.

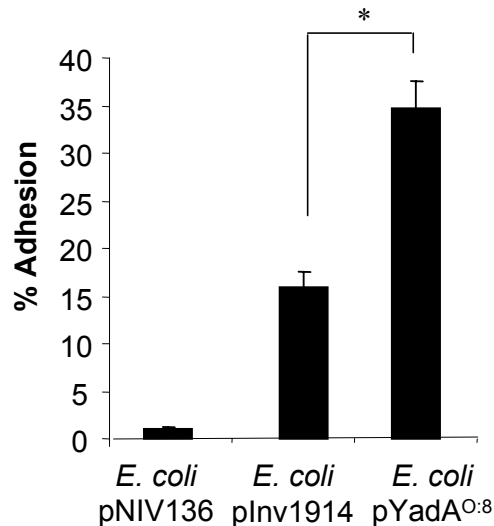


Abb. 3: YadA und Invasin vermittelte Adhäsion. HeLa Zellen wurden mit *E.coli* pNIV136, *E.coli* pInv1914 und *E.coli* pYadA^{O:8} infiziert (MOI 100) und 15min nach der Infektion die adhärennten Bakterien bestimmt (2.2.4.5.). Der Stern kennzeichnet, den signifikanten Unterschied der Adhäsion zwischen YadA- und Invasin-exprimierenden *E. coli* ($P < 0,05$)

Um festzustellen ob, durch YadA von *Y. enterocolitica* eine proinflammatorische Antwort in Wirtszellen ausgelöst werden kann und dabei β 1-Integrine eine Rolle spielen wurde verschiedene Zellen verwendet. HeLa Zellen wurden als Modell für Epithelzellen im Darm verwendet und die Maus-Zelllinien GD25 und GD25- β 1A (2.1.9.) wurden verwendet um den Einfluss von β 1-Integrinen zu untersuchen. Diese Zellen sind Fibroblasten-ähnliche Zellen vom embryonalen Stammzellklon G201, der in der β 1A-Integrin Untereinheit defizient ist. Bei der Zelllinie GD25- β 1A wurden GD25 Zellen stabil mit der cDNA von Wildtyp Integrin- β 1A transfiziert, so dass diese Zellen β 1-Integrine exprimieren. Somit handelt es sich bei GD25 und GD25- β 1A um die gleiche Zelllinie mit bzw. ohne β 1-Integrine. (Wennerberg et al. 1996; Fassler et al.1995).

3.1.4. Durchflusszytometrische Analyse der verwendeten Zellen auf die Expression von β 1-Integrinen

Die Expression der β 1-Integrine auf den verwendeten humanen (HeLa) und Maus-Zellen (GD25 und GD25- β 1A) wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse überprüft. Dazu wurden die GD25 und GD25- β 1A Zellen mit einem anti- β 1-Integrin Antikörper (FITC-gekoppelter anti-Ratte/Maus CD29, 2.1.3.) inkubiert. Um die β 1-Integrine der HeLa Zellen zu detektieren, wurde ein unmarkierter anti- β 1-Integrin Antikörper benutzt, der anschließend durch Inkubation mit einem zweiten FITC-gekoppelten anti-Maus Antikörper (2.1.3.) markiert wurde.

In Abbildung 4A ist die durchflusszytometrische Analyse der verwendeten Zellen dargestellt. Dabei ist in den Diagrammen jeweils die Anzahl der Ereignisse gegen die Fluoreszenz aufgetragen.

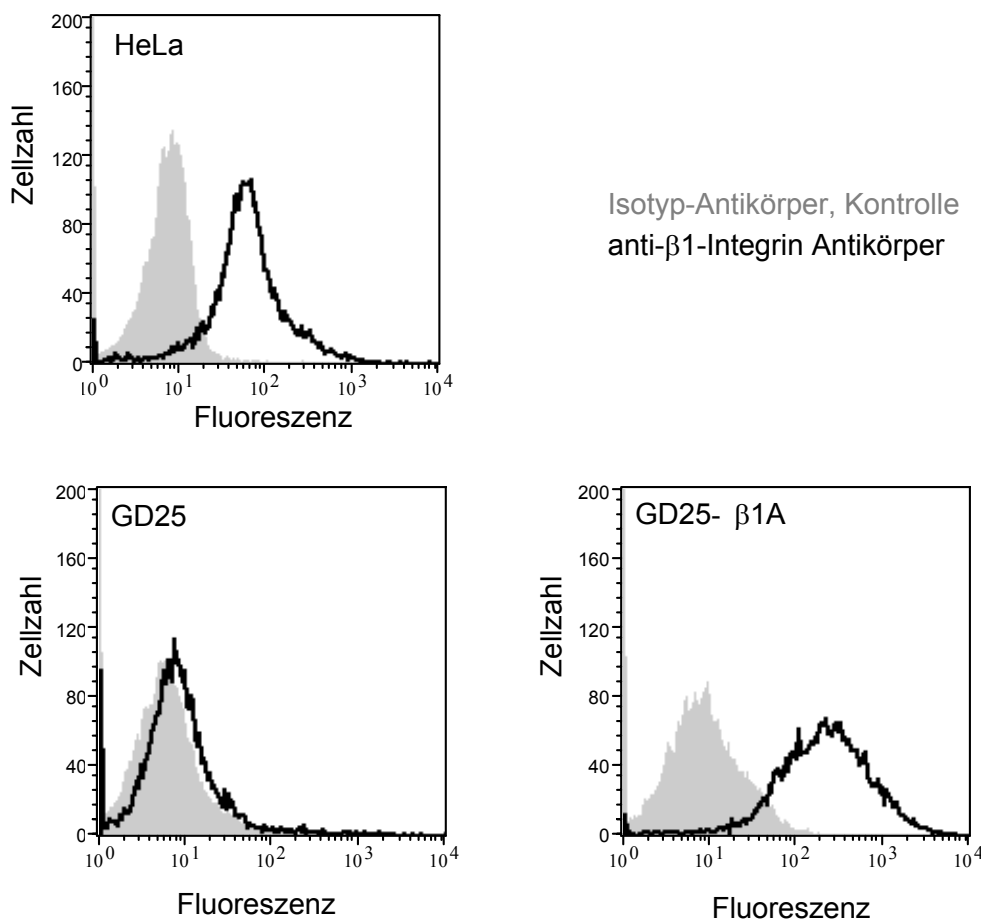


Abb. 4A: Durchflusszytometrische Analyse der verwendeten Zellen. HeLa, GD25 und GD25- β 1A Zellen wurden mit FITC-gekoppelten anti- β 1 Integrin Antikörpern fluoreszenzmarkiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert (2.2.4.9.). grau, Kontrollantikörper; weiß, FITC-gekoppelter anti- β 1-Integrin Antikörper

Die GD25 Zellen weisen nach Inkubation mit dem anti- $\beta 1$ Integrin Antikörper keine erhöhte Fluoreszenz auf. Bei den GD25- $\beta 1A$ Zellen konnte der anti- $\beta 1$ Integrin Antikörper binden und somit zeigen diese Zellen eine erhöhte Fluoreszenz. Es konnte gezeigt werden, dass GD25- $\beta 1A$ Zellen $\beta 1$ -Integrine exprimieren und bei GD25 keine $\beta 1$ -Integrine exprimiert werden.

3.1.5. $\beta 1$ -Integrin abhängige Adhäsion von YadA exprimierenden Bakterien an Zellen

Um zu klären, ob die Bindung von YadA an die Wirtszelle über $\beta 1$ -Integrine stattfindet, wurden die beiden Zelllinien GD25 und GD25- $\beta 1A$ wie in 2.2.4.3. beschrieben ausgesät und mit den, zuvor mit *E. coli* pNIV136, *E. coli* pInv1914 und *E. coli* pYadA^{O:8} infiziert und ein Adhäsionsassay (2.2.4.5.) durchgeführt. Abbildung 4B zeigt, dass *E. coli* pNIV136 weder an GD25, noch an GD25- $\beta 1A$ Zellen adhärirt. *E. coli* pInv1914 und *E. coli* pYadA^{O:8} zeigen eine deutlich erhöhte Adhärenz bei der Infektion von GD25- $\beta 1A$ Zellen verglichen mit der Adhärenz an GD25 Zellen. Die Adhärenz von *E. coli* pInv1914 an GD25- $\beta 1A$ beträgt 20%, die an GD25 Zellen nur 5%. Bei *E. coli* pYadA^{O:8} sind die Ergebnisse ähnlich, die Adhärenz an GD25- $\beta 1A$ beträgt 27%, an GD25 7%. Somit konnte gezeigt werden, dass an der Adhärenz von YadA an die Wirtszelle $\beta 1$ -Integrine beteiligt sind.

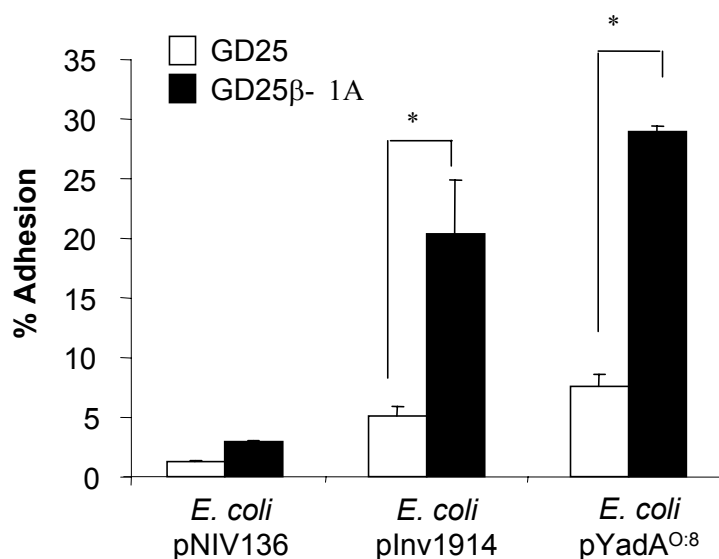


Abb. 4B : YadA und Invasin vermittelte Adhäsion. GD25 und GD25- $\beta 1A$ Zellen wurden mit *E. coli* pNIV136, *E. coli* pInv1914 und *E. coli* pYadA^{O:8} infiziert (MOI 100) und nach 15min die Anzahl der adhärirten Bakterien bestimmt. Die Sterne kennzeichnen, den signifikanten Unterschied der Adhäsion zwischen Zellen mit und ohne $\beta 1$ -Integrine ($P < 0,05$) (2.2.4.5.).

3.1.6. Untersuchung der Invasivität von *E. coli* pInv1914 und *E. coli* YadA^{O:8} in Epithelzellen

Um die Internalisation von YadA- und Inv- exprimierenden Bakterien zu untersuchen wurden Invasionsassays („Gentamycin-Killing Assay“) (Abb. 5) und Immunfluoreszenzfärbungen (Abb. 6) durchgeführt. Dazu wurden HeLa Zellen mit *E. coli* pNIV136, *E. coli* pInv1914 und *E. coli* pYadA^{O:8} infiziert.

Der Invasionsassay wurde wie in 2.2.4.6. beschrieben durchgeführt und die Bakterien nach 15, 30 und 60 min ausplattiert. Im Vergleich zu *E. coli* pNIV136 (Leervektor), war die Internalisation von *E. coli* pInv1914 und *E. coli* pYadA^{O:8} deutlich höher (siehe Abb. 5).

Die Anzahl an internalisierten Bakterien betrug bei *E. coli* pInv1914 nach 60 min fast 3%. Die YadA- vermittelte Internalisation war nach 60 min um die Hälfte geringer als die Internalisation von Inv- exprimierenden Bakterien.

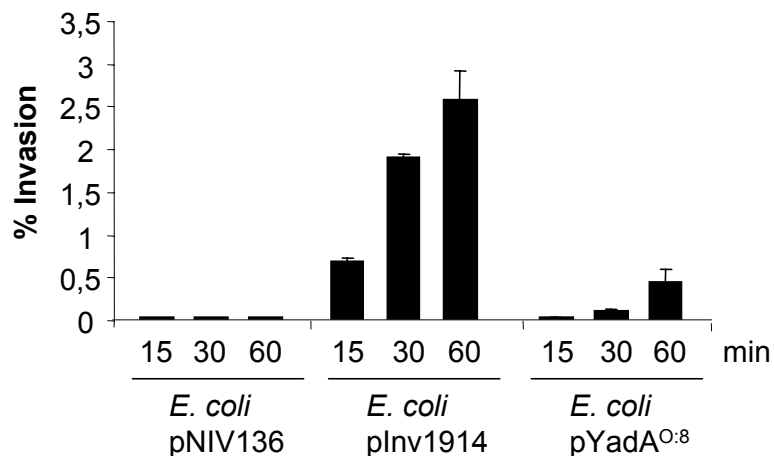


Abb. 5 : YadA und Invasin vermittelte Invasion. HeLa Zellen wurden mit *E. coli* pNIV136, *E. coli* pInv1914 und *E. coli* pYadA^{O:8} infiziert (MOI 100) und nach 15,30 und 60 min die intrazellulären Bakterien mittels Invasionsassay (2.2.4.6.) bestimmt.

Abbildung 6 zeigt eine Immunfärbung von HeLa Zellen, welche zuvor mit *E. coli* pInv1914 und *E. coli* pYadA^{O:8} infiziert worden waren (2.2.4.7.). Mit YadA- oder Inv- spezifischen Antikörpern konnte die extra- oder intrazelluläre Lokalisation der Bakterien gezeigt werden. Die Immunfluoreszenzfärbung bestätigte das Ergebnis des Invasionsassays und zeigte, dass 60 min nach der Infektion von HeLa Zellen mit *E. coli*. Die *E. coli* pInv1914 waren nach 60 min fast vollständig in die Zellen invadiert. Die *E. coli* pYadA^{O:8} waren nach 60min größtenteils extrazellulär lokalisiert. Somit konnte durch zwei verschiedene Methoden gezeigt werden,

dass die Invasivität von *E. coli* pYadA^{O:8} geringer als die von *E. coli* pInv1914 ist und die YadA- exprimierenden Bakterien größtenteils an die Zellen adhäreren und nicht invadieren.

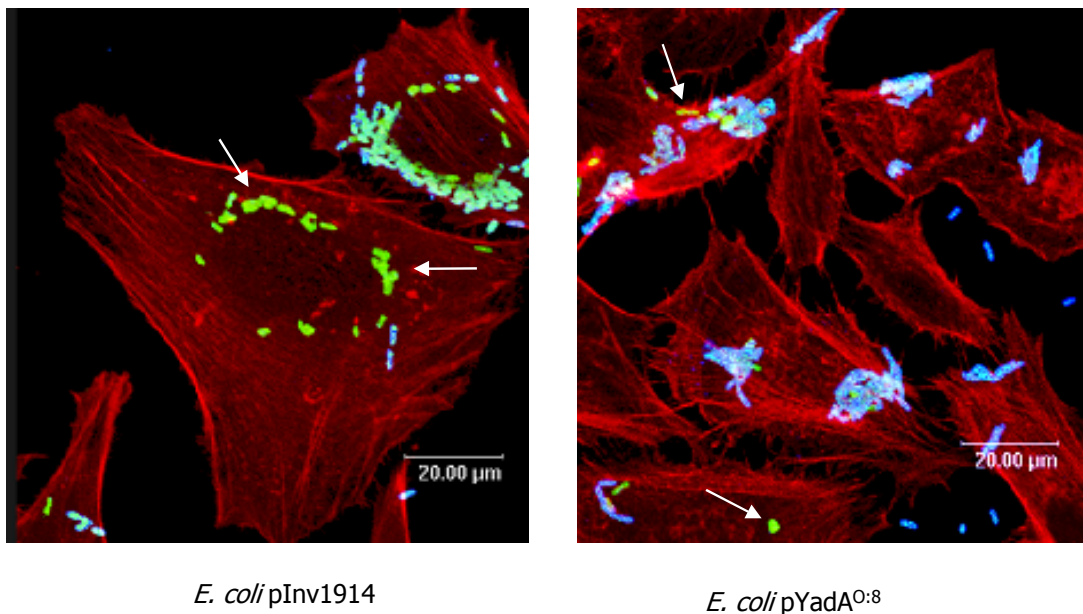


Abb. 6 : Immunfluoreszenzfärbung von HeLa Zellen nach Infektion mit *E. coli* pInv1914 und *E. coli* pYadA^{O:8}. HeLa Zellen wurden mit *E. coli* pNIV136, *E. coli* pInv1914 und *E. coli* pYadA^{O:8} infiziert (MOI 100) und nach 2 h, mit Hilfe von YadA- oder Invasin- spezifischen Antikörpern die mit FITC und cy5-gekoppelten Zweitantikörpern markiert wurden, gefärbt (2.2.4.7.). grün (FITC): intrazelluläre Bakterien, blau (cy5): extrazelluläre Bakterien, rot (TRITC): Zytoskelett

3.1.7. Untersuchung der IL-8- Induktion durch *E. coli* YadA^{O:8}

Um zu untersuchen, ob YadA die Sekretion von IL-8 in Epithelzellen auslöst, wurden HeLa Zellen wie in 2.2.4.3. beschrieben für die Infektion ausgesät. 2, 3, 4, 5 oder 6h nach Infektion wurde Zellkulturüberstand abgenommen und mittels ELISA auf die Konzentration von IL-8 untersucht.

Abbildung 7 zeigt, dass die sekretierte IL-8-Menge 6 h nach der Infektion mit *E. coli* pYadA^{O:8} und *E. coli* pInv1914 in etwa gleich hoch war.

Jedoch konnte ein Unterschied in der Menge an IL-8 im zeitlichen Verlauf beobachtet werden. Die Induktion von IL-8 war bei der Infektion mit *E. coli* pYadA^{O:8} nach 2,3,4 und 5h deutlich geringer als Inv. Als Kontrollen wurden HeLa Zellen unstimuliert belassen oder mit *E. coli*, die den Leervektor pNIV136 trugen, stimuliert. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass Inv und YadA von *Y. enterocolitica* in der Lage die IL-8 Sekretion zu stimulieren, doch verläuft dieser Prozess bei *E. coli* pYadA^{O:8} langsamer ab als bei einer Stimulation durch *E. coli* pInv1914.

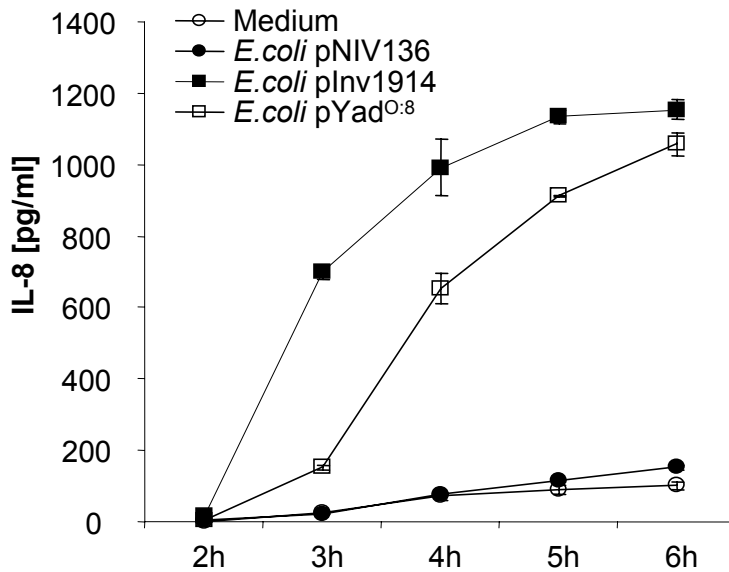


Abb. 7: IL-8 Sekretion nach Infektion mit YadA- oder Invasin-exprimierenden Bakterien. HeLa Zellen wurden mit *E.coli* pNIV136, *E.coli* plnv1914 und *E.coli* pYad^{O:8} infiziert (MOI 100) und die sekretierte Menge an IL-8 im Überstand mittels ELISA 2,3,4,5 und 6 h nach der Infektion bestimmt (2.2.2.4.1.).

3.1.8. Einfluss der NSVAIG-S Motive von YadA auf die Fähigkeit der Adhäsion

Die YadA-Mutanten (Tabelle 3) pYMS4505-M6 und pYL8 waren schon zu einem früheren Zeitpunkt als „Kollagenbindemutanten“, d.h. die Bakterien binden nicht mehr an Kollagen, beschrieben worden (Michiels and Cornelis 1991; Tahir et al. 2000; Tamm et al. 1993).

Auf dem Plasmid pYMS4505 ist das *yadA*-Gen aus dem Stamm *Y. enterocolitica* Serotyp O:3 kodiert, nach Transformation in einen *E. coli*- oder *Y. enterocolitica*- Stamm kommt es zur Expression von YadaO:3 und den Einbau dieses Proteins in die äußere Membran (Tahir et al. 2000). Die verwendeten Mutanten pYMS4505-M6 und pYL8 tragen beide eine Mutation in den NSVAIG-S Motiven (Abb. 8A). Diese Motive wurden zunächst als Kollagenbindemotive beschrieben (Tahir et al. 2000), spätere Strukturanalysen des YadA Kopfes ergaben aber eine Beteiligung dieser Motive an der Stabilität des Proteins. Durch die Mutation dieser Motive kommt es zu Konformations-Änderungen im Protein und dadurch zur Beeinträchtigung der Kollagenbindung (Nummelin et al. 2004). Analysen der Mutanten auf die Bindung an extrazelluläre Matrixkomponenten ergaben, dass die Fähigkeit der Kollagenbindung bei

diesen Mutanten (pYMS4505-M6 und pYL8) völlig verschwunden ist, während die Bindung von Laminin und Fibronectin fast unbeeinflusst bleibt (Tahir et al. 2000).



Abb. 8A : Darstellung der Aminosäure-Sequenz der Kopfdomäne von YadA. Die NSVAIG-S Motive sind mit M1-8 bezeichnet und durch einen Kasten markiert.

Die pYMS4505-M6 Mutante beinhaltet einen Austausch von 3 Aminosäuren im Bereich des M6- Motivs (Abb. 8A), während die Mutante pYL8 eine Deletion von 21 Aminosäuren in den Motiven M2-3 trägt. Die Mutanten (pYMS4505-M6 und pYL8) sowie der Vektor mit dem unmutierten YadA (pYMS4505) und der Leervektor (pEEV1) wurden in den Stamm *Y. enterocolitica* pYV Δ inv eingebracht.

Diese Stämme wurden nun für Adhäsionsexperimente und die Infektionsversuche verwendet, um den Einfluss der Konformations-Änderungen des Proteins auf die Fähigkeit der Adhäsion und der IL-8 Induktion zu untersuchen (Abb. 8B und Abb. 9) Die Zellen wurden dafür wie in 2.2.4.3. beschrieben vorbereitet und mit den Bakterien, die entweder den YadA oder YadA-Mutanten exprimierten, infiziert. Als Kontrolle wurden Bakterien, die den Leervektor (pEEV1) trugen verwendet.

Da für dieses Experiment *Y. enterocolitica* Stämme benutzt wurden, bei welchen das pYV-Plasmid entfernt worden war (*Y. enterocolitica* pYV Δ), war somit weder das ursprüngliche *yadA*-Gen noch die Gene für die verschiedenen Yops vorhanden. Des weiteren war bei dem verwendeten Stamm (*Y. enterocolitica* pYV Δ inv). das *inv*-Gen durch eine Kanamycin-Kassette deletiert worden, um die Adhäsion über Inv an die Zellen auszuschließen. Die Abbildung 8B zeigt, dass nur die Bakterien, die das YadA Wildtyp Protein (pYMS4505) exprimieren, noch die Fähigkeit besitzen, an die Zellen zu adhären. Sowohl der Leervektor als auch die beiden Mutanten sind dazu nicht in der Lage. Das bedeutet, dass diese Fähigkeit eindeutig auf die Anwesenheit von YadA zurückzuführen ist. Die Versuche wurden ebenfalls mit *E. coli* Stämmen durchgeführt (ohne Abbildung) und lieferten das gleiche Ergebnis. Somit konnte die Fähigkeit zur Adhäsion als eine Eigenschaft von YadA nachgewiesen werden. Die

Adhäsionsfähigkeit ist bei den Mutanten vollkommen aufgehoben. Das zeigt, dass die konformale Anordnung von YadA Einfluss auf die Adhäsion von YadA hat.

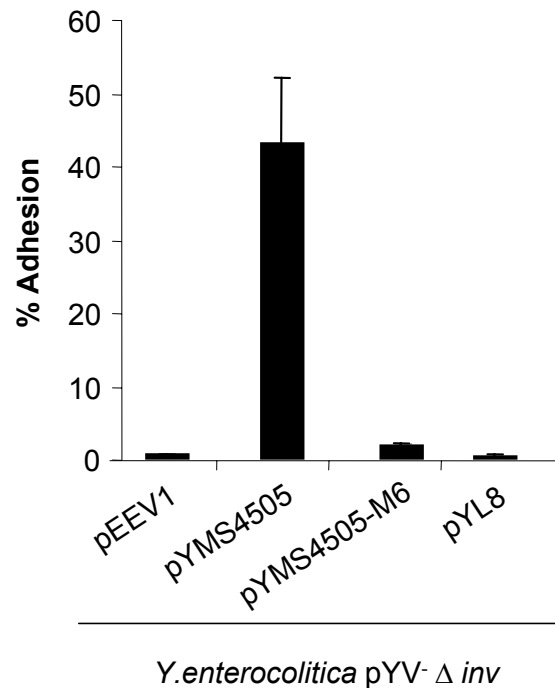


Abb. 8B: Adhäsion von YadA- und YadA-Mutanten-exprimierenden Bakterien an HeLa Zellen. HeLa Zellen wurden mit *Y. enterocolitica* pYV Δ inv pEEV1 (Leervektor), *Y. enterocolitica* pYV Δ inv pYMS4505 (YadA), *Y. enterocolitica* pYV Δ inv pYMS4505-M6 (YadA Mutante) oder *Y. enterocolitica* pYV Δ inv pYL8 (YadA Mutante) infiziert (MOI 100) und nach 15min die Anzahl der adhärenierten Bakterien bestimmt (2.2.4.5.).

3.1.9. Einfluss der NSVAIG-S Motive von YadA auf die IL-8 Induktion in HeLa Zellen

Da gezeigt worden war, dass die Konformations-Änderungen im Protein von YadA die Adhäsion an HeLa Zellen beeinflussen, sollte als nächstes der Einfluss auf die IL-8 Sekretion untersucht werden. Dazu wurden HeLa Zellen mit *Y. enterocolitica*, die entweder Inv, YadA oder YadA- Mutanten exprimierten, infiziert. Die Bakterien wurden wie in 2.2.3.6. beschrieben angezüchtet und in der MOI 100 (Verhältnis Zellen zu Bakterien 1:100) zu den Zellen gegeben. Als Negativkontrollen wurden die Zellen uninfiziert belassen oder mit *Y. enterocolitica* pEEV1 (Leervektor) infiziert. Als Positivkontrolle zur IL-8 Stimulation wurde TNF- α in der Endkonzentration 50ng/ml eingesetzt. Für die Expression von Inv wurde auch hier ein plasmidloser Yersinienstamm (*Y. enterocolitica* pYV) verwendet. Auch in

diesem Fall wurden die oben beschriebenen Mutanten (pYMS4505-M6 und pYL8) verwendet.

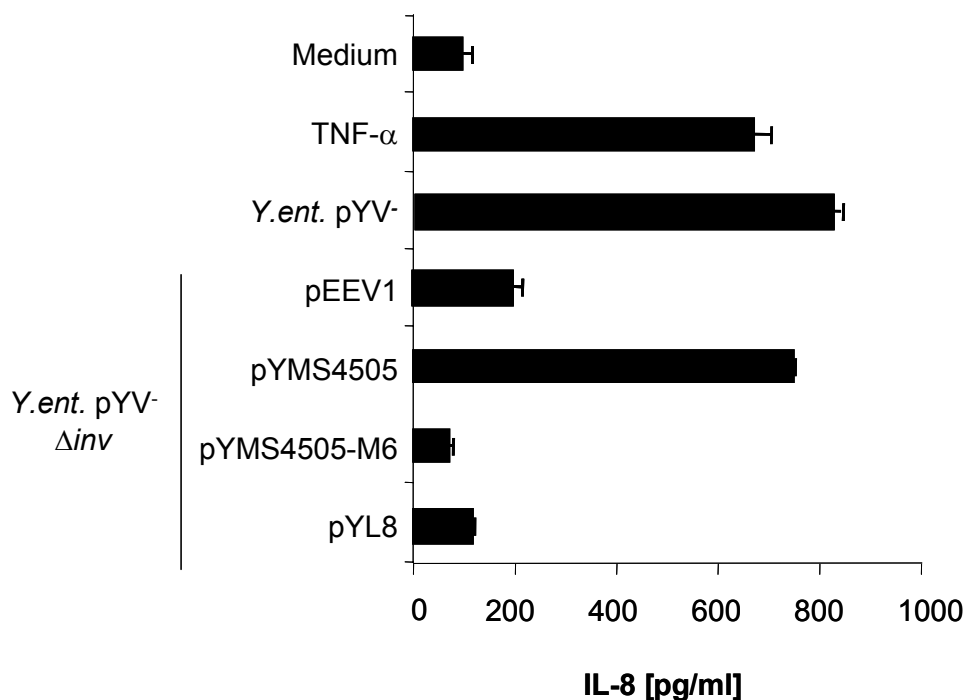


Abb. 9: IL-8 Sekretion nach Infektion mit YadA- oder YadA-Mutanten-exprimierenden Bakterien. HeLa Zellen wurden mit *Y. enterocolitica* pYV (Inv), *Y. enterocolitica* pYV Δinv pEEV1 (Leervektor), *Y. enterocolitica* pYV Δinv pYMS4505 (YadA), *Y. enterocolitica* pYV Δinv pYMS4505-M6 (YadA Mutante) oder *Y. enterocolitica* pYV Δinv pYL8 (YadA Mutante) infiziert (MOI 100) oder unstimuliert belassen (Medium) oder mit 50ng/ml TNF- α stimuliert und die sekretierte Menge an IL-8 im Überstand mittels ELISA 4h nach der Infektion bestimmt (2.2.2.4.1.).

Die Abbildung 9 zeigt, dass sowohl *Y. enterocolitica* pYV (Inv+, YadA-) als auch der Stamm *Y. enterocolitica* pYV Δinv pYMS4505 (YadA+, Inv-) beide die IL-8 Sekretion in HeLa Zellen auslösen. Die beiden YadA-Mutanten (*Y. enterocolitica* pYV Δinv pYMS4505-M6 und *Y. enterocolitica* pYV Δinv pYL8) zeigten eine IL-8 Konzentration die vergleichbar war mit der von den Kontrollen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Konformations-Änderungen im Protein von YadA auch Einfluss auf die Fähigkeit zur IL-8 Induktion hatten. Die Mutanten waren nicht mehr in der Lage die IL-8 Sekretion zu induzieren. Das zeigt, dass die Konformations-Änderungen, die Fähigkeit der IL-8 Induktion in HeLa Zellen beeinflussen.

3.1.10. Expression von YadA und YadA-Mutanten

Um zu zeigen, dass die verminderte Fähigkeit zur IL-8 Induktion nicht an der verminderten Proteinexpression der Mutanten (*Y. enterocolitica* pYV Δ inv pYMS4505-M6 und *Y. enterocolitica* pYV Δ inv pYL8) liegt wurden diese Bakterien angezüchtet und mittels Photometer bei oD_{600} die Anzahl der Bakterien bestimmt. Die Bakterien wurden in SDS-Puffer aufgenommen und auf in gleichen Mengen auf ein SDS-PAGE geladen (Abb.10). In der Spur *Y. enterocolitica* pYV Δ inv pEEV1 (Leervektor) als sind Kontrolle aufgetragen. Auf dem Gel sind unter anderem die YadA Trimer-Bande (*Y. enterocolitica* pYV Δ inv pYMS4505) und die Trimer-Banden der YadA Mutanten (*Y. enterocolitica* pYV Δ inv pYMS4505-M6 und *Y. enterocolitica* pYV Δ inv pYL8) zu sehen (Markierung). Die Bande der YadA-M6 Mutante lief etwas langsamer durch das Gel als die anderen Banden, was wahrscheinlich auf drei zusätzlichen negativ geladenen Aminosäuren (VAI anstelle von DEE) in dem Protein zurückzuführen ist (Tahir et al. 2000).

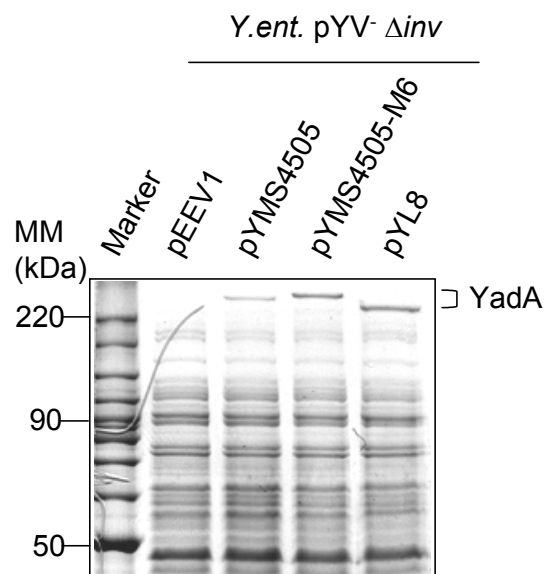


Abb. 10: SDS-PAGE zur Untersuchung der Proteinexpression der YadA- oder YadA-Mutanten-exprimierenden Bakterien. *Y. enterocolitica* pYV Δ inv pEEV1 (Leervektor), *Y. enterocolitica* pYV Δ inv pYMS4505 (YadA), *Y. enterocolitica* pYV Δ inv pYMS4505-M6 (YadA Mutante) oder *Y. enterocolitica* pYV Δ inv pYL8 (YadA Mutante) wurden über Nacht bei 27°C angezüchtet und gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Klammer markiert die zu untersuchenden Proteine (2.2.2.1.).

3.1.11. Untersuchung der Beteiligung von β 1-Integrinen bei der Stimulation der IL-8 Sekretion

Um die Abhängigkeit der IL-8 Induktion über β 1-Integrine nachzuweisen sollte mit Hilfe GD25 und GD25- β 1A Zellen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen mittels ELISA nach der Induktion mit den YadA- und Inv-exprimierenden Bakterienstämmen gemessen werden. Da es sich bei den verwendeten Zelllinien um Mauszellen handelt sollte das funktionelle Homolog von IL-8 der Maus, das CXCL1 Zytokin KC (Bozic et al. 1994) nachgewiesen werden. Nach einigen Vorversuchen stellte sich heraus, dass diese beiden Zelllinien nicht für die Untersuchung der KC Induktion über β 1-Integrine von YadA herangezogen werden konnten, weil andere bakterielle Moleküle (wie z.B. LPS) ihrerseits eine proinflammatorische Antwort und somit eine Induktion des Zytokin KC in den Zellen auslösten. Da die verwendeten GD25 und GD25- β 1A Zellen schon alleine durch die Kontrolle *E. coli* pNIV136 zur Ausschüttung von KC stimuliert wurden. Diese Stimulation lässt sich auf die Interaktion des LPS (Lipopolysaccharid), der verwendeten Bakterien, mit den auf den Zellen vorhandenen TLR-4 Rezeptoren, zurückführen. Die Beteiligung von β 1-Integrinen an der proinflammatorischen Antwort musste somit mit Hilfe von HeLa Zellen untersucht werden, die keinen TLR-4 Rezeptor für LPS von Gram-negativen Bakterien besitzen.

3.1.12. Untersuchung der β 1 Integrin-abhängigen IL-8 Induktion durch β 1 Integrin-blockierende Antikörper

Um den Zusammenhang von YadA und der Adhärenz an β 1-Integrine weiter zu bestätigen und den Zusammenhang auf die IL-8 Induktion zu untersuchen, wurden Infektionsexperimente mit HeLa Zellen und Inv oder YadA exprimierenden Bakterien durchgeführt. Die Beteiligung von β 1-Integrinen an der Induktion der IL-8 Sekretion sollte durch einen Antikörper, der gegen β 1-Integrine gerichtet ist und den Rezeptor blockiert, gezeigt werden.

Die Abbildung 11 zeigt die IL-8 Stimulation nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen und anschließender Infektion. Dazu wurde zu den Zellen, 30min vor der Infektion, anti- β 1-Integrin Antikörper in steigenden Mengen zugegeben. Als Kontrollen wurden TNF- α als Stimulanz einer nicht β 1-Integrin abhängigen IL-8

Ausschüttung, sowie nicht stimulierte Zellen verwendet. Bei den Kontrollen wurden die Mengen an ausgeschüttetem IL-8 durch die Präinkubation mit β 1-Integrin Antikörper nicht verändert.

Die Infektion mit den Stämmen *Y. enterocolitica* pYV⁻ (Inv⁺) und *Y. enterocolitica* pYV⁻ Δ inv pYMS4505 (YadA⁺) führte zu einer deutlichen Ausschüttung von IL-8, die mit steigenden Antikörperkonzentrationen abnahm. Die Menge an ausgeschüttetem IL-8 war bei Inv ohne anti- β 1-Integrin Antikörper ca. 1000pg/ml nach der Inkubation mit der höchsten Antikörperkonzentration stieg die IL-8 Konzentration nur noch bis zu einem Wert von 600pg/ml an. Im Falle von Inv nach Inkubation mit dem Antikörper war die IL-8 Konzentration 40% geringer, im Vergleich zu der Stimulation durch Inv ohne Antikörper. Bei YadA konnte die Stimulation bei der höchsten Antikörperkonzentration um 79% blockiert werden und ist somit sogar noch höher als bei Inv.

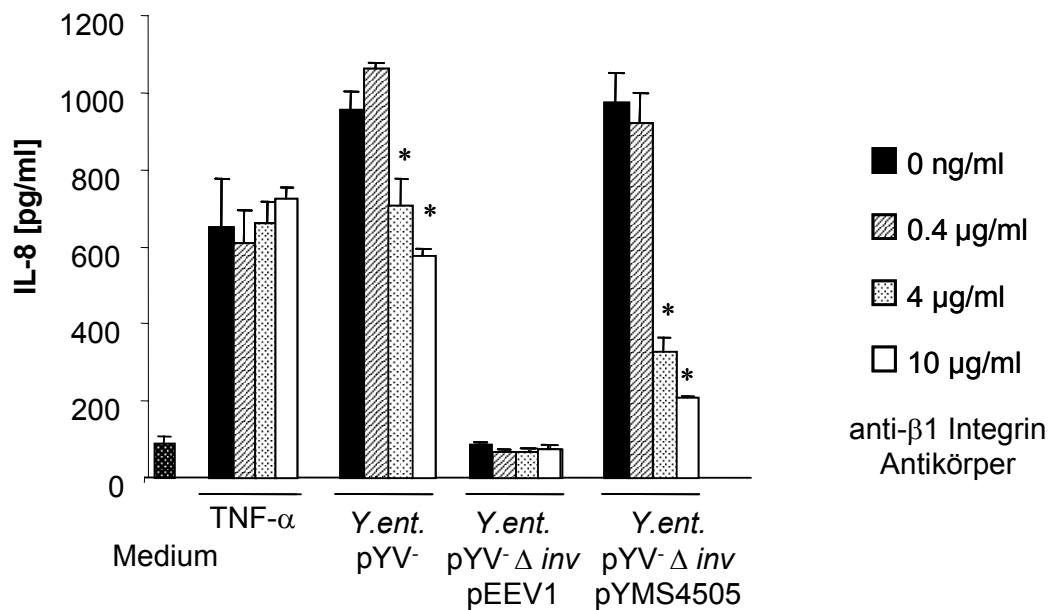


Abb. 11: IL-8 Sekretion nach Inkubation mit neutralisierenden anti- β 1-Integrin Antikörper. HeLa Zellen wurden mit 0, 0.4, 4 und 10µg/ml anti- β 1-Integrin Antikörper inkubiert und anschließend mit *Y.enterocolitica* pYV⁻ (Inv), *Y.enterocolitica* pYV⁻ Δ inv pEEV1 (Leervektor), *Y.enterocolitica* pYV⁻ Δ inv pYMS4505 (YadA) infiziert (MOI 100) oder unstimuliert belassen (Medium) oder mit 50 ng/ml TNF- α stimuliert und die sekretierte Menge an IL-8 im Überstand mittels ELISA 4h nach der Infektion bestimmt (2.2.2.4.1.).

Um auszuschließen, dass verschieden hohe Expression von YadA und Inv bei den verwendeten *Yersinia*- Stämmen auftreten, wurden die Blockierungsexperimente mit den anti-

β 1-Integrin Antikörpern mit den *E. coli*- Stämmen wiederholt (Abbildung 12). In diesen Stämmen werden die beiden Proteine im selben Vektorsystem exprimiert. Der Versuch wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die IL-8 Sekretion durch die YadA- und Inv-exprimierenden Stämme induzierbar. Durch aufsteigende Antikörpermengen war die ausgeschüttete IL-8 Menge bei *E. coli* pInv1914 zu 21% und bei *E. coli* pYadA^{O:8} zu 49% reduziert. Um zu untersuchen, ob die niedrigeren IL-8 Mengen mit verminderter Adhäsion in Zusammenhang Adhäsionsversuche (2.2.4.5.) durchgeführt.

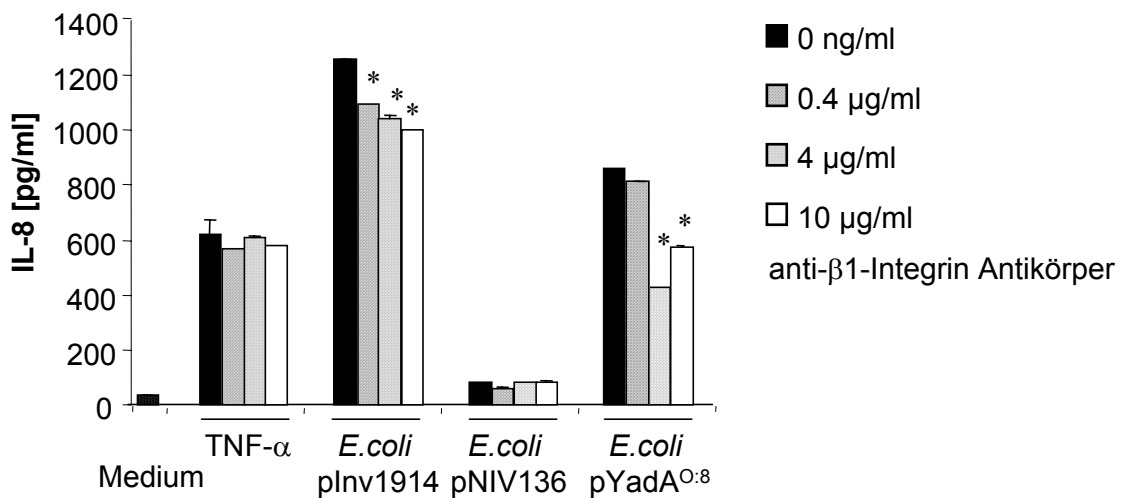


Abb. 12: IL-8 Sekretion nach Inkubation mit neutralisierenden anti- β 1-Integrin Antikörper. HeLa Zellen wurden mit 0, 0.4, 4 und 10 μ g/ml anti- β 1-Integrin Antikörper inkubiert und anschließend mit *E. coli* pNIV136, *E. coli* pInv1914 und *E. coli* pYadA^{O:8} infiziert (MOI 100) oder unstimuliert belassen (Medium) oder mit 50 ng/ml TNF- α stimuliert und die sekretierte Menge an IL-8 im Überstand mittels ELISA 4h nach der Infektion bestimmt (2.2.2.4.1.).

Abbildung 13 zeigt die Adhäsion der YadA und Inv- exprimierenden *E. coli*- Stämme vor und nach Inkubation mit ansteigenden β 1-Integrin- Antikörper Konzentrationen. Die Adhäsion konnte durch die neutralisierenden Antikörper im Falle von *E. coli* pYadA^{O:8} um 49 % und bei *E. coli* pInv1914 um 64% reduziert werden. Das bedeutet, dass die verminderte Ausschüttung von IL-8 mit einer Reduktion der Adhärenz im Zusammenhang steht.

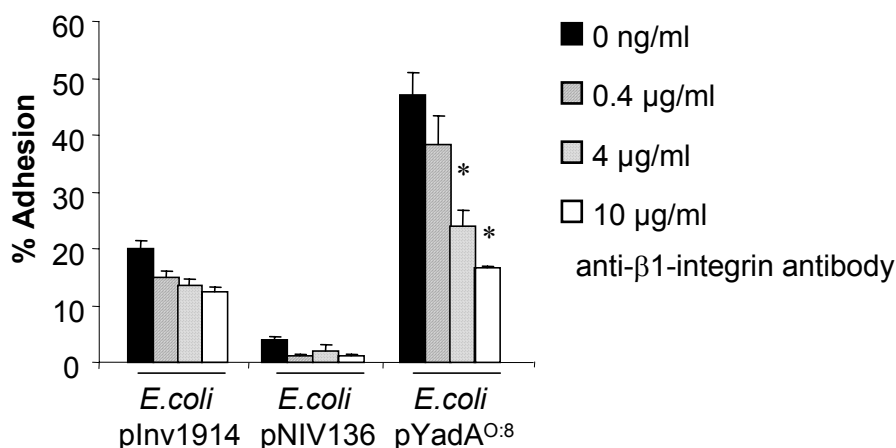


Abb. 13: Adhäsion nach Inkubation mit neutralisierendem anti-β1-Integrin Antikörper. HeLa Zellen wurden mit 0, 0.4, 4 und 10 µg/ml anti-β1-Integrin Antikörper inkubiert und anschließend mit *E. coli* pNIV136, *E. coli* pInv1914 und *E. coli* pYadA^{O:8} infiziert (MOI 100) und nach 15min die adhärenierten Bakterien mittels ausplattieren, bestimmt (2.2.4.5.).

3.1.13. YadA induziert die Expression von IL-8 durch Aktivierung von NF-κB

Um zu untersuchen, ob NF-κB an der Aktivierung der IL-8- Sekretion beteiligt ist, wurden HeLa Zellen mit *E. coli* pEEV1 (Leervektor), *E. coli* pInv1914 (Inv+) und *E. coli* pYMS4505 (YadA+) infiziert und Kernextrakte aus den Zellen gewonnen. Die Kernextrakte wurden 60, 90 und 120min nach der Infektion hergestellt, um die Aktivierung von NF-κB an diesen Zeitpunkten zu untersuchen. Diese Extrakte wurden mittels eines *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) auf die Zellkernlokalisierung und die DNA- Bindungsfähigkeit von NF-κB untersucht. Nicht infizierte HeLa Zellen wiesen keine NF-κB Bindungsfähigkeit auf (Abb. 14). Nach Infektion mit den Bakterien den Leervektor trugen konnte, eine geringe Bindeaktivität von NF-κB nachgewiesen werden. Die Bindeaktivität nach Infektion mit *E. coli* pInv1914 war schon nach 60 und 90 min nachweisbar, war aber nach 120min am höchsten (Abb. 14). Dieses Ergebnis war übereinstimmend mit bereits beschriebenen Untersuchungen (Grassl et al. 2003). Es konnte auch durch Infektion mit *E. coli* pYMS4505 (YadA+) eine NF-κB Aktivierung nachgewiesen werden, jedoch war diese etwas geringer als bei durch *E. coli* pInv1914 stimulierten Zellen und der Zeitpunkt der höchsten Stimulation

war hier nach 90min. Somit konnte gezeigt werden, dass die YadA-vermittelte IL-8 Ausschüttung mit der nukleären Lokalisation von NF- κ B zusammenhängt.

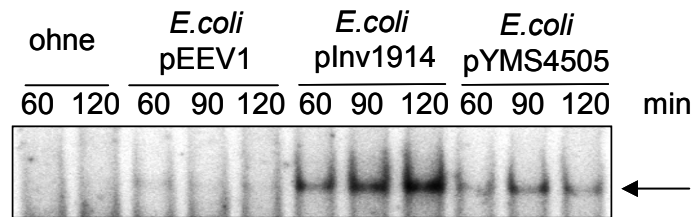


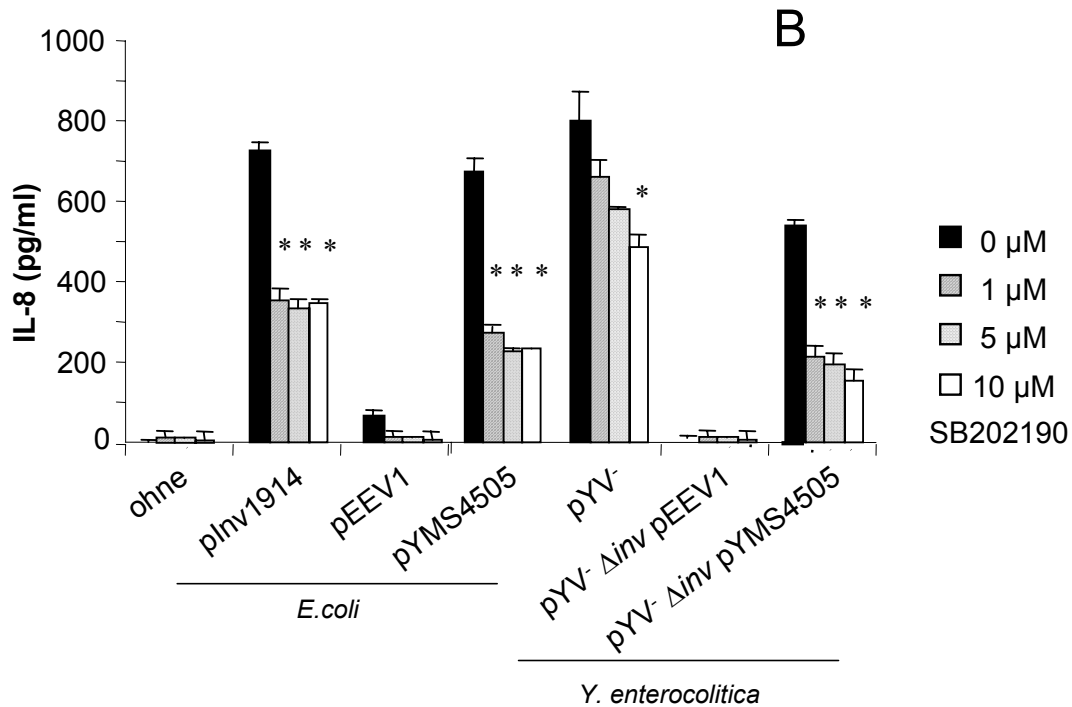
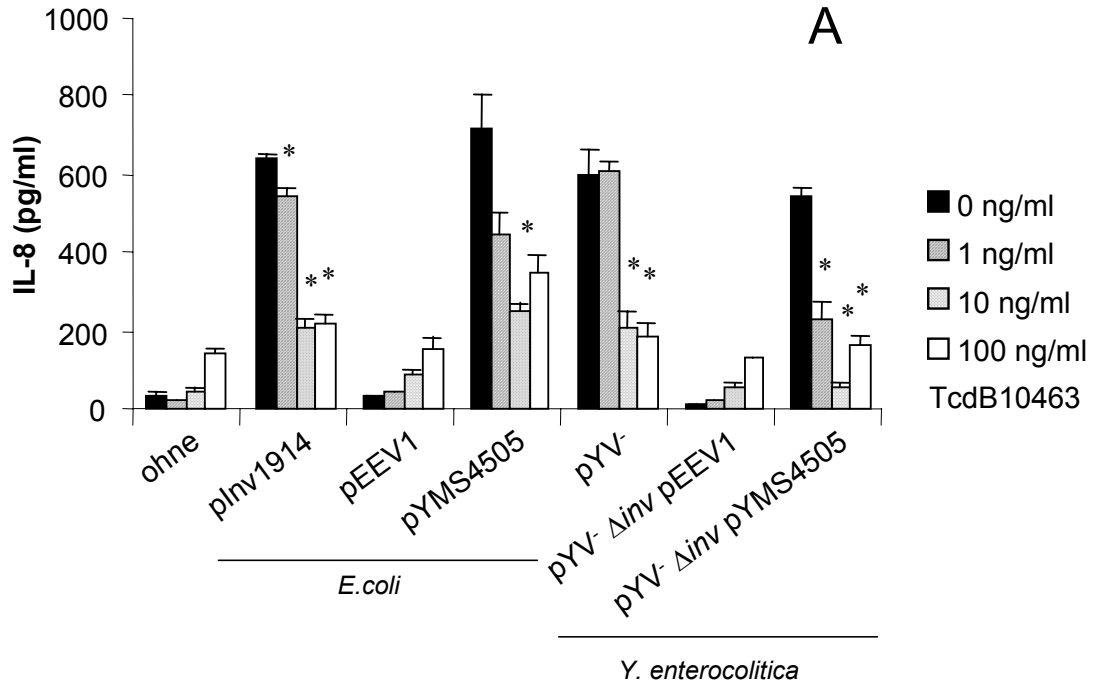
Abb. 14: EMSA (electrophoretic mobility shift assay) mit Kernextrakten aus HeLa Zellen.

Die Kernextrakte von HeLa Zellen, die zuvor mit verschiedenen Bakterien stimuliert worden waren, wurden zusammen mit 32 P- markierten Oligonukleotiden inkubiert und anschließend durch ein nicht denaturierendes PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.2.5.). Als Kontrolle dienten Kernextrakte aus Zellen die nicht infiziert worden waren (ohne). pEEV1 (Leervektor), plnv1914 (Inv), pYMS4505 (YadA)

3.1.14. Untersuchung der Signalkaskade in eukaryontischen Zellen

Um zu analysieren welche Proteine in der Signalkaskade und der Aktivierung von NF- κ B beteiligt sind, wurden verschiedene Inhibitoren benutzt, die unterschiedliche in der Signaltransduktion beteiligte Moleküle inhibieren. Vorangegangene Studien der Signaltransduktion einer durch Inv ausgelösten NF- κ B Aktivierung zeigten die Beteiligung von Rho GTPasen und MAP Kinasen. Die Zellen wurden entweder 24h vor der Infektion mit dem Toxin B von *C. difficile* TcdB10463 (Abb. 15A) behandelt, um die Beteiligung von Rac, Rho und Cdc42 zu untersuchen. Da TcdB10463 die Inv- und YadA-vermittelte IL-8 Sekretion bis zu 60% inhibiert, kann die Beteiligung an der IL-8 Induktion aller oder einiger dieser Rho GTPasen angenommen werden. Die Beteiligung von MAP Kinasen wurde mit Hilfe des spezifischen MAP Kinase Inhibitors für p38 (SB202190) (Abb. 15B), oder für MEK1 (PD98059) (Abb. 15C) bzw. für JNK (SP600125) (Abb. 15D) untersucht. Diese wurden 30 min vor der Infektion in ansteigenden Mengen zugegeben und danach mit Inv- oder YadA-exprimierenden Bakterien infiziert. Die Zugabe des p38 Inhibitors reduzierte die YadA spezifische IL-8 Sekretion um 70%. Die Inkubation der Zellen mit dem MEK1 Inhibitor reduzierte die IL-8 Ausschüttung nach Infektion mit YadA- exprimierenden Bakterien um 67% und bei dem Inhibitor von JNK waren die IL-8 Konzentrationen bei der höchsten Dosierung um 69% reduziert. Als Kontrolle dienten uninfizierte Zellen, die ebenfalls mit

aufsteigenden Mengen der verschiedenen inhibitorischen Substanzen behandelt worden waren. Bei diesen Zellen war kein IL-8 im Zellkulturüberstand detektierbar.



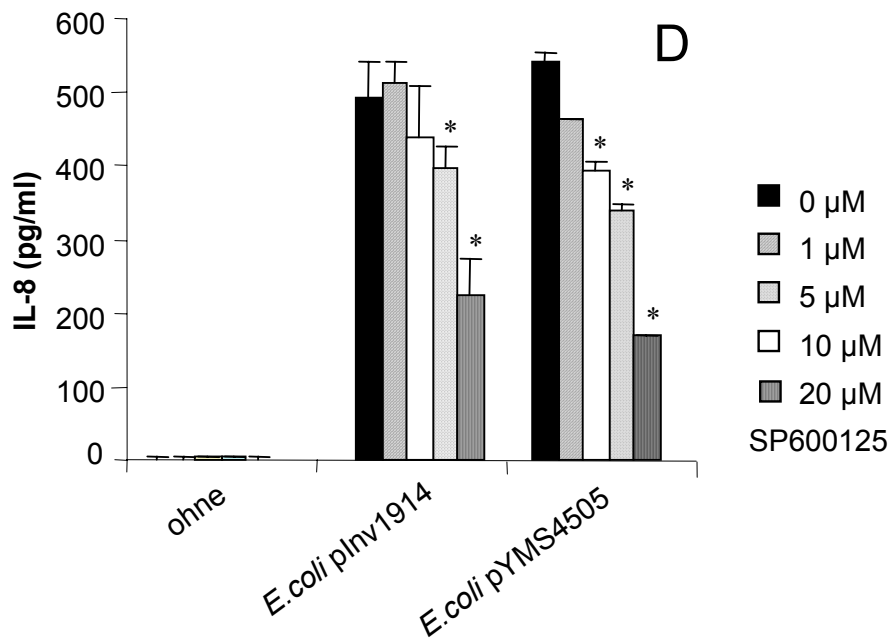
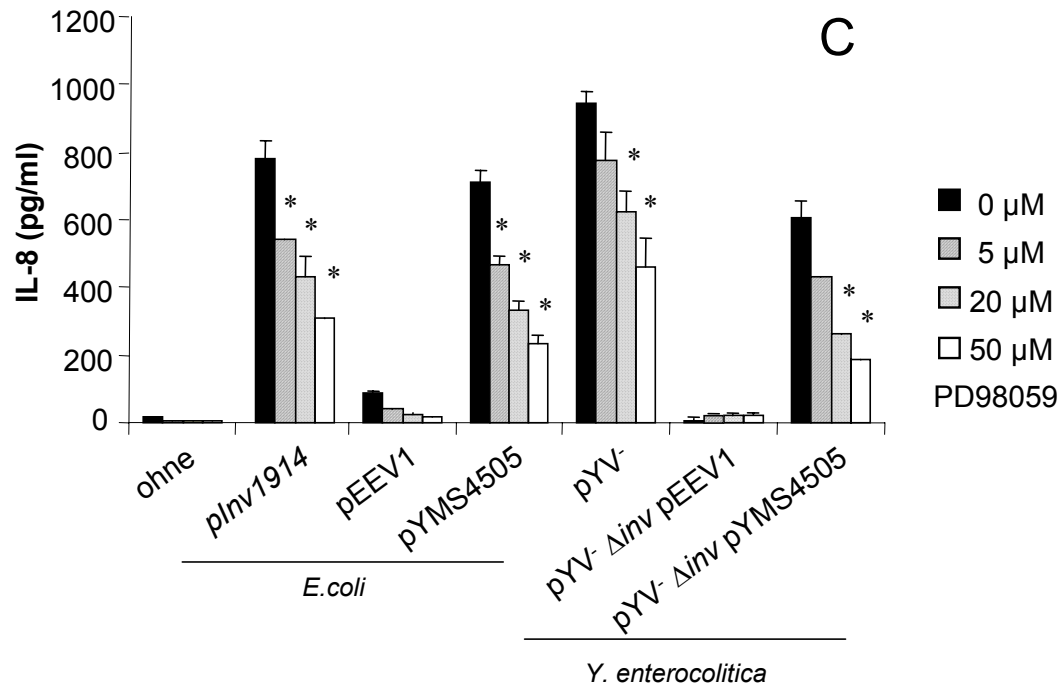


Abb. 15: Modulation der IL-8 Sekretion nach Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren

Zellen wurden vor Infektion mit Yada- oder Inv-exprimierenden Bakterien für 24h mit (A) *C. difficile* Toxin TcdB10463 (Inhibitor für Rac, Rho und Cdc42 oder für 30 min vor der Infektion mit (B) p38 Inhibitor SB202190 oder (C) MEK1 Inhibitor PD98059 oder (D) JNK Inhibitor SP600125 inkubiert und die IL-8 Konzentration in den einzelnen Proben mittels ELSIA (2.2.2.4.1.) bestimmt. pEEV1 (Leervektor), pInv1914 (Inv), pYMS4505 (YadA), pYV- (Inv), pYV- Δinv pYMS4505 (YadA). Die Sterne kennzeichnen die signifikanten Unterschiede in den IL-8 Konzentrationen ($P < 0,05$)

Zusammengefasst zeigen diese Versuche eine Beteiligung von Rho GTPasen, MEK1, JNK und p38 MAP Kinase an der Signaltransduktion von den β 1-Integrinen zur NF- κ B Aktivierung, nach Stimulation von HeLa Zellen mit YadA- exprimierenden Bakterien, welche schließlich zu einer proinflammatorischen Antwort und zur Sekretion von IL-8 führt.

3.2. Aktivierung der β 1-Integrin unabhängigen IL-8 Induktion durch Invasin

Das äußere Membranprotein Inv induziert durch die Bindung an β 1-Integrine die Sekretion von IL-8 in Epithelzellen. Zur Aktivierung der Signalkaskade muss entweder mit Bakterien stimuliert werden, die Inv exprimieren oder rekombinant hergestelltes Protein auf Latex-Partikel gebunden werden. Lösliches Inv kann die Zelle nicht zur IL-8 Sekretion stimulieren, da Inv gleichzeitig an mehrere nebeneinander liegende Integrine binden muss, damit es zu einem Zusammenlagern der Rezeptoren („clustern“) kommt und die Signalkaskade gestartet wird. Durch die Bindung von Inv auf die Latex-Partikel werden mehrere Integrin- Rezeptoren gleichzeitig aktiviert und so kommt es zu einer Signaltransduktion im Inneren der Zelle (Schulte et al. 2000b).

Um zu untersuchen, ob es ohne die Bindung von Inv an Latex-Partikel auch zu einer Induktion der IL-8 Sekretion kommt wurden Zellen mit rekombinant hergestelltem GST-Inv stimuliert. Bei dem Protein handelt es sich um ein Gluthations-S-Transferase (GST) Fusionsprotein. Die letzten 195 C-terminalen Aminosäuren des Invasinproteins aus *Y. enterocolitica* O:8 wurden dabei mit GST fusioniert. Das Protein wurde durch eine Affinitätschromatographiesäule aufgereinigt und stand in der Arbeitsgruppe zur Verfügung.

Die Fibroblasten GD25 und GD25- β 1A wurden mit Latex-Partikel gebundenem Inv und löslichem Inv stimuliert (Abb. 16). Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS) von *E. coli* Serotyp 0127:B8 stimuliert. Als weitere Kontrollen wurde GST als rekombinantes Protein in löslicher und Latex-Partikel gebundener Form zu den Zellen gegeben. Zur Neutralisation von LPS wurde Polymyxin (PM) zu allen Ansätzen gegeben. LPS stimuliert eine hohe KC Ausschüttung in beiden Zelllinien. PM ist in der Lage die Stimulation durch LPS auf das Niveau der Spontanproduktion von KC zu reduzieren. Lösliches und gebundenes GST und GST+PM stimulieren die KC Sekretion nicht. Durch Stimulation mit GST-Inv in löslicher oder gebundener Form kommt es zur KC Sekretion in beiden Zelllinien. Also auch in der Zelllinie ohne β 1- Integrine, dem Rezeptor für Inv. Die Stimulation von GD25 und GD25- β 1A mit löslichem Inv führte zur Ausschüttung von KC.

Die Stimulation der Zellen mit löslichem Inv und PM führt zur KC Sekretion. LPS stimuliert die Zellen zur KC Sekretion. Die Zugabe von PM zu LPS unterbindet die KC Sekretion. Inv stimuliert die Zellen zur KC Sekretion. Die Zugabe von PM zu Inv unterbindet die KC

Sekretion nicht. Die Stimulation der KC Sekretion ist unabhängig von β 1-Integrinen, also gleich bei GD25 und GD25- β 1A. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es eventuell noch einen anderen Rezeptor, an den Inv binden kann, gibt, welcher die Induktion von KC durch lösliche Proteine auslöst.

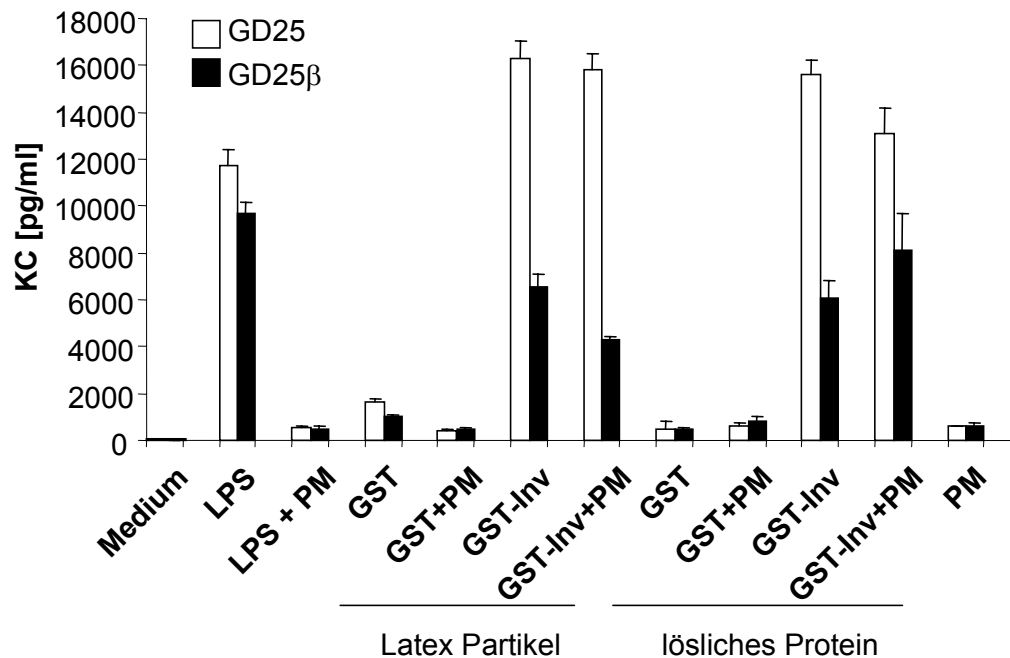


Abb. 16: KC Konzentration im Überstand der Maus-Fibroblasten nach Stimulation mit rekombinantem Invasin (2.2.4.4.)

GD25 und GD25- β 1A Zellen wurden mit löslichem oder auf Latex- Partikel (2.2.2.6.) gebundenem rekombinantem Protein stimuliert und die KC Sekretion nach 4h mittels ELISA (2.2.2.4.1.) bestimmt. Als Kontrolle wurde mit LPS stimuliert. Zur Neutralisierung des LPS wurde PM verwendet. LPS, Lipopolysaccharid; PM, Polymyxin; GST, Gluthation-S-Transferase; GST-Inv, Gluthation-S-Transferase Invasin Fusionsprotein

Als weitere Rezeptoren für bakterielle Produkte kommen z. B. Toll-like Rezeptoren (TLRs) in Frage, da durch die TRLs essentielle Komponenten von Pathogenen erkannt werden wie z.B. LPS bei Gram-negativen Bakterien, LTA bei Gram-positiven Bakterien und Lipoproteine von Bakterien und Parasiten. Stimulationsversuche mit HEK239 Zellen, die mit verschiedenen Toll-like Rezeptor DNA transfiziert worden waren (AG Carsten Kirschning), ergaben dass möglicherweise TLR-2 ein Rezeptor für Inv sein könnte (ohne Abbildung).

Zur näheren Untersuchung des TLR-2 als möglichen Rezeptor für lösliches Inv wurden Zellen aus TLR-4 und TLR-2 defizienten Mäusen verwendet. Die Zellen wurden aus der Milz von C3H/HeN (Wildtyp) und C3H/HeJ TLR-2^{-/-} (TLR-4^{-/-} und TLR-2^{-/-}) Mäusen isoliert (2.2.5.1.) und mit GST und GST-Inv in löslicher Form und auf Latex- Partikel gebunden stimuliert. Als Kontrolle wurde zu beiden Zelltypen 1000EU pro Ansatz an LPS gegeben oder die Zellen

unstimuliert belassen. Die Sekretion von KC wurde 4 Stunden nach der Stimulation mittels KC- spezifischen ELISA bestimmt (Abb. 17). LPS konnte die C3H/HeN Zellen, aber nicht die C3H/HeJ und C3H/HeJ TLR-2^{-/-} Zellen zur KC Sekretion anregen. Die KC Konzentrationen bei Stimulation mit GST (gebundene und lösliche Form) blieben auf Hintergrundniveau.

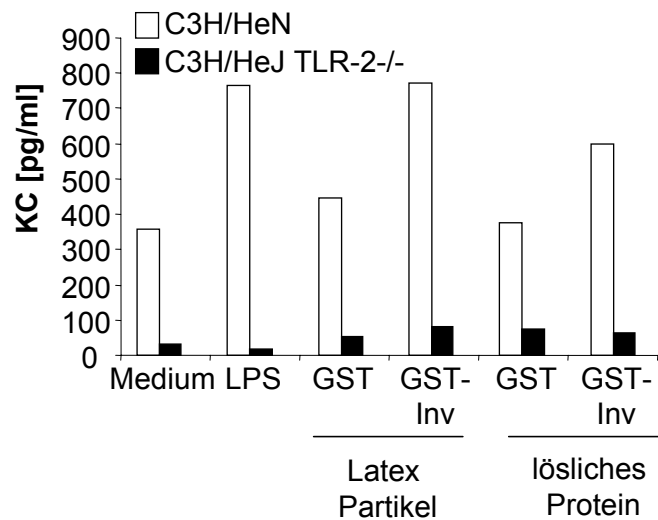


Abb. 17: Konzentration im Überstand der Milzzellen nach Stimulation mit rekombinatem Invasin Milzzellen von Wildtyp (C3H/HeN) und TLR-2^{-/-} und TLR-4^{-/-} (C3H/HeJ TLR2^{-/-}) Mausstämmen (2.1.13.) wurden mit löslichem oder auf Latex- Partikel gebundenem rekombinatem Protein stimuliert und die KC Sekretion nach 4 h mittels ELISA (2.2.2.4.2.) bestimmt. LPS, Lipopolysaccharid; GST, Gluthation-S-Transferase; GST-Inv, Gluthation-S-Transferase Invasin Fusionsprotein

Die C3HHe/J TLR 2^{-/-} Zellen konnten von keiner in diesem Versuch eingesetzten Substanz stimuliert werden. GST-Inv zeigte jeweils (löslich und in gebundener Form) eine Stimulation der KC Produktion in den Wildtyp (C3H/HeN) Zellen, während in den anderen Zellen keine Stimulation zu erzielen war. Lösliches GST-Inv ist in der Lage, KC in He/N Milzzellen zu induzieren, während es nicht möglich ist, KC in Milzzellen zu induzieren, die weder TLR-2 noch TLR-4 exprimieren. Dies ist ein erster Hinweis, dass TLR-2 und/oder TLR-4 ein Rezeptor für Inv sein könnten, da es nur in Anwesenheit dieser Rezeptoren zu einer Induktion der KC Sekretion kommt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden wieder Milzzellen und dendritische Zellen (DC) (2.2.5.2.) aus Wildtyp Mäusen (C3H/HeN), TLR-4 defizienten Mäusen (C3H/HeJ) und TLR-4 und TLR-2 negativen Mäusen (C3H/HeJ TLR2^{-/-}) präpariert und mit GST und GST-Inv in löslicher Form stimuliert. Um das LPS zu neutralisieren wurden alle Substanzen auch zusammen mit 100U pro Ansatz Polymyxin (PM) zu den Zellen gegeben. Als Negativkontrolle wurden die Zellen unstimuliert belassen oder GST wie auch GST-Inv 2h

gekocht, um das Protein zu inaktivieren. Die Abbildung 18A zeigt, dass LPS die KC Sekretion nur in den Wildtyp Zellen auslösen konnte. Da in den anderen beiden Zelltypen der TLR-4 Rezeptor fehlt, konnte dort kein KC induziert werden. Lösliches GST-Inv war in der Lage in Wildtyp Milzzellen eine KC Antwort zu induzieren, in TLR-4 negativen Milzzellen war die Konzentration an ausgeschüttetem KC nur noch halb so hoch. Auch mit dem gekochten GST-Inv konnte bei den Wildtyp Zellen, verglichen mit ungekochtem GST-Inv, nur noch 50% der KC Konzentration erreicht werden.

Eine Induktion von KC konnte in C3H/HeJ TLR2^{-/-} Zellen mit keiner der Substanzen stimuliert werden. Mit den gleichen Substanzen wurden parallel auch dendritische Zellen aus denselben Mausstämmen stimuliert. Auch hier lösten LPS und GST-Inv eine KC Antwort aus. LPS konnte durch PM neutralisiert werden. Wenn PM zu GST-Inv zugegeben wurde, und somit das LPS in der GST-Inv Präparation neutralisiert war, konnte in C3H/HeJ Zellen immer noch KC stimuliert werden. Bei diesem Versuch wirkte das gekochte GST-Inv Protein nicht mehr stimulierend. Zur Kontrolle, dass die Zellen prinzipiell stimulierbar sind, wurde bei den dendritischen Zellen CpG- DNA zugegeben, die die KC Sekretion über TLR-9 induziert (Hemmi et al. 2000) (Abb. 18B).

Die Versuche zeigen eine Induzierbarkeit des Zytokins KC durch lösliches GST-Inv Protein, solange TLR -2 und -4 auf den zu stimulierenden Zellen exprimiert werden. Diese Versuche wurden viele Male mit den gleichen Proben wiederholt, waren aber sehr inkonsistent in den Ergebnissen. Vor allem konnte nicht sicher gezeigt werden, dass die Neutralisation des LPS durch PM immer erfolgreich war.

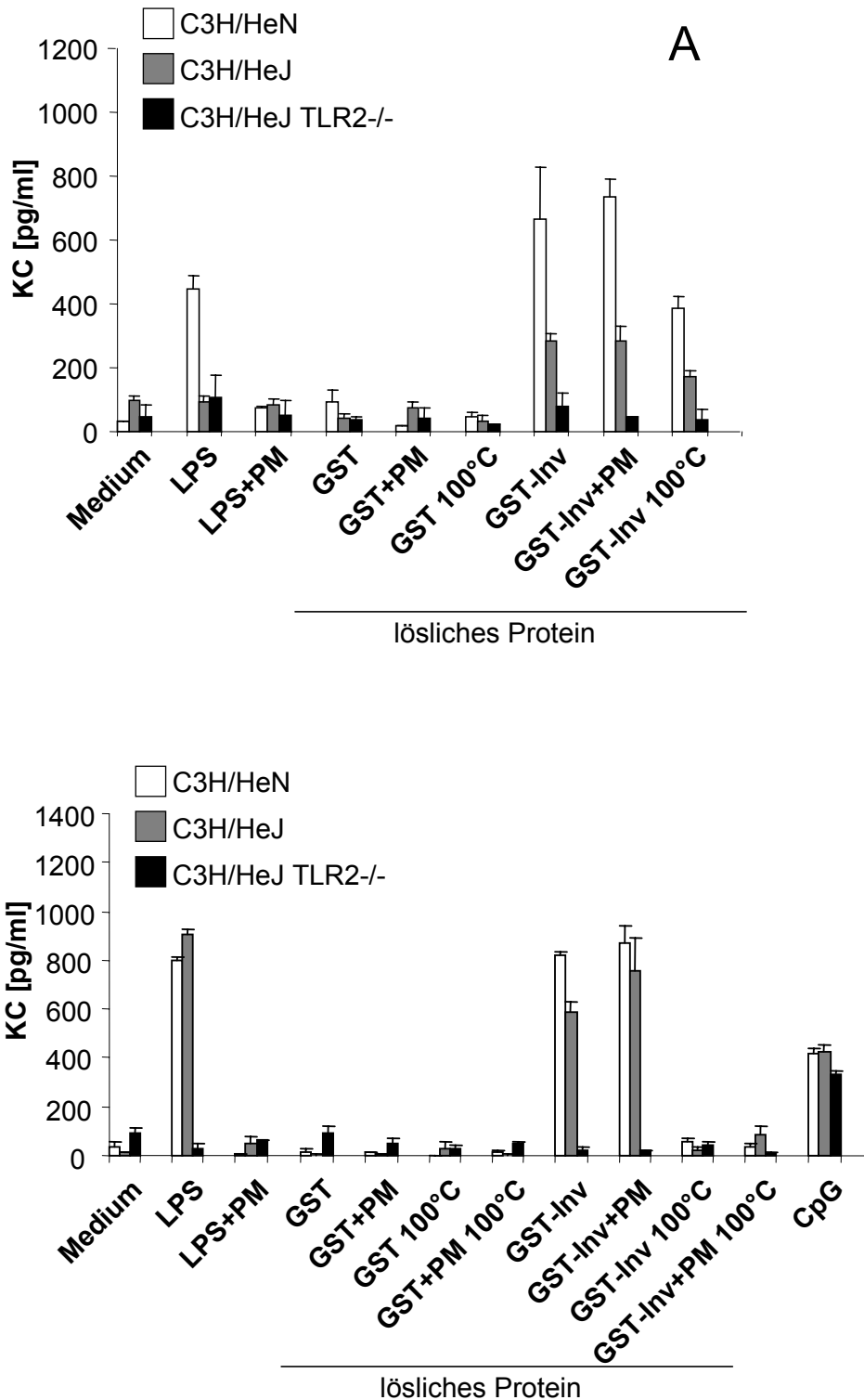


Abb. 18: KC Konzentration nach Stimulation von Wildtyp, TLR-4 defizienten oder TLR-4/ TLR- 2 defizienten Mauszellen mit rekombinatem Invasin

(A) Milzzellen (2.2.5.1.) oder (B) dendritische Zellen (2.2.5.2.) aus Wildtyp (C3H/HeN), TLR- 4⁻ (C3H/HeJ) und TLR- 4⁻ / TLR2⁻ (C3H/HeJ TLR2^{-/-}) Mausstämmen wurden mit löslichem rekombinanten Protein stimuliert und die KC Sekretion nach 4 h mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle wurde mit LPS, GpC- oder CpG-DNA stimuliert. Zur Neutralisierung des LPS wurde PM verwendet. LPS, Lipopolysaccharid; PM, Polymyxin; GST, Gluthation-S-Transferase Protein (als Kontrolle); GST-Inv, Gluthation-S-Transferase-Invasin Fusionsprotein; 100°C, Protein wurde gekocht ; CpG, DNA als Positivkontrolle für Stimulation der Zellen über TLR- 9;

In Abbildung 19 ist beispielhaft gezeigt, dass LPS durch PM nicht neutralisiert werden konnte. In diesem Falle wurde durch die Inkubation der Zellen mit LPS (1000EU) +PM (100U) trotzdem eine KC Ausschüttung erreicht. Das lässt schließen, dass auch das PM in der Probe mit GST-Inv nicht immer seine Wirkung entfaltet. Da aber bekannt war (Dissertationsarbeit Oliver Bühler), dass sich in der GST-Inv Proteinlösung durch die Aufreinigung des Proteins LPS (ca. 100EU pro μg Protein) befand, konnte somit nicht eindeutig gezeigt werden, dass die KC Induktion nur durch GST-Inv, nicht aber durch in der Präparation befindliches LPS ausgelöst wird. Auch mit gekochtem GST-Inv Protein, bei welchem eine Degradation des Proteins durch ein SDS-PAGE nachgewiesen worden war, konnte teilweise noch KC induziert werden. Die Neutralisierung mit PM war also nicht in jedem Falle erfolgreich und insgesamt waren die Daten zu wenig reproduzierbar, als das eine Aussage über den Zusammenhang zwischen Inv und TLR-2 getroffen werden könnte.

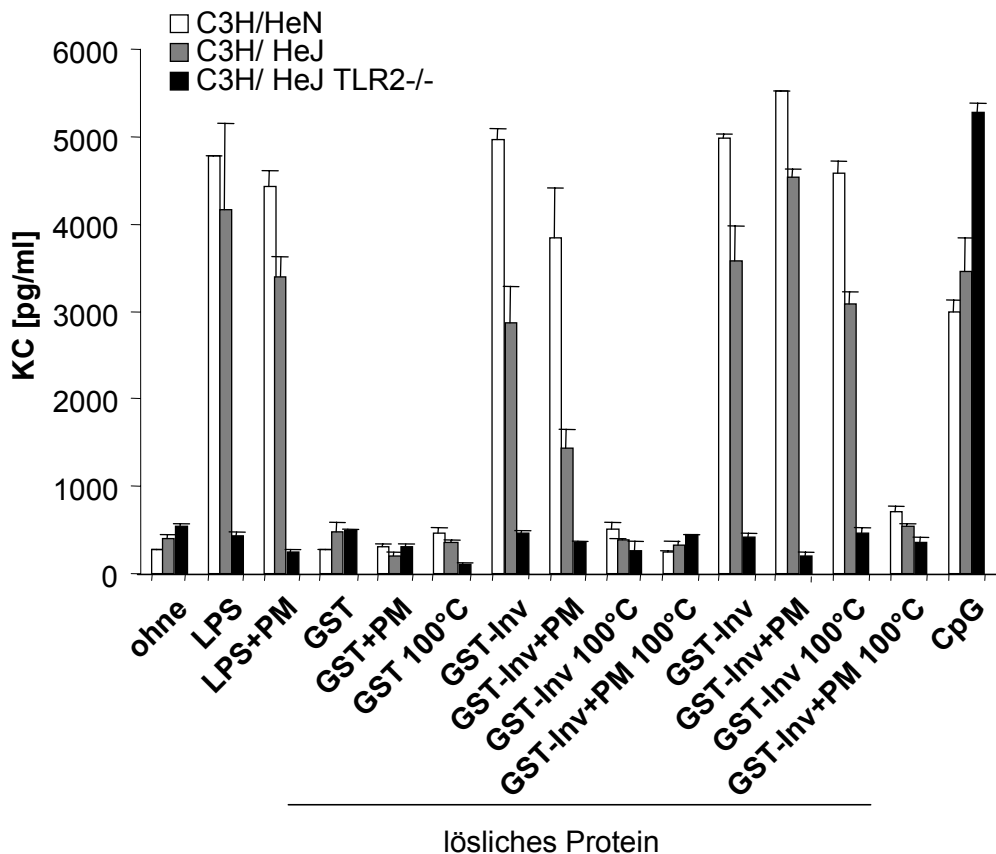


Abb. 19: KC Konzentration nach Stimulation von Wildtyp, TLR-4 defizienten oder TLR-4/ TLR-2 defizienten Mauszellen mit rekombinativem Invasin

Dendritische Zellen (2.2.5.2.) aus Wildtyp (C3H/HeN), TLR-4⁻ (C3H/HeJ) und TLR-4⁻ / TLR2^{-/-} (C3H/HeJ TLR2^{-/-}) Mausstämmen wurden mit löslichem rekombinativem Protein stimuliert und die KC Sekretion nach 4 h mittels ELISA (2.2.2.4.2.) bestimmt. Als Kontrolle wurde mit LPS oder CpG-DNA stimuliert. Zur Neutralisierung des LPS wurde PM verwendet. LPS, Lipopolysaccharid; PM, Polymyxin; GST, Gluthation-S-Transferase Protein (als Kontrolle); GST-Inv, Gluthation-S-Transferase-Invasin Fusionsprotein; 100°C, Protein wurde gekocht; CpG, DNA als Positivkontrolle für Stimulation von TLR-9;

Als weiteren Ansatz wurde auf mehrere Arten versucht die GST-Inv Präparation LPS frei zu machen. Das wurde zunächst mit Polymyxin- Agarose, bei der das LPS an die Polymyxin- Agarose bindet und dann abzentrifugiert werden kann. Bei unseren Versuchen hat aber sowohl LPS als auch GST-Inv an die Polymyxin- Agarose gebunden und somit war es nicht möglich das LPS alleine aus der Proteinpräparation zu entfernen, um eine reine GST-Inv Präparation zu erhalten (ohne Abbildung).

Im Weiteren wurde versucht, das LPS mittels des Detergenzes Triton X114 zu entfernen (Arbeit Oliver Bühler), aber auch dieses Vorhaben führte nicht zum gewünschten Ergebnis, das Protein GST-Inv LPS frei und funktional in ausreichenden Mengen zur Verfügung zu haben. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Kontaminationen wie Lipoproteine in der GST-Inv Präparation vorhanden sind. Lipoproteine wurden schon früher als Kontaminationen in LPS Präparationen gefunden und sind für die Signaltransduktion über TLR-2 verantwortlich (Girardin et al. 2003). Aufgrund dessen, der Inkonsistenz der Ergebnisse und des mangelnden Erfolgs bei der LPS freien GST-Inv Präparation wurden die Arbeiten an diesem Projekt eingestellt.

3.3. Mutation einer Aminosäure im Membrananker von YadA von *Yersinia enterocolitica*

YadA weil es sich bei YadA um einen Autotransporter handelt (Desvaux et al. 2004) und diese Aminosäure in der Membrananker und Autotransporter Domäne lokalisiert ist (Desvaux et al. 2004).

Die Aminosäure Glycin an der Position 389 von *Y. enterocolitica* O:8 YadA ist stark konserviert. Sie kommt in allen YadA Proteinen und in fast allen Proteinen verschiedenster Organismen, die Homologien zu YadA aufweisen (Abb. 20) vor. Da sich diese Aminosäure evolutionär fast nie verändert hat, kann vermutet werden, dass sie eine bestimmte Aufgabe erfüllt. Beispielsweise könnte diese Aminosäure bei dem Einbau des Proteins in die äußere Membran wichtig sein. Um dies zu überprüfen wurden YadA Mutanten hergestellt, die und an der Stelle Gly389 im YadA von *Y. enterocolitica* ein Alanin tragen. Alanin hat die kleinste, unpolare Seitenkette und der Austausch soll somit die geringste strukturelle Veränderung am Protein mit sich bringen.

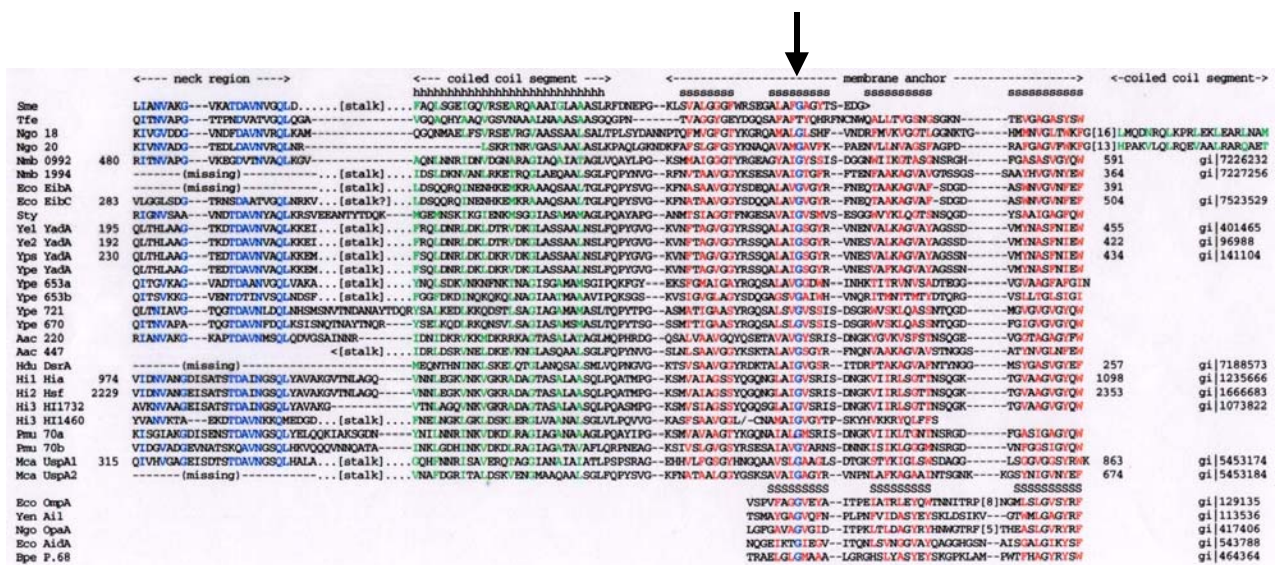


Abb. 20: Sequenzvergleich verschiedener YadA Proteine und verwandeter YadA Proteine
Die Pfeile markieren das stark konservierte Glycin im Membrananker von YadA; Bild: Hoiczky et al. 2000

3.3.1. Konstruktion von pYadA^{O:8} G389A

Der Vektor pYadA^{O:8} wurde mittels *site directed mutagenesis Kit* (stratagene) mutagenisiert. Dazu wurden die primer Roque for und Roque back benutzt, die das Basentriplett ggt gegen gct austauschten und es somit an der Aminosäurestelle 389 nicht zu einem Einbau von Glycin, sondern zum Einbau von Alanin kommt. Die Aminosäure Alanin wurde gewählt, weil Glycin und Alanin beide hydrophobe Aminosäuren sind und Alanin nach Glycin die kleinste, und somit am wenigsten störende Seitenkette besitzt. Die Basenabfolge in dem neu entstandenen Vektor pYadA^{O:8} G389A wurde mittels Sequenzierung überprüft und bestätigt. Der Vektor pYadA^{O:8} G389A wurde in *E. coli* HB101 transformiert und die Expression des mutagenisierten Proteins überprüft.

3.3.2. Überprüfung der Expression von YadA und YadA G389A

Die Bakterien *E. coli* HB101 pNIV136, *E. coli* HB101 pYadA^{O:8} und *E. coli* HB101 pYadA^{O:8} G389A wurden wie unter 2.2.3.6. angezchtet und anschließend Western Blot untersucht (Abb.21). Die Bakterienanzahl wurde vor der Elektrophorese bestimmt und das Gesamtzelllysat auf ein SDS-PAGE aufgetragen.

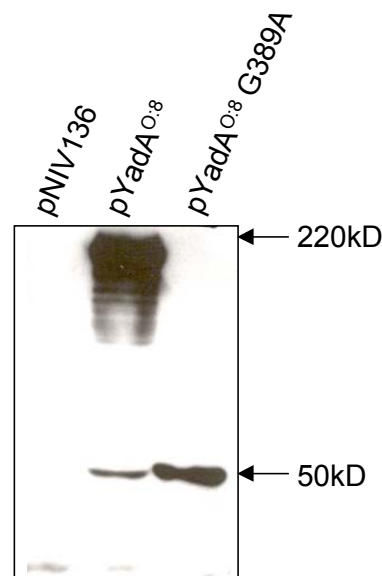


Abb. 21: Expression von YadA und YadA G389A. Die Bakterien wurden auf einem 8%igen SDS-PAGE (2.2.2.1.) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Durch Inkubation der Membran mit anti- YadA (anti-P1.O8) Antikörper wurde die Expression der beiden Proteine untersucht (2.2.2.2). Die Pfeile markieren die Trimerbande von YadA (220kD) und die Monomerbande der Mutante YadA G389A (50kD). pNIV136 (Leervektor)

Nach anschließendem Übertragen der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (2.2.2.2.) wurden, durch Inkubation der Membran mit dem anti-P1.O8 (YadA) Antikörper (2.1.3.) und einem anti-Kaninchen-Peroxidase Antikörper wurden die Proteine detektiert. Die Trimer-Bande (Tahir et al. 2000; Mack et al 1994) des YadA Proteins in Spur 2 war 220kD groß, ein kleinerer Teil des Proteins war auch als Monomerbande bei 50kD zu detektieren. Das mutagenisierte Protein YadA G389A war nur als Monomerbande, bei einer Größe von 50kD zu sehen. Die Expression von YadA G389A konnte gezeigt werden. Als Kontrolle wurden in Spur 1 Bakterien aufgetragen, die den Leervektor pNIV136 trugen. Bei diesem Ansatz konnte mit dem anti-P1.O8 (YadA) Antikörper kein Protein detektiert werden. Durch die Mutation einer einzigen Aminosäure konnte ein verändertes Laufverhalten des Proteins im SDS-PAGE beobachtet werden. Die Proteine der Oca Familie, zu denen YadA zählt, bilden Hitze- stabile Oligomere, die auch im SDS- Gel erhalten bleiben (Roggenkamp and Heesemann 2003). Die Stabilität des Trimers scheint durch den Austausch der Aminosäure Glycin zu Alanin, im SDS-PAGE, stark beeinträchtigt zu werden.

3.3.3. Immunfluoreszenzfärbung der YadA und YadA G389A exprimierenden Bakterien

Um zu untersuchen, ob die beiden Proteine YadA und YadA G389A beide in die äußere Membran eingebaut werden oder unterschiedlich im Bakterium lokalisiert sind, wurden die Bakterien auf runde Deckgläser aufgebracht und fixiert (2.2.4.8.). Danach wurden die Bakterien mit Hilfe von anti-P1.O8 (YadA) und unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abb. 22). *E. coli* pYadA^{O:8} zeigt eine Corona, die bei *E. coli* pYadA^{O:8} G389A nicht zu sehen ist. Dieser Versuch zeigt, dass das mutierte YadA G389A Protein auch innerhalb der Bakterienzelle anders lokalisiert ist, als das YadA Wildtyp Protein. YadA G389A befindet sich gleichmäßig überall im Bakterium, während beim Wildtyp YadA eine vermehrte Lokalisation am Rand des Bakterium zu erkennen ist. Die Mutation der Aminosäure Glycin zu Alanin an der Stelle 389 im YadA O:8 führt als zu einer veränderten Lokalisation des Proteins im Bakterium.

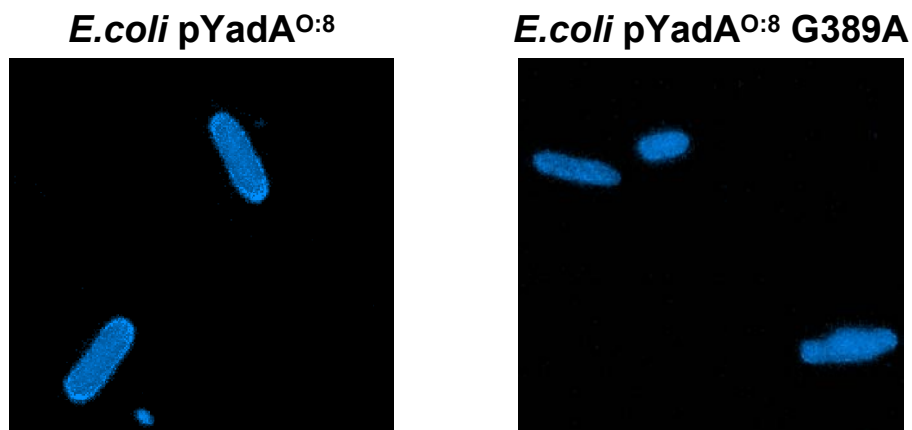


Abb. 22: Immunfluoreszenzfärbung von *E. coli* pYadA^{O:8} und *E. coli* pYadA^{O:8} G389A
Die Bakterien wurden angezüchtet, induziert und mit anti-YadA (anti-P1.O8) und anti-rabbit-cy5 Antikörper als Zweitantikörper gefärbt (2.2.4.8.).

3.3.4. Funktionelle Untersuchung der IL-8 Induktion von YadA G389A in HeLa Zellen

Um die Funktionalität von YadA G389A zu untersuchen wurden, HeLa Zellen mit *E. coli* pNIV136, *E. coli* pYadA^{O:8} und *E. coli* pYadA^{O:8} G389A infiziert und nach 4 Stunden die IL-8 Konzentration gemessen. In Abbildung 23 ist die Menge an sekretiertem IL-8 nach Infektion mit YadA G389A- exprimierenden Bakterien fast genauso hoch wie nach Infektion mit YadA- exprimierenden Bakterien. Das bedeutet, dass die Mutation von YadA zu YadA G389A, also der Austausch einer Aminosäure, keine Auswirkungen auf die Funktionalität des Proteins in Bezug auf die Stimulation der IL-8 Sekretion hat.

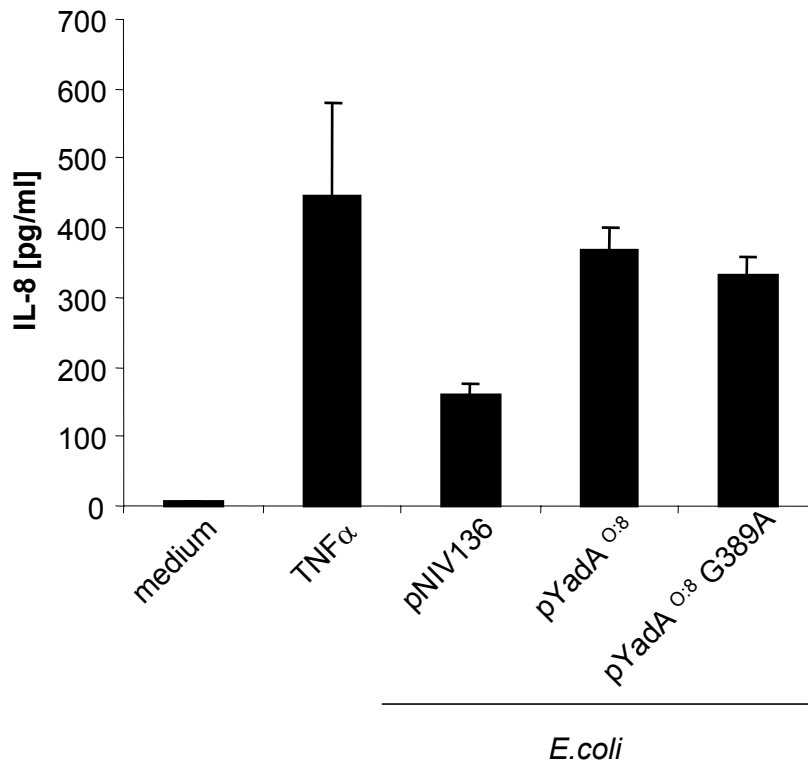


Abb. 23: IL-8 Konzentration nach Infektion mit YadA- oder YadA G389A- exprimierenden Bakterien

HeLa Zellen wurden mit *E. coli* pNIV136, *E. coli* pYadA^{O:8} und *E. coli* pYadA^{O:8} G389A infiziert (MOI 100) und die sekretierte Menge an IL-8 im Überstand mittels ELISA (2.2.2.4.1.) 4h nach der Infektion bestimmt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit TNF- α stimuliert oder unstimuliert belassen.

3.3.5. Konstruktion weiterer Mutanten mit größeren destruktiven Effekten

Nachdem der Austausch der Aminosäure Glycin zu Alanin keinen Effekt auf die Funktionalität des Proteins hatte, wurden weitere Mutanten mit größeren destruktiven Effekten hergestellt. Dazu wurde wieder der Vektor pYadA^{O:8} benutzt und mittels *site directed mutagenesis Kit* (stratagene) mutagenisiert. Die Aminosäure Glycin an der Stelle 389 wurde durch Serin, Threonin oder Histidin ersetzt. Die Aminosäuren Serin und Threonin wurden ausgewählt, weil diese hydrophilere und etwas größere Seitenketten als Alanin haben und deshalb größere Auswirkungen auf die Faltung des Proteins erwartet werden können. Histidin hat eine stark hydrophile Seitenkette, und durch den Imidazolring werden größere Effekte bezüglich Faltung und Transport der Proteins erwartet.

Für die Mutagenese wurden die Oligonukleotide YadA Gly zu Ser for bzw. back, YadA Gly zu His for bzw. back und YadA Gly zu Thr for bzw. back benutzt, die die Basentriplets ggt gegen agt für Serin, cat für Histidin und act für Threonin austauschten und es somit an der

Aminosäurestelle 389 nicht zu einem Einbau von Glycin, sondern zum Einbau von Serin, Histidin oder Threonin kommt. Die Basenabfolge in den neu entstandenen Vektoren pYadA^{O:8} G389S, pYadA^{O:8} G389H und pYadA^{O:8} G389T wurde mittels Sequenzierung überprüft und konnte bestätigt werden. Die Vektoren pYadA^{O:8} G389S, pYadA^{O:8} G389H und pYadA^{O:8} G389T wurden anschließend in *E. coli* HB101 transformiert und die Expression der mutagenisierten Proteine überprüft.

In Abbildung 24 wurden *E. coli* HB101 pNIV136, *E. coli* HB101 pYadA^{O:8}, *E. coli* HB101 pYadA^{O:8} G389A, *E. coli* HB101 pYadA^{O:8} G389S, *E. coli* HB101 pYadA^{O:8} G389H und *E. coli* HB101 pYadA^{O:8} G389T durch Western Blot analysiert. Die Trimer-Bande des YadA Proteins in Spur 2 war 220kD groß, ein kleinerer Teil des Proteins war auch als Monomerbande bei 50kD zu detektieren. Die beiden mutagenisierte Proteine YadA G389A und YadA G389S waren als Monomerbande bei einer Größe von 50kD zu sehen. Die Expression der beiden Proteine YadA G389A und YadA G389S konnte nachgewiesen werden, während die beiden Proteine YadA G389H und YadA G389T nicht detektiert werden konnten.

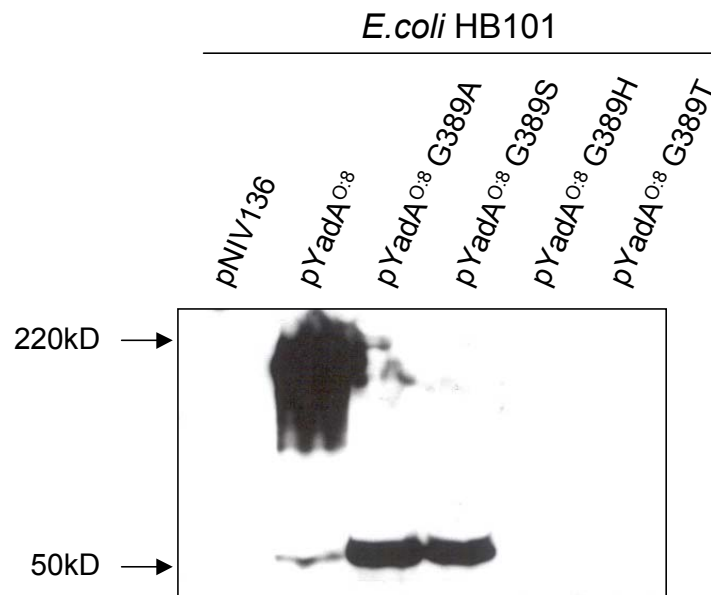


Abb. 24: Expression von YadA und Yad- Mutanten

Die Bakterien wurden auf einem 8%igen SDS-PAGE (2.2.2.1.) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Durch Inkubation der Membran mit anti- YadA (anti-P1.O8) Antikörper wurde die Expression der beiden Proteine untersucht (2.2.2.2.). Die Bakterienanzahl wurde vor der Elektrophorese mittels Photometer bestimmt und die Proben auf die gleiche Bakterienanzahl eingestellt. Die Pfeile markieren die Trimerbande von YadA (220kD) und die Monomerbande der Mutante YadA G389A und YadA G389S (50kD). pNIV136 (Leervektor)

Als Kontrolle wurde in Spur 1 Bakterien aufgetragen, die den Leervektor pNIV136 tragen. Bei diesem Ansatz konnte mit dem anti-P1.O8 (YadA) Antikörper kein Protein detektiert werden. Das Protein YadA G389S ist in der Stabilität des Trimers im SDS-Gel ebenso beeinflusst, wie das schon zuvor untersuchte Protein YadA G389A.

Da die Expression der Proteine YadA G389H und YadA G389T nicht nachgewiesen werden konnte, wurden die beiden Vektoren durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* überprüft (Abb. 25) um nachzuweisen, dass das *yadA*-Gen in den Vektoren pYadA^{O:8} G389H und pYadA^{O:8} G389T vorhanden war. Da dieses Enzym sowohl im Vektoranteil als auch im *yadA*-Gen des Vektors pYadA^{O:8} schneidet, sollten durch die Restriktion zwei DNA Fragmente entstehen, wenn *yadA* im Vektor enthalten ist. In allen Spuren des Agarosegels konnten zwei DNA Fragmente in den erwarteten Größen nachgewiesen werden. In der Spur 1 war nur der Leervektor pNIV136, der zuvor mit *EcoRV* geschnitten worden war aufgetrennt, dieser zeigt nur eine DNA Bande, weil hier auch kein *yadA* Gen im Vektor vorhanden war.

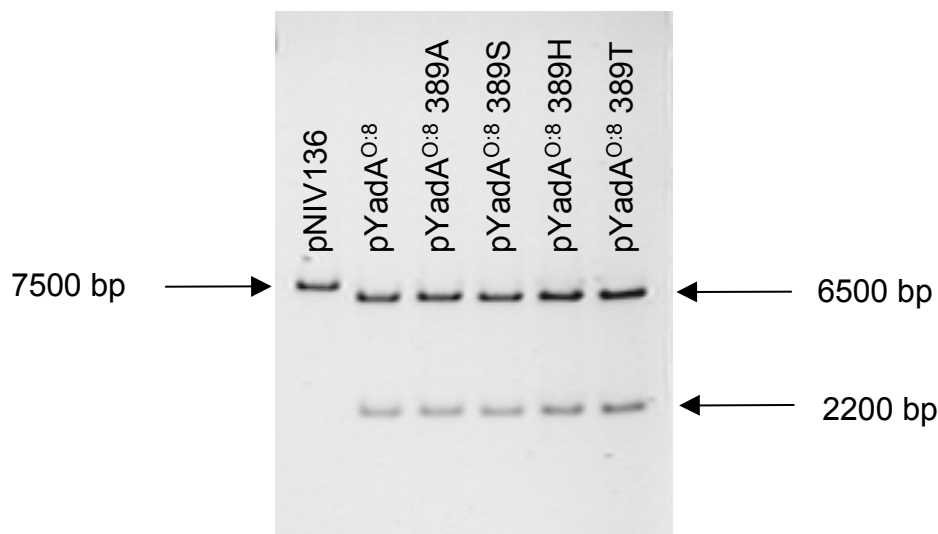


Abb. 25: Restriktionsverdau zur Überprüfung der Anwesenheit des *yadA*-Gens

Die Vektoren pNIV136, pYadA^{O:8}, pYadA^{O:8} G389A, pYadA^{O:8} G389S, pYadA^{O:8} G389H und pYadA^{O:8} G389T wurden mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* geschnitten und auf einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt um die Anwesenheit des *yadA* Gens zu überprüfen. Größe von pNIV136 ist 7500bp. Die Größe der Vektoren pYadA^{O:8}, pYadA^{O:8} G389A, pYadA^{O:8} G389S, pYadA^{O:8} G389H, pYadA^{O:8} G389T beträgt jeweils 8700bp. *EcoRV* schneidet einmal im Vektor pNIV136 und einmal im *yadA*-Gen.

Es konnte somit gezeigt werden, dass in allen Vektoren, außer pNIV136, das *yadA* Gen vorhanden war, obwohl ein Nachweis auf Proteinebene bei pYadA^{O:8} G389H und pYadA^{O:8} G389T nicht erbracht werden konnte.

Daraufhin wurden diese Mutanten ebenfalls auf ihre Fähigkeit IL-8 in HeLa Zellen zu induzieren untersucht (Abb. 26).

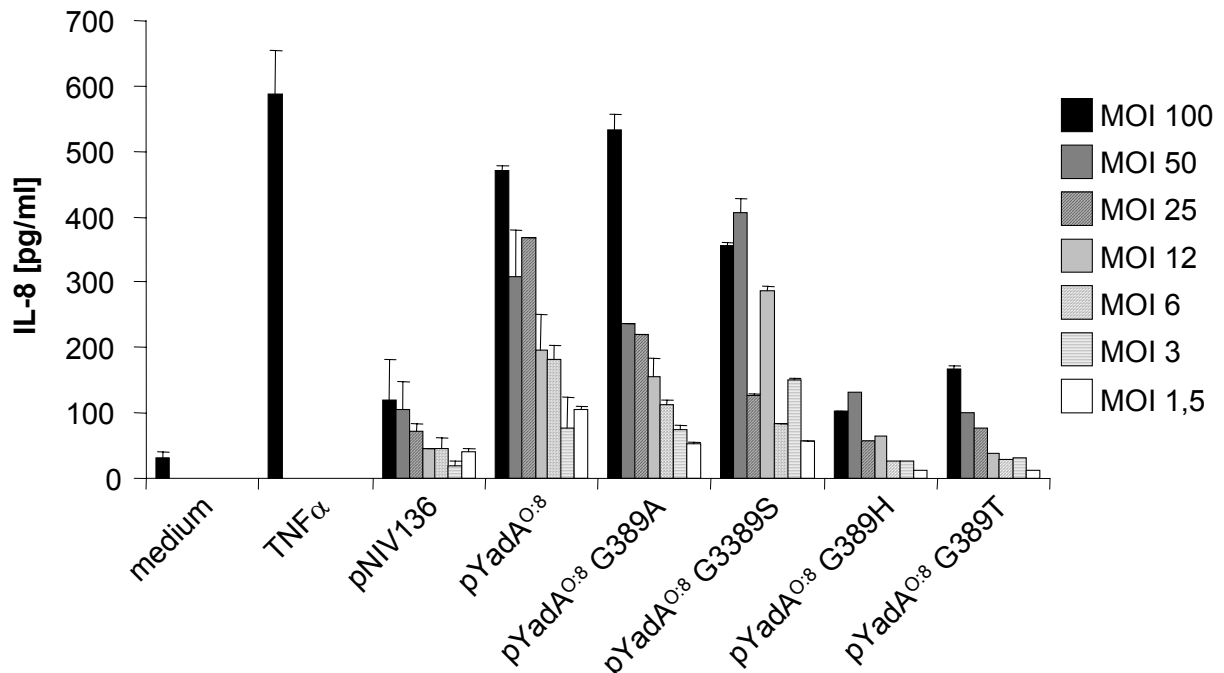


Abb. 26: IL-8 Sekretion nach Infektion mit YadA- oder YadA Mutanten- exprimierenden Bakterien

HeLa Zellen wurden mit *E.coli* pNIV136, *E.coli* pYadA^{O:8}, *E.coli* pYadA^{O:8} G389A, *E.coli* pYadA^{O:8} G389S, *E.coli* pYadA^{O:8} G389H und *E.coli* pYadA^{O:8} G389T mit verschiedenen MOIs infiziert und die sekretierte Menge an IL-8 im Überstand mittels ELISA (2.2.2.4.1.) 4h nach der Infektion bestimmt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit TNF- α stimuliert oder unstimuliert belassen.

Die Bakterien *E.coli* pYadA^{O:8}, *E.coli* pYadA^{O:8} G389A, *E.coli* pYadA^{O:8} G389S konnten die Zellen dosisabhängig zur Sekretion von IL-8 stimulieren. Die beiden Mutanten *E.coli* pYadA^{O:8} G389H und *E.coli* pYadA^{O:8} G389T konnte die Zellen nur zu einer IL-8 Sekretion auf Hintergrundniveau, wie bei *E.coli* pNIV136, stimulieren. Da diese Proteine sehr wahrscheinlich nicht exprimiert werden kommt es auch zu keiner Ausschüttung von IL-8 in den Zellen.

3.3.6. Klonierung der Mutanten in einen Anhydrotetracyclin (AHT)- induzierbaren Vektor pASK-IBA2

Der Vektor pASK-IBA2 erlaubt die kontrollierte Expression von Proteinen. Mit Hilfe des Vektors pASK-IBA2 ist es die Expression des Proteins im uninduzierten Zustand gering und kann mit geringsten Mengen von Anhydrotetracyclin (AHT) langsam induziert werden.

YadA, YadA G389A und YadA G389S wurden in den Vektor pASK-IBA2 kloniert. Das Plasmid pASK-IBA2 wurden dazu mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *SalI* geöffnet. Die Vektoren pYadA^{O:8}, pYadA^{O:8} G389A und pYadA^{O:8} G389S wurden ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen verdaut und die Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt. Nach erfolgter Auftrennung wurden die DNA Fragmente mit der richtigen Größe aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels Qiaquick Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die vorliegenden Fragmente wurden in den geöffneten Vektor ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Die Klone wurden zur Expression in den Stamm *E. coli* HB101 transformiert. Vor der Transformation wurde die Plasmid DNA mittels Restriktionsverdau mit *XbaI* und *SalI* kontrolliert und es konnte gezeigt werden, dass das gewünschte DNA Fragment im Vektor vorhanden war.

Die Bakterienstämme *E.coli* HB101 pASK-IBA2 YadA^{O:8}, *E.coli* HB101 pASK-IBA2 YadA^{O:8} G389A und *E.coli* HB101 pASK-IBA2 YadA^{O:8} G389S wurden nun auf die Expression von YadA, YadA G389A bzw. YadA G389S mittels Western Blot untersucht (Abb. 27). Dazu wurden die Bakterien angezchtet 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180 und 240min nach der Induktion mit AHT Proben entnommen und diese auf ein SDS-Polyacrylamid- Gel geladen. In Abbildung 27A ist der Western Blot der Kinetik der YadA-exprimierenden Bakterien zu sehen. Das YadA Protein, ist sogar schon zu einem kleinen Anteil 10min nach der Induktion mit AHT als Trimerbande zu detektieren. Die Proteinmenge stieg mit zunehmender Induktionsdauer an und war dann auch zu einem kleinen Anteil als Monomerbande zu sehen. Das YadA G389A Protein, welches in dem Vektor pASK-IBA2 exprimiert wurde (Abb. 27B) ist im Gegensatz zu vorherigen Versuchen mit dem IPTG-induzierbaren pNIV136, ebenfalls als Trimer- und Monomerbande zu sehen. Das Protein konnte schon 10min nach der Induktion detektiert werden. YadA G389S war auch in diesem Vektorsystem nach Induktion als Monomerbande zu sehen (Abb. 27C).

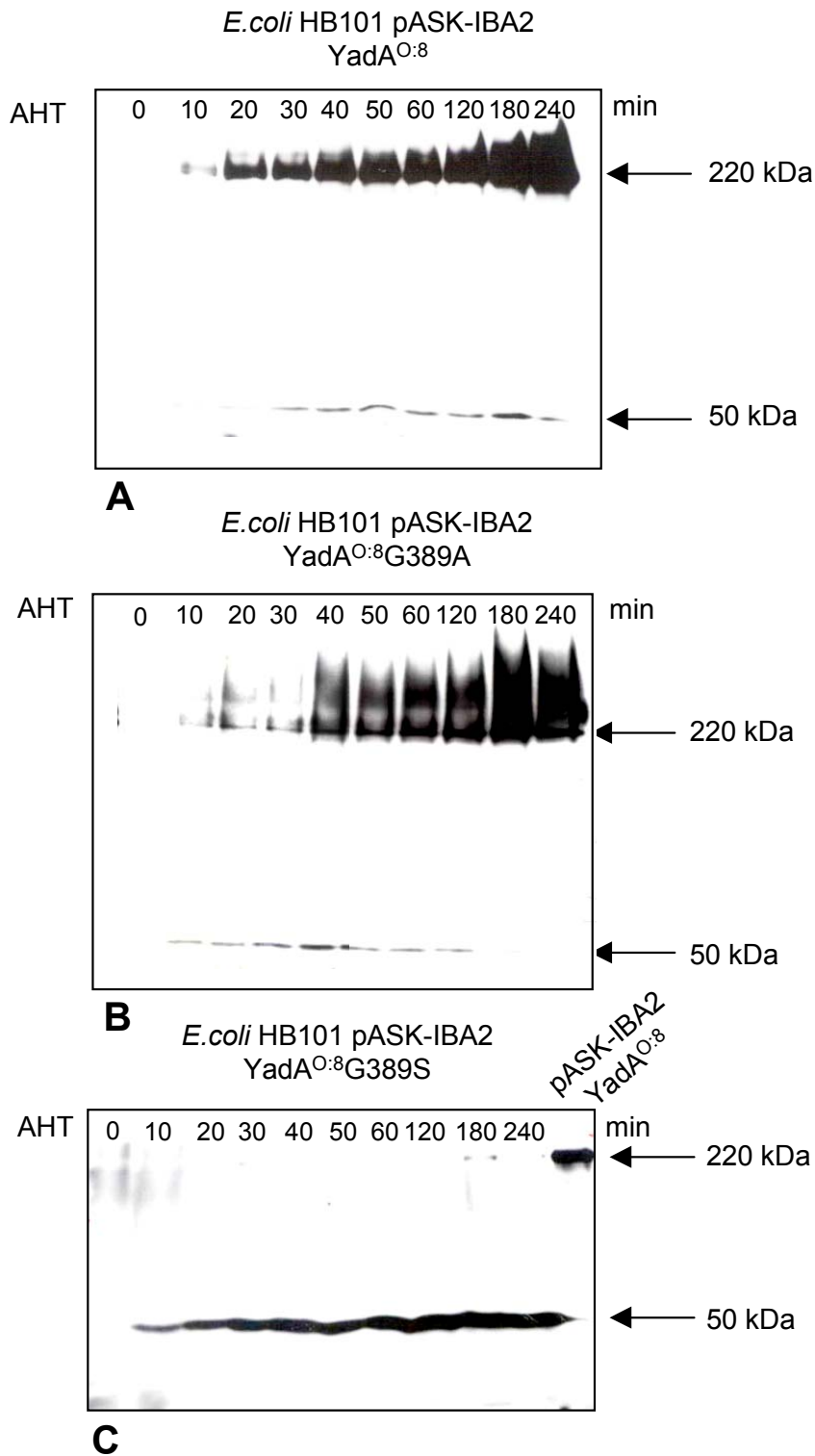


Abb. 27: Kinetik der Expression von YadA, YadA G389A und YadA G389S im Vektor pASK-IBA2

Die Bakterien wurden mit Anhydrotetracyclin (AHT) induziert und nach 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180 und 240 min Proben entnommen. Die Bakterien wurden auf einem 8%igen Polyacrylamid (PAA)-Gel (2.2.2.1.) aufgetrennt und anschliessend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und ein Immunblot mit anti-P1.O8 (YadA) durchgeführt (2.2.2.2.). Die Bakterienanzahl wurde vor der Elektrophorese mittels Photometer bestimmt und die Proben auf die gleiche Bakterienanzahl eingestellt. Die Pfeile markieren die Trimer- und Monomerbande von (A) YadA, (B) YadA G389A und die Monomerbande von (C) YadA G389S.

Bei YadA G389S war die 50kDa Monomerbande nach 10min detektierbar. In der letzten Spur in der Abbildung 27C ist zum Größenvergleich *E.coli* HB101 pASK-IBA2 YadA^{O:8} aufgetragen, welches als 220kD Bande zu sehen ist.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Proteine YadA, YadA G389A und YadA G389S auch im AHT induzierbaren pASK-IBA2 exprimiert werden. Im uninduzierten Zustand können die Proteine kaum detektiert werden, was die gut kontrollierbare Expression zeigt. Die Trimerbande beim YadA zeigt, dass die langsamere und gezieltere Induktion der Proteinexpression im pASK-IBA2 wahrscheinlich zu einer besseren Faltung des Proteins führt. Damit hat das Protein genügend Zeit sich trotz Alanin anstelle von Glycin richtig zu falten. Dieses Vektorsystem ist geeignet die Mutanten weiter zu charakterisieren und durch weitere Versuche die Rolle des Glycin an der Stelle 389 im YadA Protein besser zu verstehen.

4. Diskussion

4.1. YadA vermittelt die IL-8 Induktion in Epithelzellen

Die Pathogenität von *Yersinien* ist durch eine Vielzahl verschiedener Plasmid- und chromosomal kodierter Faktoren bestimmt (Cornelis 1994; Cornelis et al. 1998; Cornelis 2002). Zu den Virulenzfaktoren gehören der Typ III Sekretionsapparat, die Yersinia outer proteins (YOPs) und äußere Membranproteine wie z.B. Invasine und Adäsine. Zu diesen zählen der Attachment- Invasion Locus (AIL), Invasin (Inv) und das Yersinia Adäsin A (YadA).

Die Infektion von epithelialen Zellen mit *Y. enterocolitica* führt zur Expression einer Vielzahl von Genen in diesen Zellen, darunter sind auch Gene, die für proinflammatorische Moleküle, wie z. B. IL-8 kodieren (Bohn et al. 2004). Durch die Analyse von Mutanten wurde gezeigt, dass Inv einer der Hauptfaktoren darstellt, der die IL-8 Expression und Sekretion auslöst. Plasmid- kodierte Faktoren, z. B. YopP sind in der Lage der proinflammatorischen Antwort entgegen zu wirken, (Bohn et al. 2004). Die Induktion einer proinflammatorischen Antwort durch Inv ist von der β 1-Integrin-vermittelten Adhäsion an die Wirtszellen abhängig. Da es Hinweise gab, dass YadA ebenfalls über β 1- Integrine an Zellen adhäriert vermutet, dass YadA ebenfalls eine proinflammatorischen Antwort induzieren könnte. Experimente aus dieser Arbeit bestätigen diese Annahme und zeigen, dass auch YadA die IL-8 Sekretion induzieren kann. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass wie bei Inv, auch β 1-Integrine an diesem Prozess beteiligt sind. Im Weiteren wurden der Weg der Signaltransduktion und die daran beteiligten Moleküle im Inneren der Wirtszelle untersucht. Es stellte sich heraus, dass dieselben Komponenten beteiligt sind, nämlich Rho GTPasen und die MAP Kinasen MEK1, JNK und p38, welche auch bei der Signaltransduktion, die durch Inv ausgelöst wird, eine Rolle spielen (Grassl et al. 2003).

In den ersten Versuchen sollten die beiden äußeren Membranproteine von *Y. enterocolitica* YadA und Inv in Bezug auf Adhäsion und Invasionsfähigkeit miteinander verglichen werden. Dazu wurden YadA und Inv in das gleiche Vektorsystem kloniert und entweder in *E. coli* oder plasmidlosen Yersinienstämmen exprimiert, so dass keine pYV- kodierten Virulenzfaktoren von *Y. enterocolitica* Einfluss auf die Ergebnisse haben. In den Versuchen,

die mit Inv und YadA überexprimierenden *E. coli* gemacht wurden, ist die Inv und YadA vermittelte Adhäsion an Fibroblasten effektiver als an HeLa Zellen. Indem die Fibroblasten Zelllinie GD25 (Fassler et al. 1995), welche keine β 1-Integrine auf ihrer Oberfläche exprimiert und die Zelllinie GD25- β 1A (Wennerberg et al. 1996) welche β 1-Integrine überexprimiert, für die Experimente benutzt wurden, konnte die Beteiligung von β 1- Integrinen in der YadA vermittelten Adhäsion von *Yersinien* an Zellen direkt gezeigt werden. Übereinstimmend mit den Arbeiten von anderen Gruppen (Bliska et al. 1993, Eitel et al. 2002) kann festgestellt werden dass, β 1-Integrine an der durch YadA- vermittelten Bindung von *Yersinien* an Zellen, beteiligt sind.

Es wurde gezeigt, dass *Y. pseudotuberculosis* YadA sehr effizient die Invasion in Epithelzellen vermitteln kann, wenn es entweder in *E. coli* überexprimiert wird, oder wenn *Y. pseudotuberculosis* unter bestimmten Wachstumsbedingungen angezüchtet wird (Eitel et al. 2002). Dieser Prozess kann durch neutralisierende Antikörper gegen β 1-Integrine oder Fibronectin blockiert werden. Dieses Ergebnis führte zu der Vermutung, dass die *Y. pseudotuberculosis* YadA vermittelte Invasion über extrazelluläre Matrix- (ECM) Proteine verläuft. Für *Y. enterocolitica* YadA ist beschrieben, dass YadA an die ECM Moleküle Fibronectin, Laminin und Kollagen bindet (Flügel et al. 1994; Tahir et al. 2000). Da diese Moleküle ebenfalls an β 1-Integrine binden, liegt die Vermutung nahe, dass die Bindung von YadA an β 1-Integrine über ein so genanntes Brückenmolekül stattfindet. Wie früher beschrieben (Heesemann and Grüter 1987), aber im Widerspruch zu den Daten von *Y. pseudotuberculosis* (Eitel et al. 2002), vermittelt *Y. enterocolitica* YadA auch wenn es überexprimiert wird, nur eine geringe Aufnahme in HeLa Zellen. Die Aufnahme der Bakterien in Epithelzellen über *Y. enterocolitica* YadA ist im Gegensatz zu *Y. enterocolitica* Inv um das 18- fache geringer. Der Grund für den Unterschied der Invasivität der beiden YadA Moleküle von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* ist unklar. Die Aminosäuresequenzen beider YadA Moleküle ist sehr ähnlich, allerdings gibt es zwei zusätzliche Aminosäuresequenzen in der Kopfdomäne von *Y. pseudotuberculosis* YadA und eine zusätzliche Sequenz im Stamm („stalk“) von *Y. enterocolitica* YadA. Es ist möglich, dass diese Sequenzunterschiede für die unterschiedliche Fähigkeit der beiden YadA Proteine, Zellen zu invadieren, verantwortlich sein könnten. Um dies zu klären müssten weitere Studien mit Hybridproteinen, in welchen einzelne Bereiche der YadA Proteine von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* ausgetauscht wurden gemacht werden.

Die Bindung von *Y. enterocolitica* Inv an β 1- Integrine vermittelt Adhäsion und vermittelt dadurch die Aufnahme der Bakterien in die Wirtszelle (Isberg and Barnes 2001). Frühere Studien haben gezeigt, dass die Adhäsion von Inv- exprimierenden *Y. enterocolitica* an epitheliale Zellen für eine Induktion der IL-8 Sekretion notwendig ist (Kampik et al. 2000; Schulte et al. 1998; Schulte and Autenrieth 1998). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von *Y. enterocolitica* YadA im gleichem Vektor wie Inv, ebenfalls zur Ausschüttung von IL-8 in den infizierten Zellen führt. YadA und Inv induzieren beide die IL-8 Ausschüttung, aber nur Inv vermittelt die effiziente Aufnahme in die Zellen. Dadurch werden frühere Ergebnisse bestätigt, welche zeigen, dass nur die Adhäsion nicht aber die Invasion von *Y. enterocolitica* nötig ist, um die IL-8 Sekretion über β 1- Integrine zu induzieren. Die Bindung von Inv an β 1-Integrine führt in den Wirtszellen zur Umlagerung des Zytoskeletts und nachfolgender Internalisierung der Bakterien in die Wirtszelle (Young et al. 1992). Aufgrund dieser Daten konnte geschlossen werden, dass es zwei Signalwege gibt. Ein Weg führt zur Aktivierung von NF- κ B wodurch es zur Transskription von IL-8 kommt und über den zweiten Weg kommt es zur Aktivierung der PI3-Kinase, was zur Internalisierung der Bakterien führt (Schulte et al. 2000). Man kann nun vermuten, dass für YadA die Induktion der IL-8 Ausschüttung, wie bei Inv auch unabhängig von der Invasion ist. Dadurch kann erklärt werden, dass die YadA vermittelte IL-8 Ausschüttung gleich stark wie die Inv-vermittelte IL-8 Ausschüttung ist, obwohl die Affinität an β 1-Integrine von Inv höher zu sein scheint, als die von YadA.

Tahir et al. haben gezeigt, dass die NSVAIG-S Motive in der N- terminalen Hälfte des YadA Proteins für die Bindung an Kollagen wichtig sind (Tahir et al. 2000). Kristallisationsstudien haben gezeigt, dass sich die NSVAIG-S Motive die sich im Inneren des YadA Trimers befinden, für die Kollagenfasern nicht zugänglich sind und somit diese Motive nur indirekt an der Kollagenbindung beteiligt sein können (Nummelin et al. 2004). Die Mutation dieser Motive (pYMS4505-M6, pYL8) führen zu konformalen Änderungen in der Kopf Domäne des YadA Proteins und wodurch die Kollagenbindefähigkeit verloren geht (Nummelin et al. 2004). Interessanterweise ist die Bindung an Laminin und Fibronectin bei diesen Mutanten nicht beeinflusst (Tahir et al. 2000). Somit scheint die Bindung an die ECM Proteine Laminin und Fibronectin unabhängig von der Trimerisierung des YadA Proteins zu sein, die von YadA an Kollagen jedoch schon.

Versuche mit den YadA NSVAIG-S Mutanten (pYMS4505-M6, pYL8), die in einem *Y. enterocolitica* Stamm ohne pYV- Plasmid und ohne Inv exprimiert worden waren, haben

gezeigt, dass diese Bakterien nicht mehr an Epithelzellen adhären können und auch keine IL-8 Sekretion mehr auslösen. Die Adhäsion der Bakterien an Zellen, die durch die Expression von Inv und YadA erreicht wird, ist somit, wie bei Inv auch bei YadA ausschlaggebend für die IL-8 Sekretion. Für HeLa Zellen konnte eine höhere Adhäsion von YadA- exprimierenden *E. coli* als für Inv- exprimierenden *E. coli* an die Zellen gezeigt werden. Untersuchungen des zeitlichen Ablaufs der IL-8 Sekretion nach Infektion von HeLa Zellen mit YadA- oder Inv- exprimierenden Bakterien haben gezeigt, dass durch YadA eine langsamere IL-8 Sekretion induziert wird, als dies bei Stimulation durch Inv der Fall ist. Dies scheint im Gegensatz zur höheren Adhäsionsfähigkeit von YadA zu stehen und kann bedeuten, dass YadA nicht so effizient in der Induktion der IL-8 Sekretion wie Inv ist. Außerdem ist es möglich, die YadA vermittelte Adhäsion und IL-8 Sekretion durch blockierende β 1- Integrin Antikörper besser zu unterbinden, als das bei der durch Inv vermittelten Adhäsion und IL-8 Sekretion erreicht werden kann. Da bekannt ist, dass Inv eine etwa 100- fach (Hamburger et al. 1999) stärkere Affinität zu β 1-Integrinen, als der natürliche Ligand Fibronectin hat, kann die weniger effiziente IL-8 Induktion durch YadA bedeuten, dass die Affinität von YadA zu β 1-Integrinen nicht so stark ist wie die von Inv. Wie schon erwähnt, gibt es Hinweise darauf, dass die Bindung von YadA an β 1-Integrine möglicherweise nicht direkt, sondern über ein weiteres Molekül, wie z. B. Fibronectin, erfolgt. Die Bindung an β 1- Integrine über ECM Proteine könnte die effizientere Adhäsion, die verzögerte IL-8 Induktion und die höheren Blockierkapazitäten der anti- β 1- Integrin Antikörper erklären.

Die Beteiligung von β 1- Integrinen bei der Inv- und YadA- vermittelten IL-8 Sekretion impliziert, dass möglicherweise der Weg der Signaltransduktion im Inneren der Wirtszelle für die beiden proinflammatorischen Antworten der gleiche sein könnte. Durch die Vernetzung der Rezeptoren (*crosslinking*) durch Antikörper wurde schon früher gezeigt, dass β 1- Integrine an der Signalkaskade über Rac1 und MAP Kinase p38, die letztlich zu einer IL-8 Sekretion der Wirtszelle führt, beteiligt sind (Schulte et al. 2000b). Für die Inv- vermittelte IL-8 Induktion wurde gezeigt, dass Rac1 an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B beteiligt ist, und dass durch Inv die MAP Kinasen p38 JNK und MEK1 aktiviert werden. Der Vergleich der YadA und Inv vermittelten IL-8 Induktion in dieser Studie hat gezeigt, dass auch in der YadA- vermittelten Signalweiterleitung diese Moleküle wie bei Inv- induzierten NF- κ B Aktivierung beteiligt sind. Weitere Studien zeigen eine Beteiligung der Focal Adhesion Kinase (FAK), c-Src und der kleinen GTPase Ras im Invasions- und IL-8

Sekretionsprozess bei Zellen, die durch YadA von *Y. pseudotuberculosis* stimuliert worden waren (Eitel et al. 2005).

Zusammenfassend trägt YadA neben einer Vielzahl anderer biologischer Eigenschaften wie Serumresistenz (Ballingand et al. 1985; China et al. 1993; el Tahir and Skurnik 2001), das Auslösen von Arthritis (Gripenberg-Lerche et al. 1994) und Vermittlung der Adhäsion an epitheliale Zellen (Heesemann and Grüter 1987), ebenfalls zur proinflammatorischen Antwort des Wirts auf die Infektion durch *Y. enterocolitica* bei. Die Faktoren, die eine proinflammatorische Antwort auslösen, scheinen bei *Yersinia* relativ redundant zu sein. Da mehrere Moleküle wie Inv, YadA, YopB und LPS beschrieben sind, die in unterschiedlichen Zelltypen die Sekretion des Zytokins IL-8 auslösen, muss die *in vivo*-Rolle jedes Einzelnen in Zukunft sicherlich noch weiter untersucht werden. Diese Untersuchungen sollten die Faktoren von *Y. enterocolitica*, die der proinflammatorischen Antwort entgegenwirken, miteinbeziehen. Zusammengefasst zeigen die Versuche dieser Arbeit eine Beteiligung von Rho GTPasen, MEK1, JNK und p38 MAP Kinase an der Signaltransduktion von den $\beta 1$ -Integrinen zur NF- κ B Aktivierung, welche schließlich zu einer proinflammatorischen Antwort und somit zur Sekretion von IL-8 führt (Abb. 28).

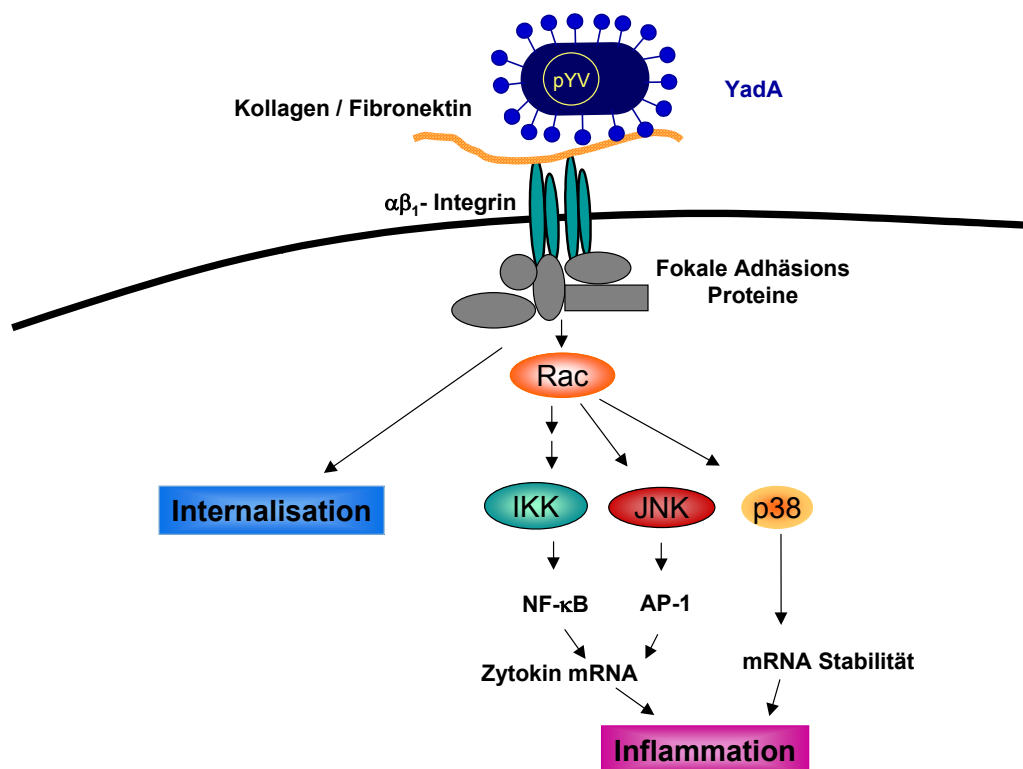


Abb.:28 Signaltransduktionskaskade der YadA- stimulierten Wirtszellaktivierung.

4.2. Gibt es eine Inv-vermittelten proinflammatorischen Antwort über einen β 1- Integrin unabhängigen Weg?

Das angeborene Immunsystem kann zwischen Gruppen von Krankheitserregern mittels Transmembranproteinen, den sogenannten Toll- like Rezeptoren (TLRs), unterscheiden. Die Liganden der TLRs sind sogenannte PAMPs (*Pathogen- Associated Molecular Pattern*), wie z.B. LPS (Hirschfeld et al. 1999; Tapping and Tobias 2000), Flagelin (Hayashi et al.2001), Lipoproteine (Aliprantis et al.1999; Brightbill et al. 1999; Lien and Yoshimura 1999; Hirschfeld et al. 1999; Thoma-Uszynski and Takeuchi 2001), Peptidoglycan und Lipoteichonsäuren (Schwander and Kirschning 1999; Yoshimura and Golenbock 1999) oder bakterielle CpG- DNA (Hemmi et al. 2000).

Die Bindung von Inv an β 1-Integrine und die darauf folgende Signaltransduktion im Inneren der Zelle, wurde bereits früher eingehend untersucht (Isberg and Barnes 2001). Dabei wurde festgestellt, dass eine hohe Integrin-Konzentration auf den Bakterien nötig ist um eine Singaltransduktion in der Zelle zu induzieren. Es ist also nötig, dass mehrere Invasinmoleküle an nebeneinanderliegende Rezeptoren auf der Zelloberfläche der eukaryontischen Zelle binden um die Induktion von IL-8 zu erreichen. Schulte et al. haben gezeigt, dass die Substatkonzentration durch Zugabe von löslichem Inv zu den Zellen nicht hoch genug zu sein scheint um eine Signaltransduktion und somit IL-8 Sekretion zu erreichen (Abb. 29).

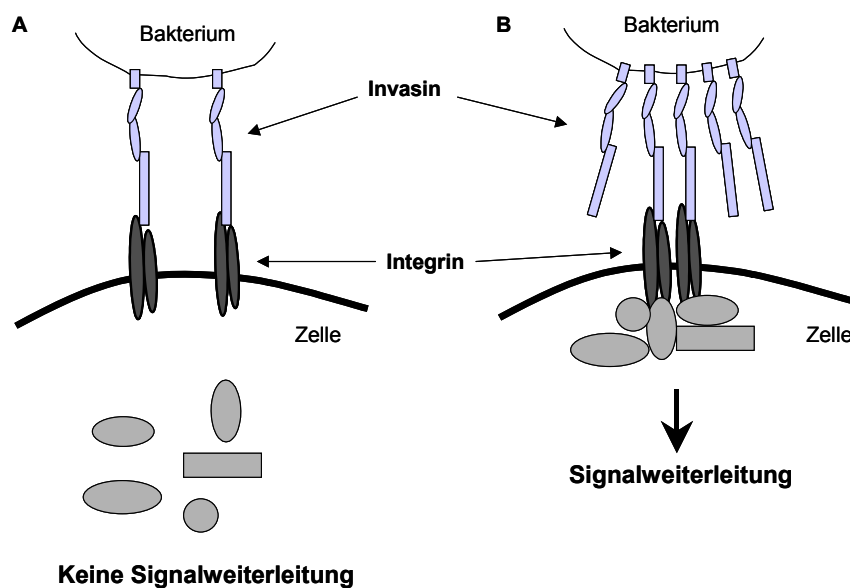


Abb. 29. Einfluss der Substratkonzentration auf die Signalkonzentration in der Zelle (Isberg and Barnes 2001) (A) geringe Substratdichte auf der bakteriellen Oberfläche führt zur Bindung von Invasin an β 1-Integrine aber keiner Signalweiterleitung im Inneren der Zelle. (B) Bakterien mit hoher Invasinkonzentration (Substratdichte) können die Rezeptoren aggregieren und es kommt somit zu einer Weiterleitung der Signals in der eukaryontischen Zelle

In diesen Versuchen war es nötig, das GST-Inv Protein auf Latex- Partikel zu binden, um eine IL-8 Sekretion in den Zellen zu erreichen (Schulte et al. 2000).

In unseren Versuchen wurden Fibroblasten mit bzw. ohne β 1-Integrine, mit löslichem Protein stimuliert und es konnte auch in den Fibroblasten ohne β 1-Integrine eine Ausschüttung von KC gemessen werden. Da durch Stimulation mit löslichem Protein nicht zu einer Vernetzung der β 1-Integrine kommt, kann keine Signaltransduktion in der Zelle ausgelöst werden. Die Ergebnisse zeigten, dass durch Stimulation mit löslichem Inv auch die Zellen ohne β 1-Integrine stimuliert werden konnten. Dadurch kam es zur Hypothese, dass ein anderer Rezeptor an dieser Signaltransduktion und KC-Ausschüttung beteiligt sein könnte. Transfektionsversuche von HEK293 Zellen ergaben Hinweise über die Mitwirkung von TLRs an dieser KC Antwort. Die weiteren Experimente mit Zellen, denen entweder TLR-4 allein oder TLR-4 und TLR-2 fehlten, haben eine Induzierbarkeit der KC Antwort durch Inv ergeben, solange nur TLR4 fehlt. Die Zellen zeigten allerdings keine KC Induktion mehr, wenn zusätzlich zu TLR-4 auch noch TLR-2 fehlte. Das würde bedeuten, dass es durch Interaktion von Inv mit TLR-2 zur Aktivierung einer proinflammatorischen Antwort kommt. Da wir feststellen mussten, dass sich in der GST-Inv Präparation, außer GST-Inv auch noch LPS befand, wurde zur Neutralisation des LPS das Antibiotikum Polymyxin B (PM) eingesetzt. PM bindet an den Lipid A Teil von LPS und eine Interaktion mit TLR-4 ist durch die Bindung von PM an Lipid A nicht mehr möglich (Muta et al. 2001; Pristovsek and Kidric 1999; Morrison and Jacobs 1976). Die Gründe dafür, dass es in einigen Ansätzen der Stimulationsversuche trotzdem zu einer IL-8 Sekretion kam, obwohl die Zellen mit LPS, welches zuvor durch PM neutralisiert worden war, behandelt wurden, sind unklar.

In unseren Versuchen kam es weiterhin vor, dass die C3H/HeJ Zellen nach Stimulation durch LPS mit der Ausschüttung von KC reagierten. Die Zellen (Makrophagen und B- Zellen) von C3H/HeJ Mäusen sind aber in der Literatur (Morrison and Ryan 1979; Poltorak et al. 1998) als hyporesponsiv auf LPS beschrieben, was in unseren Versuchen nicht immer der Fall war. Das könnte zum Einen daran liegen, dass diese Tatsache für die benutzten Zelltypen (gesamte Milzzellen und dendritische Zellen) nicht zutrifft, oder, was wahrscheinlicher ist, dass das benutzte LPS durch andere bakterielle Bestandteile wie z. B. Lipoproteine oder Peptidoglycan kontaminiert war. Diese Problematik war schon durch frühere Studien bekannt, denn zunächst wurde TLR-2 als Rezeptor für LPS beschrieben. Zu diesem Ergebnis kam man, weil durch Transfektion von TLR-2 in HEK293 Zellen und anschließender Stimulation mit LPS eine

NF- κ B Aktivierung gezeigt werden konnte (Yang and Gray 1998; Kirschning and Rothe 1998).

Spätere Studien zeigten aber einen genetische Defekt im TLR-4 Gen der C3H/HeJ Mäuse, die als ein Mausstamm beschrieben worden waren, der nicht auf LPS reagiert (Poltorak et al. 1998; Qureshi and Malo 1999). Somit scheint TLR-4 der Rezeptor für LPS zu sein.

Weitere Gruppen zeigten, dass die Überexpression von TLR-4 in verschiedenen Zelllinien dazu führt, dass in diesen Zelllinien die NF- κ B Aktivierung durch Stimulation durch LPS erreicht werden kann (Chow and Gusovsky 1999; Shimazu et al. 1999).

Durch TLR-2 knock-out Mäusen konnte dann gezeigt werden, dass diese Mäuse keinen signifikanten Defekt in der durch LPS induzierten Antwort zeigen (Takeuchi et al. 1999) und somit TLR-2 kein Rezeptor für LPS ist.

Bestätigt wurden dies durch Experimente (Tapping and Tobias 2000; Hirschfeld et al. 1999) bei denen das kommerziell erhältliche LPS vor zusätzlicher Aufreinigung die Zellen auch über TLR-2 aktivieren konnte, während nach der Aufreinigung von *E. coli* LPS keine TLR-2 vermittelte Signaltransduktion mehr stattfand. Das zeigt, dass eine wie in dieser Arbeit verwendete ungenügend aufgereinigte LPS- Präparation ein Grund für die gelegentlich auftretende KC Sekretion der Zellen von C3H/HeJ Mäusen sein könnte, da Verunreinigungen im LPS für die Stimulation über TLR-2 verantwortlich sind.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass lösliches rekombinantes Inv Protein in der Lage war, TLR-4 defiziente Mauszellen zur Sekretion von KC zu stimulieren. Das war in TLR-2/4-defizienten Zellen nicht mehr möglich.

Nachdem festgestellt wurde, dass sich in der GST- Inv Aufreinigung LPS befindet, wurde zusätzlich PM vor jedem Stimulationsversuch zu der GST-Inv Präparation gegeben um das vorhandene LPS zu neutralisieren. Da die Daten insgesamt nicht reproduzierbar waren und nicht feststellbar war, ob die GST-Inv Präparation noch durch andere bakterielle Bestandteile (Lipoproteine) kontaminiert waren konnte keine genaue Aussage getroffen werden.

Neuere Studien zeigen unter bestimmten Transfektionsbedingungen durch kommerzielles LPS eine Aktivierung von NF- κ B über TLR2 und TLR 4 in HEK293 Zellen (Muta et al. 2001). Auch von Muta et al. konnte gezeigt werden, dass kommerzielles LPS TLR4 und TLR-2 zu einer NF- κ B Aktivierung stimuliert, diese Stimulation allerdings nicht erfolgt, wenn das LPS zusätzlich gereinigt worden war. Synthetisch hergestelltes Lipid A war ebenfalls nicht in der Lage eine NF- κ B Aktivierung über TLR-2 zu induzieren, was eine Aktivierung von TLR-2 durch LPS ausschließt. Hingegen konnte aber die LPS-induzierte Antwort, des ungereinigten LPS über TLR-2, durch PM blockiert werden. Es wurde bereits

gezeigt, PM die NF- κ B Aktivierung über LTA, Lipoproteine und Peptidoglycan nicht beeinflusst (Muta et al. 2001).

Es ist also demnach nicht ganz klar, ob LPS an TLR-2 binden kann und dadurch eine Aktivierung von NF- κ B erfolgt. Deshalb war es auch schwer in unsere Studie Beweise für die Aktivierung von TLR-2 über Inv zu bekommen, da wir eine Kontamination von weiteren bakteriellen Bestandteilen, außer LPS, in unserer GST-Inv Präparation nicht ausschließen konnten.

4.3. Mutationsanalysen der Membranankerdomäne von YadA

Nicht-fimbrielle Adhäsine wie YadA stellen eine neue Klasse von äußeren Membranproteinen dar (Hoiczky et al. 2000). Ihr charakteristisches Merkmal ist der Aufbau aus einer Kopfregion, einem Stamm und einem Membrananker. Kopf und Stamm von YadA werden durch eine Hals-Sequenz verbunden, die ein neues Trimerisierungsmotiv darstellt (Nummelin et al. 2004). Der Membrananker von YadA wird aus vier Transmembran- β -Faltblattstrukturen gebildet, die für die Porenbildung und die Eigenschaft von YadA als Autotransporter verantwortlich sind

Autotransporter sind eine immer weiter wachsende Familie von äußeren Membranproteinen, die oft bei Gram-negativen Bakterien vorkommen (Henderson et al. 1998). Neben einer C-terminalen, transmembranen „ β -barrel“ Struktur haben diese Art Proteine eine lösliche N-terminale Domäne, die auf der Bakterienoberfläche entfaltet wird (Henderson et al. 2004). Die lösliche Domäne heißt Passenger- Domäne und hat eine für jeden Autotransporter spezifische Funktion. Die Transmembrandomäne wird β -Domäne genannt und wird für den Transport der Passenger- Domäne zur externen Oberfläche des Bakteriums gebraucht. Der Autotransporter Sekretionsmechanismus ist einzigartig, weil sämtliche Information die für die Sekretion der Passenger- Domäne nötig ist, in einer einzigen Polypeptidkette enthalten ist (Oomen et al. 2004). Der Autotransporter Sekretionsprozess wurde zuerst für die *Neisseria gonorrhoeae* IgA₁ Protease beschrieben (Pohlner et al. 1987). Bis heute wurde dieser Prozess für mehr als 120 verschiedene Proteine beschrieben, unter anderem auch für YadA.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde ein hochkonserviertes Glycin im Bereich der Transmembrandomäne von YadA gegen verschieden andere Aminosäuren ausgetauscht. Dieses Glycin ist in fast allen Autotransporterproteinen vorhanden und könnte daher eine Funktion in der Bildung der Pore in der äußeren Membran oder dem Autotransport des Proteins erfüllen. Um dies zu untersuchen wurden die Aminosäuren Alanin, Serin, Histidin und Threonin ausgesucht.

Zunächst wurde durch Western Blot analysiert, ob das Protein YadA G389A exprimiert wird. Dabei fiel schon auf, dass die Mutation des Glycins dazu führt, dass YadA G389A nicht mehr als Trimerbande auf dem Blot zu detektieren ist, sondern nur noch als Monomer zu sehen ist. Das bedeutet zwar nicht, dass unter normalen physiologischen Bedingungen das mutierte Protein auch nur als Monomer auf der Bakterienoberfläche gefunden werden kann. Es ist allerdings ein erster Hinweis auf eine Veränderung des Proteins, da unter denaturierenden Bedingungen die Trimerstruktur, welche sonst bei YadA erhalten bleibt, bei YadA G389A nicht gefunden werden kann. Für Proteine der Oca Familie, zu denen YadA zählt, ist bekannt, dass sie sehr hitzestabil sind und im SDS-PAGE immer noch als Oligomere detektiert werden können (Roggenkamp and Heesemann 2003). Ob diese Mutation wirklich zum Verlust der Trimerisierung führt oder nur die Faltung des mutierten Proteins verlangsamt ist, muss in weiteren Experimenten noch untersucht werden.

Um zusätzliche Hinweise auf die Funktionalität von YadA G389A zu bekommen, wurde die Fähigkeit zur IL-8 Induktion in Wirtszellen untersucht. Wenn das Protein nicht mehr auf die Oberfläche transportiert wird oder nicht mehr als Trimer auf der Oberfläche vorhanden ist, sollte auch keine Bindung an die β 1-Integrine und somit keine IL-8 Sekretion mehr stattfinden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Sekretion von IL-8 in HeLa Zellen auch durch YadA G389A noch ausgelöst wird. Die Daten der Fluoreszenzmikroskopie deuten darauf hin, dass das Protein nicht mehr zu einem so hohen Grade wie beim YadA Wildtyp auf die Bakterienoberfläche transportiert wird. Für Inv wurde gezeigt, dass eine hohe Substratkonzentration auf der bakteriellen Oberfläche nötig ist, um eine proinflammatorische Antwort auszulösen (Dersch and Isberg 1999). Wenn YadA G389A nicht mehr so häufig auf der Bakterienoberfläche vertreten ist, wie das Wildtyp YadA und es aber trotz niedriger Substratkonzentration zu einer Ausschüttung von IL-8 kommt, könnte das damit zu tun haben, dass YadA über ein Brückenmolekül an β 1-Integrine bindet (Eitel et al. 2002). Somit muss nicht so viel YadA Protein auf der Bakterienoberfläche vorhanden sein, um die β 1-Integrine zu vernetzen („crosslinken“). Diese Vernetzung oder Verbindung der β 1-Integrine zur

Signalverstärkung geschieht somit über das Brückenmolekül wie zum Beispiel Fibronectin oder vielleicht auch Kollagen.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden das Glycin durch weitere Aminosäuren ausgetauscht. Das Protein, bei dem Glycin durch Serin substituiert worden war, zeigte zunächst keine Unterschiede in Expression, Bandenmuster im Western Blot oder IL-8 Induktionsfähigkeit. Die beiden mutierten Proteine YadA G389H und YadA G389T konnten weder durch Immunoblot und noch durch Immunfluoreszenzmikroskopie (ohne Abbildung) nachgewiesen werden.

Warum diese Proteine nicht nachgewiesen werden können, ist nicht klar. Es könnte sein, dass die Proteine in Einschlusskörperchen in der Bakterienzelle angereicht werden und verklumpt sind, sodass sie nicht mehr in das SDS-PAGE einwandern und somit auch nicht detektiert werden können. Eine andere Möglichkeit wäre, dass diese beiden Proteine aufgrund der nicht korrekten Faltung sofort nach der Translation in der Zelle wieder abgebaut werden und somit nicht detektierbar sind. Die beiden Möglichkeiten sollten in der Zukunft untersucht werden, indem man versucht, die mRNA der Proteine nachzuweisen, um sicher zu gehen, dass die Transkription der Gene stattfindet. Ein weiterer Ansatz wäre, die Vektoren in einen proteasereduzierten Bakterienstamm einzubringen um eine erfolgreiche Expression der Proteine zu erreichen.

Um die Expression von YadA, YadA G389A und YadA G389S besser kontrollieren zu können, wurden die Basensequenzen dieser Proteine in den Anhydrotetracyclin (AHT)-induzierbaren Vektor pASK-IBA2 eingebracht. Die Expression im IPTG induzierbaren Vektor pNIV136 war im auch im uninduzierten Zustand schon vorhanden. Deshalb war es in dem IPTG induzierbaren Vektorsystem nicht möglich die Kinetik der Expression und einen möglichen Unterschied zwischen den einzelnen Proteinen zu untersuchen. Der Vektor pASK-IBA2 hat den Vorteil, dass die Proteinexpression im uninduzierten Zustand kaum vorhanden ist, aber durch AHT die Expression dosisabhängig induziert werden kann. Diese Eigenschaften war für unsere Untersuchungen wichtig, damit geklärt werden kann, ob durch die Mutation im YadA ein verlangsamter Einbau in die äußere Membran erfolgt. Dies müsste durch Induktionskinetiken mit anschließender Extraktion der äußeren Membran und Western Blot nachgewiesen werden.

Nach Expression von YadA G389A in pASK-IBA2 fiel auf, dass nach Auftrennung im SDS-Gel und anschließendem Western Blot das Protein YadA G389A als Timer detektierbar war. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Induktion der Expression durch das neue

Expressionssystem wie erwartet langsam genug abläuft, dass YadA G389A trotz vielleicht hinderlicher Aminosäure besser falten kann. Wenn die Expression in pNIV136 durch IPTG induziert wird, werden die Proteine sofort stark exprimiert, so dass eine korrekte Faltung oder vielleicht eine damit verbundene stabile Trimerisierung nicht möglich ist. Durch die langsamere Expression im pASK-IBA2 scheint dies möglich zu sein. Als Nächstes ist zu versuchen, ob durch niedrigere Dosen an AHT als Induktor und eine niedrigere Anzuchttemperatur der Bakterien YadA G389S dazu gebracht werden kann, sich wieder korrekt zu falten und damit wieder als Trimer im Western Blot detektierbar zu sein.

In Abbildung 30 ist schematisch dargestellt, wie man sich den Einbau der trimeren Autotransporter in die äußere Membran vorstellt.

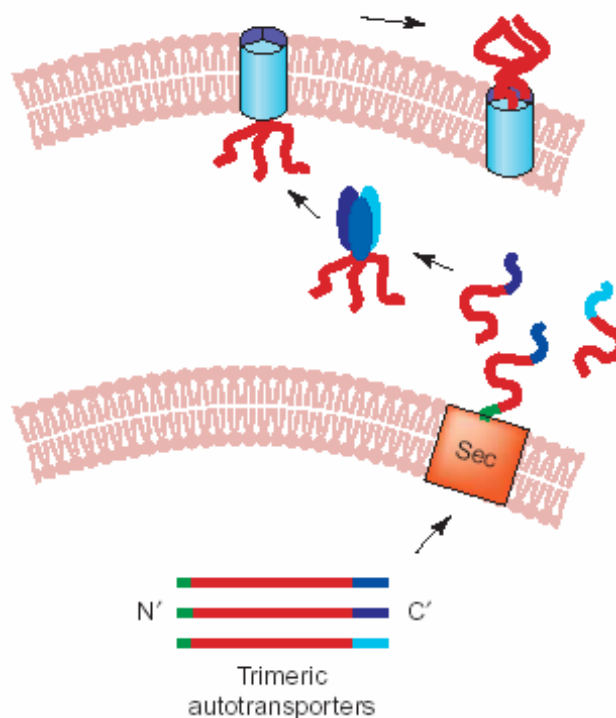


Abb. 30 Autotransporter Sekretion.

Die Translokation über die innere Membran erfolgt durch Interaktion zwischen den N-terminalen Signalpeptiden und dem Sec Apparat (orange). Die C-Termini leiten das Protein zur äußeren Membran und dort formen drei Monomere je eine Pore, die die Translokation der drei Passengedomänen zur bakteriellen Oberfläche erlaubt. N-terminalen Signalpeptide, grün; Passengedomänen, rot;; Translokationsdomänen, blau; Bild: Cotter et al.

Eine Möglichkeit, warum dieses Glycin in der Familie der Autotransporter so konserviert vorkommt und somit äußerst wichtig für die Funktion des jeweiligen Proteins zu sein scheint, kann vielleicht am Beispiel von YadA erläutert werden. Wenn die Aminosäure Glycin an der

Stelle 389 im YadA Protein so wichtig ist, dass das Protein möglichst schnell und effizient auf die Oberfläche des Bakteriums transportiert wird, ist es nicht verwunderlich, dass diese Aminosäure fast nie durch eine andere ersetzt wurde. Man weiß, dass es für das Bakterium lebensnotwendig ist, z. B. die Eigenschaft der Serumresistenz von YadA möglichst schnell nach Eindringen in den Wirtsorganismus zu Verfügung zu haben. Deshalb kann man verstehen, dass eine verlangsamte Expression, Faltung und ein damit verbundener verlangsamter Einbau in die äußere Membran von YadA einen fatalen Nachteil im Kampf ums Überleben für *Y. enterocolitica* darstellen würde. Das könnte ein Grund das konservierte Vorkommen des Glycins sein.

Es ist noch nicht bekannt, wie der Mechanismus zur Ausbildung der Pore in der Membran genau funktioniert. Es gibt keine Hinweise darüber, welche Funktion genau das Glycin erfüllt. Da dieses Glycin im YadA Molekül aufgrund der Trimeren Struktur dreimal vorkommt und somit die Untersuchungen somit schwieriger sind. Deshalb wäre es interessant einen Monomeren Autotransporter, wie z. B. AIDA (Benz and Schmidt 1989) zu untersuchen und herauszufinden, was das Fehlen des Glycins in diesem Protein bewirkt.

5. Zusammenfassung

In dieser Studie konnte dem multifunktionellen Virulenzfaktor YadA, der Adhäsion, Serumresistenz und Autoagglutination vermittelt, eine weitere Eigenschaft hinzugefügt werden. YadA induziert, wie auch der Virulenzfaktor Invasin (Inv), der die Internalisierung von *Yersinia* über Bindung an β 1-Integrine vermittelt, β -1 Integrin abhängig die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-8 in Epithelzellen. Die vergleichende Analyse der Inv- und YadA-vermittelten IL-8 Sekretion zeigte, dass die Signalkaskaden durch ähnliche oder sogar identische Moleküle vermittelt werden. Inhibitorstudien zeigten, dass sowohl für Inv, als auch YadA, GTPasen der Rho Familie und MAPkinasen wie p38, MEK1 und JNK an der Signaltransduktion beteiligt sind. Ebenso ist die IL-8 Sekretion in beiden Fällen β 1-Integrin vermittelt. Diese Studie zeigt, YadA, neben Inv, YopB und *Yersinia* Lipopolysaccharid als einen weiteren Induktor von proinflammatorischen Molekülen, mit welchem *Yersinien* eine inflammatorische Gewebsreaktion auslösen können. Weitere *in vivo* Untersuchungen sollen zeigen, welche Bedeutung die proinflammatorischen Eigenschaften von YadA für den Infektionsverlauf haben.

Für die Induktion einer proinflammatorischen Reaktion über β 1-Integrine, ist die Vernetzung der β -1 Integrine notwendig. Dies wird nur erreicht, wenn sie Stimulation durch Inv, welches auf Bakterien exprimiert wird oder an Latex-Partikel gebunden ist, erfolgt. Untersuchungen mit integrindefizienten Fibroblasten ergaben, dass auch lösliches Inv eine proinflammatorische Antwort auslösen kann. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass Inv auch β 1-Integrin unabhängig, eine proinflammatorische Antwort über einen anderen Rezeptor auslösen könnte. Initiale Untersuchungen ergaben, dass Inv möglicherweise über Toll-like Rezeptor 2 eine proinflammatorische Antwort induziert. *In vitro* Untersuchungen, mit Milzzellen und dendritischen Zellen aus TLR-2 und TLR-4 defizienten Mausstämmen unterstützen diese Hypothese. Da das rekombinante Inv Protein nicht LPS frei zur Verfügung stand und weitere Kontaminationen nicht ausgeschlossen werden konnten, war es nicht möglich abschließend zu klären, ob es sich bei der möglichen Inv-TLR2 Interaktion, um einen Artefakt oder eine reelle Beobachtung handelt.

In der homologen Membranankerdomäne von Proteinen, der Oca Familie, zu der YadA gehört ist eine hochkonservierte Aminosäure, bei YadA von *Y. enterocolitica* an Position 389 zu finden. Um zu untersuchen, ob die diese Aminosäure für den Autotransport des Proteins in die äußere Membran und funktionell von Bedeutung sind, wurden die Mutanten YadA G389A, YadA G389S, YadA G389H und YadA G389H hergestellt. Während das Wildtyp

YadA in Western Blot-Analysen primär in seiner trimeren Form nachweisbar war, konnte YadA G389A und YadA G389S nur noch in seiner monomeren Form nachgewiesen werden. Deshalb ist anzunehmen, dass aufgrund einer Konformationsänderung die Stabilität des Proteins verändert ist. Auf die YadA vermittelte IL-8 Sekretion haben die Mutationen keinen Einfluss. Eine Proteinexpression der vollständig sequenzierten Mutanten YadA G389H und YadA G389T konnte nicht nachgewiesen werden. In weiteren Untersuchungen muss der Zusammenhang zwischen diesen Punktmutationen und der aberranten Proteinexpression geklärt werden. Ebenso soll untersucht werden, wie sich die Mutationen G389A und G389S bei einer Infektion *in vivo* auswirken.

6. Abkürzungen

A Alanin
 AA Acrylamid
 Abb. Abbildung
 A. dest. einfach destilliertes Wasser
 A. bidest. zweifach destilliertes Wasser
 AG Arbeitsgruppe
 AHT Anhydrotetracyclin
 Ail *attachment invasion locus*
 AmpR Ampicilin-Resistenz
 APS Ammoniumpersulfat
 BA Bisacrylamid
 BSA *bovine serum albumin* (Rinderserumalbumin)
 C Cytosin
 Ca Calcium
 CFU *colony forming unit* (Kolonie bildende Einheit)
 CmR Chloramphenicol-Resistenz
 dATP desoxy-Adenosin-Triphosphat
 dCTP desoxy-Cytosin-Triphosphat
 dGTP desoxy-Guanosin triphosphat
 DMSO Dimethylsulfoxid
 DNA *desoxyribonucleic acid* Desoxyribnukleinsäure
 dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphat
 ECL *enhanced chemoluminescence*
 EDTA Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
 EGTA Ethylen-Glycol-Bis-Aminoethylether-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
 ELISA *Enzyme-linked immunosorbent assay*
 ER endoplasmatisches Reticulum
et al. und andere
 FACS *fluorescence activated cell sorter*
 FITC Fluoresceinisothiocyanat
 FCS fötales Kälberserum
 G Glycin
 g Erdbeschleunigung
 GFP *green fluorescence protein*
 GM-CSF *granulocyte-monocyte colony stimulating factor*
 H Histidin
 h Stunde
 HBSS *Hank's balanced salt solution*
 HEPES N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
 HLA *human leucocyte antigen*
 HPI *high pathogenicity island*
 HRP *horse-radish peroxidase* Meerrettich-Peroxidase
 ICAM *intercellular adhesion molecule*
 IFN Interferon
 Ig Immunglobulin
 IL Interleukin
 Inv Invasin
 IPTG Isopropyl β -D-Thiogalactopyranosid
 KanR Kanamycin-Resistenz
 kDa Kilo Dalton
 LB Luria Bertani
 Lcr *low Calcium response*
 LPS Lipopolysaccharid
 MCP-1 *macrophage chemoattractant protein*
 M molar
 MALT *mucosa associated lymphoid tissue*
 MAP *mitogen activated protein*

Mg Magnesium
MHC *major histocompatibility complex*
min Minute
MOI *multiplicity of infection*
M-Zelle *membraneous* oder *microfold-Zelle*
N Stickstoff
Na Natrium
NaIR Nalidixin-Resistenz
NF *nuclear factor*
NK *natural killer*
O *Oxygen*, Sauerstoff
OD *optical density* (optische Dichte)
ori *origin of replication*
Ova Ovalbumin
P Phosphor
PAA Polyacrylamid
PAGE Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS *phosphate buffered saline*
(phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR *polymerase chain reaction*
(Polymerase-Kettenreaktion)
PFA Paraformaldehyd
p.i. *post infectionem*
PM Polymyxin
PMN polymorphonucleare Neutrophile
PNPP p-Nitrophenyl-Phosphat Dinatrium
p.o. *per oral*
PP Peyer'sche Plaques
pYV *Yersinia*-Virulenzplasmid
PVDF Polyvinylidenfluorid
Rb Rubidium
Rho Ras-Homolog
RNA *ribonucleic acid* (Ribonukleinsäure)
RPMI *Roswell Park Memorial Institute*
S Serin
s. siehe
SDS *sodium dodecyl sulfate* Natriumdodecylsulfat
sec Sekunde
SI Stimulationsindex
s.o. siehe oben
s.u. siehe unten
Syc *specific Yop chaperone*
T Threonin
Tab. Tabelle
TCA Trichloressigsäure
TcR Tetracyclin-Resistenz
TCR T-Zell-Rezeptor
TEMED N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris Tris(hydroxymethyl)aminomethan
IKK inducible IκB-kinase
TNF Tumor Nekrose Faktor
U *unit* (Einheit)
UV ultraviolett
v/v Volumen pro Volumen
w/v Gewicht pro Volumen
w/w Gewicht pro Gewicht
YadA *Yersinia adhesin A*
Yop *Yersinia outer protein*

7. Referenzen

- Aebi, C., et al. "Phenotypic effect of isogenic *uspA1* and *uspA2* mutations on *Moraxella catarrhalis* 035E." *Infect.Immun.* 66.7 (1998): 3113-19
- Aliprantis, A.O. et al. "Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor 2." *Science* 285 (1999) 736-739
- Arencibia, I., et al. "*Yersinia* invasin, a bacterial beta1-integrin ligand, is a potent inducer of lymphocyte motility and migration to collagen type IV and fibronectin." *J.Immunol.* 159.4 (1997): 1853-59.
- Arnold, R., et al. "Effects of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* on cytokine gene expression and release from human polymorphonuclear granulocytes and epithelial (HEp-2) cells." *Infect.Immun.* 61.6 (1993): 2545-52.
- Autenrieth, I. B., et al. "Immunohistological characterization of the cellular immune response against *Yersinia enterocolitica* in mice: evidence for the involvement of T lymphocytes." *Immunobiol.* 187 (1993): 1-16.
- Autenrieth, I. B., et al. "Desferrioxamine-promoted virulence of *Yersinia enterocolitica* in mice depends on both desferrioxamine type and mouse strain." *J Infect Dis* 169 (1994): 562-67.
- Autenrieth, I. B., et al. "Deferoxamine B but not deferoxamine G1 inhibits cytokine production in murine bone marrow macrophages." *J Infect Dis* 172 (1995): 490-96.
- Autenrieth, I. B. and R. Firsching. "Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study." *J Med Microbiol* 44 (1996): 285-94.
- Autenrieth, I. B., et al. "Defence mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against *Yersinia enterocolitica* involve integrins and cytokines." *Infection and Immunity* 64 (1996): 1357-68.
- Baeuerle, P. A. "Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF-kappaB puzzle?" *Curr.Biol.* 8.1 (1998): R19-R22.
- Baeuerle, P. A. and D. Baltimore. "NF-kappa B: ten years after." *Cell* 87.1 (1996): 13-20.
- Balligand, G. et al. "Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination." *Infect Immun.* 48 (1985): 782-86.
- Barenkamp, S. J. and III St.Geme JW. "Identification of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by non-typable *Haemophilus influenzae*." *Mol.Microbiol.* 19.6 (1996): 1215-23.

- Barz, C., et al. "The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1." *FEBS Lett.* 482.1-2 (2000): 139-43.
- Benz, I. and M.A. Schmidt "Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*." *Infect Immun* 57 (1989) 1506-1511
- Biedzka-Sarek, M., et al. "Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3." *Infect Immun.* 73(4) (2005) 2232-44
- Black, D. S. and J. B. Bliska. "The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence." *Mol.Microbiol.* 37.3 (2000): 515-27.
- . "Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions." *EMBO J.* 16.10 (1997): 2730-44.
- Bliska, J. B. and S. Falkow. "Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89.8 (1992): 3561-65.
- Bliska, J. B. et al. "The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEP-2 cells." *Infect. Immun.* 61 (1993) 3914-3921.
- Bliska, J. B. and D. S. Black. "Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase." *Infect.Immun.* 63.2 (1995): 681-85.
- Boland, A. and G. R. Cornelis. "Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection." *Infect Immun.* 66 (1998): 1878-84.
- Bölin, I. et al. "Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid." *Infect. Immun.* 37 (1982) 506-512
- Bottone, E. J. "*Yersinia enterocolitica*: the charisma continues." *Clin.Microbiol.Rev.* 10.2 (1997): 257-76.
- Bozic, C. R., et al. "The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. Expression and biological characterization." *Journal of Biological Chemistry* 269.47 (1994): 29355-58.
- Bradford, M. M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal.Biochem.* 72 (1976): 248-54.
- Brett, S. J., et al. "The invasin protein of *Yersinia spp.* provides co-stimulatory activity to human T cells through interaction with beta 1 integrins." *Eur.J.Immunol.* 23.7 (1993): 1608-14.
- Brightbill, H.D. et al. "Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors." *Science* 285 (1999) 732-736

- Carter, P. B. "Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice." *Infect.Immun.* 11 (1975a): 164-70.
- . "Animal model of human disease. *Yersinia enterocolitica* infection of mice." *Am.J.Pathol.* 81 (1975b): 703-06.
- China, B., et al. "Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules." *Infect.Immun.* 61.8 (1993): 3129-36.
- Chow, J.C. and F. Gusovsky "Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction." *J Biol Chem.* 274(16) (1999); 10689-92
- Comanducci, M., et al. "NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*." *J Exp.Med* 195.11 (2002): 1445-54.
- Cope, L.D. et al. "Characterization of the *Moraxella catarrhalis* uspA1 and uspA2 genes and their encoded products." *J.Bacteriol.* 181 (1999) 4026-4043
- Cornelis G.R." *Yersinia* pathogenicity factors. *Curr Top Microbiol Immunol* 192 (1994) 243-263
- Cornelis et al. "The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome." *Microbiol Mol Biol* 62 (1998) 1315-1352
- Cornelis, G.R. "Yersinia type III secretion: send in the effectors." *J Cell Biol* 158 (2002) 401-408
- Cotter S. et al. "Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins." *TRENDS in Microbiol* 13 (2005)
- Darwin, A. J. and V. L. Miller. "Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis." *Mol.Microbiol.* 32.1 (1999): 51-62.
- Delor, I. and G. R. Cornelis. "Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits." *Infection and Immunity* 60 (1992): 4269-77.
- Denecker, G., et al. "*Yersinia enterocolitica* YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid." *J.Biol.Chem.* 276.23 (2001): 19706-14.
- Dersch, P. and R. R. Isberg. "A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association." *EMBO J.* 18.5 (1999): 1199-213.
- . "An immunoglobulin superfamily-like domain unique to the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein is required for stimulation of bacterial uptake via integrin receptors." *Infect.Immun.* 68.5 (2000): 2930-38.

- Devenish, J. A. and D. A. Schiemann. "HeLa cell infection by *Yersinia enterocolitica*: evidence for lack of intracellular multiplication and development of a new procedure for quantitative expression of infectivity." *Infect.Immun.* 32 (1981): 48-55.
- Di Genaro, M. S et al. "Attenuated *Yersinia enterocolitica* mutant strains exhibit differential virulence in cytokine-deficient mice: implications for the development of novel live carrier vaccines." *Infect. Immun.* 71 (2003) 1804–1812.
- Dube, P. H., et al. "The rovA mutant of *Yersinia enterocolitica* displays differential degrees of virulence depending on the route of infection." *Infect.Immun.* 71.6 (2003): 3512-20.
- Eaves-Pyles, T., et al. "Bacterial invasion is not required for activation of NF-kappaB in enterocytes." *Infect.Immun.* 67.2 (1999): 800-04.
- Eckmann, L., M. et al. "Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system." *Trends Microbiol* 3 (1995): 118-20.
- Elkins, C., K.J. Morrow, Jr., and B. Olsen "Serum resistance in *Haemophilus ducreyi* outer membrane protein DsrA" *Infect. Immun.* 68 (2000) 1608-1619
- Eitel, J. et al. "The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasin is repressed." *Infect.Immun.* 70.9 (2002): 4880-91.
- Eitel, J. et al. "Cell invasion and IL-8 production pathways initiated by YadA of *Yersinia pseudotuberculosis* require common signalling molecules (FAK, c-Src, Ras) and distinct cell factors. *Cell. Micro.* 7(1) (2005) 63-77
- el Tahir, Y. and M. Skurnik. "YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin." *Int.J.Med.Microbiol.* 291.3 (2001): 209-18.
- Elewaut, D., et al. "NF-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria." *J.Immunol.* 163.3 (1999): 1457-66.
- Emody, L., et al. "Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms." *J Bacteriol.* 171 (1989): 6674-79.
- Ennis, E., et al. "Very late antigen 4-dependent adhesion and costimulation of resting human T cells by the bacterial beta 1 integrin ligand invasin." *J.Exp.Med.* 177 (1993): 207-12.
- Fallman, M., et al. "*Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells." *Infect.Immun.* 63.8 (1995): 3117-24.
- Fassler, R., et al. "Lack of beta 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts." *J.Cell Biol.* 128.5 (1995): 979-88.
- Fauconnier, A., A. Van Elsen, and A. Bollen. "Construction and sequencing of new derivatives of the pIN-III-ompA secretion vector." *Genet.Anal.* 14.4 (1998): 129-31.

- Flügel, A., et al. "Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, Laminin-1 and -2, and Nidogen/Entactin." *J.Biol.Chem.* 269 (1994): 29732-38.
- Galyov, E. E., et al. "A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant." *Nature* 361 (1993): 730-32.
- Gemski, P., J. R. Lazere, and T. Casey. "Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*." *Infect.Immun.* 27 (1980): 682-85.
- Girardin S.E. et al. "Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan" *Science* 300 (2003) 1584-1587
- Gort, A. S. and V. L. Miller. "Identification and characterization of *Yersinia enterocolitica* genes induced during systemic infection." *Infect.Immun.* 68.12 (2000): 6633-42.
- Grassl, G. A., et al. "Activation of NF- κ B and IL-8 by *Yersinia enterocolitica* invasin protein is conferred by engagement of Rac1 and MAP kinase cascades." *Cell Microbiol* 5.12 (2003): 957-71.
- Gripenberg-Lerche, C., et al. "Role of YadA in Arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica* Sertype 0:8: Experimental Studies with Rats." *Infect.Immun.* 62.12 (1994): 5568-75.
- Grosdent, N., et al. "Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis." *Infect.Immun.* 70.8 (2002): 4165-76.
- Grutzkau, A., et al. "Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria." *Gut* 31 (1990): 1011-15.
- Guan, K. L. and J. E. Dixon. "Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*." *Science* 249 (1990): 553-56.
- Hallman, M. et al. "Toll-like receptors as sensors of pathogens" *Ped. Research* 50 (2001) 315-321
- Hamburger, Z. A., et al. "Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein." *Science* 286.5438 (1999): 291-95.
- Haag, H., et al. "Purification of Yersiniabactin: a siderophore and a possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*." *J Gen Microbiol* 139 (1993): 2159-65.
- Hamburger, Z. A., et al. "Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein." *Science* 286.5438 (1999): 291-95.
- Hanahan, D. "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Journal of Molecular Biology* 166.4 (1983): 557-80.

- Hanski, C., et al. "Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis." *Infect Immun.* 57 (1989): 673-78.
- Hayashi, F. et al. "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor-5." *Nature* 410 (2001) 1099-1103
- Heesemann, J., U. Gross, and L. Gruter. "Genetic manipulation of virulence of *Yersinia enterocolitica*." *Contrib. Microbiol Immunol* 9 (1987): 312-16.
- Heesemann J. and Grüter L. "Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells." *FEMS Microbiol Lett* 40 (1987): 37-41.
- Heesemann et al. "Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rodents: a model for human yersiniosis." *APMIS* 101 (1993): 417-29.
- Hemmi H., O. Takeuchi and Akira S. "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." *Nature* (2000) 408:740
- Henderson, I. R. et al. "The great escape: structure and function of the autotransporter proteins." *Trends Microbiol.* 6.9 (1998): 370-78.
- Henderson, I.R. et al. "Type V protein secretion pathway: the autotransporter story." *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(4) (2004) 692-744.
- Hirschfeld M., et al. "cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2." *J Immunol* 163, (1999) 2382-2386
- Hoiczyk, E., et al. "Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins." *EMBO J* 19.22 (2000): 5989-99.
- Holtmann, H., et al. "Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways." *Mol. Cell Biol.* 19.10 (1999): 6742-53.
- Hoogkamp Korstanje, J. A., J. de Koning, and J. Heesemann. "Persistence of *Yersinia enterocolitica* in man." *Infection* 16 (1988): 81-85.
- Hultgren, S. J., et al. "Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition." *Cell* 73.5 (1993): 887-901.
- Iriarte, M. and G. R. Cornelis. "YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells." *Mol. Microbiol.* 29.3 (1998): 915-29.
- Iriarte, M., et al. "The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*." *Mol. Microbiol.* 9.3 (1993): 507-20.
- Isberg RR and S. Falkow "A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12." *Nature* 317 (1985) 262-4

- Isberg RR et al. "Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells." *Cell*. 50 (1987) 769-78
- Isberg, R. R. and J. M. Leong. "Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells." *Cell* 60.5 (1990): 861-71.
- Isberg, R. R. and P. Barnes. "Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*." *J.Cell Sci.* 114.Pt 1 (2001): 21-28.
- Juris, S. J., et al. "A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97.17 (2000): 9431-36.
- Kampik, D., et al. "*Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in *Yersinia* infections." *Infect Immun.*2000.May.;68.(5.):2484.-92. 68.5 (2000): 2484-92.
- Kapperud, G. and E. Namork. "Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*. Correlation with outer membrane protein YOP1, autoagglutination, and hemagglutination." *Contrib.Microbiol Immunol.* 9 (1987): 165-72.
- Kapperud, G., et al. "Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible importance for pathogenesis." *Infect.Immun.* 55.9 (1987): 2247-54.
- Kirschning, C.J. and M. Rothe "Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide." *J exp med* 188 (1998) 2091-2097
- Koornhof, H. J., R. A. Smego, Jr., and M. Nicol. "Yersiniosis. II: The pathogenesis of *Yersinia* infections." *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 18.2 (1999): 87-112.
- Krause, A., et al. "Stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase is required for interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB." *J.Biol.Chem.* 273.37 (1998): 23681-89.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch. "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." *Physiol Rev.* 81.2 (2001): 807-69.
- Laemmli, U. K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227 (1970): 680-85.
- Leung, K. Y., B. S. Reisner, and S. C. Straley. "YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice." *Infection and Immunity* 58 (1990): 3262-71.
- Leung, K. Y. and S. C. Straley. "The yopM gene of *Yersinia pestis* encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPIb alpha." *Journal of Bacteriology* 171.9 (1989): 4623-32.

- Lien , E. and A. Yoshimura "Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products." J.Biol.Chem. 274 (1999) 33419-334225
- Lundgren, E., et al. "Invasin of *Yersinia pseudotuberculosis* activates human peripheral B cells." Infect.Immun. 64.3 (1996): 829-35.
- Mack, D. et al. "Characterization of different oligomeric species of the *Yersinia enterocolitica* outer membrane protein YadA" Med.Microbiol. Immunol. 181 (1994) 217-227
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. Molecular Cloning. Ed. C. Nolan, N. Ford, and M. Ferguson. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Matsusaka, T., et al. "Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 90.21 (1993): 10193-97.
- Martinez, R.J. "Thermoregulation-dependent expression on *Yersinia enterocolitica* protein P1 imparts serum resistance to Escherichia coli K-12." J Bacteriol. 171 (1989) 3732-3739
- McGraw EA, Li J, Selander RK, Whittam TS "Molecular evolution and mosaic structure of alpha, beta, and gamma intimins of pathogenic *Escherichia coli*." Mol Biol Evol. 16(1) (1999) 12-22.
- Mercurio, F. and A. M. Manning. "Multiple signals converging on NF-kappaB." Curr.Opin.Cell Biol. 11.2 (1999): 226-32.
- Michiels, T. and G. R. Cornelis. "Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system." Journal of Bacteriology 173.5 (1991): 1677-85.
- Miller, V. L. and S. Falkow. "Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells." Infection and Immunity 56 (1988): 1242-48.
- Miller, V.L. et al. "The ail locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease." Infect.Immun. 57 (1989) 121-131
- Mills, S. D., et al. "*Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein." .Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 94 (1997): 12638-43.
- Monack, D. M., et al. "*Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 94.19 (1997): 10385-90.
- Morrison, D.C. and D.M. Jacobs "Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides." Immunochemistry. 13(10) (1976) 813-818.
- Morrison, D.C. and J.L. Ryan "Bacterial endotoxins and host immune responses." Adv Immunol. 28 (1979) 293-450

- Mukaida, N., et al. "Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines." *J.Biol.Chem.* 265.34 (1990): 21128-33.
- Mukaida, N., et al. "Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression." *J.Leukoc.Biol.* 56.5 (1994): 554-58.
- Munzenmaier, A., et al. "A secreted/shed product of *Helicobacter pylori* activates transcription factor nuclear factor-kappa B." *J.Immunol.* 159.12 (1997): 6140-47.
- Muta et al.. "Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR) 2 as well as TLR4: Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations." *FEBS Journal* 268.16 (2001): 4580-89.
- Nakajima, R., V. L. Motin, and R. R. Brubaker. "Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization." *Infect.Immun.* 63.8 (1995): 3021-29.
- Nelson, K. M., G. M. Young, and V. L. Miller. "Identification of a locus involved in systemic dissemination of *Yersinia enterocolitica*." *Infect.Immun.* 69.10 (2001): 6201-08.
- Nummelin, H., et al. "The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll." *EMBO J* 23.4 (2004): 701-11.
- O'Neill, L. A. "The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense." *Sci.STKE.* 2000.44 (2000): RE1.
- Oomen, C.J. et al. "Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter." *EMBO J.* 23(6) (2004)1257-66.
- Orth, K., et al. "Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease." *Science* 290.5496 (2000): 1594-97.
- Pawel-Rammingen, U., et al. "GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure." *Mol.Microbiol.* 36.3 (2000): 737-48.
- Pepe, J. C. and V. L. Miller. "The *Yersinia enterocolitica* *inv* gene product is an outer membrane protein that shares epitopes with *Yersinia pseudotuberculosis* invasin." *J. Bacteriol.* 172 (1990) 3780-3789
- Pepe, J. C. and V. L. Miller. "*Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90.14 (1993): 6473-77.
- Pepe, J. C. et al. "Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection." *Infect. Immun.* 63 (1995) 4837-4848.
- Perry, R. D., et al. "DNA sequencing and analysis of the low-Ca²⁺-response plasmid pCD1 of *Yersinia pestis* KIM5." *Infect.Immun.* 66.10 (1998): 4611-23.

- Pierson, D. E. and S. Falkow. "Nonpathogenic isolates of *Yersinia enterocolitica* do not contain functional inv-homologous sequences." *Infection and Immunity* 58 (1990): 1059-64.
- Pilz, D., et al. "Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3." *Infect.Immun.* 60.1 (1992): 189-95.
- Pohlner et al. "Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease" *Nature* 325 (1987) 458-462
- Poltorak et al. "Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene." *Science* 282.5396 (1998): 2085-2088.
- Portnoy, D. A. and S. Falkow. "Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*." *Jornal of Bacteriology* 148 (1981): 877-83.
- Portnoy, D. A et al.. "Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis." *Infection and Immunity* 31 (1981): 775-82.
- Pristovsek, P. And J. Kidric "Solution structure of polymyxins B and E and effect of binding to lipopolysaccharide: an NMR and molecular modeling study." *J Med Chem.* 42(22) (1999); 4604-4613
- Qureshi, S.T.and D.Malo "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4" *J Exp Med.* 189(4) (1999) 615-25.
- Ramamurthy, T., et al. "The novel heat-stable enterotoxin subtype gene (ystB) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the yst genes." *Microb.Pathog.* 23.4 (1997): 189-200.
- Ray, S. K., et al. "A high-molecular-weight outer membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exhibits similarity to non-fimbrial adhesins of animal pathogenic bacteria and is required for optimum virulence." *Mol.Microbiol.* 46.3 (2002): 637-47.
- Revell, P. A. and V. L. Miller. "A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* inv gene and for virulence." *Mol.Microbiol.* 35.3 (2000): 677-85.
- Riess T. et al. "Bartonella adhesin a mediates a proangiogenic host cell response." *J Exp Med.* 200(10) (2004) 1267-78.
- Robert, L. and M.D. Modlin "Mammalian toll-like receptors" *Ann Allergy Asthma Immunol* 88 (2000) 543-548
- Robins-Browne, R. M., et al. "Mechanism of action of *Yersinia enterocolitica* enterotoxin." *Infect.Immun.* 25.2 (1979): 680-84.
- Roggenkamp, A., et al. "Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA." *J Bacteriol.* 185.13 (2003): 3735-44.
- Roggenkamp, A., et al. "Contribution of the Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O8." *Infect.Immun.* 65.11 (1997): 4705-10.

- Roggenkamp, A., et al. "Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence." *Mol.Microbiol.* 16.6 (1995): 1207-19.
- Roggenkamp, A., et al. "Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils." *Infect.Immun.* 64.7 (1996): 2506-14.
- Roggenkamp, A. and J. Heesemann "Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* Adhesin A YadA" *J. Bacteriol.* 135 (2003) 3735-3744
- Rosqvist, R., et al. "Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein." *Infection and Immunity* 56 (1988): 2139-43.
- Rosqvist, R., A. Forsberg, and H. Wolf Watz. "Microinjection of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption." *Biochem.Soc.Trans.* 19 (1991): 1131-32.
- Rothwarf, D. M. and M. Karin. "The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus." *Sci.STKE.* 1999.5 (1999): RE1.
- Ruckdeschel, K., et al. "*Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages." *J.Immunol.* 166.3 (2001): 1823-31.
- Ruckdeschel, K., et al. "Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils." *Infect Immun.* 64 (1996): 724-33.
- Russmann, H., K. et al. "Translocation of *Yersinia enterocolitica* through an endothelial monolayer by polymorphonuclear leukocytes." *Infect.Immun.* 64.3 (1996): 1016-19.
- Salinovich, O. and R. C. Montelaro. "Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *Anal.Biochem.* 156.2 (1986): 341-47.
- Savkovic, S. D., et al. "Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*." *Am.J.Physiol* 273.4 Pt 1 (1997): C1160-C1167.
- Shimazu, R. et al. "MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4." *J Exp Med.* 189(11) (1999)1777-82.
- Schmitz, M. L. et al. "I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations." *Trends Biochem.Sci.* 26.3 (2001): 186-90.
- Schoppet, M., A. et al. "Dendritic cell function is perturbed by *Yersinia enterocolitica* infection in vitro." *Clin.Exp.Immunol.* 122.3 (2000): 316-23.
- Schulte, R., et al. "Differential secretion of interleukin-8 by human epithelial cell lines upon entry of virulent or nonvirulent *Yersinia enterocolitica*." *Infect Immun.* 64 (1996): 2106-13.

- Schulte, R., et al. "Wortmannin blocks *Yersinia* invasin-triggered internalization, but not interleukin-8 production by epithelial cells." *Med.Microbiol.Immunol.(Berl)* 187.1 (1998): 53-60.
- Schulte, R. and I. B. Autenrieth. "*Yersinia enterocolitica*-induced interleukin-8 secretion by human intestinal epithelial cells depends on cell differentiation." *Infect.Immun.* 66.3 (1998): 1216-24.
- Schulte, R., et al. "Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta1 integrins apically expressed on M-like cells." *Cell Microbiol.* 2.2 (2000a): 173-85.
- Schulte, R., et al. "*Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers." *FASEB J* 2000.Aug.;14.(11.):1471.-84. 14.11 (2000b): 1471-84.
- Schulze-Koops, H., et al. "Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic yersiniae to various types of collagen." *Infect.Immun.* 60.6 (1992): 2153-59.
- Schulze Koops, H., et al. "Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin." *Infect.Immun.* 61 (1993): 2513-19.
- Schwander, R. and C.J. Kirschning "Peptidoglycan- and lipoteichoic acid- induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2." *J.Biol.Chem.* 274 (1999) 17406-17409
- Sharma, S. A., et al. "Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells." *J.Immunol.* 160.5 (1998): 2401-07.
- Sing, A., et al. "*Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice." *J.Immunol.* 168.3 (2002): 1315-21.
- Sinha, B., et al. "Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1." *Cell Microbiol* 1.2 (1999): 101-17.
- Skrzypek, E., C. et al. "Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus." *Mol.Microbiol.* 30.5 (1998): 1051-65.
- Skurnik, M., et al. "Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia spp.*" *J.Bacteriol.* 158.3 (1984): 1033-36.
- Skurnik, M. "Expression of antigens encoded by the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* under different growth conditions." *Infect. Immun.* 47 (1985) 183-190
- Skurnik M. and H. Wolf-Watz "Analysis of the yopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia spp.*" *Mol Microbiol.* 3(4) (1989) 517-29

- Smego, R. A., J. Frean, and H. J. Koornhof. "Yersiniosis I: microbiological and clinicoepidemiological aspects of plague and non-plague *Yersinia* infections." *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 18.1 (1999): 1-15.
- Soto, G. E. and S. J. Hultgren. "Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly." *J Bacteriol.* 181.4 (1999): 1059-71.
- St.Geme JW, III, D. Cutter, and S. J. Barenkamp. "Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils." *J.Bacteriol.* 178.21 (1996): 6281-87.
- Tahir, Y. E., P. Kuusela, and M. Skurnik. "Functional mapping of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. Identification of eight NSVAIG-S Motifs." *Mol.Microbiol.* 37.1 (2000): 192-206.
- Takeuchi, O. et al. "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." *Immunity.* 11(4) (1999) 443-51
- Tamm, A., et al. "Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*." *Mol Microbiol* 10 (1993): 995-1011.
- Tapping, R.I. and R.S.Tobias "Toll-like receptor 4, but not Toll-like receptor 2, is a signaling receptor for *Escherichia* and *Salmonella* lipopolysaccharides." *J. Immunol.* 165, (2000) 5780-5787
- Terti, R., et al. "Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin." *Infect.Immun.* 60.7 (1992): 3021-24.
- Thoma-Uszynski S. and O. Takeuchi "Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors." *Science* 291 (2001) 1544-1547
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76 (1979): 4350-54.
- Unkmeir, A., et al. "Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells." *Molecular Microbiologie* 46.4 (2002): 933-46.
- Visser, L. G., et al. "Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes." *Infect.Immun.* 64.5 (1996): 1653-58.
- Wallach, D., et al. "Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms." *Annu.Rev.Immunol.* 17 (1999): 331-67.
- Welkos, S., et al. "V antigen of *Yersinia pestis* inhibits neutrophil chemotaxis." *Microb.Pathog.* 24.3 (1998): 185-96.
- Wennerberg, K., et al. "Beta 1 integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin." *J.Cell Biol.* 132.1-2 (1996): 227-38.

Yang, Y. and R. Isberg W Cellular internalisation in the absence of invasin expression is promoted by the *Yersinia pseudotuberculosis* yadA product." Infect.Immun. 61 (1993) 3907-3913

Yang, R.B. and A. Gray "Toll-like receptor 2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling." Nature 395 (1998) 284-288

Yang, R.B. and P.J.Godowski "Signaling events induced by lipopolysaccharide- activated Toll-like receptor 2." J.Immunol. 163 (1999) 639-643

Yao, T., et al. "Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH." J.Exp.Med. 190.9 (1999): 1343-50.

Yasumoto, K., et al. "Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene." J.Biol.Chem. 267.31 (1992): 22506-11.

Yoshimura, A. and D. Golenbock "Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. J.Immunol. 165 (1999) 1-5

Young, V.B. et al. "The invasin product of *Yersinia enterocolitica*: internalization of invasin-bearing bacteria by eukaryotic cells is associated with reorganization of the cytoskeleton. J. Cell Biol. 116 (1992) 197-207

Zhang, L., et al. "Molecular and chemical characterization of the lipopolysaccharide O-antigen and its role in the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8." Mol.Microbiol. 23.1 (1997): 63-76.

Zumbihl, R., et al. "The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA." J.Biol.Chem. 274.41 (1999): 29289-93.

8. Veröffentlichungen

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurden schon vor dem Einreichen des Dissertations-Textes als Publikation und Poster veröffentlicht:

Yvonne Schmid, Guntram A. Grassl, Oliver T. Bühler, Mikael Skurnik, Ingo B. Autenrieth und Erwin Bohn “*Yersinia enterocolitica* Adhesin A Induces Production of Interleukin-8 in Epithelial Cells.” *Infect Immun* (2004), p. 6780–6789 Vol. 72, No. 12

Yvonne Schmid, Guntram A. Grassl, Oliver T. Bühler, Mikael Skurnik, Ingo B. Autenrieth und Erwin Bohn “*Yersinia enterocolitica* Adhesin A Induces Production of Interleukin-8 in Epithelial Cells.” Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, September 2004

Sonstige Veröffentlichungen:

Gutram A. Grassl, Erwin Bohn, Yvonne Müller, Oliver T. Bühler und Ingo B. Autenrieth „Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion“ *Int J Med Microbiol* (2003) 293, 41-54

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Yvonne Schmid
geb. Müller
Geburtsdatum 18. September 1975
Geburtsort Ruit / Ostfildern

Schulausbildung

1982 – 1986 Grundschule Neuffen
1986 – 1995 Hölderlin-Gymnasium Nürtingen

Hochschulstudium

10/1995 – 03/2001 Studium der Biologie
an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg
05/2000 – 03/2001 Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Mikrobiologie und Genetik der
Universität Erlangen-Nürnberg
Betreuung durch Prof. Dr. W. Hillen
Thema: Funktionsanalysen von rTetR Transaktivatoren

Promotion

07/2001 – 08/2005 Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am
Universitätsklinikum Tübingen, Eberhard Karls Universität Tübingen
Betreuung durch Prof. Dr. I. B. Autenrieth
Thema: Molekulare Mechanismen einer *Yersinia enterocolitica*
induzierten Wirtszellantwort.

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Yvonne Schmid
Viktor-Renner-Str. 27
72074 Tübingen