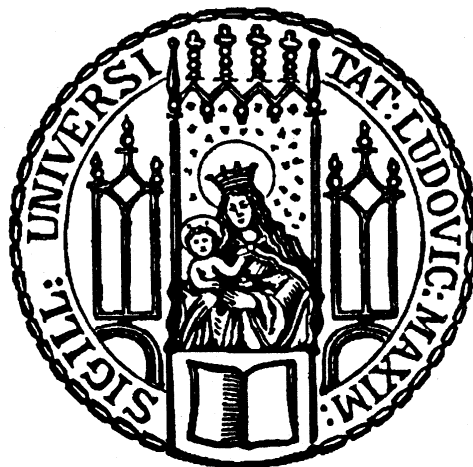


Aus dem Max von Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Rolle der angeborenen Immunität für die *Yersinia*- Infektion im Mausmodell

Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von
Ekaterina Lenk geb. Vlasova

2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Bakteriologie am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. J. Heesemann angefertigt.

Die Dissertation wurde bei der Ludwig-Maximilians-Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Biologie angenommen

am: 18. August 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Dezember 2011

Vorsitzende: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Prüfer/-in der Dissertation:

1. Gutachterin: Prof. Dr. Elisabeth Weiß
2. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Jung

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den

.....
(Unterschrift)

Erklärung

Hiermit erkläre ich,

- (x) dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.

- (x) dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.

- () dass ich mich mit Erfolg der Doktorprüfung im Hauptfach
und in den Nebenfächern.....
bei der Fakultät für der
(Hochschule/Universität)
unterzogen habe.

- () dass ich ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den.....

.....
(Unterschrift)

Meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Die Gattung <i>Yersinia</i>	3
1.1.1 <i>Yersinia enterocolitica</i>	4
1.1.2 Infektion und Klinik der Yersiniose.....	4
1.1.3 Pathogenese und Virulenz von <i>Y. enterocolitica</i>	5
1.1.4 <i>Yersinia</i> -Injektisom/Ysc-T3SS.....	5
1.1.5 <i>Yersinia</i> -Effektorproteine (Yops).....	7
1.1.6 Das Virulenz-Antigen LcrV.....	10
1.2 Mechanismen der Infektionsabwehr.....	11
1.2.1 Toll-like Rezeptoren.....	12
1.2.2 NOD-like Rezeptoren.....	15
1.2.3 Neutrophile Polymorphkernige Leukozyten (PMN).....	17
1.2.4 Zytokine und Chemokine als Effektoren der angeborenen Immunantwort.....	20
1.2.5 IL-10 als anti-inflammatorisches Zytokin der angeborenen und adaptiven Immunität.....	22
Zielsetzung.....	25
2 Material und Methoden.....	26
2.1 Reagenzien.....	26
2.2 Geräte.....	27
2.3 Bakterien.....	27

2.3.1 Yersinienstämme	27
2.3.2 Nährmedien und Zusätze.....	28
2.3.3 Kultivierung von Yersinien	28
2.3.4 Mauspassage von <i>Y. enterocolitica</i>	28
2.3.5 Bestimmung der Bakterienzahl für Mausinfektionsversuche	29
2.3.6 Bestimmung der Bakterienzahl für Zellkulturinfektionsversuche.....	29
2.4 Mausgenotypisierung	29
2.4.1 Mauslinien	29
2.4.2 DNA-Isolierung	30
2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
2.4.4 Primer für Mausgenotypisierung	33
2.4.5 Agarosegelelektrophorese	35
2.5 Tierexperimentelle Arbeiten.....	36
2.5.1 Medien und Lösungen	36
2.5.2 Gewinnung von neutrophilen Granulozyten aus der Peritonealhöhle	36
2.5.3 Gewinnung von Knochenmarkzellen.....	37
2.5.4 Zellzahlbestimmung.....	37
2.5.5 Mausinfektionsmodell	37
2.5.6 Anfertigen von Gewebepräparaten	39
2.5.7 Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten.....	39
2.6 Allgemeine immunologische Techniken.....	41
2.6.1 FACS-Analyse	41
2.6.2 Cytometric Bead Array (CBA)	42
2.6.3 Stimulation von Knochenmarkzellen mit <i>Y. enterocolitica</i>	44
2.6.4 Zytokinbestimmung mittels ELISA.....	45
2.6.5 ROS-Test.....	46
2.6.7 Statistische Auswertungen.....	47
3. Ergebnisse	48
3.1 Untersuchungen zur <i>Yersinia</i> -Infektionsempfänglichkeit von Mäusen mit definierten Defekten der angeborenen Immunität.....	48

3.1.1	Differentielle Anfälligkeit der <i>ko</i> -Mausstämme für <i>Y. enterocolitica</i>	50
3.1.2	Veränderung des Milzgewichtes während einer <i>Yersinia</i> -Infektion.....	52
3.1.3	Immunhistopathologische Untersuchung der Milzstruktur	54
3.1.4	Zytologische Charakterisierung der Milzzellzusammensetzung vor und nach der <i>Yersinia</i> -Infektion.....	62
3.1.5	Charakterisierung der hämatopoetischen Zellen in der Bauchhöhle uninfizierter Mäuse	66
3.1.6	Analyse des Infektionsverlaufs bei C57BL/6, IL-10 ^{-/-} und MyD88 ^{-/-} Mäusen	69
3.1.7	Zytokinkinetik von <i>Yersinia</i> -infizierten C57BL/6, IL-10 ^{-/-} und MyD88 ^{-/-} Mäusen.....	73
3.1.8	Analyse des Infektionsverlaufs bei C57BL/6, MyD88 ^{-/-} und TLR2 ^{-/-} /TLR4 ^{-/-} Mäusen.....	77
3.1.9	Analyse des Infektionsverlaufs bei C57BL/6, TLR2 ^{-/-} , CD14 ^{-/-} und TLR2 ^{-/-} /CD14 ^{-/-} Mäusen	81
3.1.10	Analyse des Infektionsverlaufs bei C57BL/6, RIP2 ^{-/-} , NOD2 ^{-/-} und NOD1 ^{-/-} /NOD2 ^{-/-} Mäusen.....	84
3.2	In vitro Analyse der differentiellen <i>Yersinia</i> -Empfänglichkeit von Mäusen mit definierten Defekten in der angeborenen Immunität	87
3.2.1	Zytokinsekretion von Knochenmarkzellen nach <i>Yersinia</i> -Infektion in vitro.....	87
3.2.2	Untersuchung der bakteriziden Eigenschaften der PMN	90
4.	Diskussion.....	93
4.1	Identifizierung von <i>Yersinia</i> -Infektionsempfänglichkeitsgenen bei der C57BL/6 Maus	93
4.2	Immunhistologische Untersuchungen der Milzen von <i>ko</i> -Mäusen im uninfizierten und infizierten Zustand.....	102
4.3	Qualitative und Quantitative Analyse der Immunzelltypen in der Milz und in der Bauchhöhle uninfizierter Mäuse mittels FACS.....	107
4.4	Qualitative und Quantitative Analyse der Immunzelltypen in der Milz und in der Bauchhöhle <i>Yersinia</i> -infizierter Mäuse mittels FACS.....	109
4.5	Abhängigkeit der Neutrophilenbakterizidie von TLR-Signalwegen.....	112

4.6 Kontrolle der <i>Yersinia</i> -Vermehrung/Kolonisierung in Abhängigkeit des angeborenen Infektionsabwehrpotentials.....	115
4.7 Vergleich der Zytokin- und Chemokinfreisetzung während der <i>Yersinia</i> -Infektion von Mäusen mit Defekten in der angeborenen Immunität	116
<i>Literaturverzeichnis</i>	125
<i>Anhang</i>	149
A1 Veröffentlichungen	149
A2 Danksagung.....	151
A3 Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
α -M.	α -Maus
Abb.	Abbildung
add	auffüllen auf
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CFU	engl.: „ <i>colony forming units</i> “
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
d	engl.: „ <i>day</i> “
Da	Dalton
d.h.	Das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: „ <i>deoxyribonucleic acid</i> “, DNS
dNTP	Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
dpi	engl.: „ <i>days post infection</i> “
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GFP	engl.: „ <i>green fluorescent protein</i> “
h	engl.: „ <i>hour</i> “
Ham.	Hamster
hpi	engl.: „ <i>hours post infection</i> “
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ip	intraperitoneal
Kan.	Kaninchen
Kann ^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaare

kDa	Kilodalton
<i>ko</i>	engl.: „ <i>knock out</i> “; außer Gefecht setzen (Deaktivierung eines Gens)
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar (mol/l)
m	milli (10^{-3})
meldepfl.	Meldepflichtig
MFI	engl.: „ <i>mean fluorescence intensity</i> “
mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOI	engl.: „ <i>multiplicity of infection</i> “
MW	Molekulargewicht
MZ-M Φ	Marginalzonenmakrophagen
MM Φ	marginale metallophile Makrophagen
μ	mikro (10^{-6})
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
n	nano (10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid
NK-T-Zellen	Natürlichen Killer T-Zellen
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt
OMP	engl.: „ <i>outer membrane protein</i> “
PBS	Phosphatgepufferte NaCl-Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pi	engl.: „ <i>post infection</i> “
PMN	polymorphkernige Leukozyten (Neutrophile)
PPiN	Proteose-Pepton-induzierte Neutrophile
Rat.	Ratte
ROS	engl.: „ <i>reactive oxygen species</i> “
rpm	engl.: „ <i>rounds per minute</i> “

RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sp ^c ^R	Spectinomycinresistenz
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
üN	über Nacht
u.U.	unter Umständen
usw.	und so weiter
v.a.	vor allem
Verd.	Verdünnung
vs.	Latein: „ <i>versus</i> “; gegen, gegenüber gestellt
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Yersinia enterocolitica ist pathogen für Mensch und Maus. Als gramnegative Bakterien setzen sie typische „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMP), wie Lipopolysaccharid (LPS), Fragmente der Zellwand (Peptidoglykan), Lipoprotein (LP) und *Yersinia* V Antigen (LcrV) frei, die durch wirtseigene PAMP-Rezeptoren (PRR) erkannt werden. Die PRR-Familie besteht aus Oberflächenrezeptoren, wie z.B. TLR-Moleküle und zytosolischen Rezeptoren wie NOD1/2, die über Signaltransduktionsadaptorproteine wie MyD88, TRIF und RIP2 die Genexpression regulieren. PRR-Signalwege führen zur Sekretion von pro-inflammatorischen Zyto- und Chemokinen (z.B. IL-1, IL-6, KC, IFN- γ , IL-12 und MIP-2) sowie anti-inflammatorischen Zytokinen IL-10 und IL-1Ra. In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die PRR TLR2, TLR4, CD14, NOD1 und NOD2, die Komponenten der Signaltransduktionskaskade MyD88, TRIF, RIP2 sowie die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-1Ra auf die *Yersinia*-Infektionsempfänglichkeit im Mausmodell haben.

Entsprechende gendefiziente Mäuse wurden intraperitoneal mit *Y. enterocolitica* infiziert und der Infektionsverlauf charakterisiert. Die Keimzahl in infizierten Mäusen wurde mittels Bestimmung der CFU („colony forming units“) in der Milz und in der Peritoneallavage ermittelt, während die zelluläre Antwort der infizierten Mäuse mittels Untersuchung der Milzmorphologie, Charakterisierung der Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen in Peritoneum und Milz sowie Zytokin-/Chemokinbestimmung analysiert wurde.

Die untersuchten gendefizienten Mäuse konnten drei verschiedenen *Yersinia*-Empfänglichkeitsgruppen zugeordnet werden:

- 1) Ye-HR (hochresistent): IL-10^{-/-}, IL-1Ra^{-/-};
- 2) Ye-R (wt-ähnlich resistent): C57BL/6, TLR2^{-/-}, CD14^{-/-}, TLR2^{-/-}/CD14^{-/-}, TLR4^{-/-}, TRIF^{-/-}, NOD1^{-/-}, NOD2^{-/-}, NOD1^{-/-}/NOD2^{-/-}, RIP2^{-/-};
- 3) Ye-HS (hochempfänglich): MyD88^{-/-}, TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}, TRIF^{-/-}/MyD88^{-/-}.

Yersinien besiedeln nach der Infektion lymphatische Organe wie Peyer Plaques, periphere Lymphknoten, Milz und Leber, wobei sie im Gewebe extrazellulär Mikrokolonien bilden. Die immunhistologische Analyse der Milz von C57BL/6 (3 dpi) und IL-10^{-/-} (2 dpi) Mäusen zeigte, dass *Yersinia*-Stäbchen durch die sich verzweigende Milzarterie in die weiße Pulpa gelangen, wo sie in den T-Zellarealen zu kompakten Mikrokolonien heranwachsen, was zur Auflösung der T-Zellareale führt (T-Zellzerstörung oder -Abwanderung). In diesen Mäusen werden Yersinien innerhalb der weißen Pulpa zurückgehalten, die durch die Marginalzone (Marginalsinus und Marginalzonen-Makrophagen) begrenzt ist. Im Vergleich dazu wurde bei infizierten Milzen von MyD88^{-/-} Mäusen 2 dpi eine Zerstörung der Milzarchitektur mit

Vermehrung von Yersinien in weißer und roter Pulpa sowie Auflösung der Marginalzone festgestellt.

Diese Befunde sprechen dafür, dass die Yersinien bei MyD88^{-/-} Mäusen in die Marginalsinus und die rote Pulpa gelangen. Offensichtlich ist hierfür die defekte TLR/IL-1R-Signaltransduktion verantwortlich. Darüber hinaus konnte eine massive Rekrutierung von Neutrophilen (PMN) zu *Yersinia*-Mikrokolonien festgestellt werden. Es wurde gefunden, dass IL-10^{-/-} Mäuse in der Lage sind, Yersinien vollständig aus dem Bauchraum sowie aus der Milz innerhalb von 3 Tagen zu eliminieren und dass diese erhöhte Resistenz mit der frühen Rekrutierung der PMN zusammenhängt. Der zeitige Zugang der Neutrophilen in den Bauchraum und in die Milz ist dabei für die weitere Dissemination von Yersinien und den Ausgang der Infektion entscheidend. Die PMN-Rekrutierung wird durch eine frühe Produktion von Zytokinen/Chemokinen, wie G-CSF, KC und MIP-2, wahrscheinlich von Mesothelzellen und eingewanderten Neutrophilen, induziert.

Es wurde nachgewiesen, dass die Expression von IL-1 α/β nach der frühzeitigen Erkennung der *Yersinia*-PAMP die Chemokinsekretion und darauffolgende PMN-Einwanderung induziert. Dabei wurde die möglichst frühe (2-4 hpi) Produktion von IL-1 α/β , G-CSF, KC und MIP-2 als ausschlaggebend für die *Yersinia*-Resistenz gefunden. So bedingt eine hohe Chemokinsekretion und eine rapide PMN-Einwanderung in den Peritonealraum und in die Milz die erhöhte Resistenz von IL-10^{-/-} Mäusen gegenüber einer *Yersinia*-Infektion. Dagegen erwiesen sich MyD88^{-/-} Mäuse wegen stark verzögerter (24 h) pro-inflammatorischer Zytokin- und Chemokinantwort als hochempfindlich für *Yersinia enterocolitica*.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Bauchraum die erste Schutzbarriere gegen Yersinien-Proliferation und Dissemination darstellt.

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Yersinia*

Yersinien sind gramnegative stäbchenförmige Bakterien, die zu Ehren von Alexandre Emile Yersin benannt wurden, der 1894 in Hongkong während der 3. Pestpandemie den Pesterreger *Y. pestis* isolierte und beschrieb (Bottone, 1997). Die Gattung *Yersinia* wird der Familie der Enterobacteriaceae zugeordnet, zu der aktuell 16 bekannte Arten gehören (Murros-Konttiainen et al., 2010). Yersinien sind pleomorphe, fakultativ anaerobe, nicht-sporulierende Bakterien, die in einem Temperaturbereich von 4°-42°C wachsen, wobei ihr Temperaturoptimum bei 27°C liegt. Es gibt drei typisch humanpathogene Arten: *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* (Bottone, 1997). Während *Y. pestis* der Erreger der Pest ist, sind *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* primär enteropathogen und verursachen die als Yersiniosen definierten Erkrankungen (Brubaker, 1991). Das Hauptreservoir für *Y. pestis* stellen chronisch infizierte Wildnagetiere dar. Die Übertragung auf Menschen geschieht durch den Biss infizierter Flöhe (z.B. *Xenopsylla cheopis*), die die Erreger von den Nagern mit der Blutmahlzeit aufnehmen (Perry and Fetherston, 1997). Von der Eintrittsstelle aus gelangen die Bakterien in die regionalen Lymphknoten, wo sie sich vermehren und nach einer Inkubationszeit von 2-10 Tagen beim Menschen die Beulenpest hervorrufen können. Die Lungenpest tritt als Folge einer Bakteriämie im Verlauf einer Beulenpest oder nach Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch auf (Butler, 2009; Heesemann, 2001). *Y. pseudotuberculosis* führt in erster Linie zu Infektionen bei Tieren und nur selten bei Menschen. Die Erkrankungen manifestieren sich als mesenteriale Lymphadenitis mit Fieber und manchmal Diarrhö. Die wichtigsten Reservoirs für *Y. pseudotuberculosis* sind neben Nagern auch Carnivore (z.B. Fuchs, Igel) und Wildvögel (Dedie K. et al., 1993).

Yersinia enterocolitica kann in eine nicht-pathogene Gruppe, die Biogruppe 1A, und bezüglich der Mausvirulenz in 2 Gruppen unterschiedlicher Pathogenität eingeteilt werden (Perry and Fetherston, 1997). Die schwachpathogene, nicht mausletale Gruppe umfasst Biovar 2-5 mit den Serotypen O:3, O:9, O:5,27 (letale Dosis $LD_{50} > 10^7$ Yersinien, parenterale Applikation), und die hochpathogene, mausletale Gruppe gehört zum Biovar 1B mit den Serotypen O:4, O:8, O:13ba, O:13b, O:18, O:20, O:21 (letale Dosis $LD_{50} < 1000$ Yersinien, parenterale Applikation) (McNally et al., 2004; Prentice et al., 1991).

1.1.1 *Yersinia enterocolitica*

Y. enterocolitica kommt weltweit ubiquitär vor. Für die humanpathogenen Stämme stellt das Schwein das Hauptreservoir dar (Bottone, 1997). *Y. enterocolitica* ist biochemisch und serologisch sehr heterogen. Auf Grund von verschiedenen Oberflächenantigenen lassen sich 18 O-Serotypen unterscheiden. Die Serotypisierung erfolgt anhand von Modifikationen in den LPS-Seitenketten der Bakterien. Das Vorkommen der unterschiedlichen Serotypen unterliegt einer bestimmten geographischen Verteilung. So tritt Biovar 1B mit den medizinisch relevanten Serotypen O:4, O:8, O:13, O:20 und O:21 überwiegend in Nordamerika auf, wobei O:8 dominiert. In Europa werden 80% der Infektionen von *Y. enterocolitica* vom Biovar 4, Serotyp O:3 und die übrigen von den Biovaren 2, 3 und 5 mit den Serotypen O:5,27 und O:9 hervorgerufen (Prentice et al., 1991; Schubert et al., 2004; Rosner et al., 2010).

1.1.2 Infektion und Klinik der Yersiniose

Erkrankungen bei Mensch und Tier, die durch *Y. enterocolitica* oder *Y. pseudotuberculosis* verursacht werden, werden als Yersiniosen bezeichnet. In Deutschland gehören enteropathogene Yersinien, neben Salmonellen und Campylobakterien, seit Jahren zu den dritthäufigsten Verursachern bakterieller Enteritiden (Robert Koch-Institut, 2011). Die Infektion mit *Y. enterocolitica* erfolgt durch orale Aufnahme kontaminierter Nahrungsmittel (Black et al., 1978) oder Wasser (Keet, 1974) oder durch direkte Inokulation während einer Bluttransfusion (Stenhouse and Milner, 1982). Eine Yersiniose kann sich in 3 klinischen Hauptformen manifestieren: (1) Enteritis, die sich in Form von Fieber und wässrigem Durchfall äußert und in der Regel bei Kindern auftritt, (2) terminale Ileitis oder mesenteriale Lymphadenitis, welche u.U. die Symptome einer Pseudoappendizitis aufweist und vermehrt bei Jugendlichen auftritt, (3) Sepsis mit der Ausbildung von fokalen Abszessen in Milz und Leber betrifft v.a. Erwachsene mit schwerer Grunderkrankung wie z.B. Leberzirrhose oder Diabetes mellitus (Bockemuhl and Roggentin, 2004). Als postinfektiöse Folgeerkrankungen einer Yersiniose können extraintestinale, immunologisch bedingte Krankheitsbilder wie reaktive Arthritis, Erythema nodosum und Uveitis anterior auftreten (Granfors et al., 1998). In der Regel aber verläuft die Yersiniose selbstlimitierend. Eine antibiotische Therapie mit Tetracyclin, Cotrimoxazol oder Fluorochinolen wird bei Risikopatienten mit septischen Verlaufsformen angewendet.

1.1.3 Pathogenese und Virulenz von *Y. enterocolitica*

Nach der oralen Aufnahme gelangen die Yersinien zunächst in den unteren Dünndarmabschnitt und invadieren die in der Mukosa der Peyer'schen Plaques (PP) gelegenen M-Zellen. Pathogene Yersinien haben eine Affinität zum lymphatischen Gewebe wie PP (Darm-Lymphfollikeln), die im gesamten Dünndarm vorkommen und zum lymphatischen System gehören. Die Bindung an das β 1-Integrin der epithelialen M-Zellen wird durch das chromosomal kodierte Außenmembranprotein Invasin vermittelt (Isberg and Barnes, 2001). Nach der Invasion des intestinalen Epitheliums vermehren sich die Bakterien extrazellulär in PP und können von dort aus in mesenteriale Lymphknoten, Milz, Leber und Blutbahn disseminieren (Carter, 1975; Cornelis, 1998; Pujol and Bliska, 2005). Voraussetzung für die Pathogenität ist das 70 kb-große *Yersinia*-Virulenzplasmid (pYV), welches eine Vielzahl von Virulenzfaktoren kodiert (Portnoy and Falkow, 1981). Das pYV trägt Gene für die Synthese des *Yersinia* Typ III Sekretionssystems (Ysc-T3SS, auch als „Injektisom“ bezeichnet), für sogenannte „*anti host effector proteins*“ oder „*Yersinia outer proteins*“ (Yops, Substrate für Ysc-T3SS), und *Yersinia*-Adhäsine YadA. Zusätzlich zum pYV-Plasmid besitzen enteropathogene Yersinien zwei chromosomal kodierte Determinanten, welche intestinale Invasion und Maus-Virulenz unterstützen: das *inv*-Gen, welches für das Außenmembranprotein Invasin (Inv) kodiert, und ein Satz von Genen der so genannten „*high pathogenicity island*“ (HPI), die für die Biosynthese des Yersiniabactins (Ybt, Siderophor) und das Ferri (Fe^{3+})-Yersiniabactin-Aufnahmesystem kodieren. Invasin vermittelt die Adhärenz von Bakterien an die M-Zellen der PP und das Durchdringen der Mucosaschicht (Schubert et al., 2004; Heesemann et al., 2006).

1.1.4 *Yersinia*-Injektisom/Ysc-T3SS

Typ-3-Proteinsekretionssysteme (T3SS) sind injektionsnadelförmige Proteintransportsysteme, die für die Pathogenität von vielen gramnegativen Bakterien verantwortlich sind (Galan and Collmer, 1999). Das T3SS stellt ein komplexes Proteintransportsystem dar, welches aus 25 Proteinen, einschließlich der Regulatorproteine, besteht. Diese sind strukturell und funktionell eng mit dem Flagellenapparat verwandt (Cornelis and Van, 2000). T3SS ermöglicht die zellkontaktvermittelte Injektion von bakteriellen Effektorproteinen in das Zytosol von eukaryotischen Wirtszellen. Das Ysc-T3SS von *Yersinia* besteht aus „*Yersinia secretion complex*“ (Ysc) und den Substratproteinen „*Yersinia outer proteins*“ (Yops). Der Sekretionsapparat setzt sich aus einem Basalkörper zusammen, der die

Peptidoglykanschicht und die zwei Bakterienmembranen durchspannt, und einer „Nadel“, welche über die Außenmembran (OM) herausragt (Abb. 1.1) (Cornelis, 2002; Mota, 2006). Der Ring, der die Außenmembran durchspannt, besteht aus oligomeren Secretin YscC und Lipoprotein YscW. YscV, YscU, YscR, YscT und YscS sind Proteine des Basalkörpers und stehen in Kontakt mit der inneren zytoplasmatischen Membran. Die Nadel besteht aus einem Polymer aus YscF (Nadelprotein), ist 600-800 Å lang und hat einen luminalen Durchmesser von ca. 20 Å (Cornelis and Van, 2000; Cornelis and Van, 2000; Galan and Wolf-Watz, 2006; Cornelis and Van, 2000). An der Bildung der Translokationspore in der Wirtszellmembran sind die Translokatorproteine YopB und YopD und LcrV (*Yersinia* V-Antigen) beteiligt (Goure et al., 2005; Galan and Wolf-Watz, 2006).

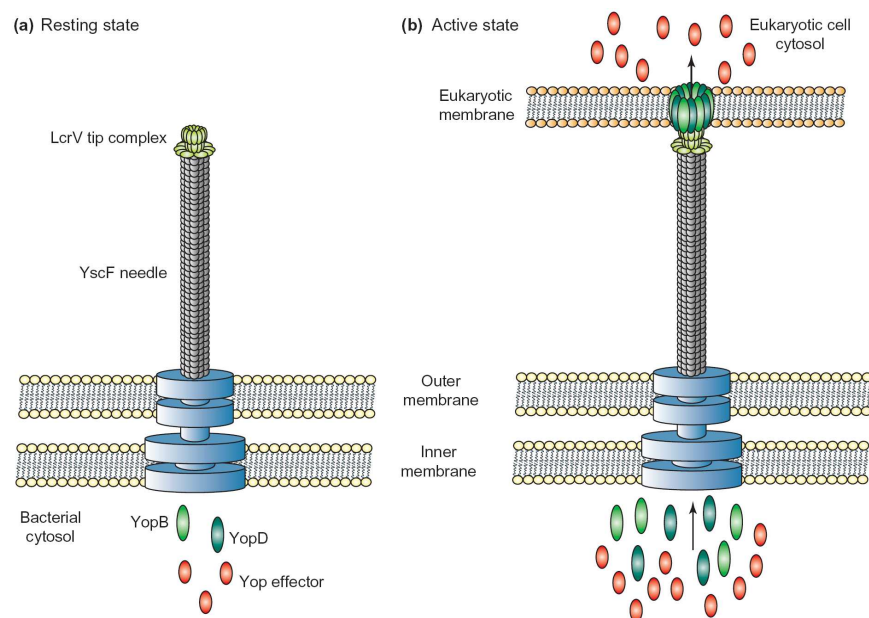


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Ysc-Nadelapparates (aus Mota, 2006). (a) Der Ysc-Nadelapparat durchspannt die innere zytoplasmatische Membran, Peptidoglykanschicht sowie die Außenmembran des Bakteriums und mündet in ein nadelähnliches Gebilde mit der Hauptkomponente YscF. An der Ausbildung der Pore in der Ziellmembran der eukaryotischen Zelle ist der LcrV „*tip complex*“ beteiligt. Im „Ruhezustand“ ohne Zellkontakt ist das Injektisom komplett ausgebildet, aber die Yop-Effektorproteine werden im Zytoplasma zurückgehalten. (b) Nach dem Zellkontakt wird das T3SS aktiviert und YopB-YopD-Translokatorproteine bilden eine Pore in der Membran der eukaryotischen Zielzelle, wobei dem LcrV die Rolle eines extrazellulären Chaperons zukommt.

1.1.5 *Yersinia*-Effektorproteine (Yops)

Die wichtigste Rolle der Yops ist es der angeborenen Immunabwehr des Wirtes entgegenzuwirken. Bisher wurden sechs Effektorproteine (YopH, YopO/YpkA, YopP/J, YopE, YopM und YopT) beschrieben, die nach dem Wirtszellkontakt des Bakteriums in die Wirtszelle injiziert werden. Die Yops kontrollieren die Dynamik des Zytoskeletts, die Phagozytose von Makrophagen und Neutrophilen und hemmen die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen zum Vorteil des Erregers (Trulzsch et al., 2008; Bliska and Black, 1995). Diese Strategie erlaubt das Überleben und die extrazelluläre Replikation der Yersinien in lymphatischem Gewebe. In vitro werden die Yops bei 37°C und Calciumionenentzug in das Kulturmedium sezerniert (Heesemann and Laufs, 1983; Heesemann et al., 1986). Calciummangel oder der Kontakt mit einer eukaryotischen Wirtszelle sowie der Temperaturanstieg kontrollieren die Transkription der *yop*-Gene. Die Wirkungsweise der einzelnen Yops wird nachfolgend vorgestellt und zur Übersicht in Abb. 1.2 zusammengefasst.

YopH ist eine Protein-Phosphotyrosin-Phosphatase (Zhang et al., 1992), die Proteine des fokalen Adhäsionskomplexes (Fak, Paxillin, p130cas) dephosphoryliert. Dadurch werden die adhäsionsregulierten Signalwege in z.B. Makrophagen zerstört, wodurch deren Phagozytosefähigkeit inhibiert wird (Persson et al., 1997; Fallman et al., 1997). Des Weiteren blockiert YopH den „oxidative burst“, d.h. die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies von Makrophagen und Neutrophilen (Persson et al., 1999). Auch die Produktion von „*monocyte chemoattractant protein-1*“ (MCP-1) wird von YopH unterbunden (Sauvonnet et al., 2002). Neben der Inhibition der Zellen der angeborenen Immunität, hemmt YopH die Antigenvermittelte Aktivierung von B- und T-Zellen (Yao et al., 1999).

YopE ist ein GTPase-aktivierendes Protein, welches hauptsächlich auf Rho-GTPasen (Rac, RhoG, Rho und CDC42) wirkt und die intrinsische GTPase Funktion aktiviert (RhoGTP → RhoGDP) (Black and Bliska, 2000; Aepfelbacher, 2004). Somit führt YopE zur Zerstörung des Zytoskeletts und Hemmung der Phagozytose. Zusätzlich wirkt YopE der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen entgegen (Schotte et al., 2004; Roppenser et al., 2009).

YopT ist eine Cysteinprotease, welche zytotoxisch wirkt und zur Zerstörung des Aktinzytoskeletts der Wirtszelle beiträgt (Adkins et al., 2007). Durch Abspaltung des C-terminalen prenylierten Cysteins (Membrananker) werden die aktiven membrangebundenen RhoA-GTPasen inaktiviert (Zumbihl et al., 1999). Die inaktivierten lipidankerfreien GTPasen lösen sich von der Zellmembran, was zu einer Inhibition der Aktinpolymerisierung in der

Wirtszelle führt. Neben YopE ist YopT das zweite Modulin, das durch Destabilisierung des Zytoskeletts zur Phagozytoseresistenz der Yersinien beiträgt.

YopO ist eine autophosphorylierende Serin/Threonin-Kinase. YopO interagiert mit RhoA und Rac, phosphoryliert Aktin und sich selbst und interferiert mit der für die Phagozytose nötigen Signaltransduktionsmaschinerie (Barz et al., 2000; Dukuzumuremyi et al., 2000). YopO inaktiviert das Gq α -heterotrimeres G-Protein. Die genauere Funktionsweise von YopO ist noch nicht vollständig geklärt. YpkA (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*) ist homolog zu YopO von *Y. enterocolitica*.

YopM ist ein „*leucine-rich repeat*“ Protein, welches über einen vesikelassoziierten Transportweg in den Zellkern gelangen kann (Skrzypek et al., 1998) und einen Proteinkomplex mit zwei zellulären Kinasen PRK2 und RSK1 bildet (McDonald et al., 2003). Der genaue zelluläre Effekt ist noch nicht geklärt, wobei über einen möglichen Einfluss auf die Gentranskription diskutiert wird. Es wurde gezeigt, dass YopM die Depletion von NK-Zellen verursacht (Kerschen et al., 2004).

YopP aus *Y. enterocolitica* und das homologe YopJ aus *Y. pseudotuberculosis/Y. pestis* vermitteln einen immunmodulatorischen Effekt auf die Regulation der Immunantwort. Auf diese Weise inhibiert YopP/YopJ die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α durch Makrophagen und IL-8 durch Endothelzellen (Palmer et al., 1998; Ruckdeschel, 2002; Boland and Cornelis, 1998). Des Weiteren wurde gezeigt, dass YopP die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 („*intracellular adhesion molecule 1*“) und E-Selektin auf Endothelzellen reduziert, was die Rekrutierung von Neutrophilen aus der Blutbahn zum Infektionsherd inhibieren könnte (Denecker et al., 2002). Diese Effekte sind das Resultat einer Blockade der Aktivierung von NF- κ B und MAP-Kinasen-abhängigen Signalwegen in *Yersinien*-infizierten Zellen (Boland and Cornelis, 1998; Ruckdeschel et al., 1998; Orth et al., 1999). YopP/YopJ inhibiert die NF- κ B-aktivierende I κ B-Kinase (IKK β) durch Deubiquitinierung, wodurch die Dissoziation von NF- κ B von I κ B und folglich die NF- κ B-Translokation in den Zellkern unterbunden wird (Orth et al., 1999; Carter et al., 2003). Die Hauptwirkung von YopJ hängt wahrscheinlich mit seiner Acetyltransferaseaktivität zusammen. So katalysiert YopJ die Acetylierung von Serin- und Threonin-Resten von MEK2, wodurch die Phosphorylierung zur Aktivierung blockiert wird. Darüber hinaus blockiert YopP auch den I κ B-Kinasekomplex IKK (Mukherjee et al., 2006; Mittal et al., 2006). Des Weiteren ist YopP für Apoptose-Induktion von Makrophagen und Dendritischen Zellen durch Inhibition von NF- κ B-induzierten anti-apoptotischen Faktoren verantwortlich (Erfurth et al., 2004; Mills et al., 1997; Monack et al., 1997).

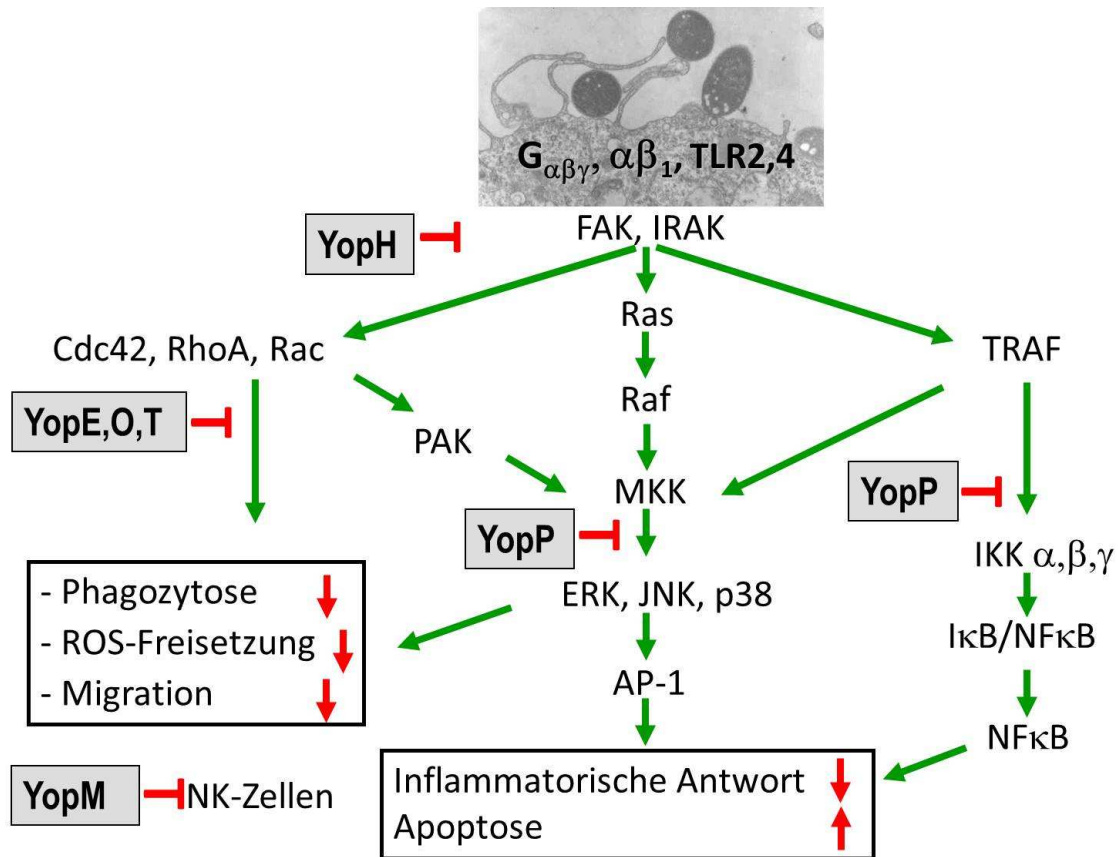


Abb. 1.2: Modulation von multiplen Signalwegen durch Yop-Effektorproteine von *Yersinia* (Heesemann et al., 2006). Auf dem elektronenmikroskopischen Bild ist ein Dünnschnitt der Interaktion von *Yersinia* mit einem Makrophagen dargestellt. Signalwege werden durch $\alpha\beta_1$ -Integrine und TLR2/TLR4 initiiert. Die Interaktion von YadA oder Inv mit $\alpha\beta_1$ -Integrinen aktiviert die Fokaladhäsionskinase (FAK), was zur Tyrosinphosphorylierung von weiteren Komponenten des Fokaladhäsionskomplexes (FAC) führt. Die Ausbildung von FAC wird von Protein-Tyrosinphosphatase YopH inhibiert. Die Aktivierung von $\alpha\beta_1$ -Integrin und TLR2 führt zur Aktivierung der GTPasen Rho und Rac durch Austausch von GDP durch GTP. Die GTPase-aktivierende Aktivität von YopE (GAP-Mimikri) und Cysteinproteaseaktivität von YopT führen zur Inaktivierung von Rac und RhoA und folglich zur Blockade der für die Phagozytose essentiellen Zytoskelettlagerung. YopO ist eine Serin/Threoninkinase, die ebenfalls mit RhoA und Rac1 interagiert. YopP interferiert mit MAPK-Signalwegen (Erk, JNK und p38) durch Bindung und wahrscheinlich nachfolgender Acetylierung von MAPK-Kinasen (MKK) sowie IκB-Kinase β (IKKβ). Auf Grund der Blockade dieser Kinasen werden sowohl die MAPK- als auch die NF-κB-Signaltransduktionswege unterbrochen. Folglich wird sowohl die inflammatorische als auch die anti-apoptotische Antwort stark abgeschwächt.

1.1.6 Das Virulenz-Antigen LcrV

LcrV („*low calcium response virulence antigen*“) wurde 1956 durch Burrows entdeckt und hat sich aufgrund seiner Multifunktionalität als einer der geheimnisvollsten Virulenzfaktoren der pathogenen *Yersinien* erwiesen (BURROWS, 1956). „*Low calcium response*“ (LCR) stellt in vitro ein Phänomen dar, bei dem durch Erhöhung der Temperatur von 26°C auf 37°C und den Entzug von freien Calciumionen (Ca^{2+}) aus dem Kulturmedium pathogene *Yersinien* die Vermehrung stark reduzieren und die T3SS-vermittelte Yop-Sekretion initiieren. Das physiologische Korrelat dazu könnte der direkte Bakterien-Wirtszellkontakt darstellen, bei dem die T3SS-Nadel die extrem niedrige zytosolische Ca^{2+} -Konzentration der Wirtszelle spürt (DeBord et al., 2001). LcrV besitzt hohe pathogenetische Bedeutung, da es sich in aktiven und passiven Immunisierungsexperimenten als protektives Antigen erwiesen hat (Hill et al., 1997; Leary et al., 1995). LcrV und das Kapselantigen F1 haben sich als wirksame Impfstoffe gegen *Y. pestis* erwiesen (Anisimov et al., 2004). Das 37,5 kDa große hydrophile Protein LcrV sitzt an der Spitze der „Injektionsnadel“ und ist zusammen mit den hydrophoben Translokatoren YopB und YopD an der Ausbildung der T3SS-vermittelten Translokationspore in der eukaryotischen Zellmembran beteiligt (Pettersson et al., 1999; Mota, 2006). Das V-Antigen kann sich im bakteriellen Zytoplasma und auf der Bakterienoberfläche befinden und über das T3SS sezerniert werden (Fields et al., 1999; Fields and Straley, 1999). LcrV gelangt aber auch durch einen T3SS-unabhängigen Mechanismus vermutlich über Endozytose in die Wirtszelle (Fields and Straley, 1999).

LcrV besitzt immunmodulatorische Aktivität, die mit der Unterdrückung der Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen TNF- α und IFN- γ sowie der Induktion des immunsupprimierenden Zytokins IL-10 assoziiert ist (Brubaker, 2003). Es wurde gezeigt, dass rekombinantes LcrV von *Y. enterocolitica* O:8 die Sekretion von TNF- α von murinen und humanen Makrophagen durch IL-10-Induktion inhibiert, und dieser Effekt von CD14 und TLR2 abhängig ist (Sing et al., 2002b). Die immunmodulatorische Rolle von LcrV während einer in vivo Infektion wurde deutlich aufgrund der Beobachtung, dass sowohl IL-10^{-/-} als auch TLR2^{-/-} Mäuse im Vergleich zu wt-Mäusen resistenter gegenüber *Y. enterocolitica* sind (Brubaker, 2003; Sing et al., 2002a). Transkriptomanalyse von einer in vitro infizierten murinen J774-Makrophagenlinie ergab, dass *Y. enterocolitica* die Transkription der *Il-1ra*-Gens induziert. Es wird daher angenommen, dass LcrV durch die Induktion der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra) über TLR2 zur Virulenz von *Yersinien* beiträgt (Heesemann et al., 2006; van Erp K. et al., 2006).

1.2 Mechanismen der Infektionsabwehr

Als Immunität bezeichnet man die Fähigkeit eines Organismus dem Eindringen der Krankheitserreger zu widerstehen bzw. die krankheitserregenden Mikroorganismen vor Ausbruch der Erkrankung zu eliminieren. Es gibt zwei hinsichtlich Spezifität und Schnelligkeit verschiedene Arten der Immunantwort: die angeborene („natürliche“ oder unspezifische) und erworbene („adaptive“ oder spezifische) Immunität. Die angeborene Immunität reguliert die adaptive Immunität und umgekehrt. Die angeborene Immunität hat sich evolutionär über Millionen Jahre hin entwickelt und ist über Gattungs- und Speziesgrenzen hinweg hochkonserviert geblieben (Janeway, Jr. and Medzhitov, 2002). Das angeborene Immunsystem antwortet schnell auf „fremde“ Agonisten (z.B. Krankheitserreger; „*stranger signal*“) aber auch auf eigene zerstörte Zellstrukturen („*damage signal*“) durch Diskriminierung zwischen fremden („*non-self*“) und zu tolerierenden wirtseigenen („*self*“) hochkonservierten molekularen Mustern („*pathogen-associated molecular patterns*“: PAMP; „*damage-associated molecular patterns*“: DAMP) (Medzhitov and Janeway, Jr., 2002). Neben phagozytierenden Zellen (Neutrophilen und Makrophagen), gehören auch Zellen, die inflammatorische Mediatoren freisetzen (Basophile, Mastzellen und Eosinophile), die Dendritischen (DZ) und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zur angeborenen Immunität. Zu den molekularen Komponenten zählen das Komplementsystem, Akutphaseproteine, Chemokine und Zytokine (Delves and Roitt, 2000). Die adaptive Immunantwort ist spezifischer und setzt verzögert ein. Die erworbene Immunität beinhaltet die Proliferation von Antigen-spezifischen B- und T-Zellen, die durch Antigenpräsentation auf der Oberfläche von Zellen des angeborenen Immunsystems initiiert wird. B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen, die antigenspezifische Antikörper (AK) sekretieren, die für die Eliminierung von extrazellulären Mikroorganismen zuständig sind. T-Zellen können Plasmazellen zur AK-Produktion anregen oder intrazelluläre Pathogene durch Aktivierung von Makrophagen oder durch direkte Zerstörung von virusinfizierten Zellen eliminieren (Delves and Roitt, 2000).

Alle Immunzellen entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Dieser Prozess wird als Hämatopoese bezeichnet (Abb. 1.3). B-Zellen reifen im Knochenmark, während T-Zellen im Thymus ausdifferenzieren. Die adaptive Immunantwort wird in den Lymphknoten, der Milz und im mucosaassoziierten lymphatischen Gewebe („*mucosa-associated lymphoid tissue*“, MALT) generiert. Die angeborene Immunantwort wird unmittelbar am Infektionsherd durch patrouillierende phagozytierende Zellen gestartet.

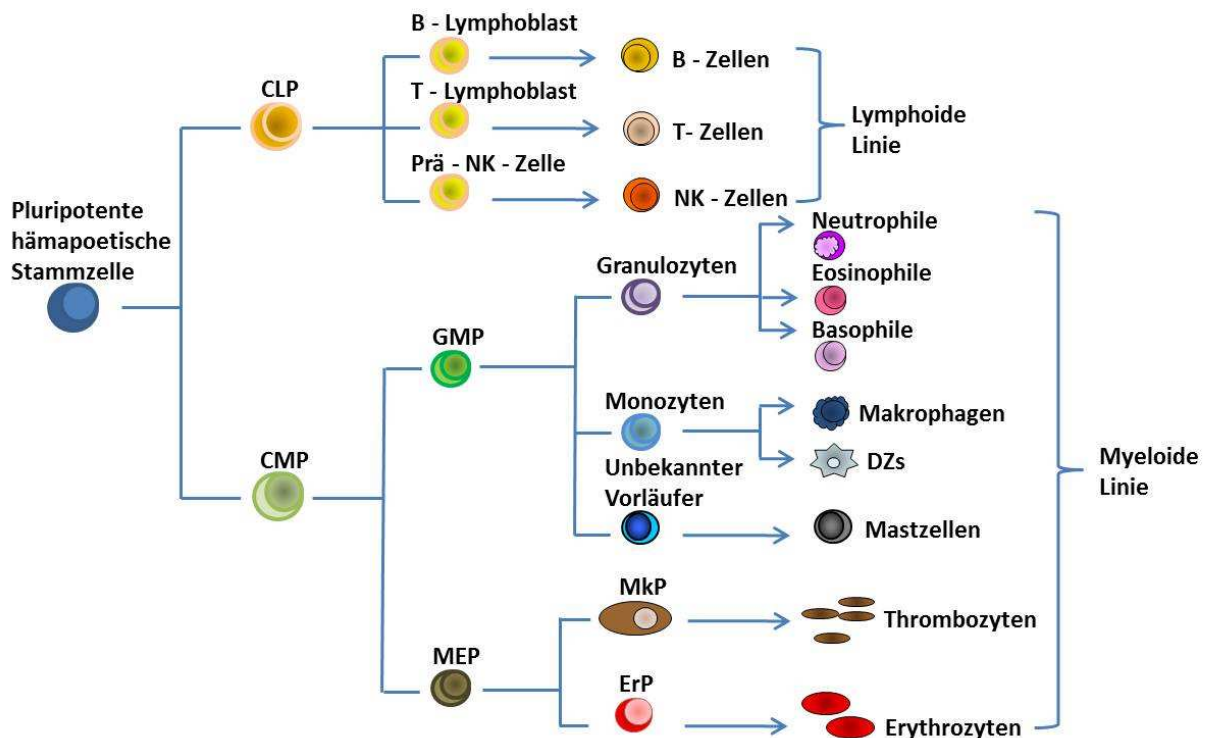


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Hämatopoese. Alle Zellen des Immunsystems und die zellulären Bestandteile des Blutes haben ihren Ursprung im Knochenmark. Durch Teilung pluripotenter, hämatopoetischer Stammzellen entstehen zwei Typen von Vorläuferzellen: die lymphoiden Vorläuferzellen, aus der sich T- und B-Lymphozyten sowie lymphozytenähnliche Zellen, die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), entwickeln; und die myeloiden Vorläuferzellen, aus der Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen (DZs), Granulozyten entstehen und Erythrozyten sowie Megakaryozyten und Thrombozyten hervorgehen. CLP-lymphoide Vorläufer („*common lymphoid precursor*“), CMP-myeloischer Vorläufer („*common myeloid precursor*“), GMP-granulozytär-monozytärer Vorläufer, MEP-megakaryozytär-erythroider Vorläufer, ErP-Erythrozytenvorläufer, MkpP-Megakaryozytenvorläufer (Janeway et al., 2008; Rieger M. and Schroeder T., 2007).

1.2.1 Toll-like Rezeptoren

Das angeborene Immunsystem ist die erste Abwehrbarriere gegen eindringende mikrobielle Erreger. Die Zellen der angeborenen Immunität exprimieren diverse „*pattern recognition receptors*“ (PRR), die verschiedene PAMP- und DAMP-Strukturen erkennen (Akira et al., 2006) erkennen. Durch die Erkennung von PAMP und DAMP durch PRR werden intrazelluläre Signalwege aktiviert, die zur Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Interferonen, und zur Hochregulierung von co-stimulatorischen Molekülen führen. In Säugetieren spielt die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR), welche auf Antigen-präsentierenden Zellen wie Dendritischen Zellen (DZ) oder Makrophagen oder auch anderen Zelltypen (Endothel- und Epithelzellen) exprimiert werden, die Schlüsselrolle in der Induktion der angeborenen Immunantwort (Akira et al., 2006). Ein Toll-Rezeptor wurde ursprünglich in der Fruchtfliege *Drosophila* als ein essentieller Faktor für die Organisation der dorso-

ventralen Achse während der Embryonalentwicklung beschrieben (Hashimoto et al., 1988; Anderson, 1985; Lemaitre et al., 1996). Mitte der 1990er Jahre wurde zusätzlich eine Abwehrfunktion des Toll-Rezeptors während Pilzinfektionen bei *Drosophila* entdeckt (Lemaitre et al., 1996). Die TLR sind Typ I-Membranproteine, deren extrazellulärer Teil (N-Terminus) eine hufeisenförmige Struktur aus leucinreichen Sequenzwiederholungen („*leucine-rich repeats*“, LRRs) bildet und für die spezifische PAMP-Erkennung essentiell ist. Der zytoplasmatische Teil der TLR stellt ein Homolog zur zytoplasmatischen Region des IL-1 Rezeptors dar, bekannt als TIR-Domäne („*Toll/IL-1R homology domain*“), die für die Signalübertragung erforderlich ist (Kawai and Akira, 2007). Aktuell sind 11 humane und 13 murine TLR bekannt, wobei jeder TLR bestimmte PAMP aus zahlreichen Mikroorganismen erkennt. Eine Übersicht der TLR inklusive der zugehörigen Agonisten ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Tabelle 1.1: Murine TLR mit Liganden und Adaptorproteinen (modifiziert nach Beutler, 2009).

TLR	Assoziierte Proteine	Liganden	Adaptor-Proteine
TLR1/2	CD14, CD36, Dectin 1,	Ac ₃ LP, Glycolipids	MyD88, Tirap
TLR2/6	CD14, Dectin1	LTA, Zymosan, Di-/Triacyliertes Lipoprotein	MyD88, Tirap
TLR3		polyI:C, dsRNA	TRIF
TLR4	CD14, MD-2	LPS, Taxol, Heparan, Hyaluronate	MyD88, Tirap, TRIF, TRAM
TLR5		Flagellin	MyD88
TLR7/TLR8		ssRNA	MyD88
TLR9	unbekannt	DNA	MyD88
TLR11		Profilin, uropathogene Bakterien	MyD88
TLR12		unbekannt	
TLR13		Vesicular Stomatitis Virus (VSV)	MyD88

Verschiedene Signalproteine wie MAP („*mitogen-activated protein*“)-Kinasen (MAPK) und PI3-Kinase werden durch die TLR-Aktivierung induziert. Der Hauptsignalweg, der von TLR initiiert wird, führt allerdings zur Translokation des „*nuclear factor*“ (NF)- κ B in den Zellkern. Die Erkennung von PAMP durch TLR aktiviert Signaltransduktionswege über eine TIR-TIR-Interaktion zwischen den TLR-TLR und der TIR (Toll/IL-1 Rezeptor)-Domäne eines Adaptorproteins wie MyD88 („*myeloid differentiation factor 88*“), TIRAP/MAL („*toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein*“), TRIF („*TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- β* “), und TRAM („*TRIF-related adaptor molecule*“) (Akira and Takeda, 2004). MyD88 interagiert mit den meisten TLR, außer mit TLR3. MyD88 trägt eine TIR-Domäne am C-Terminus und eine „*Death*“-Domäne (DD) am N-Terminus. Nach der Stimulierung des MyD88-abhängigen Signalweges rekrutiert MyD88 die Serin/Threonin-Proteinkinase IRAK

(„IL-1 Rezeptor-Kinase“) zu den TLR durch die DD-Interaktion der beiden Proteine (Abb. 1.4). Die Mitglieder der IRAK-Familie, IRAK-1 und IRAK-4 werden durch Phosphorylierung aktiviert und interagieren mit TRAF6. TRAF6 bildet einen Komplex mit einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym, um die zu den MAPKKK („MAPK Kinase Kinase“)-gehörende Kinase TAK1, zu aktivieren. TAK1 phosphoryliert und aktiviert den IKK („I κ B Kinase“)-Komplex. Der IKK-Komplex (IKK α :IKK β :IKK γ (NEMO)) phosphoryliert den Inhibitor I κ B, was zu dessen Degradation und damit zur Dissoziation des I κ B/NF- κ B Komplexes führt. Der freigesetzte NF- κ B kann somit in den Zellkern transloziert werden. Im Fall von TLR2 und TLR4 wird TIRAP/MAL ebenfalls benötigt um MyD88-abhängige Signalwege zu aktivieren. Die Aktivierung von NF- κ B und MAPK führt schließlich zur Expression von Genen, die inflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-6, IL-12 und IL-1 β kodieren (Horng et al., 2002; Akira et al., 2006).

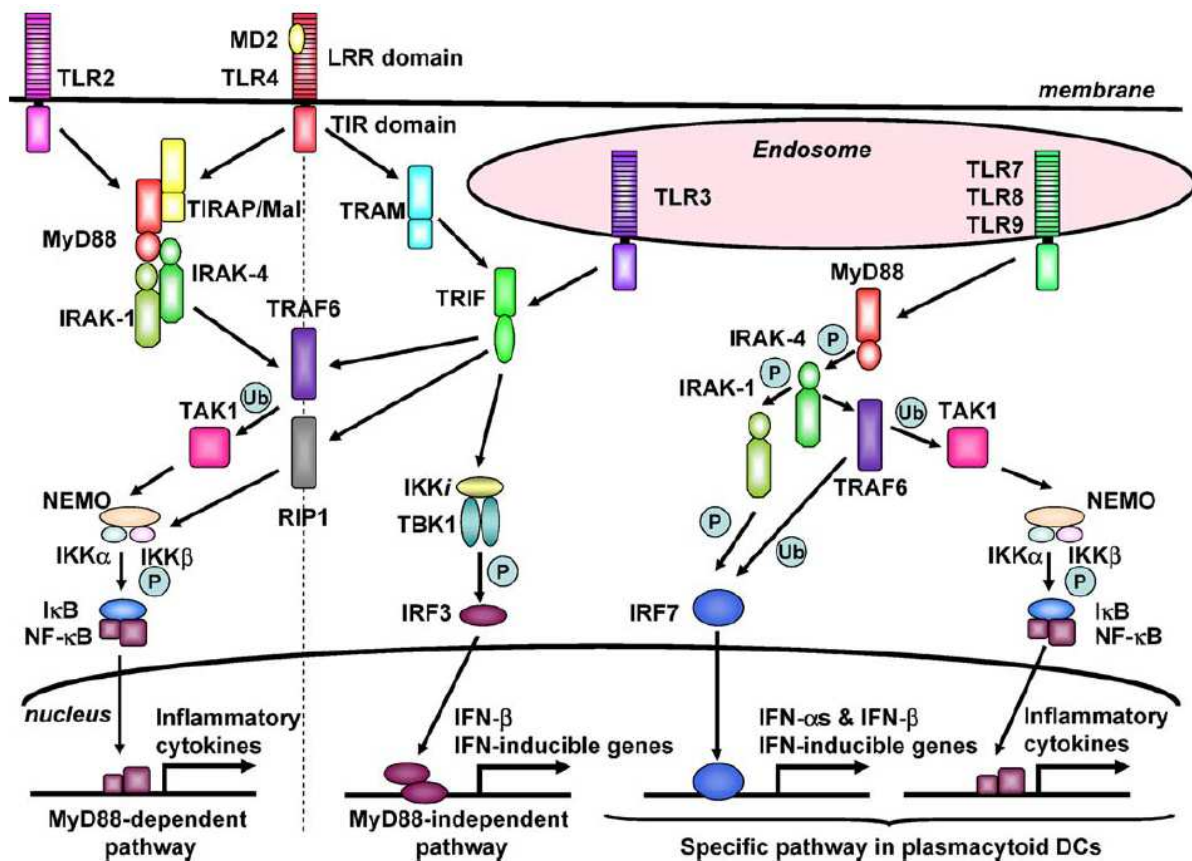


Abb. 1.4: TLR-Signalweg (Uematsu und Akira, 2006). Dargestellt sind TLR mit zugehörigen Adaptormolekülen sowie Transkriptionsfaktoren. MAP-Kinasen (Jnk, Erk, p38) sind nicht gezeigt. Für nähere Erläuterungen siehe Text.

Neben der MyD88-abhängigen Zellaktivierung, können TLR3 und TLR4 in einem MyD88-unabhängigen Signalweg IRF-3 („IFN regulatory factor 3“) aktivieren und die nachfolgende

IFN- α/β -Produktion induzieren (Kawai et al., 1999). Das Adaptorprotein TRIF ist essentiell für den TLR3- und TLR4-vermittelten MyD88-unabhängigen Weg (Yamamoto et al., 2002).

TRAM ist ein Adaptor des TLR4-vermittelten MyD88-unabhängigen Signalwegs und stellt eine Verbindung zwischen TLR4 und TRIF her (Yamamoto et al., 2003b; Oshiumi et al., 2003). TLR3- und TLR4-vermittelte Signalwege führen zur Aktivierung des IRF3-Transkriptionsfaktors, der IFN- β und IFN-induzierbare Gene aktiviert. Nach der Stimulation interagiert TRIF mit TBK1 ("TRAF family member-associated NF- κ B activator-binding kinase 1") und IKKi ("*inducible* IKK"), die IRF3 phosphoryliert. Daraufhin wird IRF3 in den Zellkern transloziert und aktiviert z.B. den IFN- β Promotor (Uematsu and Akira, 2006).

Es wurde gezeigt, dass TRAF6 an TRIF bindet und darüber NF- κ B aktiviert (Sato et al., 2003).

RIP1 („*receptor-interacting protein-1*") ist in der dsRNA-TLR3-vermittelten NF- κ B-Antwort involviert. RIP1 wird am Lysin 63-polyubiquitiniert und bildet mit TRAF6, TAK1 und dem TLR3 ein sogenanntes Signalosom (Meylan et al., 2004).

Das TLR-System des Wirts erzielt seine Spezifität in der Erkennung verschiedener PAMP mittels spezifischer PRR. Jeder TLR rekrutiert eine spezifische Kombination von Adaptorproteinen, um einen bestimmten Satz von Transkriptionsfaktoren zu aktivieren, wodurch ein erregerspezifisches Abwehrprogramm angeschaltet wird.

1.2.2 NOD-like Rezeptoren

Neben den membrangebundenen Toll-like Rezeptoren spielen die „*nucleotide oligomerization domain (NOD)-like-receptors*“ (NLR) eine wichtige Rolle bei der Antwort der angeborenen Immunität auf eindringende Erreger (Franchi et al., 2009). NLR bestehen aus einer großen Familie von intrazellulären PRR, die durch eine konservierte NOD-Domäne charakterisiert sind (Inohara and Nunez, 2001). Die NLR gleichen sich in ihrem Aufbau von Funktionsdomänen: (1) N-terminale Effektor-Binderegion, die aus Protein-Protein-Interaktionsdomänen wie „*caspase recruitment domain*“ (CARD), Pyrin- (PYD) oder BIR- („*baculovirus inhibitor repeat*")-Domäne besteht; (2) die mittlere NOD-Domäne, welche Nukleotid (ATP)-Bindung und Selbst-Oligomerisierung vermittelt; und (3) C-terminale LRR („*leucine-rich repeats*")-Domäne, welche wahrscheinlich mikrobielle PAMP erkennt und die Aktivität von NLR moduliert (Kanneganti et al., 2007).

Die NLR wie NOD1 und NOD2 werden durch Komponenten der bakteriellen Zellwand (Peptidoglykan-(PGN)-Fragmente) aktiviert (Girardin et al., 2001; Kobayashi et al., 2002). PGN ist ein Polymer, bestehend aus alternierenden Glykanketten (N-Acetylglukosamin

(GlcNAc) und N-Acetyl-Muraminsäure (MurNAc)) sowie quervernetzten Peptiden. Dabei bindet NOD2 das Muramyl-Dipeptid (MDP), welches in der PGN-Zellwand von fast allen grampositiven und gramnegativen Mikroorganismen vorkommt (Zilbauer et al., 2007), während NOD1 Meso-Diaminopimelinsäure (meso-DAP)-enthaltende Fragmente des PGNs erkennt (Sugimoto et al., 1978). DAP ist ein spezifischer Bestandteil der Zellwand von gramnegativen Bakterien und einigen grampositiven Gattungen, wie *Listeria*- und *Bacillus*-Arten (Masumoto et al., 2003). NOD1/2 werden im Mensch und in der Maus nur von antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen und Dendritischen Zellen exprimiert (Inohara and Nunez, 2003), während fast alle intestinalen Epithelzellen und alle primären Epithelialzellen NOD1 exprimieren (Kim et al., 2004). Die NOD1/2-Agonisten induzieren die Oligomerisierung der NOD-Rezeptoren und rekrutieren die Adaptorkinase RICK („receptor-interacting serine/threonine kinase“; auch RIP2 genannt) durch die Interaktion zwischen CARD-CARD-Domänen (Abb 1.5).

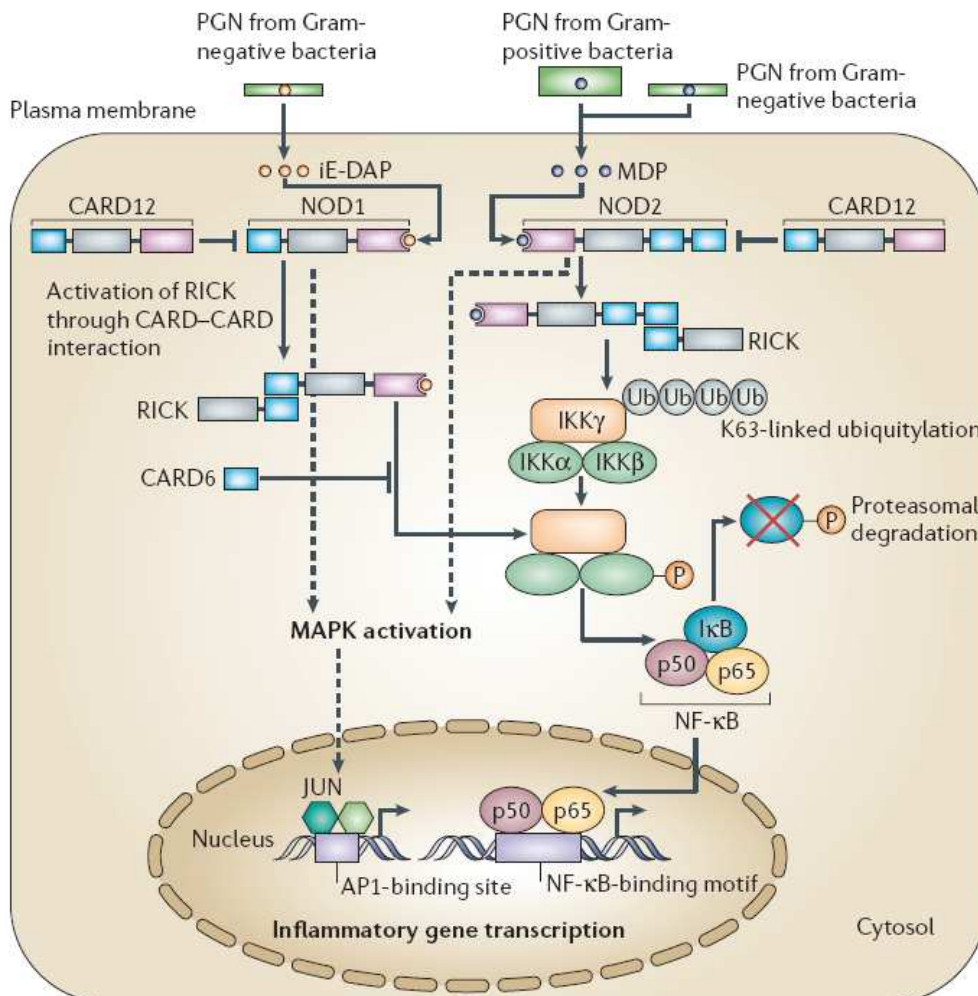


Abb. 1.5: Signaltransduktionswege von NOD1 und NOD2 (Strober et al., 2006). Intrazelluläre NOD1 und NOD2 Rezeptoren werden durch Fragmente der bakteriellen Zellwand (PGN) aktiviert und induzieren mittels Adaptorkinase RICK/RIP2 NF-κB- und MAP-Kinasen-abhängige Signaltransduktionswege. Für nähere Erläuterungen siehe Text.

Im Fall von NOD2 führt die RICK-Aktivierung über eine K63 (Lys63)-Polyubiquitinierung zur Aktivierung von IKK γ . Daraufhin werden IKK β und IKK α phosphoryliert und NF- κ B wird für die Translokation in den Zellkern freigesetzt (Strober et al., 2006). NF- κ B aktiviert die Transkription von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie TNF- α , IL-6 und IL-8, die für die Stimulation und Rekrutierung von weiteren Effektorzellen der Erregerabwehr essentiell sind (Chen et al., 2009). Es wurde gezeigt, dass die Ubiquitinierung ebenfalls eine entscheidende Rolle für die NOD1-vermittelte Signalübertragung spielt, der genaue Mechanismus der NF- κ B-Aktivierung ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. CARD12 und CARD6 sind Negativ-Regulatoren der NOD1/2-vermittelten Signalwege. Zusätzlich zur NF- κ B-Aktivierung aktivieren NOD1 und NOD2 die Signalwege der MAP-Kinasen Jnk, Erk und p38 mit Hilfe von Adaptorprotein CARD9 (Hsu et al., 2007; Franchi et al., 2009). Es besteht eine Interaktion zwischen TLR- und NOD-Signalwegen. Peptidoglykan kann gleichzeitig den Oberflächenrezeptor TLR2 und den zytosolischen Rezeptor NOD2 aktivieren. Die Aktivierung von NOD2 führt zur RIP2-Aktivierung und der anschließenden Inhibition des TLR2-Signalweges (Strober et al., 2006). Neben einer NOD1/2-vermittelten Induktion pro-inflammatorischer Zytokine, welche entweder synergistisch oder antagonistisch mit dem TLR-System zusammenwirken, ist für NOD2 auch eine Induktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 nachgewiesen worden, die durch den TLR2-Agonisten PnCW (komplexe Zellwandfragmente von *Streptococcus pneumoniae*) ausgelöst wird (Moreira et al., 2008).

1.2.3 Neutrophile Polymorphkernige Leukozyten (PMN)

Neutrophile polymorphkernige Leukozyten (neutrophile Granulozyten; Neutrophile) besitzen phagozytierende Eigenschaften und sind mit einem Durchmesser von 10-12 μ m die kleinsten Phagozyten der angeborenen Immunität (Dore et al., 1990; Nathan, 2006). Neutrophile sind durch zahlreiche intrazelluläre Vesikel (Granula) und einen segmentierten gelappten Kern charakterisiert und werden deshalb als polymorphkernige Neutrophile (PMN) bezeichnet. Als die wichtigsten zirkulierenden phagozytierenden Zellen, erreichen Neutrophile als erste den Infektionsherd und eliminieren die eingedrungenen Mikroorganismen (ves-Filho et al., 2008). Unter dem Einfluss von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren entwickeln sie sich aus myeloischen Stammzellen des Knochenmarks und werden vollständig gereift in die Blutzirkulation entlassen, wo sie eine Halbwertszeit von 6-8 h haben, wenn sie nicht in ein Gewebe eindringen, wo sie wiederum 1-2 Tage überleben können (Smith, 1994; Athens et al., 1961). Senescente (gealterte) Neutrophile werden nach Apoptose von Makrophagen

eliminiert; der gleiche Prozess spielt ebenfalls eine Rolle bei der Auflösung der inflammatorischen Reaktion (Savill et al., 1993). Der Hauptteil der Hämatopoese betrifft die Produktion der Neutrophilen, die ca. 60%-70% der Gesamtleukozytenpopulation im peripheren Blut darstellen. Der Umsatz von PMN im gesunden Erwachsenen beträgt dabei 10^{11} Zellen/Tag (Cannistra and Griffin, 1988).

Nach Phagozytose von Bakterien durch Neutrophile fusionieren das Phagosom und das mit intrazellulären Granula gefüllte Lysosom zum Phagolysosom. Die Phagozytose wird durch die Interaktion von bakteriellen PAMP mit den PRR, wie TLR, oder durch die Bindung von mit Serumkomponenten und spezifischen Antikörpern opsonisierten Mikroben an die Oberfläche von PMN induziert (Abb 1.6). Die Bakterien werden dabei durch die Wirkung von Enzymen, anti-mikrobiellen Peptiden und reaktiven Sauerstoffradikalen eliminiert (Mayer-Scholl et al., 2004). Die PMN sind in der Lage die Bakterien durch zwei verschiedene Mechanismen abzutöten: Sauerstoff-abhängig und Sauerstoff-unabhängig. Am Sauerstoff-unabhängigen Mechanismus sind drei verschiedene Granula beteiligt: azurophile, spezifische und Gelatinase-Granula, welche charakteristische Proteasen (z.B. Neutrophil-Elastase), anti-mikrobielle Proteine (z.B. Defensine) und Enzyme (z.B. Lysozym, Gelatinase) enthalten.

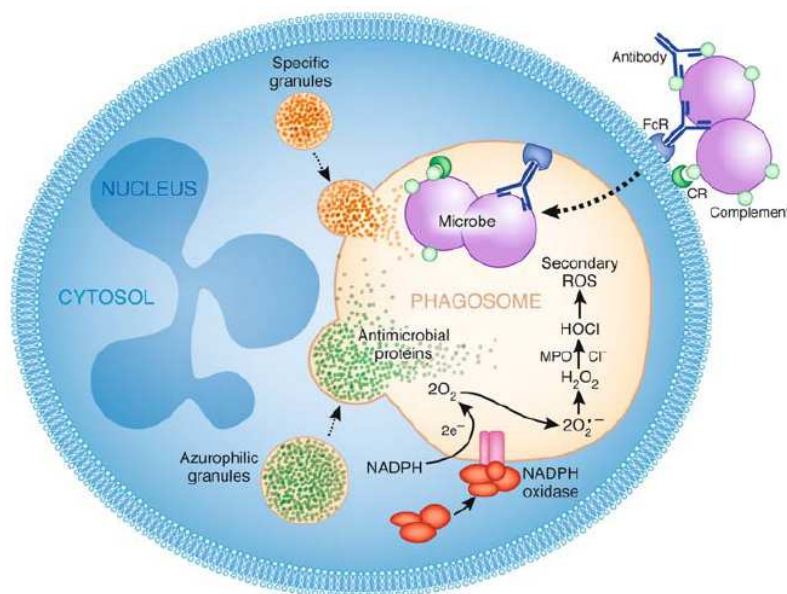


Abb. 1.6: Anti-mikrobielle Mechanismen von PMN (Kennedy and DeLeo, 2009). AK- und Komplement-opsonisierte Mikroben binden über Komplement- (CR) und AK-Fc-Rezeptoren (FcRs) an die Membran des Neutrophilen. Dies führt zur Internalisierung des Pathogens in ein Phagosom, welches mit den anti-mikrobiellen Granula verschmilzt. Durch die Degranulierung und Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS) werden die Erreger getötet.

Beim Sauerstoff-abhängigen Mechanismus werden die phagozytierten Bakterien durch reaktive Sauerstoffradikale („reactive oxygen species“, ROS) in einem Prozess, der als

„oxidative burst“ bezeichnet wird, eliminiert. ROS entstehen aus Superoxid O_2^- , welches durch den NADPH-Oxidase-Komplex produziert wird. Die NADPH-Oxidase besteht aus 7 Proteinen, die in ruhenden PMN im Zytosol und in Membrankompartimenten lokalisiert sind. Während der PMN-Aktivierung werden zytosolische Oxidase-Komponenten zur Phagosomenmembran transloziert und assoziieren dort mit der Membrankomponente Flavocytochrom b558, um den NADPH-Oxidase Komplex zu vervollständigen. Der Aufbau und die Aktivierung der NADPH-Oxidase wird unter anderem durch die Phosphorylierung des zytosolischen Proteins p47phox und die Interaktion von verschiedenen SH3-Domänen reguliert (Quinn et al., 2006). NADPH-Oxidase katalysiert die Bildung von Superoxid O_2^- , welches rasch durch die Dismutase zu H_2O_2 umgewandelt wird, wobei O_2^- und H_2O_2 eine schwache mikrobizide Wirkung haben (Klebanoff, 2005). Die Myeloperoxidase (MPO) gehört zu den Komponenten der azurophilen Granula und akkumuliert im reifen Phagosom, wo sie die Reaktion zwischen H_2O_2 und Chlorid zu Hypochlorsäure (HOCl) und anderen hochreaktiven sekundären ROS wie das Hydroxyl-Radikal $OH\cdot$ und Singulett-Sauerstoff O_2^x katalysiert (Klebanoff, 1970). PMN „sterben“ nach der Phagozytose und „oxidative burst“ durch Apoptose oder „phagocytosis-induced cell death“ (PICD).

Mit der Phagozytose von Bakterien durch PMN wird auch die Produktion verschiedener immunomodulatorischer Proteine verstärkt: z.B. IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, CCL2 (MIP-1 α), CCL3 (MIP-1 β), CXCL2 (MIP-2 α) oder TNF- α (Borjesson et al., 2005; Kobayashi et al., 2003a; Kobayashi et al., 2003b). Abgesehen von der Rekrutierung von zusätzlichen PMN zum Infektionsherd und Modulation von deren Funktionen, koordinieren diese Zyto- und Chemokine die frühe Antwort von Monozyten, Makrophagen, DZ und Lymphozyten während der Inflammation. Außerdem stellt die Produktion von Zytokinen durch PMN das erste Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar. Zirkulierende Neutrophile wandern innerhalb von wenigen Stunden zum Infektionsort. Dabei verlassen sie die Blutbahn und durchdringen die Endothelwand in einem mehrstufigen Prozess, der Extravasation oder Diapedese genannt wird und zur akuten inflammatorischen Antwort gehört. Die Neutrophilen bewegen sich rollend über die Endothelschicht der Blutgefäße durch schwache Bindung des Sialyl-Lewis-Antigens (S-Le^x) auf der Oberfläche von PMN an E- und P-Selektine auf der Endothelzellwand (Abb 1.7). Im Fall eines starken Entzündungsreizes werden die PMN durch Chemokine wie IL-8 und MIP-2, die im infizierten Gewebe produziert werden, zum Infektionsort „angelockt“. Daraufhin werden Neutrophile aktiviert und die Expression von Integrinen LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) auf deren Oberfläche wird stark hochreguliert. $\alpha_L\beta_2$ -Integrine binden an die ICAM-1 Moleküle am Endothelium, die unter Einfluss von inflammatorischen Mediatoren wie LPS, IL-1 und TNF- α exponiert werden. Die LFA-1-ICAM-1 Bindung ist nicht stark genug, um das Rollen der PMN zu arretieren. Eine

enge Adhäsion von PMN an das Endothelium wird durch Chemokine wie IL-8 (CXCL8) vermittelt, die auf der endothelialen Zellwand konzentriert sind und an die Chemokinrezeptoren (CXCR8) der PMN binden. Dadurch wird eine Konformationsveränderung der LFA-1-Integrine induziert, was in einer starken Bindung der PMN an das Endothelium resultiert. Anschließend durchqueren die Neutrophilen das Endothelium durch Auflösen der extrazellulären Matrixproteine der Basalmembran mittels proteolytischer Enzyme (Janeway et al., 2008; Ley, 2002).

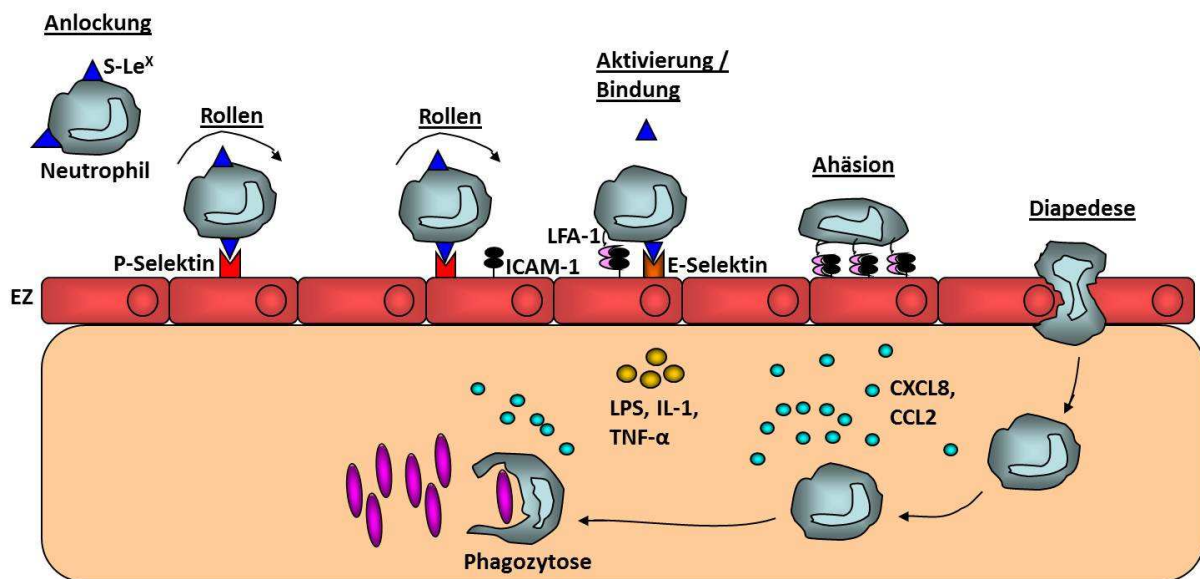


Abb. 1.7: Extravasation der Neutrophilen. Extravasation der PMN besteht aus einer Serie von Ereignissen (Anlockung, Rollen, Aktivierung, Adhäsion und Diapedese), die streng von pro-inflammatorischen Faktoren reguliert werden (Ley, 2002; Janeway et al., 2008). Nähere Erläuterungen siehe Text. EZ-Endothelzelle .

1.2.4 Zytokine und Chemokine als Effektoren der angeborenen Immunantwort

Zytokine sind kleine Proteine (ca. 25 kDa), welche von Zellen des Immunsystems oder auch von Epithel- und Mesenchymzellen als Antwort auf einen bestimmten Stimulus (z.B. PAMP oder DAMP) produziert und freigesetzt werden, und durch Bindung an spezifische Rezeptoren der umliegenden (parakrine Wirkung) aber auch der produzierenden Zellen (autokrine Wirkung) ihrerseits eine weitere Reaktion auslösen. Die selektive Freisetzung von Zytokinen kontrolliert und koordiniert die Art der Wirtsantwort (Janeway et al., 2008). Eine Übersicht von wichtigen Zytokinen, die während einer bakteriellen Infektion von Makrophagen produziert werden, ist in Tabelle 1.2 dargestellt.

Tabelle 1.2: Zytokine, die während einer Entzündung von Makrophagen sekretiert werden.

Zytokin	lokale Effekte	systemische Effekte
IL-1 α/β	aktiviert vaskuläres Endothelium; aktiviert Phagozyten; Zerstörung des umliegenden Gewebes;	Fieber; Produktion von IL-6
TNF- α	aktiviert vaskuläres Endothelium und Phagozyten; steigert vaskuläre Permeabilität;	Fieber; Schock
IL-6	aktiviert Lymphozyten; steigert AK-Produktion;	Fieber; induziert Akutphaseproteine
CXCL8 (IL-8)	chemotaktischer Faktor für Neutrophile, Basophile und T-Zellen	
IL-12	aktiviert NK-Zellen; induziert CD4 ⁺ T- Zellen \rightarrow T _H 1 Differenzierung	

Chemokine sind eine Gruppe von kleinen (8-14 kDa) strukturähnlichen Zytokinen mit chemotaktischer Wirkung auf zirkulierende Leukozyten, zur Infiltration von Entzündungs- oder Wundbereichen. Chemokine vermitteln die chemotaktische Wirkung durch Bindung an spezifische Chemokinrezeptoren („seven-transmembrane-spanning receptors“) auf den Zielzellen, die mit einem heterotrimeren G-Protein (G α_i , β , γ) gekoppelt sind (Viola and Luster, 2008; Rollins, 1997).

Chemokine werden anhand der Positionen der jeweils ersten Cystein-Reste in der Sequenz in zwei Gruppen unterteilt: die CC-Chemokin-Unterfamilie (bestehend aus zwei benachbarten Cysteinen am N-Terminus) und die CXC-Chemokin-Unterfamilie (zwei Cystein-Reste sind durch eine Aminosäure getrennt) (Janeway et al., 2008). Die Freisetzung von CXC-Chemokinen wird durch inflammatorische Reize wie bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), IL-1 und TNF- α induziert und führt zur Aktivierung von Neutrophilen. Die CXC-Unterfamilie kann weiter in zwei Unterklassen unterteilt werden in Abhängigkeit von der Präsenz des Glutamat-Leucin-Arginin (ELR) Motivs vor den Cysteinen. Die Chemokine mit dem ELR-Motiv, wie z.B. CXCL8 (IL-8), GRO α (CXCL1/KC) oder GRO β (CXCL2/MIP-2) wirken chemotaktisch auf Neutrophile und besitzen angiogenetische Eigenschaften, während die ELR-negativen Zytokine keine chemoattraktante Wirkung auf PMN ausüben (Baggiolini et al., 1994). Zur CC-Unterfamilie gehören Chemokine, die bei der Rekrutierung von Monozyten, Makrophagen, DZ, Lymphozyten, basophilen Granulozyten und NK-Zellen eine Rolle spielen, wie z.B. CCL2 („monocyte chemoattractant protein 1“, MCP-1), CCL3 („macrophage inflammatory protein 1 α “, MIP-1 α) oder CCL4 („macrophage inflammatory protein 1 β “, MIP-1 β). Eine frühe IL-8 Produktion am Infektionsort führt zur Rekrutierung von Neutrophilen. Die eingewanderten Neutrophilen selbst können Chemokine wie IL-8, KC, MIP-1 α und MIP-1 β in größeren Mengen synthetisieren und sekretieren (Cassatella, 1999; Scapini et al., 2000). Die Produktion von IL-8 und KC wird als ein positiver Rückkopplungsmechanismus interpretiert, um die Infiltration von PMN am Entzündungsort zu unterstützen (Matsukawa and Yoshinaga, 1998). Demzufolge sind die PMN nicht nur die

phagozytierenden Zellen der angeborenen Immunität, sondern sind zudem in der Lage durch die Produktion von Schlüsselzytokinen die Immunabwehr zu koordinieren, indem sie als zweite Abwehrwelle Makrophagen rekrutieren.

1.2.5 IL-10 als anti-inflammatorisches Zytokin der angeborenen und adaptiven Immunität

Wenn eine Immunabwehrreaktion erfolgreich war und den Erreger eliminiert hat, muss eine anti-inflammatorische und gewebergenerative Reaktion eintreten.

Interleukin-10 (IL-10) ist ein Zytokin mit anti-inflammatorischen Eigenschaften und spielt eine zentrale Rolle während einer Infektion mit Pathogenen durch Dämpfung der Immunantwort einerseits und durch Prävention der Gewebeerstörung des Wirts aufgrund einer überschüssigen Immunreaktion andererseits. Des Weiteren kontrolliert IL-10 inflammatorische und autoimmune Reaktionen (Hawrylowicz and O'Garra, 2005; Moore et al., 2001). IL-10-defiziente Mäuse entwickeln chronisch entzündliche Darmerkrankungen und zeigen andere inflammatorische Reaktionen nach Infektion (Kuhn et al., 1993). In manchen Fällen führt die Abwesenheit von IL-10 zur besseren Eliminierung von Bakterien ohne Immunpathologie (z.B. Listerien oder Klebsiellen), während bei den anderen Infektionen die IL-10 Defizienz mit einer Gewebeerstörung des Wirts ohne Auswirkung auf die bakterielle Last einhergeht (z.B. bei *Taxoplasma gondii* oder Plasmodium-Infektion) (Saraiva and O'Garra, 2010).

IL-10 wurde ursprünglich als inhibierender Faktor der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen beschrieben, welcher von murinen Th2-Zellen produziert wird und die Aktivierung von Th1-Zellen hemmt (Saraiva and O'Garra, 2010). IL-10 hat sich später als ein von vielen Zelltypen produzierendes Zytokin erwiesen. Dazu gehören Zellen der angeborenen Immunität (DZ, Makrophagen, Mastzellen, NK, Eosinophile und Neutrophile) sowie der adaptiven Immunität (Th1-, Th2-, Th17- und T_{Reg}-Zellen als auch B-Zellen) (Moore et al., 2001).

Es wurde gezeigt, dass die Expression von IL-10 durch die Bindung von entsprechenden Liganden an die Toll-like Rezeptoren von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) über MyD88 und TRIF Adaptormoleküle induziert werden kann (Netea et al., 2004; Sing et al., 2002b; Boonstra et al., 2006). Der MyD88-abhängige TLR-Signalweg führt zur Aktivierung von MAP-Kinasen (ERKs, JNKs und p38) und NF- κ B und somit zur Produktion von pro- sowie anti-inflammatorischen Zytokinen (Abb. 1.8). LPS induziert in Makrophagen über MyD88/TRIF-abhängige Signalwege zunächst die Produktion von Typ I Interferon (IFN- α/β) und dann über

den IFN- α/β -Rezeptor autokrin IL-10 (Chang et al., 2007). Darüber hinaus spielt eine verstärkte Induktion der NF- κ B-Untereinheit p50 eine wichtige Rolle für die IL-10-Produktion. IL-10 moduliert die angeborene Immunantwort durch Inhibition von Zyto- und Chemokinproduktion, inklusive IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF, M-CSF, TNF, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8, MIP-2 und KC, durch Monozyten, Makrophagen und DZ (de Waal et al., 1991; Fiorentino et al., 1991; Berkman et al., 1995). Bei Neutrophilen inhibiert IL-10 ebenfalls die Produktion von TNF, IL-1 α/β , IL-8, IL-12p40, KC und MIP-1 α/β (Cassatella et al., 1993).

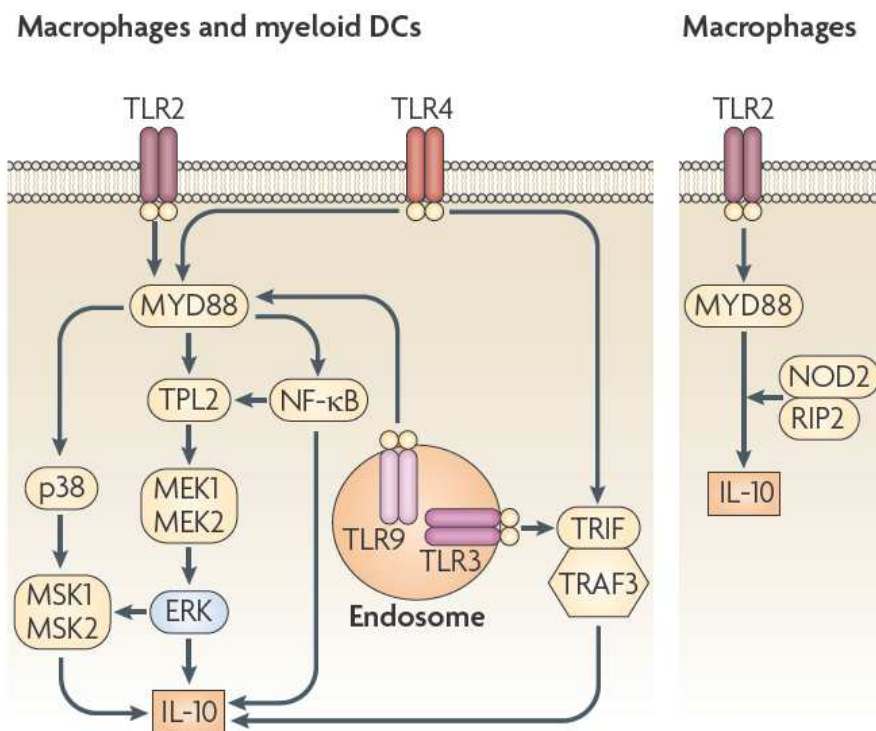


Abb. 1.8: Signale die IL-10 Expression von Zellen der angeborenen Immunität induzieren (Saraiva and O'Garra, 2010). Die Expression von IL-10 kann entweder über TLR-Signalwege oder über andere Rezeptoren in Makrophagen und DZ induziert werden. Die Aktivierung von TLR und deren Adaptormolekülen MyD88 und TRIF führen zur Aktivierung von Erks („*extracellular signal-regulated kinases*“), p38 und NF- κ B-Signalwegen und schließlich zur Induktion von IL-10 neben der Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-6 und IL-12. In Makrophagen wird ebenso eine mögliche Beteiligung von NOD2 im Zusammenspiel mit TLR2 an der IL-10 Induktion vermutet.

IL-10 kann an zwei ähnliche Rezeptoren (IL-10R1 und IL-10R2) binden, die von den meisten hämatopoetischen Zellen konstitutiv exprimiert werden (Liu et al., 1994; Lutfalla et al., 1993). Der am besten charakterisierte Signalweg von IL-10/IL-10R läuft über das Jak1/STAT3-System (O'Farrell et al., 1998; Wehinger et al., 1996). Der IL-10R aktiviert Janus-Kinase (Jak) 1, die IL-10R α Kette an zwei Tyrosin-Resten phosphoryliert, woran die SH2-Domänen von STAT3 („*signal transducer and activator of transcription*“) binden. STAT3 aktiviert Gene, die inflammatorische Signalwege blockieren (Murray, 2006b).

Der genaue Mechanismus, wie IL-10 die Produktion von inflammatorischen Genen inhibiert, ist noch nicht geklärt. Es wurde beschrieben, dass IL-10 weder auf NF- κ B-Aktivierung noch auf MAPK-Signalwege einen direkten Effekt hat (Williams et al., 2004). Erwiesen ist, dass STAT3 für IL-10-vermittelte anti-inflammatorische Antwort essentiell erforderlich ist. Eine mögliche Erklärung wäre die Beteiligung von SOCS3 („*suppressor of cytokine signaling*“), dessen Expression sowohl von IL-6 und IL-10 als auch von TLR-Liganden initiiert werden kann. SOCS3 übt inhibitorische Effekte aber lediglich auf IL-6R in Makrophagen aus (Murray, 2006b). Nach aktuellem Modell, führt die Aktivierung des IL-10/IL-10R Signalweges via STAT3 zur Expression eines unbekanntes Inhibitormoleküls, welches die inflammatorische Antwort entweder durch Repression der Transkription, Degradation der mRNA, post-translationalen Modifikation der Transkriptionsfaktoren oder Chromatinmodifikation inhibiert (El Kasmi et al., 2006; Murray, 2006a).

Des Weiteren wurde gefunden, dass IL-10 die Produktion von Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (IL-1Ra) durch Monozyten fördert und folglich die anti-inflammatorische Antwort um so mehr verstärkt (Hart et al., 1996). Damit übernimmt IL-10 eine zentrale regulatorische Funktion sowohl bei der angeborenen als auch der adaptiven Immunität.

Zielsetzung

Die Erkennung mikrobieller Makromoleküle (PAMP) durch die Wirtsrezeptoren der angeborenen Immunität führt in der Regel zu einer effizienten Immunantwort. Die humanpathogenen Yersinien, wozu auch *Y. enterocolitica* gehört, sezernieren das virulenzplasmidkodierte Protein LcrV, welches als Agonist TLR2/CD14- (Reithmeier-Rost D., 2005) und wahrscheinlich NOD1/2-Signaltransduktionskaskaden aktiviert und neben der Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen auch anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und IL-1Ra induziert. Außerdem ist es anzunehmen, dass andere freigesetzte PAMP von *Yersinia*, wie LPS oder Proteoglykan, die Rezeptoren der TLR- und NOD-Systeme stimulieren.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass C57BL/6 resistenter als BALB/c Mäuse hinsichtlich der Infektion mit *Yersinia enterocolitica* sind. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Resistenz mit einer schnelleren IFN- γ Antwort bei C57BL/6 im Vergleich zu BALB/c Mäuse im Zusammenhang steht (Autenrieth et al., 1994). Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass IL-10-defekte Mäuse (IL-10 *ko*-Mäuse) eine höhere *Yersinia*-Resistenz aufweisen als C57BL/6 Wildtyp-Mäuse (Sing et al., 2002a).

Mit diesen Ausgangsergebnissen soll in dieser Arbeit eine systematische Analyse der *Yersinia*-Infektionsempfänglichkeit von C57BL/6 Mäusen mit Gendefekten in diversen TLR, NLR sowie Schlüsselkomponenten der entsprechenden Signalkaskaden durchgeführt werden.

Die Untersuchungen der Infektionsempfänglichkeit sollen durch immunhistologische und Zytokinanalysen sowie zytochemische Differenzierung von Entzündungszellen ergänzt werden, um ein detailliertes Bild der angeborenen Wirtsimmunantwort in Abhängigkeit von Defekten der PAMP-Signalkaskade zu erhalten. Die erzielten Ergebnisse aus den Tierversuchen sollen dann zu gezielten Untersuchungen der Infektabwehr führen, um die Infektionsempfänglichkeit gegenüber *Yersinia* in Kontext der angeborenen Immunantwort einzuordnen.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie / Biochemikalie	Firma
100 bp Plus DNA-Leiter O'Gene Ruler™	Fermentas (St. Leon-Rot)
Aceton	Merck (Darmstadt)
Agarose	Peqlab (Erlangen)
Agar	BD Bioscience (Heidelberg)
BD FACS Clean	BD Bioscience (Heidelberg)
BD FACS Flow	BD Bioscience (Heidelberg)
BD FACS Shutdownsolution	BD Bioscience (Heidelberg)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
BSA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
CIN-Agar Platten	Oxoid (Hampshire)
DMSO	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DMEM	Invitrogen (Karlsruhe)
D-PBS	Invitrogen (Karlsruhe)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
FKS	Invitrogen (Karlsruhe)
Gentamicin	AppliChem (Darmstadt)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	MP Biomedicals (Ohio)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Mowiol	Calbiochem / Merck (Darmstadt)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
RPMI 1640	Invitrogen (Karlsruhe)
SDS	Serva (Heidelberg)
TRIS	MP Biomedicals (Ohio)
Trypanblau	Merck (Darmstadt)

2.2 Geräte

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Geräte.

Geräte	Bezeichnung	Firma
Analysenwaage	440-35N	Kern & Sohn (Balingen-Frommern)
Brutschrank	Typ B-20	Hereaus (Hanau)
Mikrotiterplattenmessgerät	FLUOStar Optima	BMG Labtech (Offenburg)
FACS	BD Facs Canto II	BD Bioscience (Heidelberg)
PCR-Cycler	Gene Amp PCR System 2700	Applied Biosystems (Darmstadt)
Gelelektrophoresekammer	Mini-SUB ^R Cell GT	Bio-Rad (München)
Geldokumentation	GelDoc EQ	Bio-Rad (München)
Lichtmikroskop	Axivert 25	Zeiss (Jena)
Fluoreszenzmikroskop	BX61	Olympus (Hamburg)
Neubauer Zählkammer	Neubauer improved 0,1 mm	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
pH-Meter	DIGITAL-pH-Meter	Bachofer (Reutlingen)
Photometer	Ultraspec 3100 pro	Amersham Biosciences (Freiburg)
Kühlzentrifuge	Sigma 3K30	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Zentrifuge	Megafuge 3.0R	Hereaus (Hanau)
Tischzentrifuge	Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Kryomikrotom	Kryostat CM1950	Leica Biosystems (Nussloch)
Schüttelinkubator	Certomat IS	Sartorius (Göttingen)

2.3 Bakterien

2.3.1 Yersinienstämme

Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten *Yersinia*-Stämme.

Stamm	Beschreibung	Herkunft
<i>Yersinia enterocolitica</i> WA(pYV)	Wildtyp-Stamm WA-314, O:8 Serotyp, pYV-Plasmid	(Heesemann et al., 1984)
<i>Yersinia enterocolitica</i> WA(pYVΔLcrD)	Tn5-Insertion im <i>lcrD</i> -Gen Ysc-T3SS Defekt; ursprüngliche Bezeichnung: WA-C(pYV-515)	(Ruckdeschel et al., 1996)

2.3.2 Nährmedien und Zusätze

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Nährmedien.

Medium	Zusammensetzung
Luria-Bertani (LB) Medium	1% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl pH 7,5
Einfriermedium	15% Glycerol in LB Medium
CIN-Agar Platten (Oxoid)	<i>Yersinia</i> -Selektivnährboden (CIN-Agar nach Schiemann)

2.3.3 Kultivierung von Yersinien

Die Anzucht von *Y. enterocolitica* erfolgte ün in 500 ml LB-Medium in einem Schüttelinkubator (Sartorius Certomat IS) bei 180 U/min und 27°C (Temperaturoptimum der Yersinien) unter aeroben Bedingungen. Für die Asservierung wurde die Kultur bei 4000 rpm 4°C abzentrifugiert und das Pellet dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml Einfriermedium resuspendiert und Aliquots für die Mausinfektionen bei -80°C gelagert.

Für die Zellkulturinfektionen wurde die ün-Kultur von *Y. enterocolitica* 1:50 in LB-Medium verdünnt und bis zum Erreichen der $OD_{600}=0,5$ weiter bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert.

2.3.4 Mauspassage von *Y. enterocolitica*

Für die Mausinfektionen wurden Yersinien zuerst mausspassiert. Diese Methode führt zur Selektion der Yersinien, die mausvirulenten Faktoren exprimieren bzw. im Mausperitonealraum überleben können. Dafür wurden 10^5 CFU („colony forming units“) Yersinien WA(pYV) intraperitoneal in eine C57BL/6 Maus injiziert. Die Maus wurde nach 24 h getötet und der Bauchraum mit PBS ausgespült. Die Lavage wurde auf *Yersinia*-selektiven CIN-Agar ausplattiert. Eine gewachsene Kolonie wurde beimpft und wie oben beschrieben kultiviert.

2.3.5 Bestimmung der Bakterienzahl für Mausinfektionsversuche

Die Bakterienzahl wurde durch Ausplattieren mehrerer Verdünnungsreihen der eingefrorenen Aliquots auf CIN-Agar Platten ermittelt und in koloniebildende Einheiten (CFU) pro ml umgerechnet.

2.3.6 Bestimmung der Bakterienzahl für Zellkulturinfektionsversuche

Die optische Dichte (OD) der *Yersinia*-Kultur für Zellkulturinfektionen wurde in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gegen das Leermedium gemessen. Dabei enthält ein Milliliter einer Bakteriensuspension mit einer OD_{600} von 0,3 ca. 5×10^7 Bakterien.

Für in vitro Infektionen wurden die *Yersinien* mit einer MOI (Multiplizität der Infektion) von 0,1 bis 10 eingesetzt.

2.4 Mausgenotypisierung

2.4.1 Mauslinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien (Tab. 2.5) wurden ursprünglich aus jeweils angegebener Quelle bezogen und anschließend in der hauseigenen Tierversuchsanlage unter „*specific pathogen free*“ (SPF) Bedingungen weitergezüchtet.

Die Tierversuche/Mausinfektionen wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Tierversuchsantrag: 2531- 82/07).

Tabelle 2.5: Mauslinien und Genotyp.

Mauslinie	Bezugsquelle
C57BL/6	Fa. Janvier Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich
TLR2 ^{-/-}	Karsten Kirschning TU München
TLR4 ^{-/-}	Karsten Kirschning TU München
TLR2 ^{-/-} /TLR4 ^{-/-}	Karsten Kirschning TU München
CD14 ^{-/-}	Jackson Laboratory Boston
TLR2 ^{-/-} /CD14 ^{-/-}	Kreuzung von TLR2 ^{-/-} und CD14 ^{-/-} eigene Zucht
MyD88 ^{-/-}	Wolf-Dietrich Hardt ETH Zürich
IL-10 ^{-/-}	Jackson Laboratory Boston
IL-1Ra ^{-/-}	Jackson Laboratory Boston
NOD1 ^{-/-}	Tak W. Mak University Health Network, Toronto, Canada
NOD2 ^{-/-}	Jackson Laboratory Boston Richard Flavell, Yale University School of Medicine
NOD1 ^{-/-} /NOD2 ^{-/-}	Kreuzung von NOD1 ^{-/-} und NOD2 ^{-/-} eigene Zucht
RIP2 ^{-/-}	Richard Flavell Yale University School of Medicine
TRIF ^{-/-}	Bernhard Holzmann TU München
TRIF ^{-/-} /MyD88 ^{-/-}	Kreuzung von TRIF ^{-/-} und MyD88 ^{-/-} eigene Zucht

2.4.2 DNA-Isolierung

Die Genotypisierung von *ko*-Mäusen erfolgte mittels spezifischer Polymerase-Kettenreaktion (engl.: „*polymerase chain reaction*“; PCR). Die DNA-Isolierung aus der Mausschwanzspitze erfolgte mittels DirectPCR[®]Lysis Reagent (Tail) (Peqlab, Erlangen) nach folgendem Protokoll:

1. 250 µl DirectPCR[®]-Tail, komplettiert mit 0,3 mg/ml Proteinase K (Peqlab), wurde zu 0,5-0,6 cm großen Schwanzspitzen in sterilen Reaktionsgefäßen (Eppendorf) gegeben und bei 55°C für 3-16 Stunden in einem Schüttelinkubator (Eppendorf Thermomixer Compact) bis zur kompletten Lyse des Gewebes inkubiert.

2. Reaktionsgefäße wurden im Wasserbad bei 85°C für 45 Minuten inkubiert und anschließend für 10 Sekunden zentrifugiert. Lysate können 1 Jahr bei -20°C oder 1 Woche bei 4°C aufbewahrt werden, ohne Beeinträchtigung der PCR-Ergebnisse.
3. Für die anschließende Genotypisierungs-PCR wurde 1-1,5 µl des Lysats pro 50 µl PCR-Reaktion eingesetzt.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren in vitro. Die PCR macht sich die Eigenschaft von DNA-Polymerase zunutze, DNA zu duplizieren. Die Voraussetzung für diesen Prozess ist ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH-Ende, das dann entsprechend der vorliegenden Einzelstrangmatrize verlängert werden kann (Herstellung der Doppelstrang-DNA). Der PCR-Prozess besteht aus einer Anzahl von 30 bis 50 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

- Denaturierung: die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden oberhalb der Schmelztemperatur aufgebrochen.

- Primerhybridisierung („*primer annealing*“): nach der Auftrennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt, so dass die kurzen synthetischen Einzelstrang-Fragmente von ca. 20 bp Länge, auch Oligonucleotide oder Primer genannt, sich an die Zieleinzelstrang-DNA anlagern können, wo dann an der 3'-OH-Gruppe die Kettenverlängerung durch die Polymerase erfolgt.

- Verlängerung („*elongation*“): schließlich polymerisiert die thermostabile DNA-Polymerase die zum Einzelstrang komplementären Nukleotide in 5'-3' Richtung.

Der Erfolg der PCR und Bestimmung der richtigen DNA-Größe wurde im Agarosegel nachgewiesen.

PCR-Ansatz:	BioMix Red (Bioline)	25 µl
	Mausschwanz-Lysat	1 µl
	Primer F (20 pmol/µl)	0,5 µl
	Primer R (20 pmol/µl)	0,5 µl
	ddH ₂ O	add 50 µl

Tabelle 2.6: PCR-Bedingungen für BioMix-Red (Bioline).

PCR	BioMix Red	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zkl	Produkte in bp		Primer (20 pmol/μl)	Agarose in %
						WT	Mut		
CD14	94°C-5'	94°C – 30''	62°C – 30''	72°C – 30''	35	700	280	CD14 A+B+C+D	1,5
IL-1Ra	94°C-5'	94°C – 30''	60°C – 30''	72°C – 30''	35	163	180	IL-1Ra A+B+C	3
IL-10	94°C-5'	94°C – 30''	60°C – 30''	72°C – 30''	35	200	450	IL-10 A+B+C	1,5
MyD88 wt	94°C-5'	94°C – 30''	60°C – 30''	72°C – 30''	35	350		MyD88 A+B	1,5
MyD88 mut	94°C-5'	94°C – 30''	60°C – 30''	72°C – 30''	35		350	MyD88 B+C	1,5
NOD1	94°C-5'	94°C – 30''	60°C – 30''	72°C – 30''	35	372	467	NOD1-WT-F/R + NOD1-Mut-F/R	1,5
NOD2	94°C-5'	94°C – 30''	62°C – 30''	72°C – 30''	35	370	1000	NOD2-Flv A+B+C+D	1,5
RIP2 wt	94°C-5'	94°C – 30''	54°C – 30''	72°C – 30''	35	435		CCK-PR20-F+PR21-R	1,5
RIP2 mut	94°C-5'	94°C – 30''	54°C – 30''	72°C – 30''	35		500	CCK-PR20-F+M88R	1,5
TLR2	94°C-5'	94°C – 30''	62°C – 30''	72°C – 30''	35	499	334	TLR2 A+B+C	1,5
TLR4	94°C-5'	94°C – 30''	62°C – 30''	72°C – 30''	35	1200	1114	TLR4extra+wild+neo	1,5
TRIF	94°C-5'	94°C – 30''	60°C – 30''	72°C – 30''	35	1 bp-Deletion (GC) im Vergleich zu wt		<i>Trif-fwd + Trif-rev</i>	3

¹-Minute, ''-Sekunde.

2.4.4 Primer für Mausgenotypisierung

Alle Primer wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Ulm) synthetisiert.

Tabelle 2.7: Primersequenzen für Mausgenotypisierung.

Primer	Primer-Name	Primer-Sequenz	Protokoll
CD14 WT-PCR	<i>Forward</i> Cd14-C <i>Revers</i> Cd14-D	5'-CCA AGT TTT AGC GCT GCG TAA C -3' 5'-GCC AGC CAA GGA TAC ATA GCC-3'	The Jackson Laboratory
CD14-Neo-PCR (*touchdown PCR)	<i>Forward</i> Cd14-A <i>Revers</i> Cd14-B	5'-CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC-3' 5'-AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC -3'	The Jackson Laboratory
IL 1Ra	<i>Forward</i> IL-1rn-A <i>Revers</i> IL-1rn-B <i>Revers</i> IL-1rn-C	5'-CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG-3' 5'-ACA CAC AGA CGC TCC CCT AC-3' 5'-TCA TCT CCA GAC TTG GCA CA-3'	The Jackson Laboratory
IL-10	<i>Revers</i> Il 10 -as-A <i>Forward</i> Il 10 -s-B <i>Revers</i> Il 10 -as-C	5'-GTG GGT GCA GTT ATT GTC TTC CCG-3' 5'-GCC TTC AGT ATA AAA GGG GGA CC-3' 5'-CCT GCG TGC AAT CCA TCT TG-3'	The Jackson Laboratory
MyD88	<i>Revers</i> Myd88-A <i>Forward</i> Myd88-B <i>Revers</i> Myd88-C	5'-AGA CAG GCT GAG TGC AAA CTT GTG CTG-3' 5'-CCG GCA ACT AGA ACA GAC AGA CTA TCG-3' 5'-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG-3'	Wolf-Dietrich Hardt
NOD1	<i>Forward</i> Nod1-WT-F <i>Revers</i> Nod1-WT-R <i>Forward</i> Nod1-MUT-F <i>Revers</i> Nod1-MUT-R	5'-GCT TGG CTC CTT TGT CAT TG-3' 5'-ACT GCT GCT TGG CTT TAT TCT C-3' 5'-TTG GTG GTC GAA TGG GCA GGT A-3' 5'-CGC GCT GTT CTC CTC TTC CTC A-3'	Tak W. Mak
Primer	Primer-Name	Primer-Sequenz	Protokoll
NOD2 <i>Flv</i>	<i>Forward</i> Nod2- Flv-A <i>Revers</i> Nod2- Flv-B <i>Revers</i> Nod2- Flv-C	5'-ACA GAG ATG CCG ACA CCA TAC TG-3' 5'-TGG AGA AGG TTG AAG AGC AGA GTC-3' 5'-TGA CTG TGG CTA ATG TCC TTT GTG-3'	The Jackson Laboratory
RIP 2 -WT (*touchdown PCR)	<i>Forward</i> CCK-PR20-F <i>Revers</i> CCK-PR21-R	5'-TTG GAG CTT CCT CTA GTG CTG TTC- 3' 5'-CCC AAA AAT TCA GGC TCA TTG C- 3'	Richard Flavell
Rip 2 -Mut (*touchdown PCR)	<i>Forward</i> CCK-PR20 -MUT -F <i>Revers</i> M88-4R-R	5'-TTG GAG CTT CCT CTA GTG CTG TTC- 3' 5'-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG-3'	Richard Flavell

Primer	Primer-Name	Primer-Sequenz	Protokoll
TLR2	<i>Forward</i> Tlr2-A <i>Revers</i> Tlr2-B <i>Revers</i> Tlr2-C	5'-CTT CCT GAA TTT GTC CAG TAC A-3' 5'-GGG CCA GCT CAT TCC TCC CAC-3' 5'-ACG AGC AAG ATC AAC AGG AGA-3'	The Jackson Laboratory
TLR4	<i>Revers</i> <i>wild</i> <i>Forward</i> <i>extra</i> <i>Revers</i> <i>neo</i>	5'-CGT GTA AAC CAG CCA GGT TTT GAA GGC-3' 5'-TGT TGC CCT TCA GTC ACA GAG ACT CTG-3' 5'-TGT TGG GTC GTT TGT TCG GAT CCG TCG-3'	Frank Ebel, MvP
TRIF	<i>Forward</i> <i>Trif-fwd</i> <i>Revers</i> <i>Trif-rev</i>	5'-AGG ATT CAG ATT GGA GTC CCA CAG-3' 5'-ACA GTC CCA ATC CTT TCC ATC AGC-3'	Bernhard Holzmann

2.4.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren zur Größenaufftrennung von DNA-Molekülen im elektrischen Feld. Die Agarose stellt ein Matrixpolymer dar, das aus verschiedenen verknüpften Galaktoseeinheiten besteht. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern dabei im elektrischen Feld zur Anode und werden in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts und ihrer Konformation in der Gelmatrix aufgetrennt. Für die Agarosegelelektrophorese wurden die Proben mit 1x DNA-Probenpuffer versetzt und auf Agarosegel in TAE-Puffer aufgetragen. Zur Bestimmung der Fragmentgröße diente ein 100 bp Plus DNA-Leiter (Fermentas). Der Gellauf erfolgte in horizontalen Gelkammern der Firma Bio-Rad bei 90 V für 45-60 Min. Die Gele wurden anschließend im Ethidiumbromid-Färbebad gefärbt, und die Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 254 nm.

Tabelle 2.8: Puffer und Lösungen für DNA-Gelelektrophorese.

Reagenz	Zusammensetzung
TAE-Puffer	40 mM Tris 40 mM Essigsäure 1 mM EDTA
10x DNS-Probenpuffer	50% Glycerin 0,1 M EDTA 1% SDS 0,1% Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Färbebad	1 µg Ethidiumbromid / ml ddH ₂ O

2.5 Tierexperimentelle Arbeiten

2.5.1 Medien und Lösungen

Tabelle 2.9: Medien und Lösungen.

Medium / Puffer	Zusammensetzung
RPMI	2mM L-Glutamin 10% FKS in RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen)
DPBS (Gibco, Invitrogen)	Ohne CaCl ₂ Ohne MgCl ₂
ACT	15 M Ammoniumchlorid 0,017 M TrisHCl pH 7,4

2.5.2 Gewinnung von neutrophilen Granulozyten aus der Peritonealhöhle

Aufgrund des geringen Blutvolumens einer Maus (ca. 1 ml) erweist sich die Isolierung von Neutrophilen aus Mausblut als schwierig und erfordert eine hohe Anzahl von Tieren. Die Isolierung von eingewanderten Neutrophilen in die Bauchhöhle nach Induktion einer sterilen Peritonitis stellt daher eine gängige Methode dar. Dabei lassen sich ca. $2-7 \times 10^6$ Neutrophile pro Maus aus der Peritonealhöhle gewinnen.

Um die Infiltration von Neutrophilen in den Bauchraum zu induzieren, wurden den Mäusen je 1 ml sterile 10%-Proteose-Pepton Lösung intraperitoneal injiziert. Nach 4 h wurde die Bauchdecke freipräpariert (Entfernung der Bauchhaut) und mit 5 ml sterilem PBS mittels einer Spritze (10 ml Injekt Luer, B. Braun, Melsungen) gespült. Die gewonnene Zellsuspension wurde bei 1200 rpm, 7 Min zentrifugiert und das Pellet anschließend in RPMI resuspendiert. Die Erythrozytenlyse wurde durch Inkubation des Zellpellets in 5 ml ACT-Lösung für 5 Min bei RT durchgeführt. Danach wurde der Lyseprozess mittels RPMI-Mediums beendet, die Zellen zentrifugiert und das Pellet anschließend in RPMI resuspendiert. Der Anteil der angereicherten Neutrophilen in Peritonealzellsuspension wurde mittels FACS-Analyse kontrolliert.

2.5.3 Gewinnung von Knochenmarkzellen

Die Knochenmarkzellen wurden durch Spülen von herauspräparierten Oberschenkel- (Femur) und Unterschenkelknochen (Tibia) der Maus mit sterilem PBS gewonnen. Die Zellsuspension wurde zweimal mit sterilem PBS gewaschen und die Erythrozytenlyse wurde durchgeführt. Anschließend wurden die Gewebereste und Zellaggregate von Einzelzellen durch ein 40 µm-Zellsieb (BD Falcon) getrennt.

2.5.4 Zellzahlbestimmung

Die Zahl der vitalen Zellen wurde mikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer mittels 0,4%-Trypanblau-Lösung (Sigma) bestimmt. Diese Methode basiert darauf, dass der Farbstoff Trypanblau nur tote Zellen anfärbt und die intakte Membran der lebenden Zellen nicht durchdringen kann. Der anionische Farbstoff Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytoplasma und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Durchlichtmikroskop leuchtend hell.

10 µl der Zellsuspension wurden 1:20 mit Trypanblau verdünnt und 10 µl der Zellsuspension in den Raum zwischen Deckglas und Kammer pipettiert. Die Tiefe der Zählkammer beträgt exakt 0,1 mm. Unter dem Mikroskop wurden die lebenden (weißen) Zellen in den vier Großquadranten ausgezählt.

Die Zellzahl wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \text{Mittelwert aus 4 Großquadranten} \times \text{Verdünnungsfaktor } 20 \times 10^4^*$$

*Umrechnungsfaktor der Zählkammer von 0,1µl auf ml

2.5.5 Mausinfektionsmodell

Die für die experimentellen *Yersinia*-Infektionen wurden C57BL/6 Mäuse (Wildtyp oder mit Gendelektion) verwendet (männlich und weiblich, zwischen 8-12 Wochen alt). Tierversuche wurden gemäß der geltenden Rechtsgrundlage (Tierversuchsantrag: 2531- 82-07 genehmigt von der Regierung Oberbayern) durchgeführt.

Die Mäuse wurden mit einer Dosis von 5×10^3 CFU intraperitoneal infiziert. Die Infektionsdosis richtete sich nach einer für den C57BL/6 wt-Stamm adaptierten LD₅₀ Dosis.

Unter LD₅₀ versteht man die Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben; diese beträgt bei intravenöser Infektion mit *Yersinia enterocolitica* WA(pYV) bei C57BL/6-Mäusen 2x10⁴ CFU (Autenrieth et al., 1993) .

Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden die Versuchstiere mit CO₂ getötet und die Organe unter sterilen Bedingungen entnommen.

MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-} (TLR2^{-/-}/4^{-/-}) Mäuse wurden ggb. bei Anzeichen von schwerer Septikämie (Lethargie, struppiges Fell, starke Gewichtsabnahme) nach Möglichkeit zu früheren Zeitpunkten getötet.

Für die Gefrierpräparate wurden die Milzen 2 bzw. 3 Tage nach der Infektion herauspräpariert und im Einbettmedium (Tissue Tek Cryomold, Sakura) in Probenbehältern (Hartenstein, Würzburg) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden anschließend bei -80°C gelagert.

Alternativ wurden die Milzen nach Entnahme mechanisch mit Hilfe eines Spritzenstempels (Injekt Luer 10ml, B. Braun, Melsungen) homogenisiert, in 5 ml RPMI resuspendiert und die Zellsuspension mittels eines 40 µm-Zellsiebes (BD Falcon) von Gewebeteilen getrennt (siehe auch 2.5.3). Ein Aliquot zur Bestimmung der CFU wurde entnommen und auf CIN-Agar Platten ausplattiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1500 rpm 7 Min 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann für die Zytokin-Messung mittels ELISA und BD™ CBA eingefroren und das Zellpellet der FACS-Analyse unterzogen.

Intraperitoneallavage wurde ebenfalls zu den angegebenen Zeitpunkten durch Freilegung der Bauchhöhle und Spülung mit 5 ml kaltem sterilem PBS gewonnen. Bei den infizierten Versuchstieren wurde die Peritoneallavage geteilt. Eine Hälfte wurde bei 3500 rpm und 4°C 10 Min zentrifugiert, wobei der Überstand dann für die Zytokin-Messung mittels ELISA und BD™ CBA eingefroren und das Zellpellet in 500 µl PBS resuspendiert wurde. Anschließend wurde aus dem Zell-/Bakterienpellet eine Verdünnungsreihe gemacht und Aliquots auf CIN-Agar für die Bestimmung der CFU im Peritoneallavage ausplattiert. Die partielle Zentrifugation diente zur Aufkonzentrierung der Bakterien in einer Probe, wobei die Bakterien bei dieser Umdrehungszahl im Pellet sedimentieren, während die Mauszellen platzen können. Die andere Hälfte der Peritoneallavage wurde schonend für die Zellen bei 1200 rpm und 4°C 7 Min zentrifugiert, der Überstand wurde anschließend verworfen. Nach Bedarf wurde die Erythrozytenlyse durch Inkubation des Zellpellets in 5 ml ACT-Lösung für 5 Min bei RT durchgeführt. Danach wurde der Lyse-Prozess mittels RPMI-Mediums abgestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 1200 rpm, 7 Min zentrifugiert und das Pellet anschließend in RPMI resuspendiert und mittels FACS analysiert.

2.5.6 Anfertigen von Gewebepreparaten

Die Anfertigung der Gefrierschnitte von Mausmilzen erfolgte an einem Kryomikrotom (Leica) bei -17°C. Kryoschnitte von 10 µm Dicke wurden auf Superfrost Plus-Objektträger (Menzel-Gläser) aufgebracht, üN bei 4°C getrocknet und bei -20°C bis zur Anfärbung gelagert.

2.5.7 Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten

Die Immunfluoreszenzmikroskopie kann zur Lokalisierung von Proteinen im subzellulären Bereich genutzt werden. Dabei binden die antigenspezifischen primären Antikörper an das zu untersuchende Antigen der Zellen oder Bakterien. Die Detektion dieser Interaktion erfolgt mittels eines sekundären Antikörpers, der gegen die Immunglobulinklasse der Tierspezies des primären Antikörpers gerichtet und mit einem Fluoreszenz-Farbstoff oder Fluorophore (z.B. Cy3, FITC) gekoppelt ist. Fluorophore werden durch Absorption eines Photons angeregt und emittieren beim Übergang von elektronisch höherem Zustand in einen Zustand niedrigerer Energie spontan das Licht der entsprechenden Wellenlänge. Dabei ist das Spektrum der Fluoreszenz gegenüber dem Spektrum der Absorption zu kleineren Energien, bzw. zu größeren Wellenlängen verschoben. Das Mikroskop muss dafür mit entsprechenden Fluoreszenzfiltern ausgestattet sein.

Die Milzkryoschnitte wurden nach dem untenstehenden Immunfärbungsprotokoll behandelt. Die zu verwendeten Antikörper und Reagenzien sind den Tabellen 2.10 und 2.11 zu entnehmen.

- Fixierung der Schnitte mit eiskaltem Aceton für 10 Min auf Eis
- Bei RT kurz trocknen lassen
- 2x für 5 Min rehydratisieren in TBST
- Blockieren mit 5% Ziegen Serum/TBST 30 Min bei RT
- Inkubieren mit 150 µl Primär-AK-Verdünnung für 45 Min bei RT
- 3x Waschen mit TBST
- Inkubieren mit 150 µl Sekundär-AK-Verdünnung für 45 Min bei RT
- 3x Waschen mit TBST
- Hintergrund-Färbung mit DAPI für 5 Min RT
- 3x Waschen mit TBST
- Eindeckeln mit Mowiol

Die gefärbten Kryoschnittpräparate wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop BX61 (Olympus, Hamburg) mit entsprechenden Filtern (UIS2 Fluorescence Mirror Units, Olympus) und einer schwarz-weiß Kamera (F-View II, Olympus) visualisiert.

Tabelle 2.10: Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung.

Primäre Antikörper		Verd.	Beschreibung / Klon
Ham. α-M. CD3e (T-Zellen)	BD Pharmingen™	1:50	Syrischer Hamster IgG2κ; 500A2
Rat. α-M. CD19 (B-Zellen)	BD Pharmingen™	1:50	Ratte IgG2a; 1D3
Rat. α-M. Ly-6G (PMN)	BD Pharmingen™	1:50	Ratte IgG2a; 1A8
Ham. α-M. SIGN-R1 (MZ MΦ)	eBioscience	1:50	Armenischer Hamster IgG; eBio22D1 (22D1)
Rat α-M. MARCO (MZ MΦ)	AbD Serotec	1:400	Ratte IgG1; ED31
Kan. α- <i>Yersinia</i> WA vital	J. Heesemann, Max von Pettenkofer Inst.	1:5000	Kaninchenserum gerichtet gegen <i>Y. enterocolitica</i>
DAPI	Sigma-Aldrich	1:3000	Stock 3 mg/ml
Ziegenserum	Gibco Invitrogen		Prä-immun
Sekundäre Antikörper		Verd.	Fluorophor
α-Ratte IgG (H+L)	Invitrogen	1:200	Alexa Fluor 647
α-Kan. IgG (H+L)	Invitrogen	1:200	Alexa Fluor 555
α-syrischer Hamster IgG (H+L)	Invitrogen	1:200	Alexa Fluor 488
α-armenischer Hamster IgG (H+L)	Dianova	1:200	Alexa Fluor 488

Tabelle 2.11: Reagenzien für Immunfluoreszenzfärbung.

Reagenz	Zusammensetzung
TBS, 10x	1 M Tris 1,5 M NaCl pH 7,5
TBST, 1x	1xTBS 0,1% Tween-20
Mowiol	33,6 g Mowiol 4-88 in 96 ml 0,2 M Tris pH 8,5 + 48 ml H ₂ O lösen auf 50°C erhitzen 48 ml Glycerin dazugeben üN bei 50°C rühren zentrifugieren bei 2000 rpm, 8 Min, 4°C Aliquots bei -20°C lagern
AK-Lösung	2,5% Ziegenserum / TBST

2.6 Allgemeine immunologische Techniken

2.6.1 FACS-Analyse

FACS (engl.: „*fluorescence activated cell sorting/scanning*“) oder Durchflusszytometrie ist eine Methode Einzellen anhand deren Größe und Fluoreszenzemission zu charakterisieren und ggf. zu sortieren. Das Prinzip beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle unter Laserbestrahlung. Hierbei werden in einer Lösung befindliche Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodus einzeln einen Laserstrahl. Die Zelle emittiert dabei Streulicht, welches durch Zellgröße, die Struktur der Zellmembran sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst wird. Die Zellen können damit in unterschiedliche Zellpopulationen charakterisiert und gezählt werden. Hierzu dienen zwei Parameter: das Vorwärtsstreulicht FSC (engl.: „*forward scatter*“) wird durch Beugung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Zellgröße; das Seitwärtsstreulicht SSC (engl.: „*side scatter*“) wird durch Brechung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Granularität. Zusätzlich kann man die Proben vorher mit spezifischen Antikörpern markieren, die mit Fluorophoren gekoppelt sind. Die Zelle emittiert dabei Fluoreszenzimpulse. Verschiedene Farbstoffe emittieren Licht mit unterschiedlichen Emissionsspektren, die in verschiedenen Kanälen detektiert werden können.

Für die Analyse von Milz- und Lavage-Proben wurden jeweils 1×10^6 Zellen mit Fluoreszenz-konjugierten monoklonalen Antikörpern (mAbs) direkt gefärbt. Alle Antikörper wurden zuvor austitriert und in sättigender Konzentration eingesetzt. Vor der Färbung mit spezifischen mAbs wurden Zellproben 20 Min bei 4°C mit Fc-Block- Reagenz (blockierender Antikörper für Fc-Rezeptor) in FACS-Puffer behandelt, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Anschließend wurden die Proben mit FACS-Puffer gewaschen und mit den spezifischen mAbs in 100 µl FACS-Puffer 30 Min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Antikörper können der Tabelle 2.13 entnommen werden. Anschließend wurden die Proben zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und kurz vor der Messung mit 7-AAD-Lösung (eBioscience) versetzt, um die toten Zellen auszuschließen. 7-AAD ist ein fluoreszierender Farbstoff, welcher von doppelsträngiger DNA interkaliert wird und dessen Emissionsmaximum bei ca. 650 nm liegt. 7-AAD-Lösung dringt durch die permeable Membran der toten Zellen, wobei die Kerne von lebenden Zellen ungefärbt bleiben.

Die Messung erfolgte am FACSCanto II (BD Biosciences) und die Auswertung der Proben wurde mittels FACS Diva 6.0 Software durchgeführt.

Tabelle 2.12: Puffer für die FACS-Färbung.

Puffer	Zusammensetzung
FACS-Puffer	1x PBS, pH 7,5 0,5% BSA 0,02% NaN ₃ steril filtrieren

Tabelle 2.13: Antikörper für die FACS-Färbung.

Antikörper / Färbereagens	Menge	Beschreibung / Klon
α-CD16/CD32	BD, Heidelberg	0,5 µg FcγIII und FcγII Rezeptor-Blocker 2.4G2; Ratte IgG2b
α-CD3e-APC-Cy7	BD, Heidelberg	0,2 µg T-Zell-Marker 145-2C11 Armenischer Hamster IgG1
α-CD19-PE	eBioscience	0,4 µg B-Zell-Marker eBio1D3 (1D3) Ratte IgG2a
α-Ly-6G-APC	Miltenyi Biotec	1:100 verdünnt PMN-Marker 1A8 Ratte IgG2a
α-CD11b-FITC	eBioscience	0,25 µg Integrin α _M , Mac-1a M1/70 Ratte IgG2b
α-F4/80-Pacific Blue	Invitrogen	0,2 µg Makrophagen-Marker BM8 Ratte IgG2a
α-CD11c-APC-Cy7	eBioscience	0,25 µg DZ-Marker N418 Armenischer Hamster IgG
7-AAD	eBioscience	0,25 µg tote Zellen / DNS

2.6.2 Cytometric Bead Array (CBA)

BD™ *Cytometric Bead Array* (CBA) ist eine durchflusszytometrische Anwendung, die es erlaubt mehrere Proteine (z.B. Zytokine) gleichzeitig in einer Probe zu quantifizieren. Das CBA-System (BD Biosciences) verbindet Fluoreszenzdetektion mittels Durchflusszytometer und antikörpergekoppelte Kugelpartikel („beads“).

Jedes so genannte Fangkugelpartikel (engl.: „*capture bead*“) ist mit spezifischen Antikörpern gegen ein bestimmtes Protein (z.B. Zytokin) gekoppelt und besitzt eine individuelle Fluoreszenzintensität, welche in den Kanälen APC gegen APC-Cy7 gemessen wird. Dies ermöglicht die Kombination verschiedener „*capture beads*“ in einer Probe.

Die Fangkugelpartikel werden mit der zu analysierenden Probe (z.B. Zellkulturüberstand, Serum) und/oder Standard für 1 h bei RT gemischt und anschließend mit der Kombination von den korrespondierenden Detektionsantikörpern (DAK) 1 h bei RT inkubiert, die mit Phycoerythrin (PE)-Reporter-molekülen gekoppelt sind. Nach der Inkubationszeit und folgenden Waschschritten erfolgt die Messung am Durchflusszytometer (Abb. 2.1).

Die FCAP Array Analyse-Software (BD Biosciences) setzt eine Grenze für jede individuelle *Bead*-Population und bestimmt die mittlere Fluoreszenzintensität (engl.: „*mean fluorescence intensity*“) im PE-Kanal für jeden Analyt in der Zusammenstellung (Abb. 2.2). Die Software generiert eine Standardkurve, interpoliert die Probenkonzentrationen in Abhängigkeit von der Standardkurve und errechnet die Endkonzentration jedes Analyten in der Probe im tabellarischen Format.

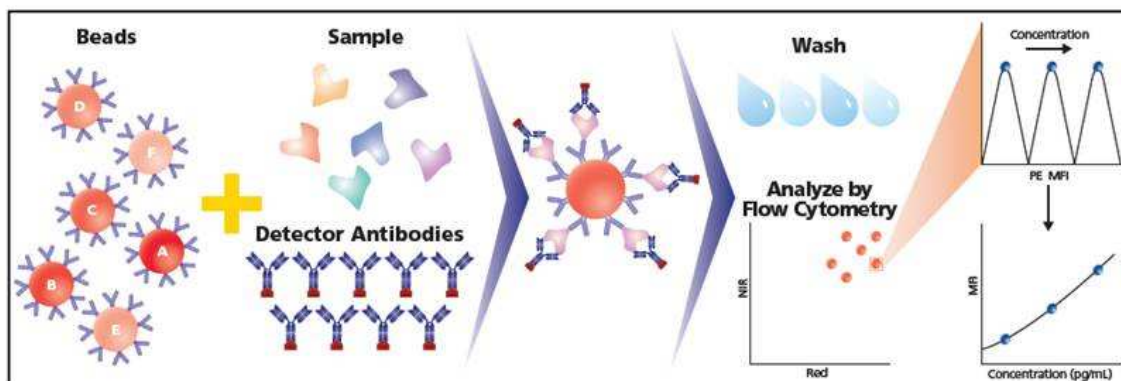


Abb. 2.1: BD™ CBA – schematische Darstellung (BD Bioscience; Sandra Ormenese, GIGA-Imaging & Flow cytometry, Liege, Belgien). Jede individuelle Gruppe der Fangkugelpartikel („beads“) ist kovalent mit spezifischen AK gekoppelt, die gegen das zu untersuchende Molekül (Analyt) in der vorliegenden biologischen Flüssigkeit (z.B. Serum- oder Plasmaprotein) gerichtet sind. Außerdem besitzen verschiedene „Bead“-Populationen eine bestimmte Fluoreszenzintensität (~660 nm und > 680 nm), die in den den Kanälen APC gegen APC-Cy7 gemessen werden kann. Der gebundene Analyt kann anschließend mit einem mit PE-gekoppelten DAK nachgewiesen werden (~585 nm). Anhand der Messung der Verdünnungsreihe einer Standardlösung (z.B. Proteinlösung mit bekannter Konzentration), wird eine eigene Standardkurve für jeden Analyt generiert. FCAP Array™ Software interpoliert die Probenkonzentrationen in Abhängigkeit von der Standardkurve und errechnet die Endkonzentration jedes Analyten in der Probe.

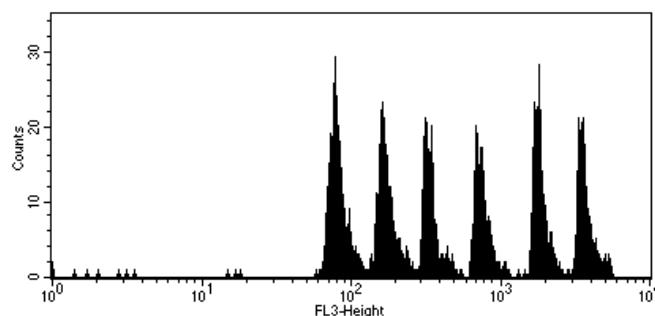


Abb. 2.2: BD™ CBA-beispielweise Darstellung einer Messung von sechs verschiedenen Zytokinen aus einer Probe (BD Bioscience). Jeder Peak repräsentiert eine MFI des Analyts im PE-Kanal.

Diese Methode ermöglicht es, gleichzeitig bis zu 30 verschiedene Proteinanalyte in einer Probe mit der Sensitivitätsgrenze von 20 pg/ml nachzuweisen.

Mittels BD™ CBA wurden nach Herstellerprotokoll Zytokine (Tabelle 2.14) aus dem Milzhomogenat- und Peritoneallavage-Überständen gemessen, mit der Ausnahme, dass 0,3 µl (statt 1 µl) von jedem AK-gekoppelten „capture bead“ und 0,3 µl (statt 1 µl) von jedem Detektionsantikörper je Probe verwendet wurden.

Tabelle 2.14 : BD™ CBA Zytokin-Flex-Sets.

Reagenz	Hersteller
Mouse G-CSF Flex Set	BD Bioscience
Mouse IL-1α Flex Set	BD Bioscience
Mouse IL-β Flex Set	BD Bioscience
Mouse IL-2 Flex Set	BD Bioscience
Mouse IL-6 Flex Set	BD Bioscience
Mouse IL-10 Flex Set	BD Bioscience
Mouse IL-12p70 Flex Set	BD Bioscience
Mouse KC Flex Set	BD Bioscience
Mouse MCP-1 Flex Set	BD Bioscience
Mouse MIP-1α Flex Set	BD Bioscience
Mouse MIP-1β Flex Set	BD Bioscience
Mouse TNF Flex Set	BD Bioscience
Mouse/Rat Soluble Protein Master Buffer Kit (Puffer und Reagenzien)	BD Bioscience

2.6.3 Stimulation von Knochenmarkzellen mit *Y. enterocolitica*

Murine Knochenmarkzellen wurden mit der Dichte von 2×10^5 Zellen / 200 µl RPMI pro „well“ in 96-well-Mikrotiterplatte ausgesät. Darauf wurde je 20 µl pro „well“ Bakteriensuspension (MOI=10) bei 1200 rpm, 5 Min zentrifugiert. 60 Min nach der in vitro Infektion wurde der Zellkulturüberstand mit der Pipette komplett abgenommen und für spätere quantitative Messung der Zytokine mittels ELISA bei -20°C aufbewahrt. Zu den Parallelproben wurde nach 60 Min Gentamicin (Gibco Invitrogen) (Endkonzentration 50 µg/ml) zugegeben, um die Yersinien abzutöten. Dabei bleiben die Zellen von den freigesetzten bakteriellen Produkten weiterhin stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden dann zu den angegebenen späteren Zeitpunkten ebenfalls mit der Pipette abgenommen und für die Messung bei -20°C aufbewahrt.

2.6.4 Zytokinbestimmung mittels ELISA

„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion und immobilisierten Antikörpern oder Antigenen basiert.

Bei dem so genannten *Sandwich-ELISA* werden zwei Antikörper (AK) verwendet, welche spezifisch an unterschiedliche Stellen an das nachzuweisende Antigen binden. Der erste AK („*coating/capture*“-Antikörper) wird an eine feste Phase (meist spezielle 96-*well*-Mikrotiterplatte) gebunden. Die Probe wird dann in die Kunststoffnöpfe („*wells*“) einer Mikrotiterplatte gegeben und für eine definierte Zeit inkubiert. Während dieser Inkubationszeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Nach mehreren Waschschritten wird ein Detektions- („*detection*“-)AK zugegeben, der ein anderes Epitop auf dem nachzuweisenden Antigen erkennt als der „*Capture-AK*“. Der Detektionsantikörper ist mit einem Enzym, meistens Meerrettichperoxidase (HRP, von engl.: „*horseradish*“), oder alkalischen Phosphatase (AP), gekoppelt, welches das passende chromogene Substrat umsetzt, dessen Nachweis durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz erfolgen kann.

Die Zytokine MIP-2, KC, IL-1 α und IL-1 β wurden aus Zellkulturüberständen (Gesamtvolumen (GV) 200 μ l), Milzhomogenaten und Peritoneallavage-Zellsuspensionen (GV je 5 ml) quantitativ mittels kommerziell erworbenen ELISA-Kits (PeproTech, Hamburg) nach Angaben des Herstellers nachgewiesen. Nach Zugabe des HRP-Substrates TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) wurde die Substratumsetzung mit 1M H₂SO₄ beendet und die optische Dichte bei 450 nm am Mikrotiterplattenmessgerät gemessen.

Tabelle 2.15: Reagenzien für ELISA.

Reagenz / Puffer	Zusammensetzung
Waschpuffer	1x PBS, pH 7,2; 0,05% Tween-20
Blockierungspuffer	1x PBS, pH 7,2; 1% BSA
Verdünnungspuffer (engl. „ <i>Diluent</i> “)	1x PBS, pH 7,2 0,05% Tween-20 1% BSA
HRP-Enzym (BD Bioscience)	
TMB-Substrat (BD Biosciences)	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)

2.6.5 ROS-Test

Als „oxidative burst“ bezeichnet man die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen bei der Phagozytose oder anderen Stimuli.

Aminophenylfluorescein (APF) und Hydroxyphenylfluorescein (HPF) sind zwei spezifische ROS-Indikatoren (Setsukinai et al., 2003). Beide reduzierten Fluorescein-(FITC)-Derivate sind nicht fluoreszierend und werden durch Oxidation mit Hydroxyl-Radikal oder Peroxynitrit-Anion zu Fluoreszenzfarbstoff konvertiert (Abb. 2.3). APF reagiert auch mit Hypochlorit-Anion. Während der Oxidation emittieren APF und HPF grünes Fluoreszenzlicht bei 515 nm, welches mittels FITC-detektierbaren Mikroskopen oder Zytfluorometern gemessen werden kann.

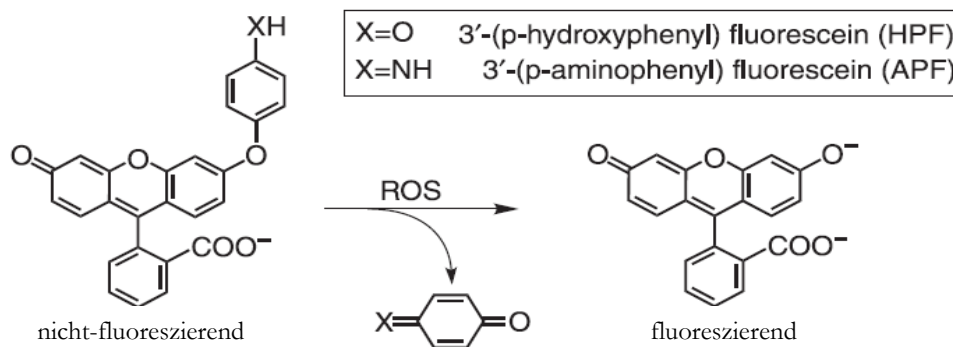


Abb. 2.3: APF-Reaktion (Invitrogen Life Science).

Knochenmarkzellen enthalten einen hohen Anteil an reifen Neutrophilen (30%-50% eigene Daten). Aufgrund dieser Tatsache hat es sich als praktikabel erwiesen, die bakteriziden Eigenschaften der Knochenmarkneutrophilen ohne Aufreinigungsschritte zu untersuchen. Die Isolierung von Knochenmarkzellen verschiedener Mausstämmen wurde wie in 2.5.3 beschrieben durchgeführt und nach folgendem Protokoll (wie für Peritonealzellen) behandelt.

Für die Induktion der Peritonitis und damit der Infiltration von neutrophilen Granulozyten in den Bauchraum wurde den Mäusen je 1 ml von 10%-Proteose-Pepton-Lösung intraperitoneal injiziert. 4 h nach der Injektion wurde mit kaltem sterilem PBS die Bauchhöhle gespült. Nach Bedarf wurden, wie unter 2.5.2 bereits beschrieben, Erythrozyten lysiert. Peritonealzellen wurden zweimal mit sterilem PBS gewaschen, in 1 ml RPMI resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

Zellen (Knochenmark- oder Peritoneallavage-Zellen) wurden mit der Dichte von $2-5 \times 10^5$ Zellen in 180 μl in 24-*well*-Platte (TPP, Trasadingen, Schweiz) ausgesät. Anschließend wurde APF zur Endkonzentration von 10 μM pro „*well*“ dazugegeben und die Zellen 30 Min bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Dann wurde die Bakteriensuspension (wt-Yersinien WA(pYV) oder sekretionsnegativer Kontrollstamm WA(pYV Δ LcrD) mit der MOI=10 in 10 μl auf die Zellen zentrifugiert (1200 rpm, 5 Min). Nach der Infektionszeit von 30 Min wurde die 24-*well*-Platte auf Eis gestellt, um sowohl die Phagozytose und den „*oxidative burst*“ als auch die Vermehrung von Yersinien zu stoppen. Die Infektionsansätze der einzelnen „*wells*“ wurden komplett in jeweils 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die „*wells*“ wurden mit je 500 μl PBS gewaschen und der Inhalt in die zugehörigen Reaktionsgefäße dazu pipettiert. Reaktionsgefäße wurden 5 Min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in FACS-Puffer mit Fc-Block 20 Min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit α -Ly-6G-APC Antikörper 20 Min bei 4°C „gefärbt“. Dann wurden die Proben zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und mittels Durchflusszytometer (FACSCanto II, BD Bioscience) analysiert. Die Messung der Proben erfolgte im so genannten Dot-Plot, wo FITC-Intensität gegen APC-Intensität aufgetragen wurde. Die Auswertung der gemessenen Proben erfolgte mittels FlowJo Software (Tree Star, Inc.).

Dabei wurde zuerst ein Streufenster (engl.: „*gate*“) um die Population mit Ly-6G⁺-Zellen „gelegt“ und als 100% gesetzt (=PMN-Population). Anschließend wurde davon die FITC⁺ Zellpopulation mittels Anlegen eines weiteren Streufensters ausgegrenzt („ausgegated“; =Anteil in % an ROS-positiven Neutrophilen) und der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität (engl.: „*geometric mean of fluorescence intensity*“) als Maß für Stärke des „*oxidative burst*“ mittels Software errechnet.

2.6.7 Statistische Auswertungen

In vitro Experimente wurden mindestens dreimal in triplica durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die in vivo Tierexperimente wurden ebenfalls zwei- bis dreimal wiederholt, wobei 5 Tiere pro Gruppe verwendet wurden.

Die statistische Analyse wurde mittels doppelseitigen Student t-Test bzw. Mann-Whitney Test durchgeführt. Unterschiede gelten als statistisch signifikant, wenn der p-Wert <0,05 ist.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur *Yersinia*-Infektionsempfänglichkeit von Mäusen mit definierten Defekten der angeborenen Immunität

Der natürliche Infektionsweg von *Yersinia enterocolitica* verläuft über perorale Aufnahme von Bakterien mit kontaminierter Nahrung oder Wasser. Nach der oralen Aufnahme gelangen die Yersinien zunächst in den unteren Abschnitt des Dünndarms und besiedeln dort die Peyer Plaques. Von dort aus disseminieren die Bakterien in mesenteriale Lymphknoten, Leber und Milz, wo sie eine systemische Infektion mit Abszessbildung verursachen.

Das orale C57BL/6-Mausinfektionsmodell hat sich jedoch für den Vergleich der Infektionsempfänglichkeit als nicht praktikabel erwiesen, da die Keimzahlwerte der in den Organen befindlichen Yersinien stark schwanken. Außerdem weisen insbesondere C57BL/6 Mäuse eine erhöhte *Yersinia*-Resistenz bei peroralem Infektionsweg auf.

Für die erste Näherung für die Bestimmung der *Yersinia*-Infektionsempfänglichkeit hat sich das intraperitoneale (ip) Infektionsmodell als geeignet herausgestellt, da bei allen C57BL/6 Mäusen (mit oder ohne Defekte der angeborenen Immunität) der Infektionsprozess mit der gleichen Infektionsdosis ausgelöst werden konnte. Die initiale Immunabwehr im Peritonealraum war damit zunächst bestimmend für die Dissemination in Milz, Leber und andere Organe. Der Infektionsprozess (Einwanderung von Zellen der Immunabwehr, Sekretion von Zytokinen/Chemokinen, Überleben/Vermehrung der Erreger) sowohl im Peritonealraum als auch im Milzgewebe konnte deshalb im Vergleich genauer bestimmt werden. Unter der Annahme, dass *Yersinia*-PAMP (LPS, PG, Lipoprotein, LcrV usw.) den initialen Abwehrmechanismus induzieren, wurden Mäuse mit PAMP-Rezeptordefekten vergleichend untersucht. Darüber hinaus wurden gendefiziente (*ko*-) Mäuse wie IL-10^{-/-} und IL-1Ra^{-/-}, die hyperinflammatorisch auf PAMP reagieren, sowie *ko*-Mäuse mit Defekten für MyD88, TRIF oder RIP2, die mehrere PAMP-Rezeptor-Signalwege blockieren, mit einbezogen. Die Veranschaulichung dieses Konzepts ist in der Abbildung 3.0 dargestellt.

In dieser Arbeit wurde die Rolle der angeborenen Immunität während einer *Yersinia*-Infektion untersucht. Zuerst wurden *ko*-Mäuse mit definierten Gendefekten mit *Yersinia*-Wildtyp-Stamm WA(pYV) intraperitoneal infiziert. Die Milzen der infizierten und als Kontrolle dienenden uninfizierten Mäuse wurden zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infektion entnommen und sowohl durchflusszytometrisch als auch mittels Immunfluoreszenzfärbungen analysiert.

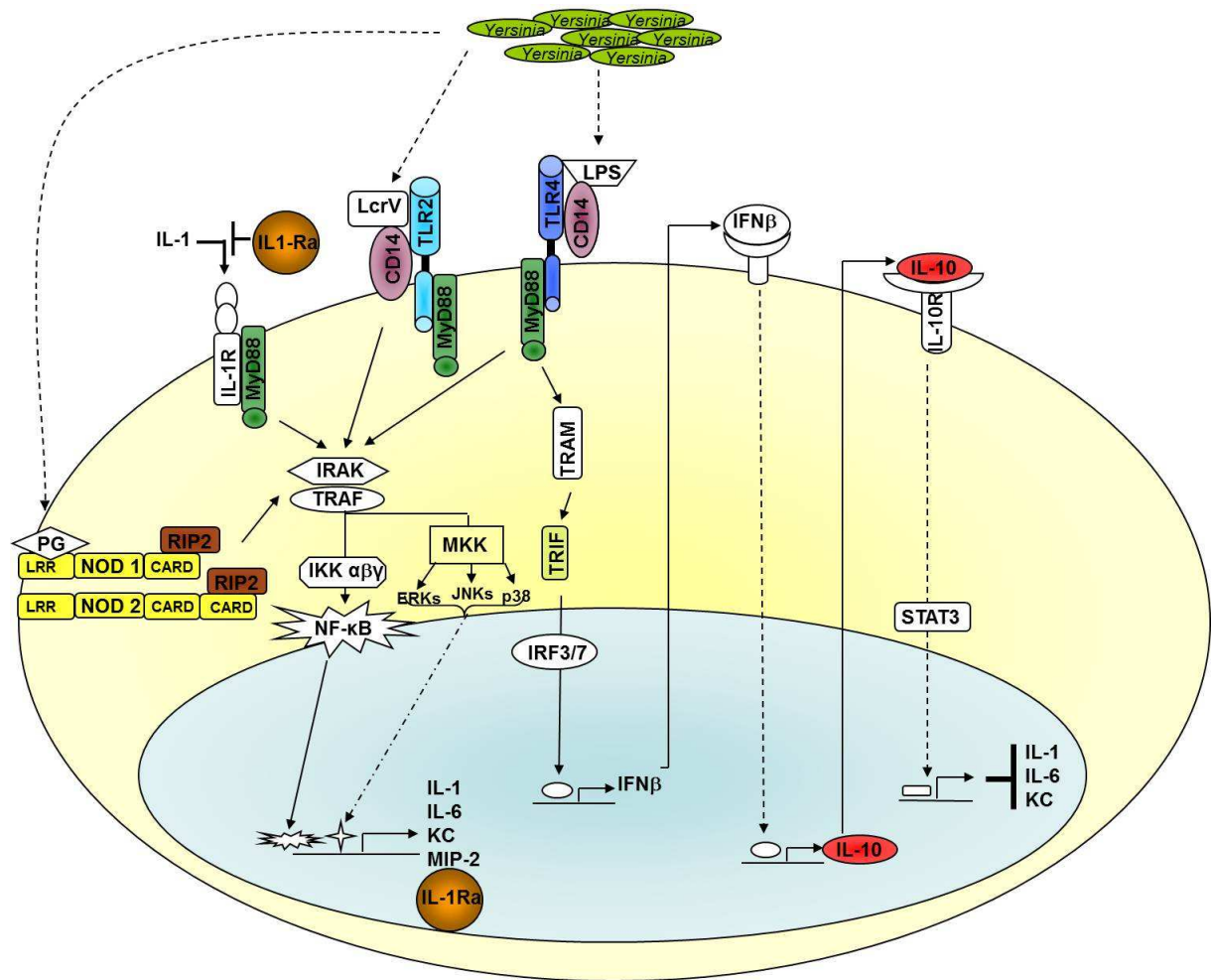


Abb. 3.0: Schematische Darstellung der durch *Yersinia*-PAMP postulierten PRR-Signalwege.

Von Yersinien freigesetzte PAMP können von PRR des Phagozyten erkannt werden: LPS bindet an MD2/TLR4/CD14-Komplex, LcrV wirkt als Agonist auf den TLR2/CD14-Komplex und PG kann intrazelluläre NOD1/2 Rezeptoren aktivieren. Die Aktivierung der PRR induziert definierte Signalwege: der MyD88-abhängiger Signalweg führt zur Translokation von NF-κB in den Zellkern und Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie IL-1, IL-6, KC und MIP-2; der TRIF-abhängiger Signalweg führt zur Induktion von IFN-α/β. IFN-β kann über IFN-β-Rezeptor die Produktion und Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 induzieren. IL-10 bindet an den IL-10-Rezeptor und führt über STAT3 zur Induktion von anti-inflammatorischen Faktoren, die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 oder KC inhibieren. Gene, die bei den hier verwendeten Mauslinien deletiert sind, sind in der Abbildung farbig dargestellt.

3.1.1 Differentielle Anfälligkeit der *ko*-Mausstämme für *Y. enterocolitica*

Um die Abhängigkeit der *Yersinia*-Infektionsempfänglichkeit von Mäusen hinsichtlich der Rolle von Signalwegen der PRR zu untersuchen, wurden verschiedene *ko*-Mäuse mit definierten Defekten in der angeborenen Immunität mit *Y. enterocolitica* intraperitoneal (ip) infiziert (Abb. 3.1).

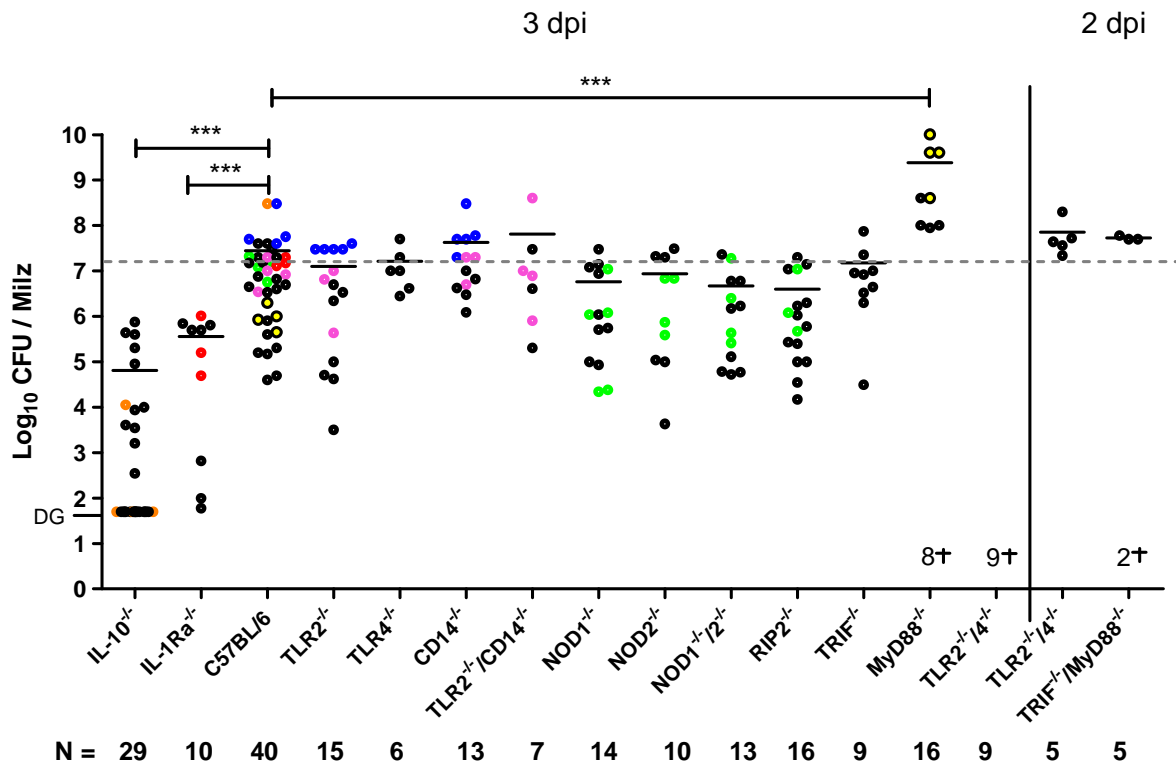


Abb. 3.1: Bakterielle Last (CFU) pro Milz 3 bzw. 2 Tage nach ip-Infektion (dpi) der verschiedenen *ko*-Mäuse mit *Y. enterocolitica* WA(pYV) (5×10^3) im Vergleich zu C57BL/6 (wt). Die Milzen wurden 3 bzw. 2 Tage nach der Infektion entnommen, homogenisiert und die Aliquots der Verdünnungsreihe auf *Yersinia*-Selektivplatten für die Bestimmung der CFU ausplattiert. Übersichtshalber wurden mehrere Experimente in einem Graphen zusammengefasst. Ein Kreis repräsentiert den CFU-Wert einer infizierten Maus, CFU-Mittelwerte sind durch einen Strich dargestellt. Punkte in der gleichen Farbe stellen exemplarisch jeweils ein individuelles Experiment dar. Einzelne Experimente wurden mindestens zweimal mit jeweils 3-5 Mäusen pro Gruppe wiederholt. N = die gesamte Anzahl von Mäusen von zusammengefassten Experimenten der jeweiligen Mauslinie. Kreuz steht für nicht überlebte (nachts) oder vorzeitig getötete Mäuse (moribund). Gestrichelte Linie zeigt den CFU-Mittelwert der Ye-R-Gruppe (wt-ähnlich resistente Mäuse: C57BL/6 – TRIF^{-/-}; siehe Tabelle 3.1). DG = Detektionsgrenze liegt bei 50 CFU. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 (Mann-Whitney-Test).

Die große Anzahl von C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu den *ko*-Mauslinien ist darauf zurück zu führen, dass C57BL/6 als Wildtyp-Kontrollmäuse bei jedem Versuch mit einbezogen wurden. Die einzelnen Experimente wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt und zum übersichtlichen Vergleich der differentiellen *Yersinia*-Empfänglichkeit verschiedener Mauslinien in einem Graphen zusammengeführt. Daraus ergeben sich

größere Streuungswerte. Nichtsdestotrotz weisen individuelle Experimente geringere Streuungswerte auf (beispielhaft dargestellt durch die Punkte in der gleichen Farbe). Des Weiteren wurden einzelne Experimente stets ebenfalls untereinander auf Signifikanz geprüft und übereinstimmend mit den Gesamtergebnissen als signifikant unterschiedlich befunden (wo angegeben).

Bei den hoch empfänglichen Mäusen sind unvorhergesehen am 2. bzw. 3. Versuchstag nachts Mäuse ihrer Infektion erlegen (†). Infizierte Mäuse, die tagsüber als schwer krank identifiziert wurden (moribund), wurden vorzeitig durch CO₂ getötet (†).

Aus den Ergebnissen ergeben sich 3 Gruppen der *Yersinia*-Empfänglichkeit (Tab. 3.1):

Tab. 3.1: *Yersinia*-Empfänglichkeitsgruppen.

Empfänglichkeitsstufe	Mausstamm
<i>Yersinia</i> -hochresistent Ye-HR	IL-10 ^{-/-} , IL-1Ra ^{-/-}
Wt-ähnlich resistent Ye-R	C57BL/6, TLR2 ^{-/-} , CD14 ^{-/-} , TLR2 ^{-/-} /CD14 ^{-/-} , TLR4 ^{-/-} , TRIF ^{-/-} , NOD1 ^{-/-} , NOD2 ^{-/-} , NOD1 ^{-/-} /NOD2 ^{-/-} (NOD1 ^{-/-} /2 ^{-/-}), RIP2 ^{-/-}
<i>Yersinia</i> -hochempfindlich (susceptible) Ye-HS	MyD88 ^{-/-} , TLR2 ^{-/-} /TLR4 ^{-/-} (TLR2 ^{-/-} /4 ^{-/-}), TRIF ^{-/-} /MyD88 ^{-/-}

Da infizierte TLR2^{-/-}/4^{-/-} sowie TRIF^{-/-}/MyD88^{-/-} Mäuse bei einer Dosis von 5x10³ CFU den dritten Tag pi nicht überleben, wurden hier die CFU-Werte 2 dpi (engl.: „days post infection“) dargestellt, wobei die Hälfte der infizierten TRIF^{-/-}/ MyD88^{-/-} Mäuse bereits den 2. Tag pi nicht überstanden haben (entweder in der Nacht verloren oder wegen schwerem Krankheitszustand vorzeitig getötet).

Wie bereits A. Sing gezeigt hat, erweisen sich IL-10^{-/-}.C57BL/6 Mäuse resistenter als IL-10^{+/+} Mäuse (Wildtyp) nach einer ip-Infektion mit *Y. enterocolitica* (Sing et al., 2002a). Die Streuung der CFU-Werte in der Milz von IL-10^{-/-} Mäusen ist dabei sehr hoch. Fast bei der Hälfte der untersuchten IL-10^{-/-} Mäuse konnten keine Bakterien 3 Tage pi reisoliert werden (CFU-Wert unterhalb der DG). Bei einigen IL-10^{-/-} Mäusen konnten dagegen CFU-Werte bis zu 10⁵ CFU/Milz nachgewiesen werden. Solche großen CFU-Schwankungen können dadurch zustande kommen, dass in der Milz nur vereinzelt *Yersinia*-Mikrokolonien heranwachsen können, bzw. vom IL-10^{-/-} Mausabwehrsystem unentdeckt bleiben im Vergleich zur IL-10^{+/+} Maus. Ähnlich verhält es sich mit den CFU-Streuungen in den Milzen der IL-1Ra^{-/-} Mäuse, die ähnlich wie IL-10^{-/-} Mäuse gegenüber *Y. enterocolitica* hochresistent (HR) sind.

Der Befund der erhöhten Resistenz gegen *Y. enterocolitica* (Ye-HR) von IL-1Ra^{-/-} Mäusen wird erstmals in dieser Untersuchung beschrieben. Offensichtlich führt die fehlende Möglichkeit, die inflammatorische Reaktion über IL-10 oder IL-1Ra abzuschwächen bei *Y. enterocolitica* Infektion zur verstärkten Erregereliminierung.

Wie aus der Abbildung. 3.1 deutlich wird, weisen die *ko*-Mäuse TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, CD14^{-/-},

NOD1^{-/-} oder NOD2^{-/-} ähnlich hohe CFU-Werte in der Milz wie C57BL/6 Mäuse auf. A. Sing hat gezeigt, dass TLR2^{-/-} Mäuse sich nach einer ip-Infektion mit *Y. enterocolitica* resistenter verhalten als TLR2^{+/+} (Sing et al., 2002b). Im Gegensatz dazu, konnte die erhöhte Resistenz von TLR2^{-/-} Mäusen in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. In der Arbeit von Isberg et al., konnte eine erhöhte Resistenz von TLR2^{-/-} Mäusen gegenüber enteropathogenen Yersinien ebenfalls nicht bestätigt werden (Auerbuch and Isberg, 2007). Auch wenn sich eine Tendenz zur höheren Empfänglichkeit bei TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} Mäusen im Vergleich zum Wildtyp zeigt, erweist sich diese als nicht signifikant. Ebenfalls wurden keine signifikanten Unterschiede in der Empfindlichkeit der TLR2^{-/-}/CD14^{-/-}, NOD1^{-/-}/2^{-/-}, RIP2^{-/-} und TRIF^{-/-} Mäuse gefunden. Im Vergleich dazu, zeigen die MyD88^{-/-}, TLR2^{-/-}/4^{-/-} und TRIF^{-/-}/MyD88^{-/-} Mäuse bereits während der ersten Tagen nach *Y. enterocolitica*-Infektion erhöhte Letalität.

Diese Ergebnisse zeigen, dass dem intakten MyD88-abhängigen TLR2/TLR4-Signalweg eine besonders protektive Rolle zukommt, während NOD1/NOD2/RIP2- oder TRIF- (über TLR3 oder TLR4) Signalwege keinen besonderen Beitrag zum Immunschutz gegen *Yersinia* liefern. Auffällig und neu ist die Beobachtung, dass der Defekt in der Expression des *il-1ra* Gens zur *Yersinia*-Resistenz führt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Resistenz von IL-10^{-/-} Mäusen.

3.1.2 Veränderung des Milzgewichtes während einer *Yersinia*-Infektion

Da *Y. enterocolitica* nach intraperitonealen Inokulation nach wenigen Stunden in Milz und Leber disseminieren, wurde das Gewicht der Milzen als zusätzlicher Entzündungs-/ Infektionsparameter bestimmt.

Die Milzen wurden entnommen, von dem haftenden Fett- und Bindegewebe befreit und auf einer Feinwaage vor und 3 Tage nach der ip-Infektion gewogen.

In dem uninfizierten Zustand unterscheiden sich die Mausstämme hinsichtlich des Milzgewichtes nicht signifikant (Abb. 3.2, schwarze Balken).

Bei bakteriellen Allgemeininfektionen tritt zunächst die akute infektiöse Milzschwellung (Splenomegalie) auf. Die Milz ist dann gering bis mäßig vergrößert. Sind die Veränderungen besonders hochgradig (starke Vergrößerung, zerfließende Pulpa), so spricht man von einer akuten septischen Milzschwellung.

Wie aus der Abbildung 3.2 deutlich wird, nimmt das Gewicht der Milz im Verlauf der *Yersinia*-Infektion zu. Dabei ist im Durchschnitt die zwei- bis dreifache Zunahme des Gewichtes im

Vergleich zu dem uninfizierten Zustand nach 3 Tagen pi festzustellen. Es konnte keine Korrelation zwischen dem Milzgewicht und der Keimzahl der jeweiligen Mauslinie festgestellt werden. Auffällig ist jedoch die höchste Gewichtszunahme der Milz bei *MyD88*^{-/-} Mäusen, was auf eine septische Milzschwellung hinweist. Im Vergleich dazu, zeigen *TLR4*^{-/-} Mäuse die geringste Gewichtszunahme der Milz nach der Infektion. Anscheinend hängt die Vergrößerung des Milzgewichts größtenteils mit den infiltrierten Phagozyten zusammen und weniger mit der *Yersinia*-Keimzahl.

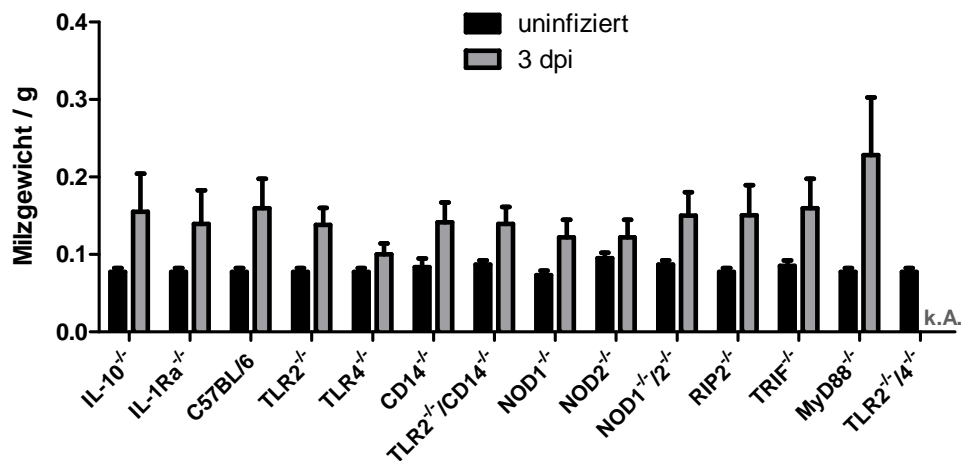


Abb. 3.2: Milzgewichte vor (uninfiziert) und 3 Tage (3 dpi) nach der ip-Infektion der verschiedenen *ko*-Mäuse mit *Y. enterocolitica* WA(pYV) (5×10^3) im Vergleich zu C57BL/6. k.A.-keine Angaben, da infizierte Mäuse wegen des moribunden Zustandes vorzeitig getötet wurden. Experimente wurden mindestens zweimal mit jeweils 3-5 Mäusen pro Gruppe wiederholt.

3.1.3 Immunhistopathologische Untersuchung der Milzstruktur

Da die hier verwendeten *ko*-Mäuse erwarten lassen, sich hinsichtlich der Gewebearchitektur und Immunzellzusammensetzung der Milzen im uninfizierten wie im infizierten Zustand von der C57BL/6 Milz zu unterscheiden, wurden immunhistologische Analysen von Milzkryoschnitten durchgeführt.

Die Interpretation der Ergebnisse setzt das Verständnis von Struktur, Funktion und Blutgefäßsystem der Milz voraus, was hier einführend erläutert werden soll.

Die Milz liegt subphrenisch auf der linken Seite intraperitoneal und ist das größte sekundäre lymphatische Organ im Säugetier. Sie wird von einer kollagenen Bindegewebskapsel (Milzkapsel) umgeben, von der aus sich verzweigende Trabekel (Balken) in das Organinnere ziehen und hier ein stützendes Gerüst aufbauen (Abb. 3.3). Das Innere des Organs wird von der Milzpulpa ausgefüllt, die das Organparenchym repräsentiert und der Kapsel und Trabekeln unmittelbar anliegt. Das Milzparenchym besteht aus zwei funktionell verschiedenen Einheiten, die beim Schneiden der Milz anhand der charakteristischen Farbe zu erkennen sind: weiße und rote Pulpa. Beide Bereiche besitzen ein Grundgerüst aus retikulärem Bindegewebe und erfüllen die zwei Hauptfunktionen der Milz: Beseitigung gealterter Erythrozyten und Zellreste aus dem Blutkreislauf, sowie Erzeugung der Immunabwehr gegen die in dem Blutkreislauf vorhandenen Erreger.

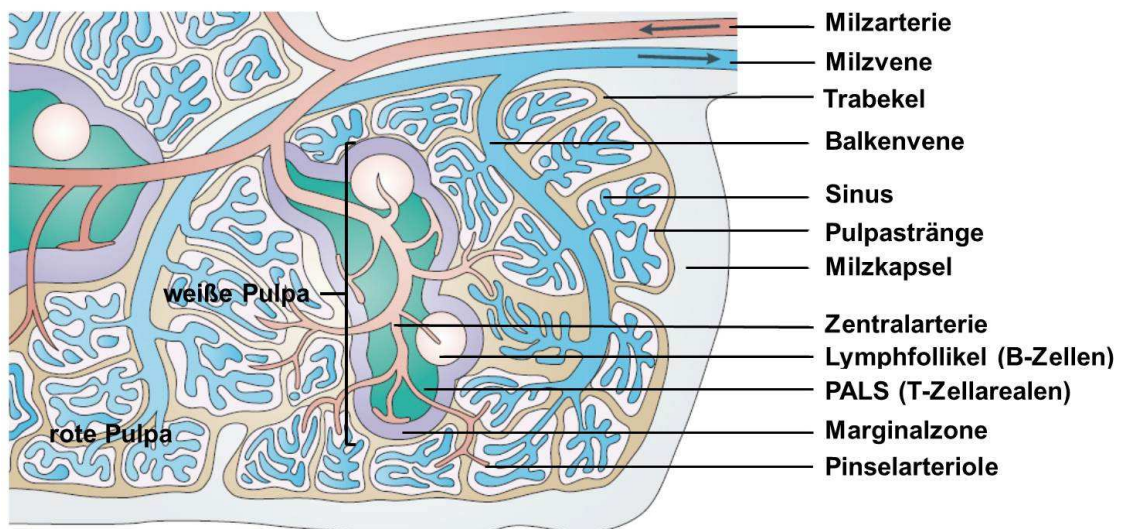


Abb. 3.3: Milzstruktur (modifiziert nach Mebius und Kraal, 2005). Die afferente Milzarterie spaltet sich in Zentralarterien auf, die in der weißen Pulpa von periarteriellen Lymphozytenscheiden (PALS) aus T-Zellarealen umhüllt werden. Stellenweise sind in der PALS die Lymphfollikel aus B-Zellen (Milzknötchen) eingelagert. Von der Zentralarterie abzweigende Gefäße führen ebenfalls zu B-Zellarealen. Darüber hinaus verzweigen sich die Zentralarterien terminal zu feinen Pinselarteriolen, die offen in die rote Pulpa oder direkt in die Milzsinus münden. Diese sammeln sich in Balkenvenen, die über die Milzvene die Milz verlassen. Seitenzweige der Zentralarterien münden ebenfalls offen in die Marginalzone.

Für den Abbau gealterter Erythrozyten und Thrombozyten ist die rote Pulpa zuständig. Sie bildet ein komplexes Maschenwerk aus den Pulpasträngen und den Milzsinus. Die Milzsinus sind spezielle dünnwandige und weitleumige Blutgefäße. Die Sinus werden von einer besonderen Art von Retikuloendothelium bzw. Endothelzellen ausgekleidet und sind von einem Netzwerk aus Gewebesträngen sowie Ring- und Längsfasern eingeschleitet. In diese Pulpastränge ergießt sich aus offenen kapillären Gefäßen Blut. Die Pulpastränge bestehen aus einem weitmaschigen Netz von Retikulumzellen, welches reich an Plasmazellen und Makrophagen ist. Die Erythrozyten müssen von außen durch die Wand der Sinus hindurch treten, um wieder in die Blutzirkulation zurückzukehren. Die „jungen“ Erythrozyten können sich gut verformen und sind daher in der Lage, durch die engen Schlitzlöcher des Sinusendothels zu translozieren (Siebeffekt). Gealterte Erythrozyten sind weniger verformbar. Sie werden in den Maschen des Milzstrangnetzwerks zurückgehalten und von Makrophagen phagozytiert. Die rote Pulpa enthält eine geringe Anzahl von Neutrophilen und ist reich an Makrophagen, die ein eisenhaltiges braunes Pigment enthalten (wahrscheinlich von der Erythrozytenphagozytose), worauf sich der Name „rote Pulpa“ bezieht.

Die weiße Pulpa ist aus periarteriellen Lymphozytenscheiden (T-Zellregionen) und den Milzknötchen, bei denen es sich um Lymphfollikel (B-Zellregionen) handelt, organisiert. Die dichten Ansammlungen von Lymphozyten in der weißen Pulpa dienen der Immunabwehr. Die Umgebung von Follikeln nennt man Follikelaußenzone oder Marginalzone. Die Äste der Milzarterie treten in die Milz ein und spalten sich in die Trabekelarterien auf. Diese dringen in die Pulpa zum Zentrum einer Lymphozytenscheide vor und werden deshalb Zentralarterien genannt. Zahlreiche Äste zweigen sich von der Zentralarterie zur Marginalzone und zu den Milzknötchen ab. Die Marginalzone (MZ) dient als erste Filterstation und stellt den Übergangsbereich von weißer zu roter Pulpa dar. Sie ist gefäßreich und enthält neben T-/B-Lymphozyten und DZ spezielle Makrophagensubpopulationen: Marginalzonen-Makrophagen (MZ-M Φ) und marginale metallophile Makrophagen (MM Φ). Die Marginalzone dient als Transitzone für die Blutbestandteile. Blut aus der Zirkulation fließt durch die Zentralarterien zu Pinselarteriolen und mündet in die Marginalsinus, von denen es in die rote Pulpa eintritt. Bakterien und andere Antigene aus dem Blutkreislauf werden hier effektiv von den Makrophagen und DZ abgefangen und den MZ-Lymphozyten präsentiert, bevor diese wieder in die Zirkulation zurückwandern (Mebius and Kraal, 2005; Lippert H., 2003; Sobotta J., 2005).

Um die Veränderung in der Milzarchitektur während einer *Yersinia*-Infektion zu visualisieren, wurden Milzkryomikrotomschnitte (10 μ m) von uninfizierten und infizierten Mäusen angefertigt und mit zelltypspezifischen Antikörpern immunhistologisch gefärbt und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

Für die immunhistologischen Färbungen wurden folgende spezifische Marker verwendet (Tabelle 3.2):

Tabelle 3.2: Marker für immunhistologische Färbungen der Milzkryoschnitten.

Zelltyp	Antikörper	Beschreibung	Referenz
B-Zellen	α-Maus CD19	CD19 ist ein 95kDa Transmembran-glykoprotein; Differenzierungsantigen der B-Lymphozytenlinie.	(Krop et al., 1996) (Sato et al., 1996)
T-Zellen	α-Maus CD3ε	CD3-Komplex wird auf Thymozyten, reifen T-Lymphozyten und NK-T-Zellen exprimiert.	(Leo et al., 1987)
PMN	α-Maus Ly-6G	Ly-6G ist ein 21-25kDa GPI-Ankerprotein. Im Knochenmark und in der Peripherie wird Ly-6G auf Granulozyten exprimiert.	(Fleming et al., 1993)
MZ-MΦ	α-Maus MARCO	MARCO („ <i>macrophage receptor with collagenous structure</i> “) gehört zur Klasse A „ <i>scavenger</i> Rezeptorfamilie“; wird von MZ-MΦ in der Milz, Alveolarmakrophagen und Kupferzellen in der Leber exprimiert.	(Elomaa et al., 1995) (Van Der Laan et al., 1999)
	α-Maus SIGN-R1	SIGN-R1 ist Typ II Transmembran-C-Typ-Lektin, welches auf Marginalzonen-Makrophagen exprimiert wird und für die Aufnahme/Bindung von Dextran-Polysacchariden zuständig ist.	(Kang et al., 2003) (Kang et al., 2004)
Yersinien	WA-Vital	Kaninchenserum gerichtet gegen <i>Y. enterocolitica</i>	J. Heesemann, Max von Pettenkofer- Institut

Exemplarisch wurde ein typischer Kryoschnitt von jeder Empfänglichkeitsgruppe IL-10^{-/-} (Ye-HR), C57BL/6 (Ye-R) und MyD88^{-/-} (Ye-HS) dargestellt (Abb. 3.4).

Der microanatomische und zelltypische Aufbau der weißen Pulpa ist auf den Serienschnitten von uninfizierten C57BL/6, IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Milzen sehr deutlich zu erkennen (Abb. 3.4, obere Reihe). Die periarteriellen Lymphozytenscheiden (PALS) sind homogen und bestehen aus T-Zellen. In diese Scheiden sind stellenweise Lymphfollikel eingelagert, die die B-Zellregionen der Milz repräsentieren. Die weiße Pulpa wird fast ringförmig von den Marginalzonen-Makrophagen (MZ-MΦ) umgeben (Abb. 3.4, mittlere Reihe). Neutrophile Granulozyten (PMN) sind in der umliegenden roten Pulpa außerhalb der Marginalzone homogen verteilt (Abb. 3.4, untere Reihe). Die schwache Färbung der PMN deutet auf eine niedrige Anzahl der vereinzelt PMN in den Milzen hin, wobei T- und B-Zellen die größten Zellpopulationen darstellen.

Es konnten weder grundlegende Unterschiede in der Mikroanatomie/Histologie noch pathologische Veränderungen im Milzaufbau von C57BL/6, IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen festgestellt werden.

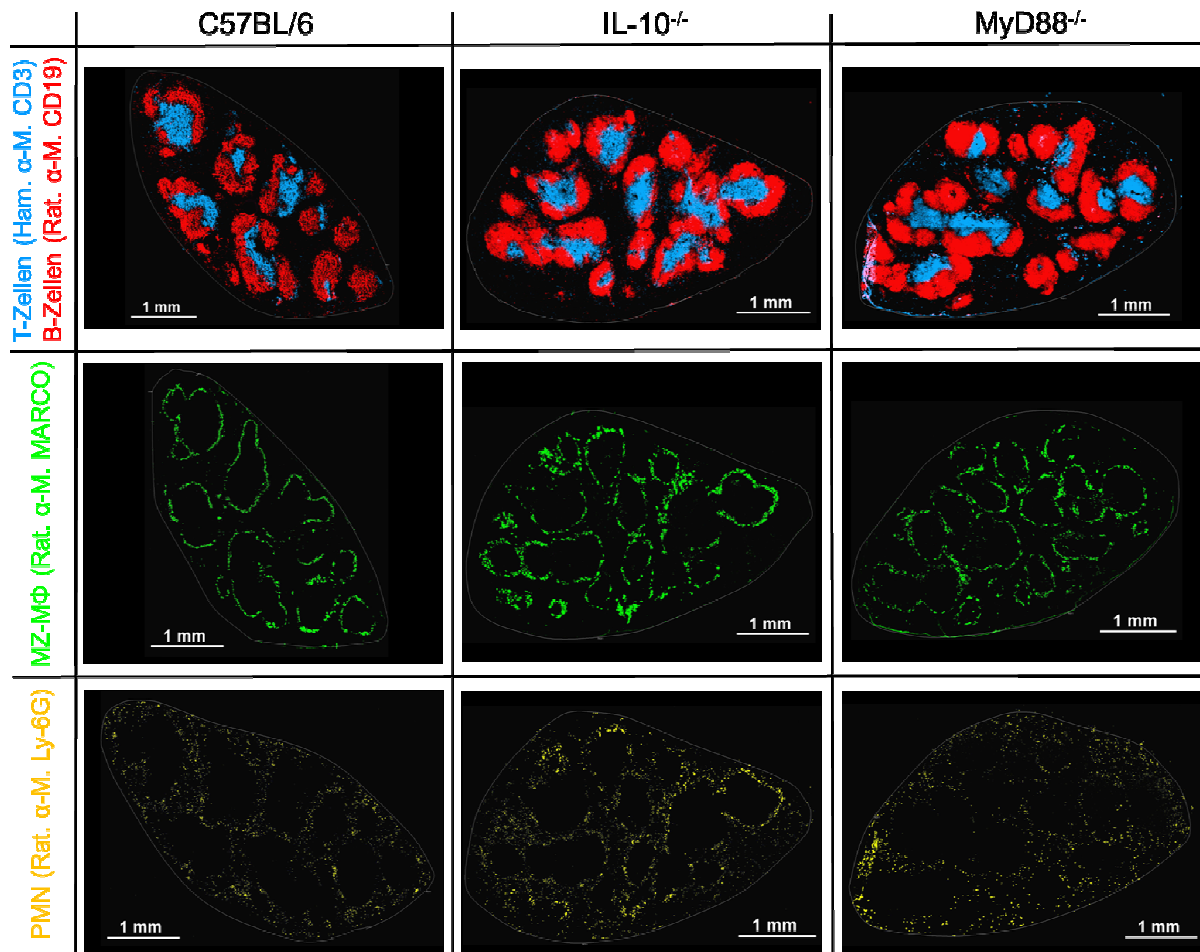


Abb. 3.4 Mikroskopische Übersichtsaufnahmen der Serien-Milzkryomikrotomschnitte (10 µm) von uninfizierten C57BL/6, IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen. Obere Reihe: T-Zellen (CD3⁺, blau) und B-Zellen (CD19⁺, rot), mittlere reihe: MZ-MΦ (MARCO⁺, grün), untere Reihe: PMN (Ly-6G⁺, gelb). Die Zellpopulationen wurden mit angegebenen primären AK inkubiert und mit folgenden sekundären AK nachgewiesen: α-Ham-Alexa 488, α-Rat-Alexa 647 und α-Kan-Alexa 555. Vergrößerung 100x. Die Serienaufnahmen zeigen repräsentative Mikrotomschnitte von vier unabhängigen Versuchen.

Aufgrund der unterschiedlichen Infektionsempfänglichkeiten von verschiedenen Mauslinien für *Yersinia*-Infektion sollte geprüft werden, ob diese Eigenschaften sich in der Immunhistologie der infizierten Milzen widerspiegeln. Es wurden deshalb Serienkryomikrotomschnitte von infizierten C57BL/6, IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Milzen (2/3 dpi) immunhistologisch untersucht und verglichen. Im Vergleich zum uninfizierten Zustand verändert sich die Milzmorphologie jeder hier dargestellten Mauslinie dramatisch während der *Yersinia*-Infektion (Abb. 3.5-3.7).

Es wird angenommen, dass die Yersinien nach intraperitonealer Inokulation das Mesothelium translozieren und über das Lymphabflusssystem oder direkt in den Blutkreislauf gelangen. Von dort gelangen die Yersinien in die Milz über die Milzarterie und dann durch die Zentralarterien in die weiße Pulpa.

Wie aus den Kryomikrotomschnitten der C57BL/6 Milz deutlich wird, bilden Yersinien kompakte Mikrokolonien (MK) innerhalb der Marginalzone präferentiell in den T-Zellarealen der weißen Pulpa, wodurch T-Zellen offensichtlich stark reduziert werden (Abb. 3.5, links). Dagegen bleiben die B-Zell-Follikel erhalten (Abb. 3.5, mitte). Ähnlich wie gealterte Erythrozyten könnten auch Bakterien von Marginalzonen-Makrophagen abgefangen werden. Die Lokalisation der *Yersinia*-Mikrokolonien in der weißen Pulpa weist darauf hin, dass die Bakterien von MZ-MΦ in den Maschen der Milzstränge abgefangen und so in der weißen Pulpa zurückgehalten werden. Es wurde bereits gezeigt, dass *Y. enterocolitica* klonal disseminiert und Mikrokolonien in lymphatischem Gewebe bildet (Oellerich et al., 2007). Demzufolge ist ein einzelnes *Yersinia*-Bakterium in der Lage in der Milz zu einer Mikrokolonie heranzuwachsen.

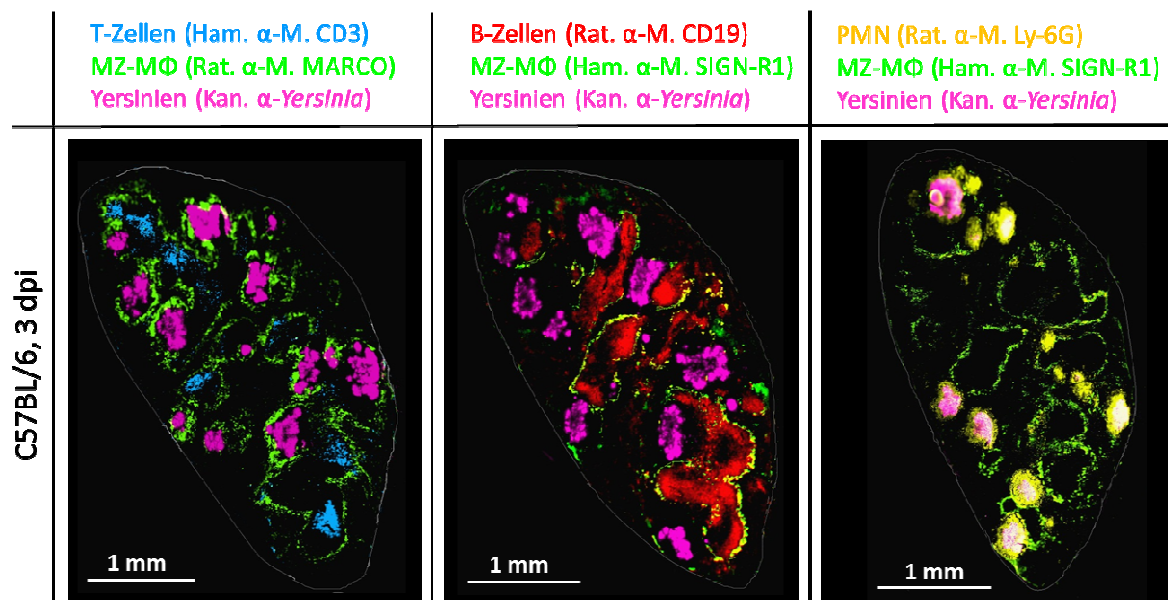


Abb. 3.5: Mikroskopische Übersichtsaufnahmen der Serien-Milzkryomikrotomschnitte (10 μm) von infizierten C57BL/6 Mäusen. Die Mäuse wurden intraperitoneal mit *Y. enterocolitica* WA(pYV) (5×10^3 CFU) infiziert und Serienschritte von der Milz drei Tage nach Infektion (3 dpi) angefertigt. Die Zellpopulationen wurden mit angegebenen primären AK inkubiert und mit folgenden sekundären AK nachgewiesen: α-Ham-Alexa 488, α-Rat-Alexa 647 und α-Kan-Alexa 555. Vergrößerung 100x. Die Serienaufnahmen zeigen repräsentative Mikrotomschnitte von drei unabhängigen Versuchen.

Auf dem mittleren und dem rechten Serienschnitt wurden die MZ-MΦ mit α-SIGN-R1-AK detektiert, was in einer schwächeren Färbung der Marginalzone im Vergleich zur Färbung mit α-MARCO-AK (linker Serienschnitt) resultiert. Dies beruht darauf, dass MARCO auf MZ-MΦ konstitutiv (und anscheinend stärker als SIGN-R1) exprimiert wird (Kraal and Mebius, 2006). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass MARCO, im Gegensatz zu SIGN-R1, auch auf marginalen metallophilen Makrophagen (MMΦ) exprimiert wird, was zur stärkeren Anfärbung der Marginalzone führt (Mebius et al., 2004).

Die Population von MZ-M Φ ist durch gleichzeitige Expression von beiden zellulären Markern als SIGN-R1⁺MARCO⁺ charakterisiert und wird deshalb am Besten durch die Doppelfärbung mit α -SIGN-R1-AK und α -MARCO-AK visualisiert. In dieser Untersuchung wurde auf die Doppelfärbung verzichtet, da sich die Einzelfärbung mit je α -SIGN-R1-AK oder α -MARCO-AK als ausreichend für die Visualisierung der Marginalzone erwiesen hat. Außerdem wurde die Dreifachfärbung der Serienschnitte nur in dieser Kombination möglich, da die jeweiligen α -Maus-AK entweder aus Ratte oder Hamster stammen, was die gleichzeitige Färbung mit mehreren Markern auf einem einzelnen Milzmikrotomschnitt einschränkt.

Charakteristisch ist eine hohe Infiltration von Neutrophilen im Bereich der *Yersinia*-Mikrokolonien 3 Tage pi (Abb. 3.5, rechts). PMN sind mit den *Yersinia*-MK sehr eng assoziiert. Sie können die MK sowohl peripher begrenzen als auch penetrieren. Aus diesem Serienschnitt wird deutlich, dass Neutrophile die Marginalzone durchwandern können. Die zentralen nicht anfärbaren Bereiche der *Yersinia*-MK bestehen aus zerstörten Zellen und wenigen intakten Granulozyten. Bei diesen Bereichen handelt es sich um Nekrosen und wahrscheinlich Abszessbildung. Bei der typischen Abszessbildung geben infiltrierte PMN proteolytische Enzyme ab, bevor sie nekrotisch werden. Dadurch kommt es zur „Einschmelzung“ des durch Yersinien geschädigten Gewebes. Die nekrotischen Leukozyten bilden mit Geweberesten eine zellige Masse, die Eiter genannt wird. Ein Abszess ist von einem Schutzwahl von Granulozytengewebe umgeben, der s.g. Abszessmembran. So versucht das Immunsystem die Abwehrzellen zu konzentrieren und die weitere Ausbreitung der Erreger zu verhindern. Inwieweit der *Yersinia*-Abszess dem klassischen Staphylokokken-Abszess histopathologisch ähnelt, konnte mit der hier angewandten Methode nicht geklärt werden.

Die Milzen infizierter C57BL/6-Mäuse sind durch zahlreiche kompakte und große *Yersinia*-MK charakterisiert. Im Vergleich dazu, konnten in der Milz von IL-10^{-/-} Mäusen lediglich vereinzelte sehr kleine MK 3 dpi detektiert werden (Abb. 3.6, untere Reihe, Bildausschnitte). Allerdings sind zahlreiche „Neutrophilen-Nester“ ohne anfärbare Yersinien erkennbar, was darauf hinweist, dass es sich hier um die Reste einer *Yersinia*-MK handeln könnte (Abb. 3.6, untere Reihe, rechts). Lediglich bei einer höheren Vergrößerung von 400x (Bildausschnitt) konnten vereinzelt intakte *Yersinia*-Stäbchen noch detektiert werden. Um *Yersinia*-MK in den Milzen von IL-10^{-/-} Mäusen nachzuweisen, wurden Milzkryoschnitte 2 Tage pi angefertigt (Abb. 3.6, obere Reihe). Zu diesem früheren Zeitpunkt waren *Yersinia*-MK deutlich sichtbar, die ebenfalls in den T-Zellarealen der Lymphfollikel innerhalb der Marginalzone lokalisiert und von PMN infiltriert sind. Aus diesen Bildern wird deutlich, dass IL-10^{-/-} Mäuse die *Yersinia*-Vermehrung frühzeitig kontrollieren und wahrscheinlich eliminieren können.

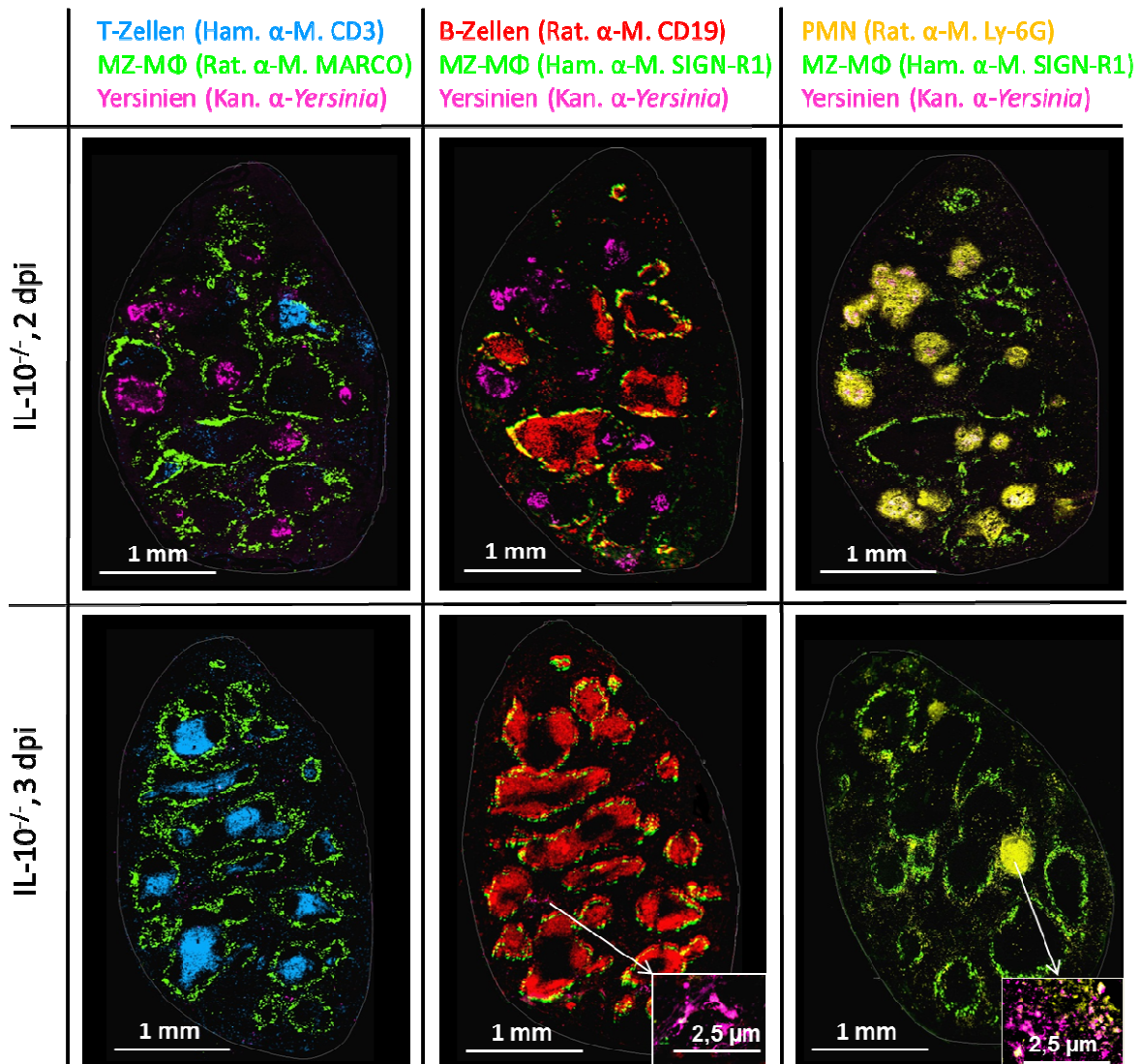


Abb. 3.6: Mikroskopische Übersichtsaufnahmen der Serien-Milzkryomikrotomschnitte (10 μ m) von infizierten IL-10^{-/-} Mäusen. Die Mäuse wurden intraperitoneal mit *Y. enterocolitica* WA(pYV) (5×10^3 CFU) infiziert. Serienschritte wurden von Milzen 2 dpi (obere Reihe) bzw. 3 dpi (untere Reihe) hergestellt. Die Zellpopulationen wurden mit angegebenen primären AK inkubiert und mit folgenden sekundären AK nachgewiesen: α -Ham-Alexa 488, α -Rat-Alexa 647 und α -Kan-Alexa 555. Vergrößerung 100x. Die Serienaufnahmen zeigen repräsentative Mikrotomschnitte von drei unabhängigen Versuchen.

Ein völlig anderes histologisches Bild ergab sich für Milzen von infizierten MyD88^{-/-} Mäusen (Abb. 3.7). Da MyD88^{-/-} Mäuse 100-fach höhere *Yersinia*-CFU in der Milz 3 dpi aufweisen als C57BL/6 Mäuse, wurden in diesem Fall Kryomikrotomschnitte 2 Tage pi untersucht, um noch mikroanatomische Strukturen zu erkennen. Auffällig ist, dass die komplette Milz von MyD88^{-/-} Mäusen bereits 2 dpi so stark mit Yersinien besiedelt ist, dass die Milzgewebearchitektur zerstört ist. Die Yersinien haben offensichtlich auch die rote Pulpa besiedelt, wobei wenige T-Zellareale und B-Zell-Follikel noch erhalten bleiben (Abb. 3.7, links und mitte). Die MZ-M Φ sind dagegen nur noch einzeln und nicht mehr als Marginalzone detektierbar. Des Weiteren ist anzunehmen, dass Yersinien bei MyD88^{-/-} Mäusen nicht durch die MZ-M Φ erkannt

werden und so die Marginalzone ungehemmt passieren können, da Bakterien über die rote Pulpa verteilt sind.

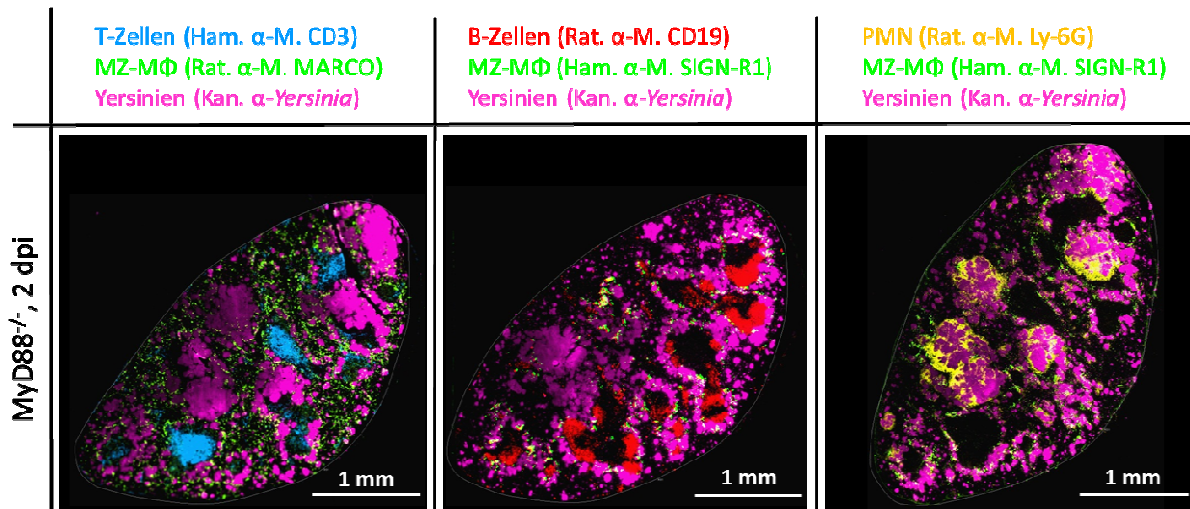


Abb. 3.7 Serienkryomikrotomschnitte von infizierten MyD88^{-/-} Mäusen. Die Mäuse wurden intraperitoneal mit *Y. enterocolitica* WA(pYV) (5×10^3 CFU) infiziert. Serienschritte wurden von Milzen zwei Tage nach Infektion (dpi) hergestellt. Die Zellpopulationen wurden mit angegebenen primären AK inkubiert und mit folgenden sekundären AK nachgewiesen: α -Ham-Alexa 488, α -Rat-Alexa 647 und α -Kan-Alexa 555. Vergrößerung 100x. Die Serienaufnahmen zeigen repräsentative Mikrotomschnitte von drei unabhängigen Versuchen.

Die PMN sind mit *Yersinia*-MK assoziiert, allerdings scheint das Yersinien-Wachstum so stark zu sein, dass die PMN-Infiltration nicht ausreicht, um die Vermehrung der Bakterien zu kontrollieren (Abb. 3.7, rechts). Infiltration der Neutrophilen und ungehemmtes Yersinien-Wachstum führen zur starken Gewebeschädigung und resultiert in der Zerstörung der Marginalzone.

3.1.4 Zytologische Charakterisierung der Milzzellzusammensetzung vor und nach der *Yersinia*-Infektion

Um die Milzen der genotypisch unterschiedlichen Mäuse hinsichtlich ihrer Immunzelltypen zu charakterisieren, wurden die Zellen mit zellmarkerspezifischen Antikörpern angefärbt und mittels Zytofluorometrie analysiert.

Dabei wurde der Prozentanteil des jeweiligen Zelltyps von hämatopoetischen Zellen in den uninfizierten und infizierten (3 dpi) Milzen bestimmt. Die Zellpopulationen wurden anhand von anerkannten zelltypspezifischen Markern, wie in Tabelle 3.3. angegeben, definiert.

Tabelle 3.3: Marker für immunhistologische Färbungen der Milzkryoschnitte.

Zelltyp		Beschreibung	Referenz
B-Zellen	CD19 ⁺	CD19 ist ein 95kDa Transmembran glykoprotein; Differenzierungsantigen der B-Lymphozytenlinie.	(Krop et al., 1996), (Sato et al., 1996)
T-Zellen	CD3 ⁺	CD3-Komplex wird auf Thymozyten, reifen T-Lymphozyten und NK-T-Zellen exprimiert.	(Leo et al., 1987)
PMN	Ly-6G ⁺ CD11b ⁺	Ly-6G ist ein 21-25kDa GPI-Ankerprotein. Im Knochenmark und in der Peripherie wird Ly-6G auf Granulozyten exprimiert.	(Fleming et al., 1993)
		CD11b (Integrin α_M -Kette) ist eine Protein-Untereinheit des heterodimeren Integrinmoleküls $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1), bekannt auch als Komplementrezeptor 3 (CR3). Mac-1 vermittelt Bindung an C3bi und ICAM-1 und wird unterschiedlich stark auf Granulozyten, Makrophagen, DZ, NK-T-Zellen, Mikrogliazellen und B-1-Zellen exprimiert. Die Expression von Mac-1 wird nach der PMN-Aktivierung stark erhöht.	(Ault and Springer, 1981), (Kishimoto et al., 1989), (Springer et al., 1979)
Monozyten/ Makrophagen (Mono/Mak)	F4/80 ⁺ CD11b ⁺	F4/80 ist ein 160kDa Glykoprotein, welches ausschließlich auf Maus-Makrophagen exprimiert wird.	(Malorny et al., 1986), (Schaller et al., 2002), (Rydstrom and Wick, 2007b).
		Da Monozyten aus der Blutzirkulation in Gewebe und Peritonealhöhle wandern und dort zu Makrophagen heranreifen, wird diese Zellpopulation als Mono/Mak bezeichnet.	
DZ	CD11c ⁺	CD11c ist eine Integrin α_X -Proteinkette. Maus CD11c-Antigen wird stark auf DZ exprimiert. Mono/Mak-Zellen und PMN können ebenfalls CD11c schwach exprimieren.	(Metlay et al., 1990), (Larson and Springer, 1990)

Die Daten zur Milzzellzusammensetzung der verschiedenen Mauslinien wurden zur Übersicht in der Tabelle 3.4 zusammenfassend dargestellt. Dabei wurden die untersuchten Mausstämme anhand der festgestellten *Yersinia*-Empfänglichkeitsgruppen (resistente, Wt-ähnliche und hochempfindliche Mäuse) (Tab. 3.1) klassifiziert, um eine bessere Vergleichsmöglichkeit zu erzielen.

Die Milz besteht im wesentlichen aus T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen, wenigen Neutrophilen und Fibroblasten (Lippert H., 2003). B-Zellen machen mit 50%-60% Anteil die größte Zellpopulation der Milz aus. Den zweitgrößten Anteil stellen die T-Zellen mit ca. 30% der hämatopoetischen Zellen der Milz dar.

Hier konnte zwar festgestellt werden, dass $CD14^{-/-}$, $TLR2^{-/-}/CD14^{-/-}$, $NOD1^{-/-}$ und $MyD88^{-/-}$ Mäuse vergleichsweise einen höheren Anteil an B-Zellen (ca. 60%) in der uninfizierten Milz aufweisen als $IL-10^{-/-}$, $TLR2^{-/-}$ oder $TLR2^{-/-}/4^{-/-}$ Mäuse (ca. 50%), diese Werte liegen dennoch innerhalb der üblichen Streuung der Mausgruppen (Tab. 3.4, weiße Spalten). Bei der T-Zellverteilung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den uninfizierten Mausstämmen gefunden werden. Es konnte kein signifikanter Unterschied von B- oder T-Zellanteilen der uninfizierten Milzen zwischen den jeweiligen Empfänglichkeitsgruppen festgestellt werden.

Mono/Mak machen ca. 5%-10% der Splenozyten aus. Dabei konnten marginale Unterschiede innerhalb der Mausgruppen gefunden werden. $NOD1^{-/-}$, $NOD2^{-/-}$, $NOD1^{-/-}/2^{-/-}$ und $RIP2^{-/-}$ Mäuse besitzen mehr Mono/Mak (8%-10%) im Vergleich zu $TRIF^{-/-}$, $MyD88^{-/-}$ und $TLR2^{-/-}/4^{-/-}$ Mäusen (ca. 4%-5%). Die Mono/Mak-Werte aller anderen untersuchten Mausgruppen liegen bei 4%-10%.

Die polymorphkernigen Leukozyten (PMN) stellten die kleinste Zellfraktion in den uninfizierten Milzen mit lediglich max. 2% dar. Es konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Mausgruppen gefunden werden. Die DZ stellen auch eine vergleichsweise kleine Zellpopulation dar (2%-7%). $TLR2^{-/-}$, $NOD2^{-/-}$, $RIP2^{-/-}$ und $MyD88^{-/-}$ Mäuse besitzen einen höheren Anteil (ca. 5,5%) von DZ in der uninfizierten Milz im Vergleich zu den anderen Mausgruppen (1,5%-4%). Die Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung der uninfizierten Milzen sind innerhalb der untersuchten Mausgruppen vernachlässigbar und es deutet darauf hin, dass vor Beginn der Infektion eine ähnliche zelluläre Zusammensetzung der Milzen der verschiedenen Mausgruppen vorliegt.

Während der *Yersinia*-Infektion sollte es in den Milzen zu unterschiedlichen PAMP-PRR-Antworten und folglich Chemokinmustern und damit zur unterschiedlichen Zellrekrutierung kommen. Es wurde deshalb die Zellzusammensetzung in infizierten Milzen (3 dpi) (Tab. 3.4, graue Spalten) mit uninfizierten Milzen verglichen (Tab. 3.4, weiße Spalten).

Während der *Yersinia*-Infektion schwillt die Milz an (Gewichtszunahme, Abb. 3.2). Diese akute infektiöse Milzschwellung wird durch die Infiltration von Leukozyten aus dem Blut und Rekrutierung aus dem Knochenmark hervorgerufen. Zuerst wandern Neutrophile und Monozyten ein.

Bei NOD1^{-/-} und TRIF^{-/-} Mäusen ist ein Anstieg von B-Zellen bezogen auf den uninfizierten Ausgangswert zu beobachten, während bei NOD2^{-/-}, NOD1^{-/-}/2^{-/-}, RIP2^{-/-} und MyD88^{-/-} Milzen diese Zellfraktion etwas absinkt. Im Gegensatz dazu gehen die T-Zellen prozentual bei allen infizierten Mausstämmen sehr stark zurück, von ca. 35% (Ausgangswert) auf ca. 17% 3 dpi. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls durch die immunhistologische Untersuchung (Abb. 3.5-3.7) bestätigt. Die Mono/Mak-Zellfraktion steigt bei den meisten infizierten Mäusen. Während der Anteil von Dendritischen Zellen vor und während der Infektion fast unverändert bleibt (ca. 7%), steigt der Anteil von Neutrophilen (PMN) bei allen getesteten Mäusen stark an (durchschnittlich von 1% bis auf 10%). Während es zu großen Veränderungen bei der zellulären Zusammensetzung jeder einzelnen Milz während der *Yersinia*-Infektion kommt, konnten keine großen signifikanten Unterschiede zwischen den Milzen bei drei unterschiedlichen Empfänglichkeitsgruppen gefunden werden. Zusammenfassend geben diese vergleichenden Splenozytencharakterisierungen noch keine Erklärung für die Ursache der Unterschiede der *Yersinia*-Empfänglichkeit in Abhängigkeit der genetischen Defekte.

Tabelle 3.4: Prozentuale Analyse der relativen Zusammensetzung der hämatopoetischen Zellen der Milz in uninfizierten und infizierten (3 dpi) Mäusen. Die untersuchten Mausstämmen wurden anhand der *Yersinia*-Empfänglichkeitsgruppen klassifiziert. In den weißen Spalten sind die Werte der uninf. Milzen den Werten 3 Tage nach ip-Infektion (graue Spalten) gegenübergestellt. Die Werte sind in % \pm Standardabweichung angegeben. Der Versuch wurde mind. zweimal mit je 3-5 Mäusen pro Gruppe wiederholt (N=8-10). ns=nicht signif.; *p \leq 0,05 signif.; **p \leq 0,01 sehr signif.; ***p \leq 0,001 hoch signifikant.

C57BL/6 Genotyp	B-Zellen in %			T-Zellen in %			Mono/Mak in %			PMN in %			DZ in %		
	Uninfiz.	3 dpi	p	Uninfiz.	3 dpi	p	Uninfiz.	3 dpi	p	Uninfiz.	3 dpi	p	Uninfiz.	3 dpi	p
<i>Yersinia</i>-hochresistente Ye-HR															
IL-10 ^{-/-}	48 \pm 8	61 \pm 4	*	34 \pm 5	20 \pm 4	**	8 \pm 2	15 \pm 4	*	1,5 \pm 0,5	12 \pm 3	**	4 \pm 0,3	8 \pm 1	***
IL-1Ra ^{-/-}	52 \pm 1	52 \pm 3	ns	31 \pm 1	16 \pm 1	***	7 \pm 1	13 \pm 4	**	2 \pm 2	12 \pm 3	***	3 \pm 2	4 \pm 0,4	ns
<i>Yersinia</i>-resistente Mäuse Ye-R															
C57BL/6	52 \pm 4	56 \pm 4	ns	34 \pm 3	18 \pm 2	***	5 \pm 2	15 \pm 4	**	1 \pm 0,5	10 \pm 6	**	3 \pm 0,4	8 \pm 1	***
TLR2 ^{-/-}	50 \pm 4	57 \pm 5	*	32 \pm 7	15 \pm 3	**	9 \pm 1	12 \pm 3	ns	2 \pm 3	8 \pm 2	*	5 \pm 4	4 \pm 1	ns
TLR4 ^{-/-}	53 \pm 4	62 \pm 3	**	28 \pm 6	18 \pm 2	*	6 \pm 3	7 \pm 2	ns	2 \pm 0,1	8 \pm 2	**	5 \pm 1	5 \pm 2	ns
CD14 ^{-/-}	61 \pm 2,4	60 \pm 1	ns	28 \pm 1	17 \pm 2	*	6 \pm 2	9 \pm 4	ns	2 \pm 1	8 \pm 4	**	2 \pm 1	4 \pm 2	ns
TLR2 ^{-/-} CD14 ^{-/-}	63 \pm 2	59 \pm 2	ns	29 \pm 2	18 \pm 2	***	6 \pm 1	8 \pm 4	ns	1 \pm 0,2	4 \pm 1	*	2 \pm 0,2	5 \pm 0,6	**
NOD1 ^{-/-}	57 \pm 5	67 \pm 5	*	29 \pm 5	17 \pm 2	**	11 \pm 2	11 \pm 3	ns	1 \pm 0,5	9 \pm 4	*	1 \pm 0,4	6 \pm 1	***
NOD2 ^{-/-}	50 \pm 6	47 \pm 4	ns	34 \pm 2	16 \pm 3	***	8 \pm 2	17 \pm 4	**	2 \pm 1	12 \pm 4	**	4 \pm 2	5 \pm 1	ns
NOD1 ^{+/-} /2 ^{-/-}	55 \pm 13	46 \pm 6	ns	32 \pm 11	22 \pm 2	**	8 \pm 2	14 \pm 5	*	1 \pm 0,1	11 \pm 2	***	2 \pm 1	4 \pm 0,6	*
TRIF ^{-/-}	67 \pm 3	66 \pm 7	ns	26 \pm 3	16 \pm 1,3	**	5 \pm 1	11 \pm 4	*	0,5 \pm 0,1	7 \pm 3	**	2 \pm 0,2	4 \pm 2	ns
RIP2 ^{-/-}	54 \pm 16	42 \pm 3	ns	32 \pm 8	19 \pm 4	*	8,5 \pm 1,59	13 \pm 4	*	1 \pm 0,4	11 \pm 5	*	6 \pm 2	4 \pm 0,4	ns
<i>Yersinia</i>-hochempfindliche Mäuse Ye-HS															
MyD88 ^{-/-}	62 \pm 1	48 \pm 3	***	28 \pm 1	13 \pm 2	***	5 \pm 0,1	7 \pm 4	ns	1 \pm 0,1	10 \pm 4	**	6 \pm 1	4 \pm 2	ns
TLR2 ^{-/-} /4 ^{-/-}	48 \pm 6	_____		37 \pm 4	_____		4 \pm 1	_____		1 \pm 0,3	_____		1 \pm 0,2	_____	

3.1.5 Charakterisierung der hämatopoetischen Zellen in der Bauchhöhle uninfizierter Mäuse

Nach der intraperitonealen *Yersinia*-Injektion sollten initial das Mesothel des Peritoneums sowie die im Peritonealraum vorhandenen hämatopoetischen Zellen auf PAMP reagieren. Deswegen wurden die residente (sterile Bauchhöhle) sowie die nach Infektion veränderte Zellzusammensetzung der Bauchhöhle untersucht.

Der Peritonealraum ist die größte Körperhöhle, die von der Muskulatur der Bauchwand (vorne) und des Rückens (hinten), sowie vom Zwerchfell (oben) und der Beckenbodenmuskulatur (unten) begrenzt wird. Die Bauchhöhle besitzt eine spezielle seröse Auskleidung: das Peritoneum oder auch Bauchfell genannt. Das Peritoneum ist durch einschichtiges, flaches Epithel gekennzeichnet (Mesothel). Dieses Mesothel stellt die erste Schutzbarriere gegen Erreger und schädliche Substanzen dar. Das peritoneale Mesothel sezerniert und absorbiert Peritonealflüssigkeit, die als „Schmiermittel“ die Reibung an seiner Oberfläche und der inneren Organe gegeneinander herabsetzt. Des Weiteren spielen die Mesothelzellen eine entscheidende immunmodulatorische Rolle während einer Entzündung des Bauchfells und der Bauchhöhle (Peritonitis), da sie zahlreiche Zytokine, Wachstumsfaktoren, Matrixproteine und intrazelluläre Adhäsionsmoleküle synthetisieren können.

Die sterile Bauchhöhle enthält eine Mischpopulation von überwiegend mononukleären Zellen (Lymphozyten und Makrophagen) und eine geringe Zahl von Neutrophilen. Die ip-Injektion von Erregern, mikrobiellen Produkten oder sterilen Irritantien (z.B. Thioglykolatlösung) führt zur rapiden Infiltration von inflammatorischen Zellen in die Bauchhöhle. Die ersten infiltrierenden Zellen sind Neutrophile, die während der früheren Infektionsphase (4-12 Stunden) dominieren. Die Quantität und Qualität (Zelltypen) der in die Bauchhöhle eingewanderten Zellen hängt von genetischem Hintergrund und dem Immunstatus der Maus sowie von der Art des injizierten Agens ab (Broche and Tellado, 2001). Die zelluläre Zusammensetzung der Peritoneallavageflüssigkeit von *Yersinia*-infizierten Mäusen wurde in individuellen Versuchen (siehe unten) analysiert und beschrieben.

Die folgenden Untersuchungsergebnisse wurden nach „Lavage“ (Spülung) der Bauchhöhle mit 5 ml PBS und anschließender Immunfluoreszenzfärbung der Zellen mit zelltypspezifischen Antikörpern mittels FACS-Analyse ermittelt.

Die Gesamtzellzahl der hämatopoetischen Zellen im sterilen Peritonealraum liegt zwischen $1,5 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^6$. Davon sind die B-Lymphozyten und Mono/Mak-Zellen mit jeweils 5×10^5 - $1,5 \times 10^6$ Zellen (40%-60%) die größten Fraktionen (Tabelle 3.5).

In der %-Verteilung der B-/T-Zellen, DZ und PMN sind sich alle untersuchten Mausstämme ähnlich. Unterschiede gibt es bei den Mono/Mak -Zellen, wo TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} und TRIF^{-/-} Mäuse relativ weniger Makrophagen besitzen, wobei dies aus der absoluten Zellverteilung nicht hervorgeht. NOD1^{-/-}, NOD2^{-/-}, TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} und TRIF^{-/-} Mäuse haben höhere Absolutzahlen von B-Zellen im Vergleich zu den anderen untersuchten Mäusen, wo wiederum die relativen Werte (%) keinen signifikanten Unterschied erkennen lassen. MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäuse besitzen mit je ca. 4% den kleinsten Anteil an T-Zellen unter den untersuchten Mausstämmen.

Die Differenzen in den absoluten Zellzahlen hängen zum Teil mit der nicht reproduzierbaren Spülung des Bauchraumes zusammen. Es ist schwierig, die Lavageflüssigkeit vollständig aus dem Peritonealraum zurück zu gewinnen. Deswegen sind die relativen Werte der Verteilung der hämatopoetischen Zelltypen sowohl in der Milz als auch im Peritonealraum zuverlässiger und damit aussagekräftiger.

Tabelle 3.5: Analyse der Zusammensetzung der hämatopoetischen Zellen uninfizierter Mäuse nach Peritoneallavage. Die untersuchten Mausstämme wurden nach *Yersinia*-Empfänglichkeitsgruppen klassifiziert (resistente, Wt-ähnliche und hochempfindliche Mäuse). In den weißen Spalten sind die Werte in absoluten Zahlen (aus je 5 ml Peritoneallavage mit PBS) den Werten in % von gesamten hämatopoetischen Peritonealzellen (kursiv, graue Spalten) gegenübergestellt. Die Werte sind mit \pm Standardabweichung angegeben. Der Versuch wurde mind. zweimal mit je 3-5 Mäusen pro Gruppe wiederholt (N = 8-10).

C57BL/6 Genotyp	B-Zellen		T-Zellen		Mono/Mak		PMN		DZ	
	Anzahl $\times 10^3$	%	Anzahl $\times 10^3$	%	Anzahl $\times 10^3$	%	Anzahl $\times 10^3$	%	Anzahl $\times 10^3$	%
<i>Yersinia</i>-hochresistente Ye-HR										
IL-10 ^{-/-}	648 \pm 165	39 \pm 2	148 \pm 34	9 \pm 1	948 \pm 310	56 \pm 2	3,2 \pm 2,0	0,2 \pm 0,1	78 \pm 5	4,5 \pm 1,1
IL-1Ra ^{-/-}	900 \pm 283	45 \pm 1	207 \pm 146	6 \pm 1	594 \pm 100	49 \pm 7	1,8 \pm 0,4	0,4 \pm 0,4	43 \pm 18	6,9 \pm 4,5
<i>Yersinia</i>-resistente Mäuse Ye-R										
C57BL/6	579 \pm 343	41 \pm 9	213 \pm 89	16 \pm 0,2	928 \pm 497	64 \pm 11	1,7 \pm 2,1	1 \pm 1,2	77 \pm 26	5,5 \pm 0,1
TLR2 ^{-/-}	404 \pm 137	33 \pm 2	77,2 \pm 6,9	6 \pm 1	757 \pm 211	60 \pm 1,4	3,3 \pm 4,1	0,3 \pm 0,2	55 \pm 11	4,4 \pm 0,3
TLR4 ^{-/-}	440 \pm 256	46 \pm 5	80 \pm 24	9 \pm 1	404 \pm 138	44 \pm 8	2 \pm 1,1	0,2 \pm 0,2	52 \pm 25	4,6 \pm 0,9
CD14 ^{-/-}	608 \pm 140	38 \pm 5	40 \pm 10	3 \pm 0,6	833 \pm 227	50 \pm 3	2 \pm 1,8	0,1 \pm 0,1	110 \pm 29	8,3 \pm 1,1
TLR2 ^{-/-} CD14 ^{-/-}	1133 \pm 62	52 \pm 3	214 \pm 54	10 \pm 2	611 \pm 45	27 \pm 2	1 \pm 0,8	0,1 \pm 0,1	87 \pm 20	3,5 \pm 0,7
NOD1 ^{-/-}	1782 \pm 94	46 \pm 4	407 \pm 115	9 \pm 1	877 \pm 502	41 \pm 10	5,6 \pm 1,2	0,5 \pm 0,4	120 \pm 17	6,2 \pm 4
NOD2 ^{-/-}	936 \pm 69	45 \pm 9	354 \pm 107	12 \pm 5	1331 \pm 445	46 \pm 15	4,6 \pm 2,5	0,1 \pm 0,1	140 \pm 60	5 \pm 1,4
NOD1 ^{-/-} /2 ^{-/-}	545 \pm 308	39 \pm 0,4	135 \pm 84	9 \pm 1	856 \pm 517	59 \pm 3	1,3 \pm 0,8	0,1 \pm 0,01	80 \pm 42	5,7 \pm 0,3
RIP2 ^{-/-}	599 \pm 137	34 \pm 4	139 \pm 58	8 \pm 2	1038 \pm 105	59 \pm 1	2,4 \pm 1,2	0,2 \pm 0,1	99 \pm 17	5,6 \pm 0,4
TRIF ^{-/-}	1359 \pm 236	52 \pm 13	312 \pm 219	13 \pm 9	560 \pm 34	23 \pm 1	2,4 \pm 3,1	0,1 \pm 0,14	90 \pm 10	3,5 \pm 1
<i>Yersinia</i>-hochempfindliche Mäuse Ye-HS										
MyD88 ^{-/-}	617 \pm 413	36,7 \pm 13,5	60 \pm 67	4 \pm 1	793 \pm 410	57,1 \pm 7,0	2,0 \pm 1,1	0,6 \pm 0,84	52 \pm 25	5,4 \pm 1,6
TLR2 ^{-/-} /4 ^{-/-}	657 \pm 78	50,6 \pm 5,1	47 \pm 8,5	4 \pm 1	567 \pm 229	42,5 \pm 7,8	3,6 \pm 3,4	0,3 \pm 0,21	42 \pm 16,3	4 \pm 1,4

3.1.6 Analyse des Infektionsverlaufs bei C57BL/6, IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen

Das Zytokin IL-10 wirkt immunsuppressiv und es konnte in früherer Arbeit bereits gezeigt werden, dass IL-10^{-/-} Mäuse einer *Y. enterocolitica* Infektion gegenüber resistent sind (Sing *et al.*, 2002a). Das Adaptorprotein MyD88 leitet das Signal von diversen TLR und vom IL-1-Rezeptor weiter und spielt damit eine Schlüsselrolle in der angeborenen Immunantwort. Deshalb wurde angenommen, dass im Gegensatz zu IL-10^{-/-} Mäusen sich MyD88^{-/-} Mäuse hochempfindlich für eine *Yersinia*-Infektion erweisen sollten.

Als Repräsentanten der drei Empfänglichkeitsgruppen wurden C57BL/6 (Ye-R), IL-10^{-/-} (Ye-HR) und MyD88^{-/-} (Ye-HS) Mäuse für die Infektionskinetikversuche ausgewählt und mit *Y. enterocolitica* WA(pYV) (5x10³ CFU) intraperitoneal infiziert. 4, 24, 48 und 72 Stunden (h) nach der Infektion wurde für die Keimzahlbestimmung (CFU) der Bauchraum gespült (Lavage) und die Milzen nach Entnahme homogenisiert (Milzhomogenat). Für die Bestimmung der Keimzahl wurden von Verdünnungsreihen Aliquots der Peritoneallavagen bzw. Milzhomogenaten auf *Yersinia*-selektiv Agarplatten ausplattiert (Abb. 3.8). Des Weiteren wurde die FACS-Analyse zur quantitativen und differentiellen Bestimmung der Immunzellen aus Lavagen und Milzhomogenaten durchgeführt (Abb. 3.9). Darüber hinaus wurden die in vivo sekretierten Zytokine und Chemokine mittels ELISA und CBA™ BD aus Milzhomogenaten und Peritoneallavagen bestimmt (Abb. 3.10).

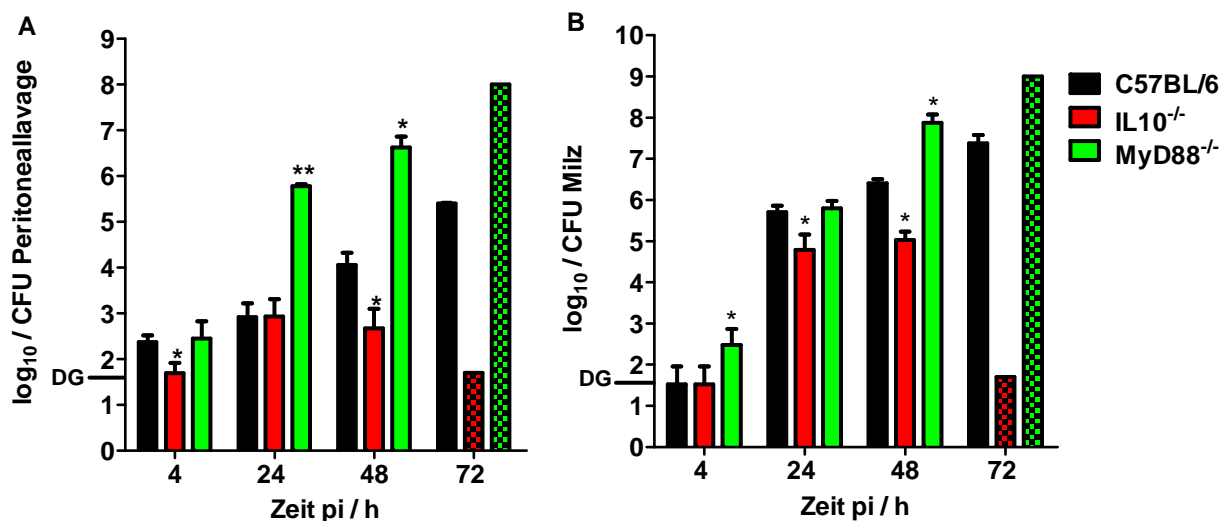


Abb. 3.8: Kinetik der Keimzahl (CFU) aus Peritonealraum (Lavage) (A) und Milzhomogenat (B) der infizierten Mäuse. C57BL/6 (wt) (schwarz), IL-10^{-/-} (rot) und MyD88^{-/-} (grün) nach 4, 24, 48 und 72 Stunden (h). Schraffierte Säulen stellen extrapolierte Werte dar. DG = Detektionsgrenze < 50 CFU. *p<0,05 signifikant; **p<0,01 sehr signifikant unterschiedlich zum Wildtyp. Der Versuch wurde zweimal mit je 5 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt wiederholt.

4 h nach der Infektion konnten signifikant weniger *Yersinien* (CFU) aus der Bauchhöhle und der Milz von den IL-10^{-/-} Mäusen reisoliert werden als bei den C57BL/6 und MyD88^{-/-} Mäusen (Abb. 3.8). Überraschend war die Tatsache, dass die Hälfte der applizierten Bakterien bereits 4 hpi in der Milz nachweisbar waren, was auf eine schnelle Translokation über das Mesothel in das Blutgefäßsystem schließen lässt. Im Verlauf der Infektion steigt die Keimzahl bei MyD88^{-/-} Mäusen sowohl im Bauchraum als auch in der Milz stetig an, wobei die *Yersinien* im Bauchraum schneller replizieren als im Milzgewebe. Offensichtlich führen Keimzahlen von >10⁷ im Peritonealraum und >10⁸ in der Milz zum letalen Ausgang, was bei MyD88^{-/-} Mäusen am 2-3 dpi eintritt. Der extrapolierte Wert (grün schraffiert: 10⁸-10⁹ CFU) ist 3 Tage pi für Peritoneum und Milz dargestellt. Im Gegensatz dazu, stagniert die Keimzahl in der Milz bei IL-10^{-/-} Mäusen im Zeitraum von 24-48 h und fällt am dritten Tag nach der Infektion unter die Nachweisgrenze. Die Keimzahl bei C57BL/6 Mäusen steigt kontinuierlich von 10² CFU (4 hpi) bis auf ca. 10⁷ (72 hpi) an.

Da die neutrophilen Granulozyten (PMN) die erste „Abwehrlinie“ der angeborenen Immunität bei bakteriellen Infektionen darstellen und mit *Yersinia*-Mikrokolonien in der Milz sehr eng assoziiert sind, gilt das besondere Interesse der Neutrophilen-Kinetik. So zeigen die resistenten IL-10^{-/-} Mäuse eine massive Infiltration von PMN zum primären Infektionsherd des Peritonealraums (Abb. 3.9 A). Der PMN-Anteil steigt dabei von unter 1% im uninfizierten Zustand bis auf ca. 50% der Gesamtzellzahl nach 4 h der Applikation. Danach fällt der PMN-Anteil auf 10% im Zeitraum zw. 4 und 48 h und steigt dann im Zeitfenster von 72 h auf 20% an. Auch bei wt-Mäusen infiltrieren die PMN die infizierte Bauchhöhle, allerdings beträgt der PMN-Anteil nur 25% 4 h nach Infektion. Ab diesem Zeitpunkt bleibt das Niveau von PMN bei ca. 20% unverändert. Bei den hochempfindlichen MyD88^{-/-} Mäusen steigt die PMN-Fraktion im Peritonealraum in den ersten 24 Stunden pi nur sehr langsam (3%/4 h, 10%/24 h). Danach findet eine massive relative Zunahme der PMN-Anzahl statt (50%/48 h). Die massive Zunahme der Erreger und des PMN-Anteils führen im Zeitraum >48 h zum septischen Krankheitsbild (Septikämie) und Exitus. Ein ähnlicher Infektionsablauf wurde für die Milzen der MyD88^{-/-} Mäuse beobachtet (Abb. 3.9 B). Die PMN-Fraktion in den Milzen der IL-10^{-/-} Mäuse steigt von ca. 1% im uninfizierten Zustand bis auf ca. 7% 24 hpi an und bleibt auf dem konstanten Niveau bis 72 h. Der zeitliche Verlauf der PMN-Anteile in den Milzen der C57BL/6 Mäuse ähnelt dem der IL-10^{-/-} Milzen, wobei der 4 h-Anstieg geringer ist.

Zusammenfassend zeigt dieser Vergleich drei charakteristische PMN-Kinetikkurven:

- für die C57BL/6 Maus einen steilen Anstieg des PMN-Anteils nach 4 hpi mit nachfolgender Plateauphase (20%);
- für die IL-10^{-/-} Maus einen überschießenden Anstieg nach 4 hpi mit nachfolgendem Abfall auf 20%;

- für die MyD88^{-/-} Maus einen um 24 h-verzögertem Anstieg des PMN-Anteils mit nachfolgendem steilem Anstieg auf 50%.

Der Anteil von B-Zellen in den Milzen verändert sich während des Infektionsverlaufs kaum (Abb. 3.9 C), während die B-Zellfraktion in Peritoneallavagen bei allen Mausstämmen stetig sinkt (Abb. 3.9 D). Der Anteil von T-Zellen an den hämatopoetischen Zellen der Milz sinkt konstant im Lauf der Infektion von ca. 35% bis auf die Hälfte (ca. 17%) (Abb. 3.9 F), wobei bei den MyD88^{-/-} Milzen ein schnellerer Abfall der T-Zellfraktion beobachtet wurde. Im Peritonealraum dagegen bleiben die T-Zellfraktionen auf dem gleichen Niveau wie bei allen drei Mauslinien (Abb. 3.9 E). Die Fraktion von Mono/Mak steigt in den infizierten Milzen der wt- und IL-10^{-/-} Mäuse an, wobei sie bei MyD88^{-/-} Mäusen unverändert bleibt (Abb. 3.9 H). Im Peritonealraum dagegen bleibt das Niveau von Mono/Mak bei C57BL/6 und IL-10^{-/-} Mäusen konstant nach einem Abfall 4 hpi. Im Vergleich dazu fällt der Anteil der Mono/Mak 48 hpi im Peritonealraum von MyD88^{-/-} Mäusen sehr stark ab (Abb. 3.9 G).

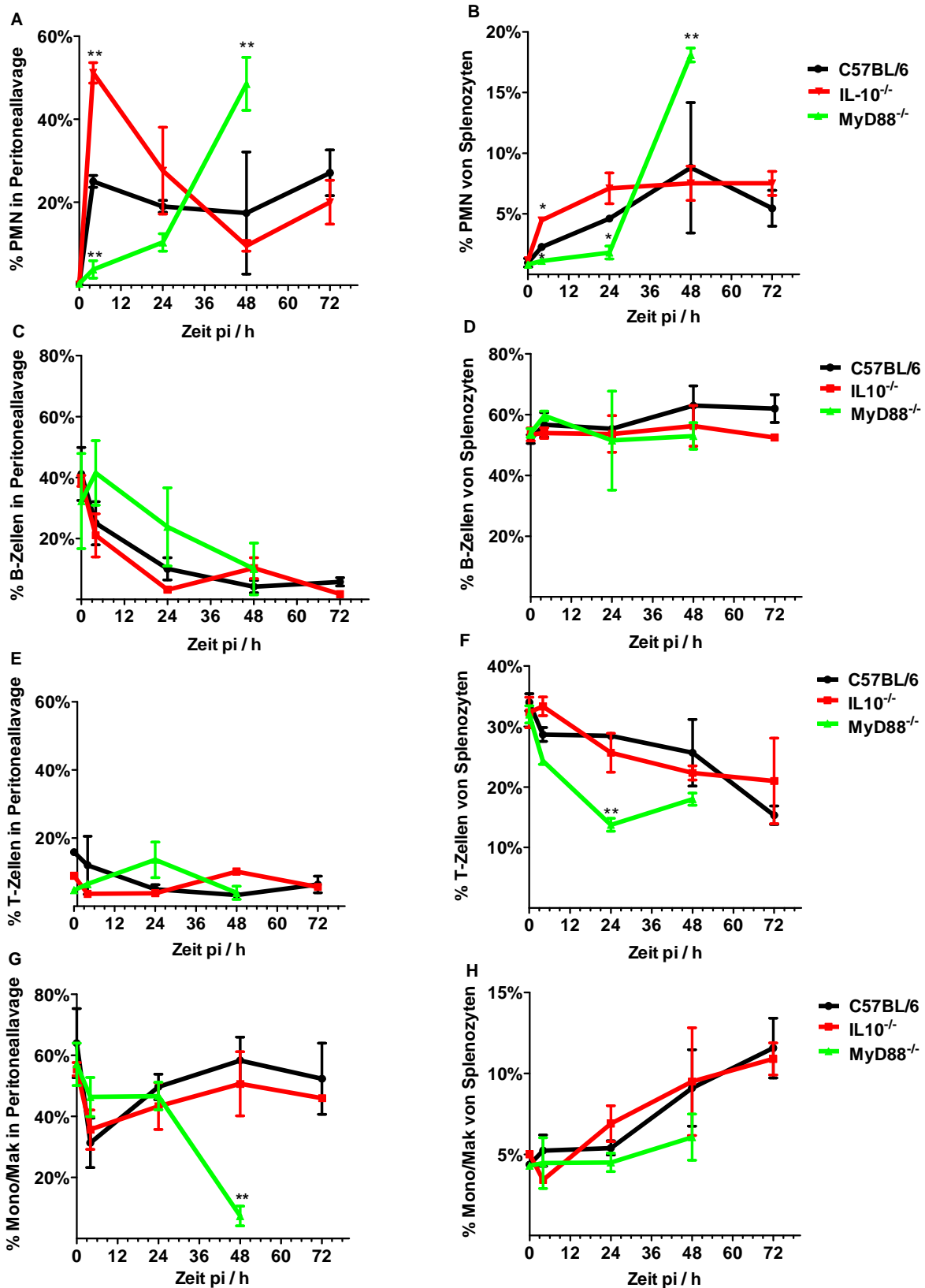


Abb. 3.9: Infektionsverlauf bei C57BL/6 (schwarz), IL-10^{-/-} (rot) und MyD88^{-/-} (grün) Mäusen. Bestimmung der relativen Anteile (%) von hämatopoetischen Zellen im Verlauf der *Yersinia*-Infektion nach intraperitonealer Applikation von 5x10³ Yersinien WA(pYV) im Zeitraum von 72 Stunden (h). (Mono/Mak: F4/80⁺CD11b⁺, PMN: Ly-6G⁺, T-Zellen: CD3⁺, B-Zellen: CD19⁺). *p ≤ 0,05 signifikant; **p ≤ 0,01 sehr signifikant unterschiedlich zum Wildtyp. Der Versuch wurde zweimal mit je 5 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt wiederholt.

3.1.7 Zytokinkinetik von *Yersinia*-infizierten C57BL/6, IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen

Für die Bestimmung der kinetischen Analyse des Infektionsverlaufs bei C57BL/6, IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen, wurden die Peritoneallavage (PL)-Proben und Milzhomogenate auf Zytokin- bzw. Chemokinkonzentrationen untersucht. Die Messung von IL-1α/β- und KC-Konzentration erfolgte mittels ELISA, alle anderen Zytokine wurden mittels BD™ CBA bestimmt. Initial liegen die Werte für die Zytokinkonzentrationen (G-CSF, IL-10, IL-6, KC, MCP-1, MIP-1α, TNF, IL-1α/β, und MIP-2) in uninfizierten Lavagen und Milzhomogenaten der C57BL/6, IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäuse unter der Detektionsgrenze von 20 pg/ml (Daten nicht gezeigt).

Da Zytokin-(Zyto-)/Chemokinsekretion durch verschiedene Mechanismen reguliert wird, weisen sezernierte Zytokine und Chemokine unterschiedliche Kinetikprofile auf. So kann man von „frühen“ und „späten“ Zyto-/Chemokinen sprechen. Zu den frühen Zyto-/Chemokinen gehören z.B. IL-1, IL-6, KC und MIP-2, zu den späten Zytokinen gehören z.B. TNF-α, IFN-γ und IL-10 (Sander et al., 1993).

IL-1α-Konzentration konnte nur in der PL von IL-10^{-/-} Mäusen 2 hpi nachgewiesen werden, wobei IL-1β-Konzentration mit vergleichbaren Werten in der PL von C57BL/6 und IL-10^{-/-} Mäusen bestimmt werden konnte (Abb. 3.10 A). IL-1α/β ist ein pleiotropisches Zytokin, das in der frühen Phase der Infektion freigesetzt wird und eine adäquate anti-bakterielle Antwort vermittelt. IL-1α/β induziert Infiltration von Neutrophilen zum Infektionsherd und stimuliert weitere Produktion von pro-inflammatorischen Chemokinen wie KC, und MIP-2, um die Leukozyten-Infiltration weiter zu verstärken (Arend, 2002). Die IL-1α/β-Familie besteht aus zwei Agonisten (IL-1α und IL-1β) sowie dem IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1Ra), die über den IL-1 Rezeptor (IL-1R) wirken (Kafka et al., 2008). IL-1α kann von Mesothelzellen und anderen Zelltypen nach inflammatorischem Reiz freigesetzt werden, wobei IL-1β als inaktives pro-IL-1β in der Zelle produziert wird und über die Aktivierung von Caspase-1 (Inflammasom-Aktivierung) als reifes IL-1β freigesetzt wird (Hazuda et al., 1988).

IL-1α/β wird als erstes Zytokin von den residenten Peritonealmakrophagen und Mesothelzellen als Reaktion auf *Yersinia*-Inokulation freigesetzt. Die im Vergleich zu den anderen Mausstämmen stark erhöhte Konzentration von IL-1α in der PL von IL-10^{-/-} Mäusen (Abb. 3.10 A) erklärt eine rapide PMN-Infiltration 4 hpi in die Bauchhöhle (Abb. 3.9 A). Eingewanderte Neutrophile produzieren wiederum selber pro-inflammatorische Moleküle, um weitere Leukozyten-Einwanderung zu induzieren (positive Rückkopplung).

Ergebnisse

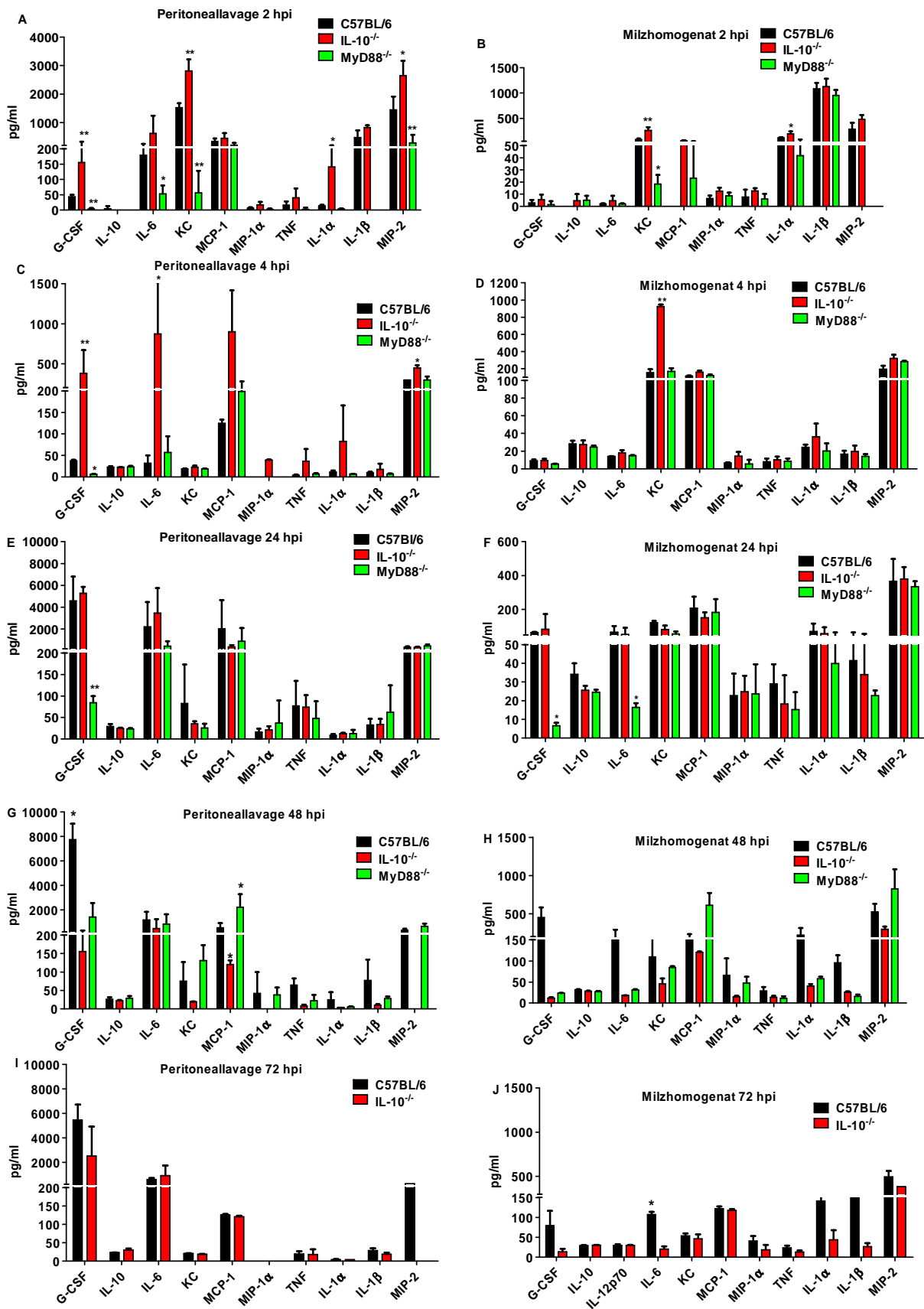


Abb. 3.10: Zytokinsekretion während der *Yersinia*-Infektion von C57BL/6, IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen. Zytokinkonzentration-Bestimmung in pg/ml in je 5 ml Peritoneallavage (in PBS) und Milzhomogenaten (Milzzellsuspension in je 5 ml PBS). Schwarz: C57BL/6 (wt), rot: IL-10^{-/-}, hellgrün: MyD88^{-/-}. *p<0,05 signifikant; **p<0,01 sehr signifikant unterschiedlich zum Wildtyp. Der Versuch wurde zweimal mit je 5 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt wiederholt.

In der Peritoneallavage von infizierten IL-10^{-/-} Mäusen konnten bereits 2 hpi höhere Konzentrationen von G-CSF, IL-6, KC und MIP-2 im Vergleich zu den Werten von C57BL/6 und MyD88^{-/-} Mäusen gemessen werden (Abb. 3.10 A). G-CSF („*Granulocyte Colony Stimulating Factor*“) wird bei Entzündungen ausgeschüttet und stimuliert das Überleben von reifen und die Proliferation von unreifen Granulozyten. Durch G-CSF werden die neutrophilen Granulozyten zur Migration zum Infektionsherd aktiviert (mobilisiert), während KC und MIP-2 Neutrophile aus der Blutbahn zum Infektionsherd hin rekrutieren (Furze and Rankin, 2008a). Allerdings sind die Spiegel dieser Zytokine bereits 4 hpi stark abgesenkt (Abb. 3.10 C; Maßstab beachten). Die relativ hohe Konzentration von KC und MIP-2 in der PL 2 hpi bedingt wahrscheinlich die rapide PMN-Infiltration in den Peritonealraum von IL-10^{-/-} Mäusen. In der PL von infizierten MyD88^{-/-} Mäusen konnten signifikant nur sehr niedrige Konzentrationen von IL-6, KC und MIP-2 gefunden werden, was offensichtlich nicht für die PMN-Infiltration in den Peritonealraum während der initialen Phase der Infektion ausreicht (Abb. 3.9 A).

In den Milzhomogenaten (MH) von infizierten IL-10^{-/-} Mäusen konnte ebenfalls eine signifikant hohe Konzentration (ca. 300 pg/ml) von KC im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen gemessen werden (Abb. 3.10 B). Dagegen war die KC-Konzentration in den MH von MyD88^{-/-} Mäusen extrem niedrig (30 pg/ml). Bemerkenswert ist, dass MIP-2 2 hpi in der Milz von infizierten MyD88^{-/-} Mäusen noch nicht nachweisbar ist. Für die übrigen aufgelisteten Zytokine konnten keine Unterschiede zwischen den Mausstämmen gefunden werden.

In der initialen Phase der Infektion (4 h) wurden bei IL-10^{-/-} Mäusen ca. 500 pg/ml von G-CSF in der Peritoneallavage gemessen (Abb. 3.10 C). Im Vergleich liegen die Werte für G-CSF in der PL bei MyD88^{-/-} Mäusen unter der Detektionsgrenze von 20 pg/ml und bei C57BL/6 Mäusen bei ca. 50 pg/ml. Es konnten lediglich marginale Unterschiede in den Konzentrationen von anderen Zytokinen zwischen C57BL/6 und MyD88^{-/-} Mäusen gefunden werden. Demnach spielt G-CSF die entscheidende Rolle für die PMN-Infiltration in den Bauchraum, wobei bereits geringe Konzentrationen (50 pg/ml bei C57BL/6) für die erfolgreiche PMN-Migration ausreichen. Zu diesem Zeitpunkt (4 hpi) wurde bei C57BL/6-Mäusen bereits eine erhöhte PMN-Infiltration in die Bauchhöhle nachgewiesen, während bei MyD88^{-/-} Mäusen Neutrophile erst 24 hpi im Bauchraum zu finden sind (Abb. 3.9 A). Ebenfalls konnten die Zytokine TNF, IL-1 α , IL-1 β und das Chemokin KC bei C57BL/6 und MyD88^{-/-} Mäusen 4 hpi im PL nicht detektiert werden. IL-10^{-/-} Mäuse produzieren dagegen hohe Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen IL-6, MCP-1, MIP-1 α , TNF und IL-1 α . In den Milzen der IL-10^{-/-} Mäuse wurde 4 hpi hohe Konzentrationen (1000 pg/ml) von KC (CXCL1 Chemokin) nachgewiesen. Bemerkenswert ist, dass bei allen drei infizierten Mausstämmen (C57BL/6, IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-}) das für Neutrophile stark chemotaktische

Chemokin MIP-2 in vergleichbaren Mengen sowohl in der PL als auch in der Milz produziert wird. 24 Stunden nach der Infektion zeigen C57BL/6 und MyD88^{-/-} Mäuse eine erhöhte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen im Peritonealraum (Abb. 3.10 E). Die Zytokin-Konzentrationen von G-CSF, IL-6, MCP-1, TNF und MIP-2 in der PL ist bei allen Mäusen stark gestiegen, wobei C57BL/6 und IL-10^{-/-} Mäuse höhere Konzentration an G-CSF im Bauchraum und in der Milz aufweisen (Abb. 3.10 E-F).

IL-10 wird *in vivo* in sehr geringen Konzentrationen produziert, so dass IL-10-Konzentrationen in den hier untersuchten Volumina von je 5ml Peritoneallavage und Milzhomogenat unter der Testsensitivitätsgrenze („cut-off“ Grenze 20-25 pg/ml) liegen. Somit sind die Werte für die IL-10-Konzentration bei allen hier untersuchten Maustämmen nicht bzw. verwertbar.

2 Tage pi sinkt die Konzentration von pro-inflammatorischen Zytokinen in der PL von IL-10^{-/-} Mäusen, während C57BL/6 und MyD88^{-/-} Mäuse stärker G-CSF produzieren, wobei bei MyD88^{-/-} Mäusen weniger G-CSF und mehr MCP-1 bestimmt wurde (Abb. 3.10 G). Ein vergleichbarer Konzentrationsverlauf ist ebenfalls 48 hpi in den Milzen zu beobachten (Abb. 3.10 H).

MyD88^{-/-} Mäuse entwickeln in der Regel 48-60 Stunden nach der *Yersinia*-Infektion eine starke Septikämie mit letalem Ausgang (fehlende Werte in der Abb. 3.10 I-J). Weder in der Peritoneallavage noch in der Milz konnten Unterschiede in Zytokinkonzentrationen zwischen C57BL/6 und IL-10^{-/-} Mäusen gefunden werden, mit der Ausnahme von hoher Konzentration von MIP-2 in PL von C57BL/6 Mäusen.

3.1.8 Analyse des Infektionsverlaufs bei C57BL/6, MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen

Wie in Abb. 3.1 gezeigt, erwiesen sich MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-} (TLR2^{-/-}/4^{-/-}) Mäuse als hochempfindlich für *Y. enterocolitica* (Infektionsdosis von 5×10^3 CFU, Überlebensdauer zw. 48-60 h). Daher liegt die Annahme nah, dass MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäuse einen ähnlichen Infektionsverlauf nach *Yersinia*-Infektion zeigen. Um eine plausible Erklärung für den Mechanismus der hohen Anfälligkeit gegenüber Yersinien zu finden, wurde der zeitliche Infektionsverlauf von MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen untersucht.

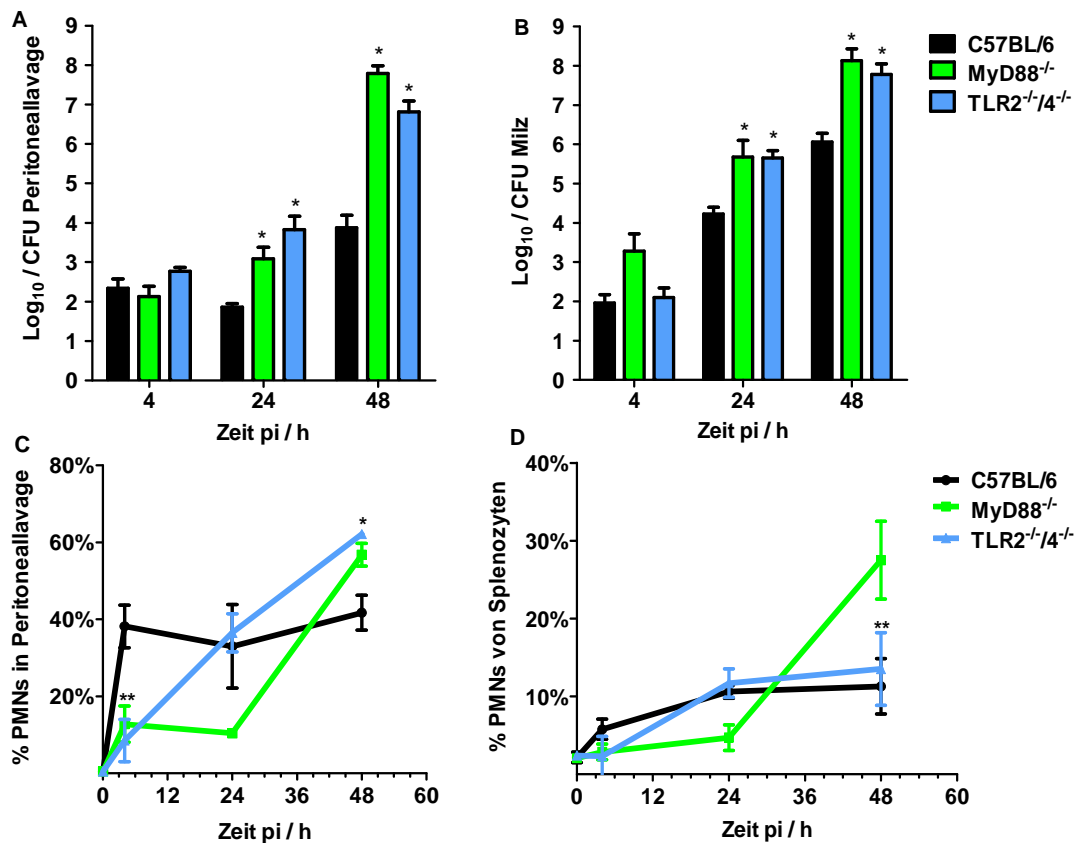


Abb. 3.11: Infektionsverlauf bei C57BL/6, MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäusen. Bestimmung der Keimzahl (CFU) im Peritonealraum (A) und in der Milz (B). Relative Anteile von PMN (Ly-6G⁺) in der Peritoneallavage (C) und in der Milz (D) im Verlauf der *Yersinia*-Infektion nach intraperitonealer Applikation von *Y. enterocolitica* WA(pYV) (5×10^3 CFU) im Zeitraum von 48 Stunden (h). Schwarz: C57BL/6 (wt), blau: TLR2^{-/-}/4^{-/-}, hellgrün: MyD88^{-/-}. *p≤0,05 signifikant; **p≤0,01 sehr signifikant unterschiedlich zum Wildtyp. Der Versuch wurde zweimal mit je 5 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt wiederholt.

4 Stunden nach ip-Inokulation konnte kein signifikanter Unterschied in den CFU-Werten im Bauchraum der infizierten Mäuse festgestellt werden (Abb. 3.11 A). Danach steigt die Yersinien-Keimzahl (CFU) schneller bei MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäusen an als bei C57BL/6 Mäusen (10³ bzw. 10⁴ CFU vs. 10² CFU 48 hpi). Eine ähnliche Tendenz der CFU-Werte ist für die infizierten Milzen zu beobachten (Abb. 3.11 B). Auffällig ist, dass MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäuse bereits 2 Tage pi sehr hohe bzw. kritische *Yersinia*-CFU-Werte in der Milz erreichen (CFU=10⁸-10⁹). Dieser Umstand erklärt, warum die Mäuse im Zeitraum 48-60 h septisch krank werden und deshalb getötet werden mussten.

In der frühen Phase der Infektion (4 hpi) ist bei C57BL/6 Mäusen eine starke Immigration von Neutrophilen in den Bauchraum festzustellen, im Unterschied zu MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäusen (Abb. 3.11 C). Der PMN-Anteil sowohl in der Peritoneallavage als auch in der Milz steigt bei MyD88^{-/-} Mäusen erst nach 24 hpi an. Eine ähnliche initiale PMN-Immigrationsverzögerung wurde auch bei TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäusen festgestellt (Abb. 3.11 C-D). Allerdings steigt die PMN-Immigration in der PL und in der Milz bei TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäusen bereits nach 4 hpi an und ist 24 hpi viel höher im Vergleich zu MyD88^{-/-} Mäusen. 48 hpi weisen die MyD88^{-/-} Mäuse den höchsten Anteil von Neutrophilen in der Milz auf (28% bei MyD88^{-/-} Mäusen im Vergleich zu 12% bei TLR2^{-/-}/4^{-/-} und C57BL/6 Mäusen).

Die *Yersinia*-Empfänglichkeit von MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäusen hängt offensichtlich initial mit der verzögerten PMN-Immigration in den Peritonealraum in den ersten vier Stunden zusammen.

Da die PMN-Immigration und Infektabwehr von Zytokinen und Chemokinen kontrolliert wird, wurden entsprechende Bestimmungen für Peritoneallavage-Flüssigkeit (Spülung mit 5 ml PBS) und Milzhomogenate (in 5 ml PBS) durchgeführt.

Initial liegen die Werte für die Zytokinkonzentrationen (G-CSF, IL-10, IL-6, KC, MCP-1, MIP-1α, TNF, IL-1α/β, und MIP-2) in uninfizierten Lavagen und Milzhomogenaten der C57BL/6, MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäuse unter der Detektionsgrenze von 20 pg/ml (Daten nicht gezeigt).

In der Initialphase (2 hpi) unterscheiden sich MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse hinsichtlich der freigesetzten Zyto-/Chemokine in der PL und in der Milz nicht signifikant (Abb. 3.12 A und B). Dagegen konnten in der PL von C57BL/6 Mäusen signifikant höhere Konzentrationen von G-CSF, IL-6, KC und MIP-2 und in dem Milzhomogenat höhere Konzentrationen von KC, MIP-2 und IL-1β gemessen werden. Interessanterweise weisen alle drei infizierten Mausstämme nach 4 Stunden pi vergleichbare Zyto-/Chemokinkonzentrationsprofile sowohl in der PL als auch in der Milz auf (Abb. 3.12 C und D). 24 hpi konnten ebenfalls keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen C57BL/6, MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäusen für die meisten Zyto- und Chemokine gefunden werden. Auffällig ist aber, dass

G-CSF und KC in der PL von MyD88^{-/-} Mäusen unterhalb der Detektionsgrenze lagen, während TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäuse ähnlich hohe G-CSF- und KC-Konzentrationen aufwiesen wie C57BL/6 Mäuse, was wiederum eine frühere PMN-Infiltration im Vergleich zu MyD88^{-/-} Mäusen erklärt (Abb. 3.12 E). In den Milzhomogenaten konnten hinsichtlich der Zyto-/Chemokinkonzentrationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mausstämmen gefunden werden (Abb. 3.12 F).

48 hpi wurden hohe Konzentrationen von G-CSF, IL-6 und IL-1 β in der PL und in der Milz von drei Mausstämmen gemessen, wobei TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäuse die höchste Konzentration von G-CSF und IL-6 aufwiesen (Abb. 3.12 G).

Außerdem wiesen C57BL/6 Mäuse 48 hpi die geringste KC-Konzentration in der PL im Vergleich zu MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäusen auf (Abb. 3.12 G). KC ist ein „frühes“ Chemokin mit der Halbwertszeit von 2-4 h, was erklären könnte, warum bei C57BL/6 Mäusen zu diesem späten Infektionszeitpunkt in der PL kaum noch KC detektierbar ist. Dagegen haben MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäuse eine stark verzögerte Immunantwort auf Grund der Defekte in der TLR2/TLR4-Signalkaskade. Interessanterweise reagieren TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäuse aber zum Zeitpunkt 48 hpi mit einer starken Konzentrationserhöhung von G-CSF in der Milz, während in der Milz von C57BL/6 Mäusen zu diesem Zeitpunkt die höchste Konzentration von IL-1 α und IL-1 β auftritt (Abb. 3.12 H).

Ergebnisse

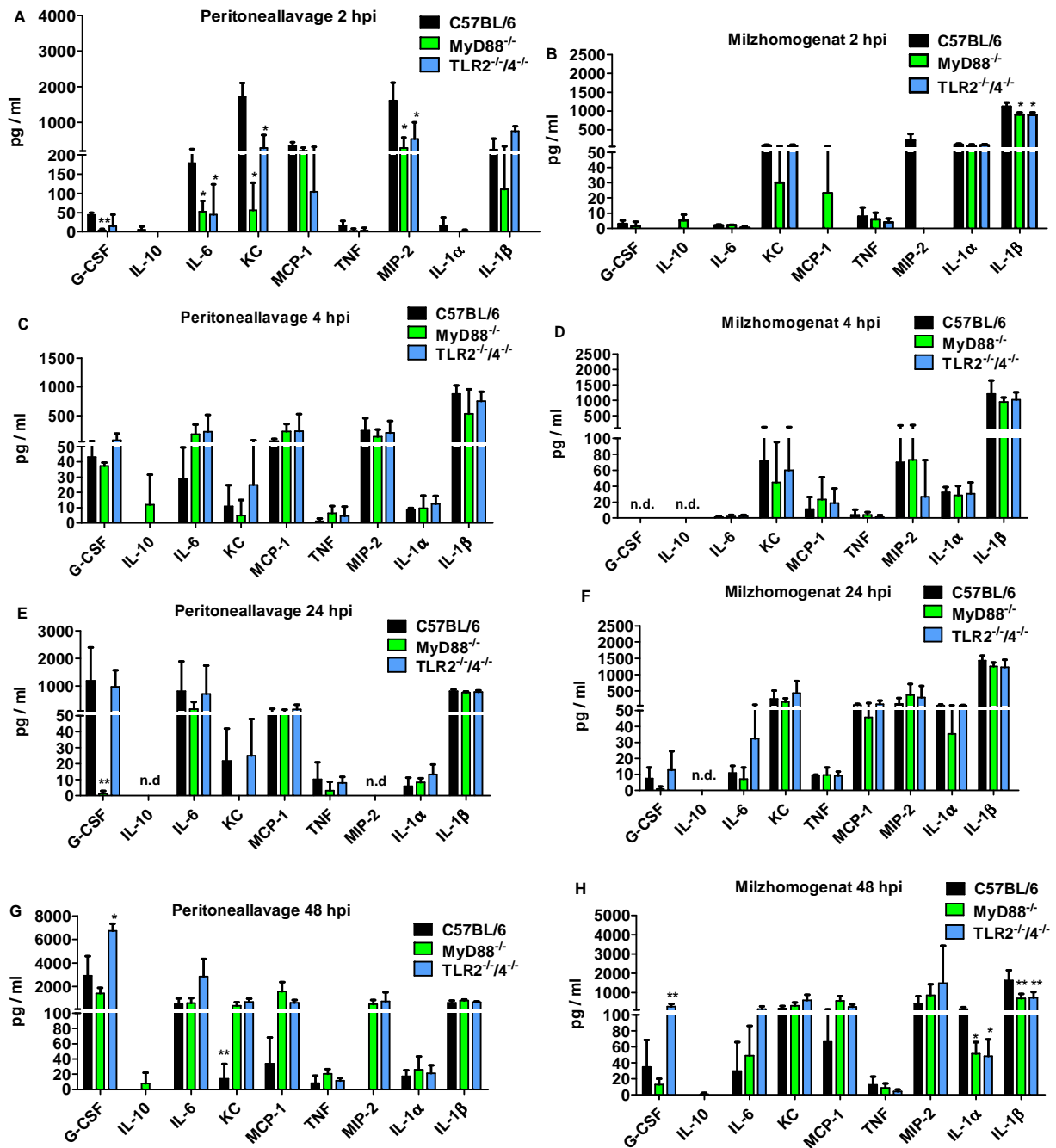


Abb. 3.12: Bestimmung der Konzentration (pg/ml) von sezernierten Zytokinen / Chemokinen im Peritonealraum (A, C, E, G; aus je 5 ml Lavage mit PBS) und im Milzhomogenat (B, D, F, H; aus je 5 ml Milzzellsuspension in 5 ml PBS) zu vier verschiedenen Zeitpunkten (2, 4, 24 und 48 hpi) nach ip-Infektion mit 5×10^3 CFU *Y. enterocolitica* WA(pYV) von C57BL/6 (wt; schwarz), MyD88^{-/-} (hellblau) und TLR2^{-/-}/4^{-/-} (grün) Mäusen. Detektionsgrenze: 20 pg/ml. Die Messung von IL-1α/β- und KC-Konzentration erfolgte mittels ELISA, alle anderen Zytokine wurden mittels BD™ CBA bestimmt. *p < 0,05 signifikant; **p < 0,01 sehr signifikant unterschiedlich zum Wildtyp. n.d.=nicht detektierbar. Der Versuch wurde zweimal mit je 5 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt wiederholt.

3.1.9 Analyse des Infektionsverlaufs bei C57BL/6, TLR2^{-/-}, CD14^{-/-} und TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} Mäusen

Um die Rolle des Toll-like Rezeptors 2 und des Korezeptors CD14 auf den *Yersinia*-Infektionsverlauf vergleichend zu untersuchen, wurden TLR2^{-/-}, CD14^{-/-}, TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} und C57BL/6 Mäuse intraperitoneal mit *Y. enterocolitica* WA(pYV) infiziert (5×10^3 CFU). Es wurde die Keimzahl in Peritoneallavagen und Milzhomogenaten bestimmt sowie die Infiltration von PMN in die Bauchhöhle sowie in die Milz mit Neutrophilen mittels FACS-Analyse im Zeitraum von 72 h ermittelt.

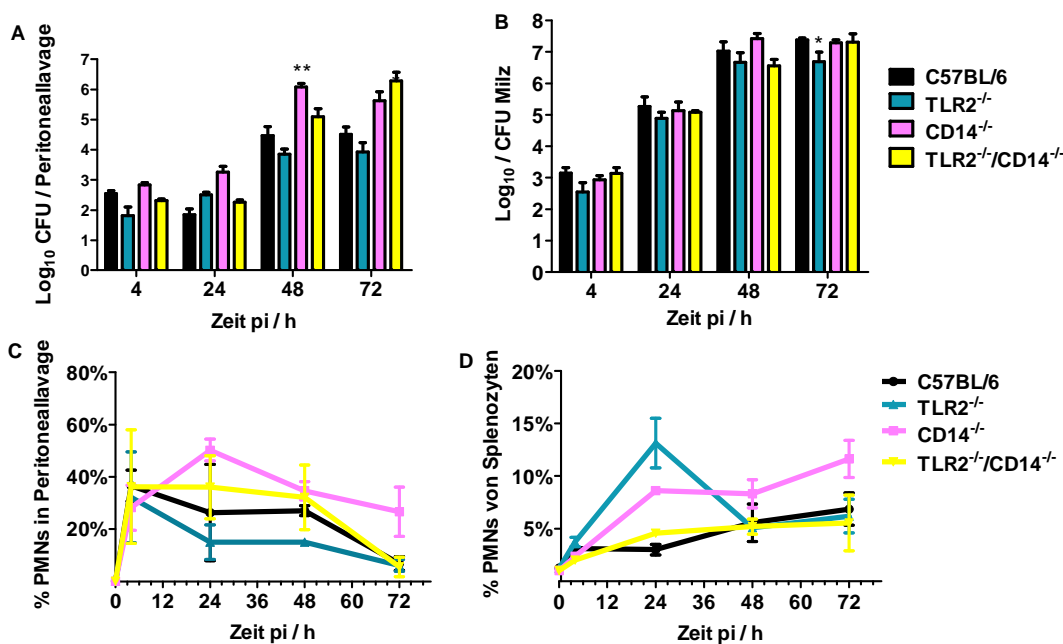


Abb. 3.13: Infektionsverlauf bei C57BL/6, TLR2^{-/-}, CD14^{-/-} und TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} Mäusen. Bestimmung der Keimzahl (CFU) im Peritonealraum (A) und in der Milz (B). Relative Anteile von PMN (Ly-6G⁺) in der Peritoneallavage (C) und in der Milz (D) im Verlauf der *Yersinia*-Infektion nach intraperitonealer Applikation von *Y. enterocolitica* WA(pYV) (5×10^3 CFU) im Zeitraum von 72 Stunden (h). Schwarz: C57BL/6 (wt), türkis: TLR2^{-/-}, rosa: CD14^{-/-}, gelb: TLR2^{-/-}/CD14^{-/-}. *p≤0,05 signifikant; **p≤0,01 sehr signifikant unterschiedlich zum Wildtyp. Der Versuch wurde zweimal mit je 5 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt wiederholt.

Während der ersten 24 Stunden pi zeigen die CFU-Werte für die verschiedenen Mausstämme keine signifikanten Unterschiede. 24-48 hpi steigt der CFU-Wert im Bauchraum von den CD14^{-/-} Mäusen stärker an im Vergleich zu C57BL/6, TLR2^{-/-} und TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} Mäusen (Abb. 3.13 A). Nach 48 h nimmt die Keimzahl in der Peritoneallavage von CD14^{-/-} und TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} Mäusen stärker zu als der von C57BL/6 und TLR2^{-/-} Mäusen. 72 hpi konnten keine signifikanten Unterschiede in der Keimzahl von C57BL/6, CD14^{-/-} und TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} Mäusen in den Milzhomogenaten festgestellt werden, wobei TLR2^{-/-} Mäuse einen um eine Log-Stufe niedrigeren CFU-Wert aufweisen (Abb. 3.13 B).

In der frühen akuten Phase der Infektion (4 h) gibt es keine Unterschiede in der Kinetik der PMN-Einwanderung in den Bauchraum unter den Mausstämmen (Abb. 3.13 C). Zwischen 4-48 h stagnieren die Anteile von PMN bei ca. 20%-40% von C57BL/6, TLR2^{-/-} und TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} Mäusen, um dann 72 hpi wieder abzufallen, während die PMN-Fraktion von CD14^{-/-} Mäusen auf dem Niveau von ca. 30% bleibt. In der Milz konnten ebenfalls keine Unterschiede der PMN-Einwanderungsrate während der ersten 4 h beobachtet werden. Die Anteile von PMN in der Milz in allen 4 Mausstämmen steigen während der Infektion an und erreichen ein Plateau von ca. 10% der gesamten hämatopoetischen Zellpopulation 72 hpi. 24 hpi weisen TLR2^{-/-} Mäuse einen Höhepunkt der PMN-Einwanderung (ca. 12%) in die Milz auf. Zusammenfassend ergibt der Infektionsverlauf hinsichtlich der PMN-Einwanderung in die Milz bei C57BL/6, TLR2^{-/-}, CD14^{-/-} und TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} Mäusen ein ähnliches Bild.

Es wurde dann der Frage nachgegangen, ob mit der vergleichbaren Neutrophilen-Einwanderung auch ähnliche Zyto-/Chemokinmuster verbunden sind. Mittels BD CBA™ wurden die Konzentrationen der freigesetzten pro-inflammatorischen Zyto-/Chemokine für vier Zeitpunkte pi bestimmt (Abb. 3.14).

Initial liegen die Werte für die Zytokinkonzentrationen (G-CSF, IL-10, IL-6, KC, MCP-1, MIP-1α, TNF, IL-1α/β, und MIP-2) in uninfizierten Lavagen und Milzhomogenaten der C57BL/6, TLR2^{-/-}, CD14^{-/-} und TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} Mäuse unter der Detektionsgrenze von 20 pg/ml (Daten nicht gezeigt).

Während der initialen akuten Infektionsphase (4 hpi) werden im Peritonealraum von C57BL/6, TLR2^{-/-}, CD14^{-/-} und TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} Mäusen erhöhte Konzentrationen von G-CSF, IL-6, MCP-1 und IL-1α nachgewiesen, wobei es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mausstämmen festgestellt werden konnten (Abb. 3.14 A). 24 hpi steigt die Konzentration von G-CSF, IL-6 und MCP-1 weiter an und stagniert schließlich nach 48 hpi. C57BL/6 und CD14^{-/-} Mäuse weisen eine höhere Konzentration von MIP-2 als TLR2^{-/-} und TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} Mäuse 48 hpi auf (Abb. 3.14 E). Im Vergleich dazu steigt die Konzentration von MIP-2 bei TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} Mäusen 72 hpi an. 4 hpi liegen die Werte für G-CSF, IL-6 und IL-10 bei den infizierten Mäusen in der Milz unter der Detektionsgrenze von 20 pg/ml (Abb. 3.14 B). KC, MCP-1 und MIP-2 sind zu diesem Zeitpunkt die einzigen Zytokine, die in den Milzen erhöht sind, wobei die Konzentration bei allen Mäusen ohne signifikante Unterschiede ist. 24 hpi bleiben die Konzentrationen von KC, MCP-1, IL-1α, IL-1β und MIP-2 praktisch unverändert bis zum Zeitpunkt 72 hpi (Abb. 3.14 D-H). Zusammenfassend wurden ähnliche Zyto-/Chemokinmuster während der *Yersinia*-Infektion bei C57BL/6, TLR2^{-/-}, CD14^{-/-} und TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} Mäusen beobachtet, v.a. in der initialen akuten Phase der Infektion (4-24 hpi).

Ergebnisse

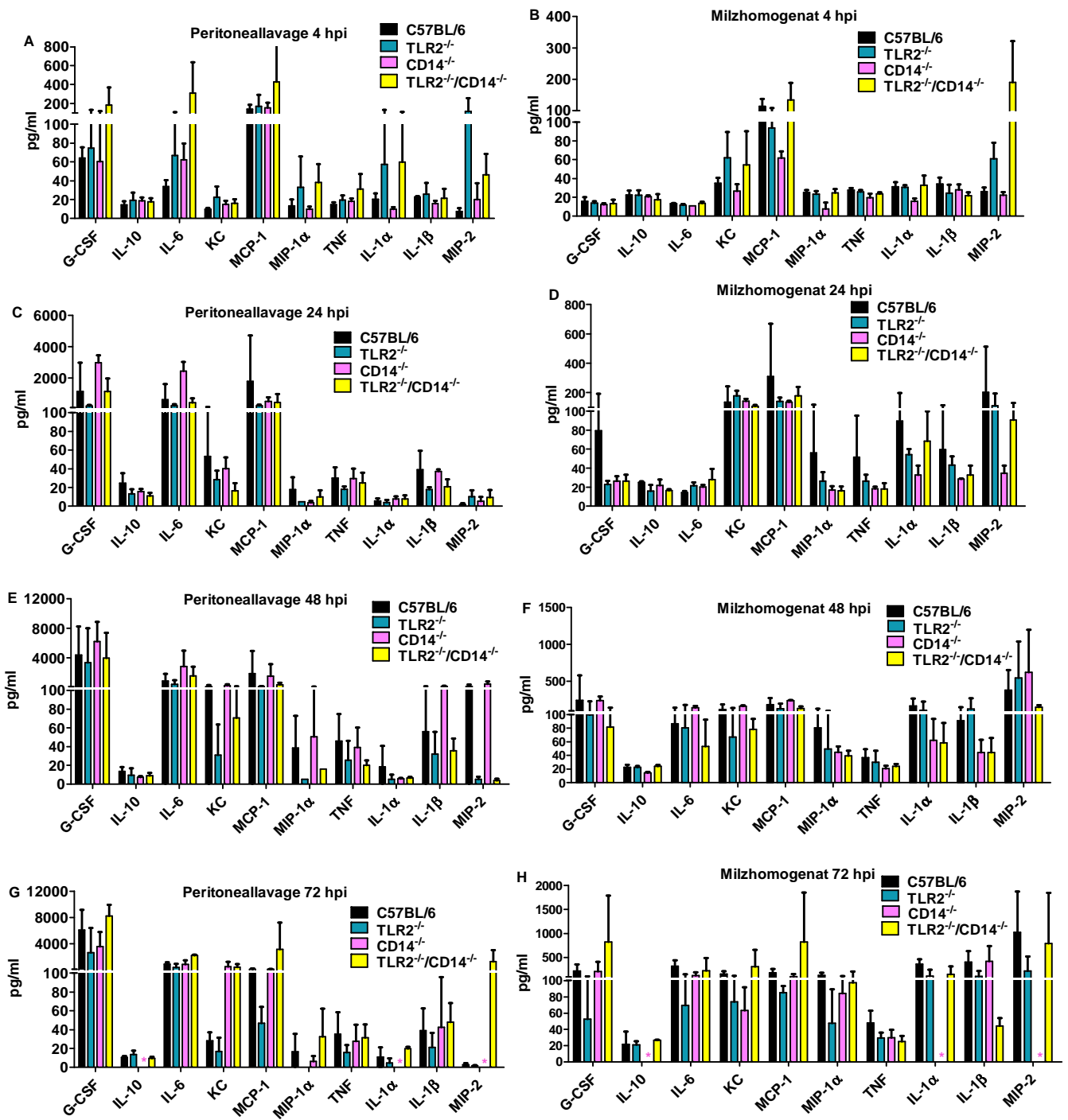


Abb. 3.14: Bestimmung der Konzentration (pg/ml) von sezernierten Zytokinen/Chemokinen im Peritonealraum (A, C, E, G; je 5 ml Lavage in PBS) und im Milzhomogenat (B, D, F, H; je 5 ml in PBS) zu vier verschiedenen Zeitpunkten (4, 24, 48 und 72 hpi) nach ip-Infektion mit *Y. enterocolitica* WA(pYV) (5×10^3 CFU) von C57BL/6 (wt; schwarz), TLR2^{-/-} (türkis), CD14^{-/-} (rosa) und TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} (gelb) Mäusen. Detektionsgrenze: 20 pg/ml. *IL-10, IL-1α und MIP-2 wurden 72 hpi in den PL und Milzhomogenaten von CD14^{-/-} Mäusen nicht gemessen. Der Versuch wurde zweimal mit je 5 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt wiederholt.

3.1.10 Analyse des Infektionsverlaufs bei C57BL/6, RIP2^{-/-}, NOD2^{-/-} und NOD1^{-/-}/NOD2^{-/-} Mäusen

Die NOD1/NOD2/RIP2-Signaltransduktionskaskade wird durch Peptidoglykanfragmente aktiviert. Um zu überprüfen, ob diese Komponenten eine Rolle bei der *Yersinia*-Infektion spielen, wurden NOD2^{-/-}, NOD1^{-/-}/NOD2^{-/-} (NOD1^{-/-}/2^{-/-}), RIP2^{-/-} und C57BL/6 Mäuse mit *Yersinia enterocolitica* WA(pYV) intraperitoneal (5×10^3 CFU) infiziert und die Infektionskinetik analysiert (Abb. 3.15).

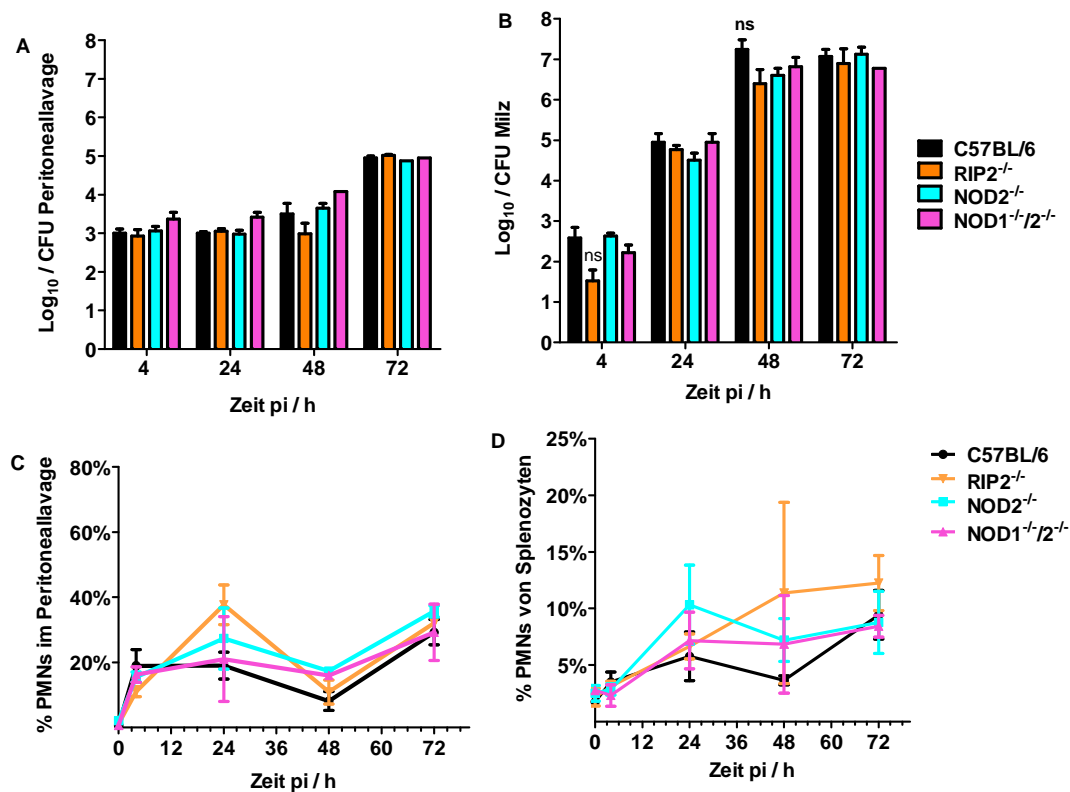


Abb. 3.15: Infektionsverlauf bei C57BL/6, RIP2^{-/-}, NOD1^{-/-} und NOD1^{-/-}/2^{-/-} Mäusen. Bestimmung der Keimzahl (CFU) im Peritonealraum (A) und in der Milz (B). Relative Anteile von PMN (Ly-6G⁺) in der Peritoneallavage (C) und in der Milz (D) im Verlauf der *Yersinia*-Infektion nach intraperitonealer Applikation von *Y. enterocolitica* WA(pYV) (5×10^3 CFU) im Zeitraum von 72 Stunden (h). Schwarz: C57BL/6 (wt), orange: RIP2^{-/-}, hellblau: NOD2^{-/-}, pink: NOD1^{-/-}/2^{-/-}. ns=nicht signifikant. Der Versuch wurde zweimal mit je 5 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt wiederholt.

Während des gesamten Infektionsverlaufs (72 h) konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Keimzahl (CFU) in der Peritoneallavage der infizierten Mausstämmen gefunden werden. Bei allen vier Mausstämmen steigt die Anzahl der Bakterien von 10^3 CFU (4 hpi) bis auf 10^5 CFU nach 72 h an. Ein ähnlicher Verlauf der CFU-Zunahme ist in der Milz feststellbar (Abb. 3.15).

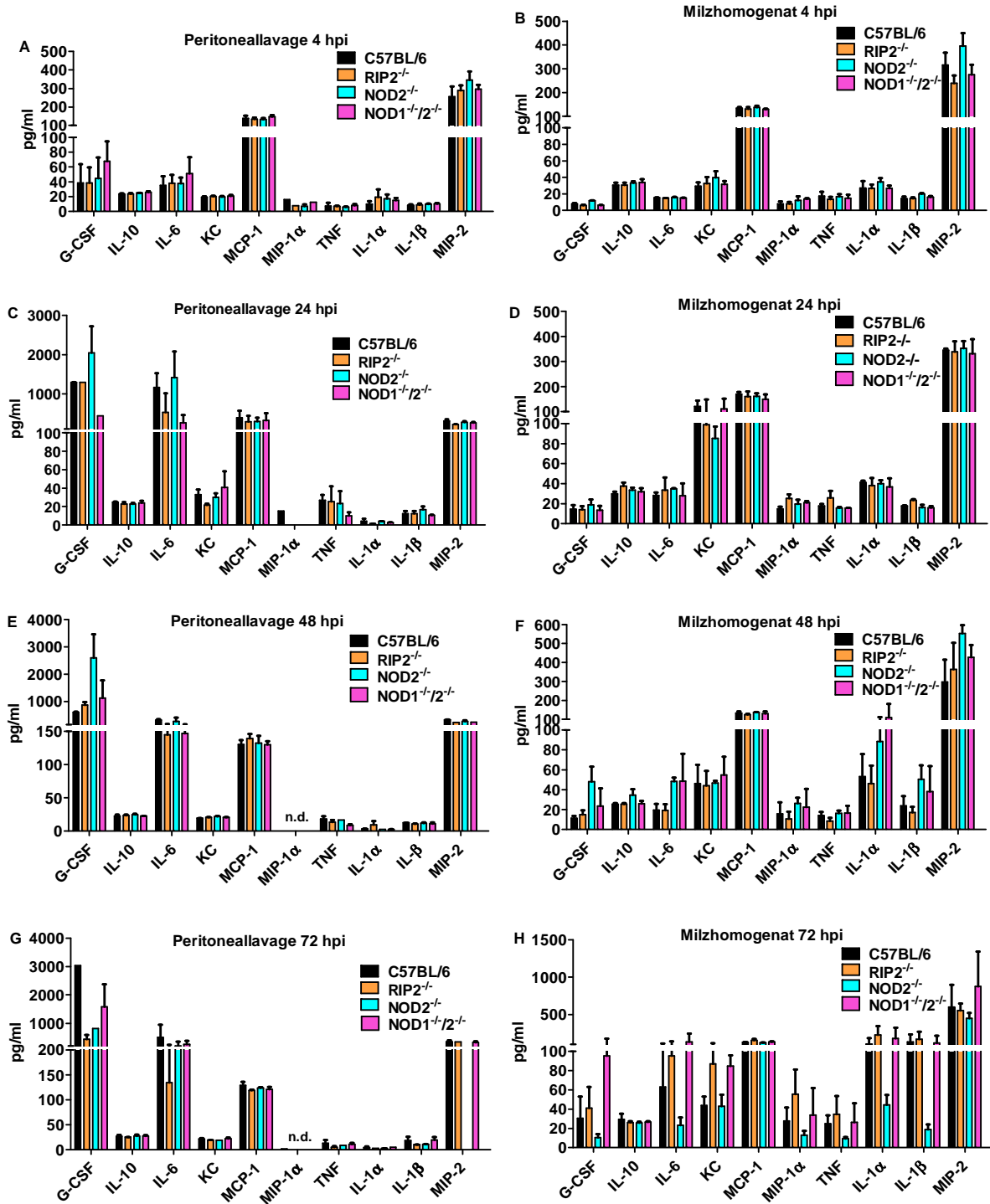


Abb. 3.16: Bestimmung der Konzentration (pg/ml) von sezernierten Zytokinen/Chemokinen im Peritonealraum (A, C, E, G; je 5 ml Lavage in PBS) und im Milzhomogenat (B, D, F, H; je 5 ml in PBS) zu vier verschiedenen Zeitpunkten (4, 24, 48 und 72 hpi) nach ip-Infektion mit *Y. enterocolitica* WA(pYV) 5×10^3 CFU von C57BL/6 (wt; schwarz), RIP2^{-/-} (orange), NOD2^{-/-} (hellblau), NOD1^{-/-}/2^{-/-} (pink). Detektionsgrenze: 20 pg/ml. n.d.=nicht detektierbar. Der Versuch wurde zweimal mit je 5 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt wiederholt.

Auffällig ist nur die scheinbar geringere Anzahl von Yersinien nach 4 h in der Milz der RIP2^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den anderen Mausstämmen, die aber im weiteren Infektionsverlauf weniger auffällig ist. Ausgehend von den Vorversuchen auf *Yersinia*-Empfindlichkeit (Abb. 3.1), wurde erwartungsgemäß ein vergleichbarer Infektionsverlauf und ähnliches PMN-Rekrutierungsmuster bei C57BL/6, RIP2^{-/-}, NOD2^{-/-} und NOD1^{-/-}/2^{-/-} festgestellt. Offensichtlich spielt der NOD1/2/RIP-2-Signalweg keine entscheidende Rolle für die Kontrolle der *Yersinia*-Infektion. Dieses zeigen auch die quantitativen Bestimmungen der Zyto-/Chemokine (Abb. 3.16).

Initial liegen die Werte für die Zytokinkonzentrationen (G-CSF, IL-10, IL-6, KC, MCP-1, MIP-1 α , TNF, IL-1 α/β , und MIP-2) in uninfizierten Lavagen und Milzhomogenaten der C57BL/6, RIP2^{-/-}, NOD2^{-/-} und NOD1^{-/-}/2^{-/-} Mäuse unter der Detektionsgrenze von 20 pg/ml (Daten nicht gezeigt).

Im Peritonealraum wird 4 hpi nur MCP-1 und MIP-2 erhöht produziert und steigen bis 24 hpi an. G-CSF, IL-6, MCP-1 und MIP-2 werden stark von 24 h bis 72 hpi anhaltend produziert. Die Werte für IL-10, KC, TNF, MIP-1 α , IL-1 α und IL-1 β liegen zu jedem gemessenen Zeitpunkt leicht über oder unter der Detektionsgrenze.

Im Vergleich, werden G-CSF und IL-6 in den Milzen im gesamten Verlauf der Infektion nur minimal produziert. 4 hpi sind nur MCP-1 und MIP-2 wirklich messbar. 24 hpi erhöht sich der Wert für KC und IL-6. Lediglich am letzten Tag der Infektion (72 hpi) steigen die Werte für alle Zyto-/Chemokine etwas an.

3.2 In vitro Analyse der differentiellen *Yersinia*-Empfänglichkeit von Mäusen mit definierten Defekten in der angeborenen Immunität

Anhand von in vivo Versuchen, haben sich IL-10^{-/-} Mäuse als resistent und MyD88^{-/-} Mäuse als hochempfindlich gegenüber der intraperitonealen *Y. enterocolitica*-Infektion erwiesen. Zwischen den C57BL/6 und den entsprechenden *ko*-Mäusen (TLR2^{-/-}, CD14^{-/-}, TLR2^{-/-}/CD14^{-/-}, RIP2^{-/-}, NOD2^{-/-}, NOD1^{-/-}/2^{-/-}) konnten keine großen Unterschiede im Infektionsverlauf gefunden werden. Im Vergleich dazu haben die Untersuchungen der Infektionskinetik von IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen eine *Yersinia*-Hochresistenz bzw. Hochempfindlichkeit ergeben. IL-10^{-/-} Mäuse zeigen in den ersten Stunden eine hohe PMN-Immigration zum Infektionsherd, während bei MyD88^{-/-} Mäusen eine stark verzögerte PMN-Einwanderung feststellbar war. Aus diesem Grund haben sich die späteren in vitro Untersuchungen auf IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäuse konzentriert.

3.2.1 Zytokinsekretion von Knochenmarkzellen nach *Yersinia*-Infektion in vitro

Im Knochenmark befindet sich, neben den Vorläuferzellen für verschiedene Blutzellarten, ein großer Pool an reifen ausdifferenzierten PMN (30%-40% der hämatopoetischen Zellen). Frisch gewonnene Knochenmarkzellen aus dem Femur wurden deshalb in vitro mit *Yersinia* infiziert und freigesetzte Zyto-/Chemokine quantitativ untersucht.

Knochenmarkzellen von C57BL/6, IL-10^{-/-}, MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäusen wurden für 1 h mit dem Stamm WA(pYV) (MOI=10) in vitro inkubiert. Anschließend wurde Gentamicin dazugegeben, um die extrazellulären Bakterien abzutöten bzw. das Überwachsen der Zellkultur mit Yersinien zu verhindern. Es ist davon auszugehen, dass die abgetöteten Bakterien durch die freigesetzten PAMP stimulierend wirken. Auch wurde nicht das intrazelluläre Überleben der Yersinien überprüft. Die Zytokinsekretion im Überstand wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Gentamicin (Genta-)-Behandlung gemessen (Abb. 3.17).

In uninfizierten Knochenmarkzellen der C57BL/6, IL-10^{-/-}, MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäuse liegen die Werte für die Zytokinkonzentrationen (G-CSF, IFN- γ , IL-10, IL-6, KC, MCP-1, MIP-2, MIP-1 α/β , TNF und IL-1 α/β) unter der Detektionsgrenze von 20 pg/ml (Daten nicht gezeigt). Eine Stunde nach Zugabe von Gentamicin sekretieren die IL-10^{-/-} Knochenmarkzellen (KM-Zellen) bereits nachweisbare Mengen von G-CSF, IL-6 und KC, im Vergleich zu KM-Zellen von C57BL/6, MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäusen. Dagegen waren relativ hohe MIP-2, MIP-1 α , MIP-1 β und TNF-Konzentrationen in den Überständen der KM-Kulturen der verschiedenen Mausstämme nachweisbar (Abb. 3.17 A). Dabei blieben die

Werte für MIP-2 bei MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} KM-Zellen stets niedriger als die MIP-2 Konzentration in Zellkulturüberstand bei C57BL/6 und IL-10^{-/-} KM-Zellen.

5 h nach Zugabe von Gentamicin steigt die Konzentration von pro-inflammatorischen Zyto-/Chemokinen wie G-CSF, IL-6, KC und MCP-1 bei IL-10^{-/-} KM-Zellen. MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} KM-Zellen produzieren wiederum signifikant weniger IL-6, MIP-2 und TNF im Vergleich zu den anderen IL-10^{-/-} und C57BL/6 KM-Zellen (Abb. 3.17 B).

17 h nach Zugabe von Gentamicin steigt die Konzentration von G-CSF, IL-6, KC und MCP-1 von IL-10^{-/-} KM-Zellen weiter an (Abb. 3.17 C). Auffallend ist, dass erst zu diesem späten Zeitpunkt IFN- γ und IL-1 β nachweisbare Konzentrationen in der IL-10^{-/-} KM-Kultur erreichen. Im Gegensatz dazu ist lediglich die Sekretion von MIP-2, MIP-1 α , MIP-1 β und TNF bei MyD88^{-/-} KM-Zellen messbar. Dabei liegen die Werte für MIP-2 und TNF von MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} KM-Zellen weit unter dem Niveau von C57BL/6 und IL-10^{-/-} KM-Zellkulturen. Zu diesem späten Zeitpunkt (und bereits 5 hpi) produzieren C57BL/6 und TLR2^{-/-}/4^{-/-} KM-Zellen hohe Mengen an anti-inflammatorischem Zytokin IL-10 im Gegensatz zu den MyD88^{-/-} KM-Kulturen, die signifikant viel weniger IL-10 freisetzen. Erwartungsgemäß ist IL-10 nicht bei den IL-10^{-/-} KM-Kulturen nachweisbar. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die KM-Zellen von IL-10^{-/-} Mäusen signifikant schneller und mehr pro-inflammatorische Zyto- und Chemokine produzieren (G-CSF, IFN- γ , IL-6, KC, MCP-1 und IL-1 β) als C57BL/6, MyD88^{-/-} oder TLR2^{-/-}/4^{-/-} KM-Zellen. Daraus wird deutlich, dass IL-10 die Produktion/Sekretion dieser Zyto-/Chemokine inhibiert. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die KM-Kulturen von MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäusen eine ähnliche Kinetik der Zyto-/Chemokinfreisetzung nach der *Yersinia*-Infektion aufweisen.

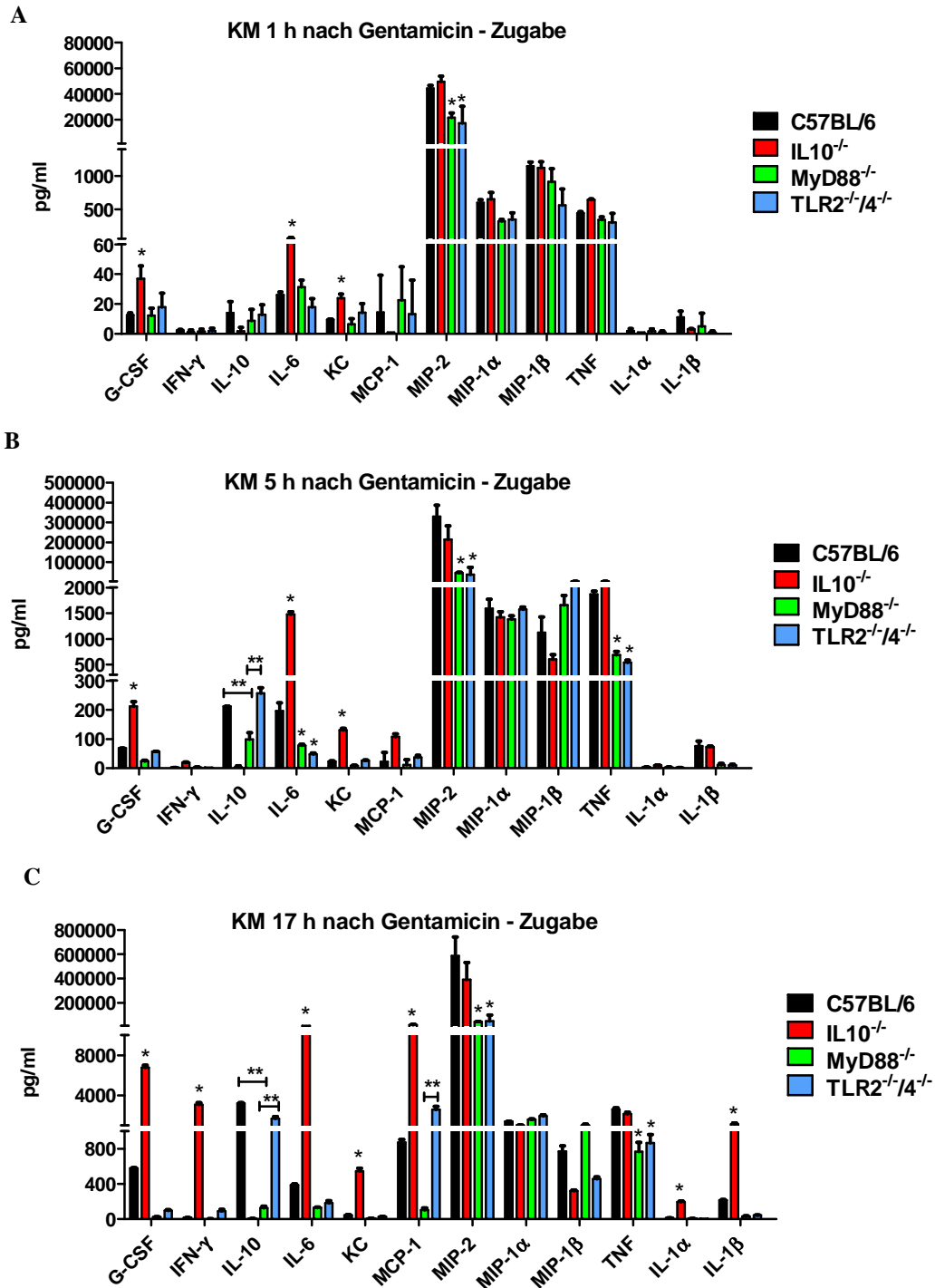


Abb. 3.17: Bestimmung der Konzentration (pg/ml) von sezernierten Zytokinen/Chemokinen durch Knochenmarkszellen (KM) nach *Yersinia*-Infektion in vitro zu verschiedenen Zeitpunkten 1 h (A), 5 h (B) und 17 h (C) nach Gentamicin-Zugabe. KM wurden mit der Dichte je 2×10^5 Zellen/"well" ausgesät und für 1 h mit *Y. enterocolitica* WA(pYV) inkubiert (MOI=10). Nach 1 h in vitro Infektion erfolgte Zugabe von Gentamicin um das Überwachsen der Zellen mit Yersinien zu verhindern. Die Zytokinsekretion im Überstand wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Zugabe von Gentamicin gemessen. Schwarz: C57BL/6 (wt), rot: IL-10^{-/-}, grün: MyD88^{-/-}, blau TLR2^{-/-}/4^{-/-}. Detektionsgrenze: 20 pg/ml. *p≤0,05 signifikant; **p≤0,01 sehr signifikant unterschiedlich zum Wildtyp. Der Versuch wurde in triplica durchgeführt.

3.2.2 Untersuchung der bakteriziden Eigenschaften der PMN

Neutrophile stellen die erste Barriere der angeborenen Immunität gegen bakterielle Erreger dar. Es konnte in den vorangehenden Untersuchungen gezeigt werden, dass die Neutrophilen (PMN) für die *Yersinia*-Resistenz eine Schlüsselrolle spielen. Hier soll untersucht werden, ob die Neutrophilen von IL-10^{-/-} Mäusen bakterizider wirken als die von C57BL/6 oder MyD88^{-/-} Mäusen.

Die Bildung von reaktiven Sauerstoffmediatoren (ROS), Stickstoffoxidradikalen (NO) und Hypochlorit (OCl⁻) von Phagozyten trägt wesentlich zur mikrobiziden Wirkung bei. Die Induktion von ROS- und NO-Produktion wird durch Zytokine und PAMP beeinflusst.

Es wurden deshalb vergleichende Untersuchungen zur ROS/NO-Bildung von Knochenmarkzellen und Proteose-Pepton-induzierten Peritonealzellen (PPiP-Zellen) der verschiedenen Mausstämme nach Infektion mit Yersinien durchgeführt.

Da die Knochenmarkzellen, wie bereits oben erwähnt, einen hohen Anteil an reifen Neutrophilen enthalten, wurden diese hinsichtlich ihrer Fähigkeit der Produktion von ROS/NO-Antwort nach einer *Yersinia*-Infektion untersucht. Dafür wurden KM-Zellen von C57BL/6, IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen mit dem reduzierten (farblosen) ROS/NO-Indikatorfarbstoff APF 30 Minuten inkubiert und anschließend mit Yersinien (MOI=10) 30 Minuten infiziert. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität des konvertierten APF-Farbstoffs in Phagozyten mittels FACS im FITC-Kanal gemessen. Dabei diente die Fluoreszenzintensität des umgesetzten Indikatorfarbstoffs als Maß für intrazelluläre ROS/NO-Bildung („oxidative burst“).

Neben der Bestimmung von gemittelten Fluoreszenzwerten der einzelnen PMN (Abb. 3.18 A) erlaubt die FACS-Analyse auch die Bestimmung des Anteils der Zellen, die ROS/NO produziert haben (Anteil der *Yersinia*-phagozytierenden Zellen). Dabei wurde der Anteil von PMN (Ly-6G⁺-Zellen) an den gesamten Knochenmarkzellen als FITC⁺-PMN bezeichnet und in Prozent ausgedrückt (Abb. 3.18 B).

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Mittelwerten der Fluoreszenzintensität von *Yersinia*-infizierten Knochenmarkzellen des jeweiligen Mausstammes festgestellt werden (Abb. 3.18 A). Zum Vergleich wurde die avirulente Ysc-T3SS defekte Δ LcrD-Mutante verwendet, die keine Phagozytose-inhibierenden Yops translozieren kann und entsprechend höhere Fluoreszenzwerte (ROS-Werte) bedingt, was auf erhöhte Phagozytoserate hinweist (Positivkontrolle der ROS/NO-Produktion).

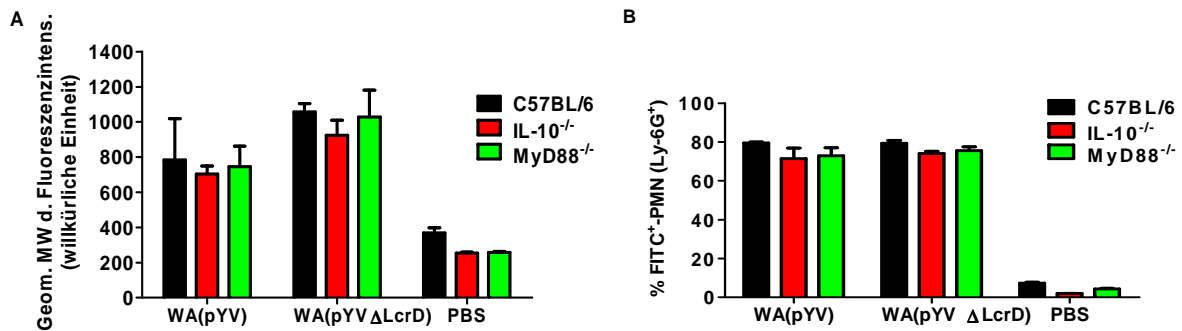


Abb. 3.18: ROS/NO-Produktion von Knochenmarkzellen (KM) von C57BL/6 (wt), IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen nach Infektion mit WA(pYV) und WA(pYVΔLcrD). KM wurden mit der Dichte von je 5x10⁵ Zellen/“well“ ausgesät und mit dem reduzierten (nicht-fluoreszierend) membrandurchgängigen Farbstoff APF 30 Min inkubiert. Anschließend wurden die KM-Zellen mit *Y. enterocolitica* WA(pYV) oder WA(pYVΔLcrD) für 30 Min infiziert (MOI=10). Die Produktion von ROS/NO wurde anhand der Fluoreszenzintensität von oxidiertem APF-Farbstoff im FITC-Kanal gemessen. **A.** Geometrischer Mittelwert (MW) der Fluoreszenzintensität. **B.** %-Anteil von FITC⁺- (ROS/NO-produzierenden) Neutrophilen. Schwarz: C57BL/6, rot: IL-10^{-/-}, grün: MyD88^{-/-}. KM-Zellen stammen jeweils aus einer Maus pro Mausstamm. Der Versuch wurde dreimal in triplica wiederholt.

Erwartungsgemäß sind die Werte für Fluoreszenzintensität nach der Infektion mit WA(pYVΔLcrD) höher als mit dem WA(pYV) (wt), der die ROS/NO-Bildung hemmt. Als Negativkontrolle wurden die KM-Zellen in PBS/APF ohne Yersinien inkubiert. Hier beträgt die durchschnittliche Fluoreszenzintensität bei allen Mauszellen ca. 200 Lichteinheiten. Es liegt daran, dass PMN sehr empfindliche Zellen sind und bei Resuspension bereits ROS/NO in geringen Mengen produzieren. Auch unter diesen Bedingungen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Aktivitäten der Knochenmarkzellen von C57BL/6, IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen festgestellt. Interessant ist, dass die Anzahl der FITC⁺-PMN aller drei Mausstämme für beide *Yersinia*-Stämme gleich ist (Abb. 3.18 B).

Bei der intraperitonealen *Yersinia*-Infektion in vivo, spielen die PMN, die in den Bauchraum einwandern, eine entscheidende Rolle in der Initialphase der Erregerkontrolle. Es wurde deshalb die bakterizide Wirkung der immigrierten intraperitonealen Neutrophilen untersucht. Um die Einwanderung von Neutrophilen in den Peritonealraum zu induzieren, wurde bei C57BL/6, IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen eine sterile Peritonitis mittels 10%-Proteose-Pepton induziert. 4 Stunden später erfolgte eine Peritoneallavage, die üblicherweise einen hohen Anteil an Proteose-Pepton- (PP-) induzierten Neutrophilen (PPiN) enthält. Die PPiN wurden mit APF-Farbstoff beladen und mit Yersinien (MOI=10) 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde ROS/NO-Produktion mittels FACS bestimmt (Abb. 3.19).

Wie aus der Abbildung 3.19 A deutlich wird, weisen PPiN von der MyD88^{-/-} Maus eine signifikant niedrigere Kapazität der Phagozytose/ROS/NO-Produktion als PPiN von C57BL/6 und IL-10^{-/-} Mäusen. Aus diesem Versuch wird deutlich, dass die ΔLcrD-Mutante eine erhöhte Phagozytoserate/ROS/NO-Produktion gegenüber dem virulenten WA(pYV)-Stamm

aufweist. Die PPI_N von IL-10^{-/-} Maus zeigen einen leicht höheren %-Anteil von FITC⁺-PMN als die PPI_N von C57BL/6 (Abb. 3.19 B). Im Vergleich dazu, weisen die PPI_N der MyD88^{-/-} Maus den niedrigsten %-Anteil von FITC⁺-PMN auf. Interessanterweise zeigen die PPI_N von C57BL/6 und IL-10^{-/-} Mäusen keine Unterschiede in der ROS/NO-Produktion. Phagozytose/ROS/NO-Aktivität von PPI_N der drei Mausstämme ist für die sekretionsdefekte ΔLcrD-Mutante erwartungsgemäß stärker ausgeprägt als für den virulenten WA(pYV)-Stamm (Abb. 3.19).

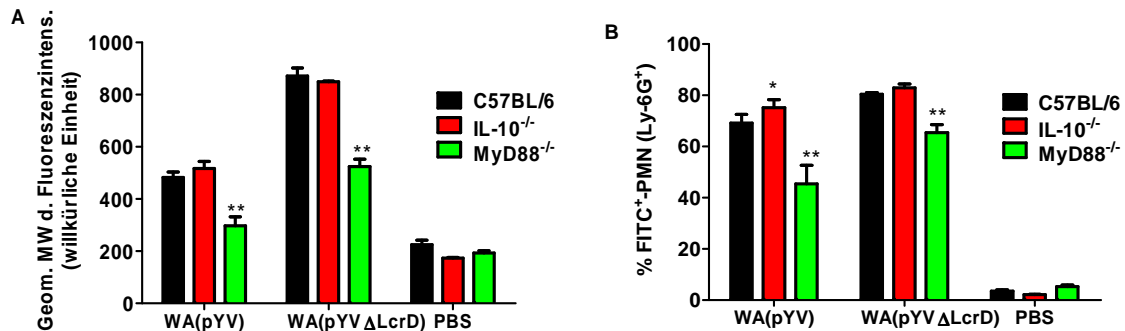


Abb. 3.19: Bestimmung der ROS/NO-Produktion von PPI_N nach der Infektion mit Yersinien in vitro. PPI_N wurden mit der Dichte von je 5x10⁵ Zellen/“well“ ausgesät und mit dem reduzierten (nicht-fluoreszierend) membrandurchgängigen Farbstoff APF 30 Min inkubiert. Anschließend wurden die PPI_N mit *Y. enterocolitica* WA(pYV) oder WA(pYVΔLcrD) für 30 Min infiziert (MOI=10). Die Produktion von ROS/NO wurde anhand der Fluoreszenzintensität von oxidiertem APF-Farbstoff im FITC-Kanal gemessen. **A.** Geometrischer Mittelwert (MW) der Fluoreszenzintensität. **B.** %-Anteil von FITC⁺- (ROS/NO-produzierenden) PMN von gesamten PPI_N. Schwarz: C57BL/6, rot: IL-10^{-/-}, grün: MyD88^{-/-}. Die PPI_N stammen jeweils aus einer Maus pro Mausstamm. *p≤0,05 signifikant; **p≤0,01 sehr signifikant unterschiedlich zum Wildtyp. Der Versuch wurde dreimal in triplica wiederholt.

4. Diskussion

4.1 Identifizierung von *Yersinia*-Infektionsempfänglichkeitsgenen bei der C57BL/6 Maus

Die angeborene Immunität bestimmt in der initialen Infektionsphase die Abwehreffizienz bakterieller Erreger. Die Zellen der angeborenen Immunität erkennen hochkonservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster („*pathogen-associated molecular patterns*“, PAMP), die charakteristisch für ein breites Spektrum von Mikroorganismen sind. PAMP werden durch „*pattern-recognition receptors*“ (PRR) erkannt, die bei Zellen der angeborenen Immunität weit verbreitet sind. Die PAMP-PRR Interaktion ermöglicht es, dem Immunsystem auf das Eindringen von Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten adäquat zu reagieren und durch Freisetzung von pro-inflammatorischen Modulatoren (Zytokine und Chemokine) die Infektabwehr und die adaptierte Immunantwort zu programmieren. Die differenzielle Produktion der PRR (wie z.B. TLR und NOD) von Immunzellen bedingt ein charakteristisches Zytokinmuster, das durch verschiedene pathogene Organismen unterschiedlich induziert wird (Trinchieri, 2003). Neben den pro-inflammatorischen Zyto- und Chemokinen (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α) werden ebenfalls anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und IL-1Ra als Folge der PAMP-Erkennung freigesetzt, um eine überschüssige Immunreaktion und Gewebeschädigung zu vermeiden. Demzufolge spielt die angeborene Immunität auch eine Rolle bei der Gewebearchitektur und der Kompartimentierung der lymphatischen Organe (wie z.B. Milz). In der Initialphase der Infektion werden Erreger durch Effektorzellen der angeborenen Immunität (Makrophagen, DZ, Mastzellen, PMN und NK-Zellen) erkannt und bekämpft. Falls die angeborene Immunität nicht in der Lage ist, die Infektionserreger initial zu eliminieren, wird die adaptive Immunität aktiviert. Die Effektorzellen der adaptiven Immunität (T- und B-Lymphozyten) generieren eine spezifische Erkennung der Erreger (Antikörper) oder erregerspezifische Killerzellen (CD8⁺ T-Zellen). Dieser Mechanismus ermöglicht zwar eine große spezifische Variabilität der Erregererkennung, setzt aber zum späteren Infektionszeitpunkt ein. DZ stellen eine entscheidende Schnittstelle zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität dar (Janeway, Jr. and Medzhitov, 2002). Nach der TLR-vermittelten Induktion der Erregerabwehr, wandern DZ in die Lymphknoten und präsentieren prozessierte Antigene über MHC-Komplex an naive T-Zellen, die dadurch zur Reifung stimuliert werden (Banchereau and Steinman, 1998). Ein weiteres essentielles Bindeglied zwischen der angeborenen Resistenz und adaptiven Immunität stellt Interleukin-12 (IL-12) dar. IL-12 wird von phagozytierenden Zellen wie Makrophagen, Neutrophilen und DZ nach Aktivierung der TLR-Signalwege produziert und

stimuliert neben der IFN- γ Produktion auch die Differenzierung von T_H1-Zellen (Trinchieri, 2003). Da die adaptive Immunantwort erst nach ca. 5-8 Tagen nach der Infektion aktiv wird, spielt die adaptive Immunität keine Rolle während der initialen Phase (0-72 h) der Infektion. Aus diesem Grund sollte in dem hier untersuchten *Yersinia*-Mausinfektionsmodell nur die angeborene Immunantwort bei der *Yersinia*-Infektionsabwehr eine Rolle spielen.

Vor ca. 25 Jahren wurde bereits beschrieben, dass unterschiedliche Inzuchtmausstämme unterschiedlich empfindlich gegenüber mausvirulenter *Yersinia enterocolitica* O:8 Infektion sind. So erwiesen sich C57BL/6 Mäuse resistenter bei intravenöser (iv) Applikation (LD₅₀ 2x10²) im Vergleich zu BALB/c Mäusen (LD₅₀ 2x10⁵) (Hancock et al., 1986). Dieser Unterschied in der Empfindlichkeit ist nicht mit dem murinen „major histocompatibility complex“ (MHC) H-2 assoziiert und steht wahrscheinlich unter einer multigenetischen Kontrolle (Hancock et al., 1988). Autenrieth zeigte, dass die Produktion von IFN- γ durch *Yersinia*-spezifische T-Zellen mit der Resistenz von C57BL/6 Mäusen gegen *Y. enterocolitica* assoziiert ist (Autenrieth et al., 1994). Des Weiteren wurde gezeigt, dass IL-12 und IL-18 (IFN- γ inducing factor) ausschlaggebend für die Resistenz bzw. Empfindlichkeit gegen eine parenterale (iv) *Yersinia*-Infektion sind (Bohn et al., 1998; Bohn and Autenrieth, 1996). Dabei induzieren IL-12 und IL-18 die INF- γ -Produktion von NK-Zellen, was die *Yersinia*-Infektionsresistenz fördert. In vivo und in vitro Versuche zeigten, dass *Yersinia*-empfindliche BALB/c Mäuse weniger abwehrtaktivierende IL-12 und IL-18 bzw. mehr abwehrdämpfende Zytokine wie IL-10 produzieren als *Yersinia*-resistente C57BL/6 Mäuse (Tansini and de Medeiros, 2009). Ein weiterer Faktor, welcher die Resistenz bzw. die Empfänglichkeit für eine Infektion beeinflusst, ist die frühe Erkennung der Erreger durch das angeborene Immunsystem. Während einer *Yersinia*-Infektion besiedeln die Bakterien lymphatisches Gewebe wie Peyer-Plaques in der Darmwand, mesenteriale Lymphknoten, sowie Milz und Leber und bilden in diesen Organen Mikrokolonien (Trulzsch et al., 2007). Durch frühzeitige Erkennung von Erregern kann der Wirt schneller mit der angeborenen Infektabwehr reagieren und möglicherweise die sich vermehrenden Erreger effizienter eliminieren.

Bisher konnte als spezifischer Agonist für TLR2 das Protein LcrV, eine Komponente des Ysc-T3SS, beschrieben werden (Sing et al., 2002b). Welche weiteren PAMP von *Y. enterocolitica* während der Frühphase der Infektion bzw. für die Infektionsempfänglichkeit eine Rolle spielen, war bisher nicht genau bekannt. In dieser Arbeit wurden deshalb C57BL/6 Mausstämme mit deletierten Genen für Rezeptoren bakterieller PAMP (CD14^{-/-}, TLR2^{-/-}, TLR2^{-/-}/CD14^{-/-}, TLR4^{-/-}, TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}, NOD1^{-/-}, NOD2^{-/-} und NOD1^{-/-}/NOD2^{-/-}) sowie deren Adaptorproteine der TLR-Signaltransduktionskaskade (MyD88^{-/-}, TRIF^{-/-}) und NOD1/2-Signaltransduktion (RIP2^{-/-}) auf *Yersinia enterocolitica* Empfänglichkeit umfassend

untersucht. Da die PAMP-Stimulation zuerst zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6, TNF- α) und mit Verzögerung zu anti-inflammatorischen Zytokinen (z. B. IL-10 und IL-1Ra) führt, wurden auch IL-10^{-/-} und IL-1Ra^{-/-} Mäuse in die Versuche einbezogen. Hierbei wurden auch immunhistologische Untersuchungen der uninfizierten und infizierten Milzen durchgeführt, um durch die Infektion verursachte Gewebeveränderungen mikroskopisch sichtbar zu machen. Dabei sollten sowohl der zelluläre Aufbau der Milz als auch die Verteilung immunologisch wichtiger Zellpopulationen im Peritonealraum und der Milz charakterisiert werden. Eine mögliche Erklärung für die differenzielle *Yersinia*-Empfänglichkeit könnten unterschiedliche Mikromilieus im Bereich der Mikroabszesse sein. Der zweite Teil der Arbeit befasst sich daher mit der Zyto-/Chemokinantwort und den zellulären Infiltraten in den jeweiligen Infektionsbereichen (Peritonealraum, Milz). Daraus sollten Rückschlüsse auf zelluläre Mechanismen gezogen werden, welche unterschiedliche *Yersinia*-Empfänglichkeiten bestimmen.

Im Vergleich zu BALB/c Mäusen zeigen C57BL/6 Mäuse eine höhere Resistenz gegenüber *Y. enterocolitica* Infektion (geringere Keimzahl und längere Lebensdauer). C57BL/6 Mäuse mit Defekten in der angeborenen Immunantwort (TLR- oder NOD-Signalkaskade) sind damit geeigneter als BALB/c Mäuse, um eine Resistenzminderung festzustellen. Darüber hinaus sind die meisten Defektmutanten im C57BL/6-genetischen Hintergrund erhältlich.

In dieser Arbeit wurde statt einer peroralen *Yersinia*-Applikation die intraperitoneale Applikation gewählt. Bei der *Yersinia*-Darminfektion beeinflusst die physiologische Darmbesiedlung die Infektion der PP. Beide Infektionswege führen zur Dissemination der Yersinien in Milz und Leber, wobei die ip-Applikation reproduzierbarere Ergebnisse für Keimzahlen in der Milz liefert als die perorale Applikation (größere Variation der effektiven Dosis am Invasionsort Dünndarmmukosa/Darmepithel der PP, wodurch die Erregerdissemination vorbestimmt wird).

Als Parameter des Empfänglichkeitsgrades der verschiedenen Mausstämme, wurde die bakterielle Keimzahl (CFU) in der Milz bestimmt. Wie in Tab. 3.1 dargestellt ergaben sich 3 Gruppen der *Yersinia*-Empfänglichkeit:

- (1) ***Yersinia*-hochresistente Mäuse Ye-HR** (IL-10^{-/-} und IL-1Ra^{-/-}),
- (2) **Wt-ähnlich resistente Mäuse Ye-R** (C57BL/6, TLR2^{-/-}, CD14^{-/-}, TLR2^{-/-}/CD14^{-/-}, TLR4^{-/-}, NOD1^{-/-}, NOD2^{-/-}, NOD1^{-/-}/2^{-/-}, RIP2^{-/-}, TRIF^{-/-}) und
- (3) ***Yersinia*-hochempfindliche Mäuse Ye-HS** (MyD88^{-/-}, TLR2^{-/-}/4^{-/-} und TRIF^{-/-}/MyD88^{-/-}).

In dieser Arbeit wurde die entscheidende Rolle der MyD88-abhängigen Signalwege über TLR2/CD14 und TLR4/CD14 für die *Yersinia*-Erkennung nachgewiesen.

CD14 ist ein Glykoprotein, welches bei der Erkennung von LPS eine wichtige Rolle spielt. CD14 kann entweder als ein Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-verankertes Molekül in der Zellmembran oder in der gelösten Form in Blutserum vorliegen (Jerala, 2007).

Da CD14^{-/-} Mäuse sich gegenüber *Yersinia*-Infektion wie CD14^{+/+}.C57BL/6 Mäuse verhalten, spielt CD14 wider Erwarten keine bedeutende Rolle für die *Yersinia*-Erkennung. Dieser Befund wird auch durch verschiedene Publikationen unterstützt. LPS ist ein wichtiger Bestandteil der Außenmembran von gramnegativen Bakterien. Als ein Schlüsselerkennungsmerkmal für die Wirtsimmunzellen ist LPS ein starker Initiator der inflammatorischen Antwort zur Infektion. LPS besteht aus drei Regionen: der O-Polysaccharidkette (O-Antigen), welche aus sich wiederholenden Polysaccharid-untereinheiten zusammengesetzt wird, dem Kern-Oligosaccharid und dem Lipid A, welches für die Endotoxizität des gesamten Moleküls verantwortlich ist (Huber et al., 2006). LPS kann von verschiedenen Mutanten in unterschiedlichen Formen produziert werden, z.B. in der S-Form (glatt, engl. „smooth“ = Anwesenheit der O-Seitenkette) und in der R-Form (rau, engl. „rough“ = fehlende O-Kette). S- und R-LPS zeigen erhebliche Unterschiede in der Kinetik ihrer zellulären Aufnahme und Aktivierung des Komplementsystems des Wirts sowie der Induktion der Immunantwort (Huber et al., 2006). Die äußere Membran der gramnegativen Bakterien besteht aus hoch heterogenen LPS-Molekülen mit unterschiedlicher Anzahl der repetitiven O-Antigeneinheit bis hin zur R-Form. Darüber hinaus können Bakterien auch hypoacyliertes (statt 6 Fettsäureketten nur 4 Fettsäureketten) LPS mit schwacher Endotoxinwirkung produzieren.

Der erste Schritt der LPS-Erkennung durch die angeborene Immunität beginnt mit der Bindung/Komplexierung durch das LPS-bindende Protein („LPS-binding protein“, LBP) im Plasma und dem anschließenden Austausch von LPS:LBP zu LPS:CD14 (Jerala, 2007).

CD14 bindet LPS an der Zelloberfläche und fördert die Bindung von LPS an den TLR4/MD-2 Komplex (Miyake, 2004). In der Abwesenheit von CD14 oder TLR4 ist die LPS-induzierte inflammatorische Antwort stark reduziert (Hoshino et al., 1999).

Für *Yersinia pestis* wurde gezeigt, dass dieser Erreger bei 37°C überwiegend ein immunstimulatorisch schwaches tetraacyliertes LPS und bei 21°C-26°C ein hexaacyliertes LPS (starkes Endotoxin) produziert (Kawahara et al., 2002; Rebeil et al., 2006). Das modifizierte LPS von *Y. pestis* wird durch TLR4/MD-2 schlechter erkannt, was wahrscheinlich die inflammatorische Reaktion verzögert oder dämpft (Montminy et al., 2006). Es wurde ebenfalls nachgewiesen, dass auch *Y. enterocolitica* Stamm 8081, Serotyp O:8, bei 21°C hexaacyliertes und bei 37°C überwiegend tetraacyliertes Lipid A produziert (Perez-Gutierrez et al., 2010). *Y. enterocolitica* Serotyp O:3 produziert bei 37°C weniger immunreaktives S-LPS und mehr R-LPS (Ogasawara et al., 1985). Außerdem wurde eine

spontane R-Mutante von *Y. enterocolitica* O:8 beschrieben, die Lipid A fast ausschließlich in tetraacylierter Form produziert (Oertelt et al., 2001).

Verschiedene Studien belegen, dass die Rolle von CD14 für die Aktivierung der TLR4 Rezeptoren durch R-LPS unklar ist (Jiang et al., 2005; Huber et al., 2006). Jiang hat gezeigt, dass CD14 für die MyD88-abhängige Freisetzung von TNF- α nach der Stimulation von Makrophagen mit R-LPS nicht benötigt wird. Diese Feststellungen könnten auch für die *Y. enterocolitica*-Infektion zutreffen, d.h. dass CD14 keine bedeutende Rolle für die *Yersinia* LPS-Erkennung haben könnte. Diese Annahme wird durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse unterstützt, da CD14^{-/-} Mäuse sich gegenüber *Y. enterocolitica* wie die CD14^{+/+} Mäuse verhalten. Im Gegensatz zum *Yersinia*-LPS benötigt das sezernierte LcrV CD14, um eine immunmodulatorische Fernwirkung über die TLR2/CD14-Signalkaskade auszulösen, die zur IL-10 Freisetzung führt (Sing et al., 2002b). Die Rolle von CD14 für die LcrV-Stimulation von TLR2 wurde allerdings nur für in vitro (Zellkultur) beschrieben. Hier konnte CD14 keine besondere Rolle für die Infektionsempfänglichkeit zugewiesen werden.

TLR2 erkennt Lipoprotein und Peptidoglykan in der bakteriellen Zellwand insbesondere von grampositiven Bakterien (Testro and Visvanathan, 2009). TLR2 kann Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 bilden. Der TLR1/TLR2-Komplex erkennt triacyliertes Lipopeptid (Akira et al., 2006) und ist wichtig für die Immunantwort gegen *Neisseria meningitidis* (Wyllie et al., 2000). TLR6/TLR2-Komplex erkennt diacyliertes Lipopeptid und ist essentiell für die Erkennung von *Staphylococcus aureus* (Ozinsky et al., 2000). TLR2 spielt ebenfalls eine Rolle bei der Erkennung von endogenen Agonisten wie z.B. Hitzeschockproteine, die während des Zellsstress freigesetzt werden. **TLR4** ist bekannt als LPS-Rezeptor und erkennt ein breites Spektrum von Liganden, die mit gramnegativen Bakterien assoziiert sind (Testro and Visvanathan, 2009). TLR4 erkennt auch „*damage-associated molecular patterns*“ (DAMP), d.h. Signalmoleküle, wie Hitzeschockproteine, β -Defensine, Fibronectin, Hyaluronanfragmente oder Heparansulfate, die beim Zellstress oder während Nekrose in die Blutbahn freigesetzt werden (Land, 2005).

A. Sing hat beschrieben, dass TLR2-defiziente Mäuse bei einer peroralen *Y. enterocolitica*-Infektion weniger empfänglich sind, als TLR2^{+/+}.C57BL/6 Mäuse (Sing et al., 2005). Die Autoren erklärten dieses Ergebnis durch ein Modell, in dem LcrV spezifisch die Expression von IL-10 über TLR2 induziert, was zu einer Dämpfung der inflammatorischen Zytokin-Antwort führt. Dieser Befund konnte für die intraperitoneale Infektion der TLR2^{-/-} Mäuse in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Allerdings konnten die Ergebnisse der peroralen *Y. enterocolitica* Infektion von TLR2^{-/-} Mäusen von A. Sing nicht reproduziert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen ebenfalls im Einklang mit der Publikation von R. Isberg, der gezeigt hat, dass TLR2^{-/-} Mäuse keine geminderte Anfälligkeit gegenüber wt nach

einer intraperitonealen Infektion mit *Y. enterocolitica* O:8 und *Y. pseudotuberculosis* aufweisen (Auerbuch and Isberg, 2007). Da die Gruppe von R. Isberg einen anderen *Y. enterocolitica* Stamm (8081) als von A. Sing und in dieser Arbeit (Stamm WA-314/WA(pYV)) benutzt haben, kann dieser Widerspruch noch nicht endgültig geklärt werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass TLR2^{-/-}.C57BL/6 oder TLR4^{-/-}.C57BL/6 Mäuse eine sehr ähnliche *Yersinia*-Empfänglichkeit wie der C57BL/6-Stamm aufweisen. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Stimulierung von TLR2 oder TLR4 ausreicht, um eine pro-inflammatorische Reaktion wie bei wt-Mäusen auszulösen (Redundanzprinzip). Des Weiteren ist es vorstellbar, dass die intrazellulären PR-Rezeptoren wie NOD1 und NOD2, die ebenfalls Peptidoglykan der bakteriellen Zellwand erkennen, die Abwesenheit von TLR2 und umgekehrt kompensieren könnten. Es konnte eine Tendenz für eine erhöhte Empfänglichkeit von TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} Mäusen als C57BL/6 Mäuse festgestellt werden, allerdings hat sich diese als nicht signifikant erwiesen. Da CD14, wie bereits oben diskutiert, keine besondere Rolle für die *Yersinia*-Infektionsempfänglichkeit in vivo spielt, wird das Fehlen von TLR2/CD14 in diesen *ko*-Mäusen offenbar durch den anwesenden TLR4 kompensiert. Im Gegensatz zu TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} Mäusen, zeigen TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäuse eine sehr hohe Letalität bereits in einer frühen Phase der Infektion. Ähnliche Befunde wurden auch für die Salmonellen-Infektionsempfänglichkeit von TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und wt-Mäusen berichtet, während TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-} und MyD88^{-/-} Mausstämme vergleichbar mit den hier erzielten Ergebnissen, als hochempfindlich beschrieben worden sind (Weiss et al., 2004). Aus dieser Arbeit hat sich ergeben, dass erst die Deletion von *tlr2* und *tlr4* Genen zur erhöhten Empfänglichkeit der Mäuse für *Y. enterocolitica* führt und die Defizienz von diesen beiden TLR von keinen anderen PRR kompensiert werden kann.

MyD88 ist ein essentielles Adaptormolekül für TLR-Signalwege. MyD88 und TIR-Domäne-enthaltendes Adaptorprotein (TIRAP; auch bekannt als „MyD88 adaptor-like“; MAL) binden nach der TLR-Ligandenbindung an die TIR-Domäne der TLR wodurch der Signalweg aktiviert wird, was zur Aktivierung von MAPK- und NF-κB und anschließender Produktion von Zyto- und Chemokinen führt (Medzhitov et al., 1998; Yamamoto et al., 2003a).

Neben dem MyD88-abhängigen Signalweg kann TLR4 auch den TRIF-abhängigen Weg aktivieren (TLR3 ist ein ausschließlich TRIF-abhängiger PRR, der durch dsRNA stimuliert wird). In einer MyD88-unabhängiger Signalkaskade werden zu den aktivierten TLR3 und TLR4 andere Adaptormoleküle wie **TRIF** („TIR-domain-containing adaptor inducing IFN-β“; auch TICAM-1 genannt) und TRAM („TRIF-related adaptor molecule“) rekrutiert. Dieser TRIF-abhängige Signalweg führt einerseits über TRAF6 zur Aktivierung von NF-κB und MAPK und andererseits über TBK1 zur Phosphorylierung des Interferon-regulatorischen Faktors (IRF)-3 mit nachfolgender IFN-α/β-Produktion (Yamamoto et al., 2003a).

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass TRIF^{-/-} Mäuse eine C57BL/6-ähnliche Empfänglichkeit gegenüber *Y. enterocolitica* aufweisen. Wahrscheinlich wird die unterbrochene TRIF-abhängige Signalkaskade über MyD88-abhängigen TLR2/4-Signalweg kompensiert. Die Rolle von TRIF für die Infektionsabwehr gegen bakterielle Erreger ist nicht eindeutig und hängt wahrscheinlich von der Erregerart ab. So besitzt TRIF eine wichtige Rolle bei der Immunantwort gegen *E. coli* (Jeyaseelan et al., 2007) und *P. aeruginosa* (Power et al., 2007), während keine Rolle für die Infektionsempfänglichkeit mit *H. influenzae* (Wieland et al., 2005) oder *B. pseudomallei* (Wiersinga et al., 2008) nachgewiesen werden konnte. Die Arbeiten von K. Ruckdeschel haben gezeigt, dass TRIF an der pro-apoptotischen Reaktion von *Yersinia*-infizierten Makrophagen beteiligt ist, wobei die TRIF-Defizienz die *Yersinia* YopP-induzierte Apoptose unterbindet (Ruckdeschel et al., 2004). Die Autoren diskutieren, dass pro-apoptotische Aktivität von TRIF als ein Teil der angeborenen Immunantwort gegen bakterielle und virale Infektionserreger gerichtet ist. Falls *Yersinia*-induzierte Apoptose über YopP (Inhibierung von NF-κB sowie MAP-Kinasen und damit anti-apoptotischen Faktoren) und TRIF für den Wirt vorteilhaft wäre, dann sollte sich dies in einer veränderten *Yersinia*-Empfänglichkeit widerspiegeln. Da die TRIF-abhängige Apoptose nur im Zusammenhang mit transloziertem YopP bei *Y. enterocolitica* in vitro beschrieben wurde, ist nicht ausgeschlossen, dass dieser Effekt in vivo keine wichtige Rolle spielt.

Während TLR4 und TLR3 den Adaptor TRIF für die Signaltransduktion nutzen, spielt der Adaptor MyD88 eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion von TLR2, TLR4, TLR7, TLR8 und TLR9 sowie von IL-1- und IL-18-Rezeptoren. Es ist deshalb nicht überraschend, dass MyD88-defiziente Mäuse als hoch empfänglich für grampositive und gramnegative Bakterien, wie z.B. *Staphylococcus aureus* (Takeuchi et al., 2000), *Klebsiella pneumoniae* (Cai et al., 2009), *Pseudomonas aeruginosa* (Power et al., 2004), *Legionella pneumophila* (Hawn et al., 2006) oder *Mycobacterium avium* (Feng et al., 2003) beschrieben wurden. Erwartungsgemäß erwiesen sich MyD88^{-/-} Mäuse auch für die *Y. enterocolitica* Infektion als hochempfänglich.

Da TRIF^{-/-}/MyD88^{-/-} Mäuse (ca. 50% Letalität 2 dpi bei Infektionsdosis 5x10³ CFU) noch empfänglicher als MyD88^{-/-} Mäuse (ca. 50% Letalität 3 dpi) sind, kann davon ausgegangen werden, dass sowohl der MyD88-Signalweg (MAPK-, NF-κB-Aktivierung) als auch der TRIF-Signalweg (MAPK- und NF-κB-Aktivierung, sowie IRF3/7 mit IFN-α/β und Apoptose-Induktion) an der Wirtsabwehr von Yersinien beteiligt sind.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der hohen Infektionsempfänglichkeit (Ye-HS) von TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen und MyD88^{-/-} Mäusen darauf hin, dass Yersinien, ähnlich wie andere gramnegative Bakterien, initial die Wirtsabwehr über die TLR2- und TLR4-Signalwege gleichermaßen induzieren. Dies könnte erklären, warum die Einzeldelation des *tlr2*- oder *tlr4*-

Gens nicht ausreicht, um eine deutliche Erhöhung der *Yersinia*-Empfänglichkeit zu bewirken. Die MyD88^{-/-} Maus kann über TRIF verzögert MAP-Kinasen, NF-κB und IRF3/7 aktivieren und damit ein breites Spektrum von pro-inflammatorischen Zyto-/Chemokinen freisetzen. Allerdings können IL-1α, IL-1β, IL-18 und partiell IFN-γ nicht über ihre korrespondierenden Rezeptoren eine Signalkaskade induzieren, da diese Rezeptoren MyD88-abhängig sind. Dagegen sind die Rezeptoren für TNF-α, IL-6 und IFN-α MyD88-unabhängig und könnten somit eine partielle Aktivierung der Wirtsabwehr bewirken im Gegensatz zu TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen, die initial offenbar durch *Yersinia*-PAMP nicht stimuliert werden. Hier ist erwähnenswert, dass die in vivo Neutralisierung von TNF-α oder IFN-γ mit Antikörper zu einer starken Erhöhung der *Yersinia*-Empfänglichkeit von Mäusen geführt hat, was die Bedeutung dieser Zytokine für die *Yersinia*-Abwehr unterstreicht (Autenrieth and Heesemann, 1992).

Zu den zytosolischen PAMP-Rezeptoren für Peptidoglykanfragmente gehören NOD1 und NOD2. **NOD1** erkennt γ-D-Glutamyl-*meso*-Diaminopimelinsäure (*meso*-DAP), die in der Proteoglykan-Zellwand von allen gramnegativen und bestimmten grampositiven Bakterien, wie *Listeria* und *Bacillus*, vorkommt (Chamaillard et al., 2003). **NOD2** dagegen wird durch Muramyldipeptid (MDP) aktiviert, einem Peptidoglykanmotiv, das in grampositiven und gramnegativen Bakterien vorkommt (Girardin et al., 2003). Diese Liganden induzieren eine Konformationsänderung, die zur Homooligomerisierung der NOD-Rezeptoren führt, wonach es dann zur Rekrutierung der Serin/Threonin-Kinase RICK (**RIP2**) kommt, die anschließend NF-κB und MAPK-Signalwege induziert (Inohara et al., 2000).

NOD1^{-/-}, NOD2^{-/-}, NOD1^{-/-}/NOD2^{-/-} und RIP2^{-/-} Mäuse weisen eine C57BL/6-ähnliche Empfänglichkeit gegenüber einer intraperitonealen *Y. enterocolitica* Infektion auf (Abb. 3.1). Dieser Befund wird durch die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe unterstützt, die gezeigt hat, dass NOD2^{-/-} Mäuse zwar bei einer oralen Infektion mit *Y. pseudotuberculosis* resistenter als wt-Mäuse sind, nicht aber bei einer intraperitonealen Infektion (Meinzer et al., 2008). Dieser Befund ähnelt damit dem von TLR2^{-/-} Mäusen (Sing et al., 2002b). Das Zusammenspiel bzw. die Komplementarität der TLR und NOD in dem *Yersinia*-Infektionsmodell kann wie folgt erklärt werden:

TLR2 erkennt, neben Lipoteichonsäuren (LTA) von grampositiven Mikroorganismen, auch Peptidoglykan (PG) (Anas et al., 2010). LTA und PG aktivieren über TLR2 die MyD88-abhängige NF-κB-Translokation in den Zellkern. CD14 verstärkt dabei die TLR2-Signaltransduktionskaskade und ist wahrscheinlich auch an der Endozytose des PG mit niedrigem Molekulargewicht (z.B. Muramyl-Dipeptid) beteiligt. Anschließend könnte PG das Endosom verlassen und die intrazellulären NOD-Rezeptoren stimulieren. Wenn TLR2 deletiert wird, werden Yersinien über TLR4 und NOD-Rezeptoren erkannt. Die Erkennung

von LPS und PG findet trotz fehlendem TLR2 statt. Wenn TLR4 deletiert wird, werden Yersinien über TLR2 und NOD-Rezeptoren erkannt. Auf Grund dieser Redundanz der PAMP-Rezeptoren kommt es beim Fehlen eines PRR trotzdem noch zu einer adäquaten Immunantwort. Außerdem besitzt *Yersinia*-LPS bei 37°C im Wirt vermutlich schwach-immunogene Eigenschaften (hypoacyliertes LPS mit 4 statt 6 Fettsäureresten), wie bereits oben diskutiert. Es sollte daher geprüft werden, ob 37°C-LPS TLR2 und TLR4 stimuliert, wobei CD14 eine untergeordnete Rolle spielen könnte. Andererseits spielt CD14 eventuell eine wichtige Rolle für LPS/CD14/TLR4-Endozytose, die Voraussetzung für den TRIF-Signalweg ist. Die Abwesenheit von TLR2 und TLR4 führt zu einer Hyperempfindlichkeit für *Y. enterocolitica*, da weder LPS noch PG erkannt werden können und demzufolge keine MyD88-abhängige Signalwege induziert werden. Da NOD1/2 Rezeptoren nur die Proteoglykanfragmente erkennen, muss PG erst endozytiert und prozessiert werden um den NOD/RIP2-Signalweg anzuschalten. Es gibt Hinweise auf den Zusammenhang von TLR2 und NOD1/2-Signalwegen (Strober et al., 2006), wonach es plausibel ist, dass PG mit Hilfe von TLR2 erst in die Zelle aufgenommen werden muss. Deswegen kann der NOD1/2-Signalweg den fehlenden TLR2/4-Signalweg nicht ersetzen. Umgekehrt wird PG durch TLR2 bei fehlenden NOD1/2-Rezeptoren erkannt, was eine C57BL/6-ähnliche Empfänglichkeit von NOD1^{-/-}, NOD2^{-/-} und NOD1^{-/-}/2^{-/-} Mäusen erklärt.

Die Stimulierung von Makrophagen und Neutrophilen mit TLR- und NOD-Liganden aktiviert initial die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen (wie IL-1 α / β , IL-6, TNF- α) und führt anschließend zur Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und IL-1Ra (Sing et al., 2002b; Carl et al., 2002; Zhao et al., 2010). **IL-10** ist ein Zytokin, welches die inflammatorische Antwort hemmt (z.B. TNF- α) und dadurch die Gewebeschädigung durch eine „Hyperimmunreaktion“ verhindert. Die Rolle von **IL-1Ra** besteht darin, die inflammatorischen Effekte von IL-1 durch kompetitive Bindung an den IL-1 Rezeptor diesen zu blockieren (negative Rückkopplung) (Arend and Gabay, 2000). Sowohl IL-1 als auch IL-1Ra werden als Antwort auf ähnliche Stimuli wie z.B. TNF- α , IL-1, Phorbolster und mikrobielle Produkte produziert (Dinarello, 1996). Die IL-1Ra-Konzentration in der Homöostase ist im Normalfall mehrfach höher als die IL-1-Konzentration, wodurch der Wirt vor IL-1-bedingten inflammatorischen Reaktionen geschützt wird (Freeman and Buchman, 2001). Andererseits führt IL-1 β -Defizienz zu erhöhter Empfänglichkeit für *Streptococcus pneumoniae* im Mausinfektionsmodell (Kafka et al., 2008). Die Produktion von IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra wird vom Immunsystem durch transkriptionale und post-transkriptionale Mechanismen reguliert (Fenton, 1992).

Verschiedene Studien zeigen, dass IL-1Ra^{-/-} Mäuse spontan inflammatorische Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis oder Vasculitis entwickeln (Nicklin et al., 2000; Horai et al., 2000).

Die Balance zwischen IL-1 α / β und IL-1Ra ist demzufolge erforderlich für die Aufrechterhaltung der Homöostase in verschiedenen Gewebetypen. Nichtsdestotrotz führt die IL-10- oder IL-1Ra-Defizienz in der initialen Phase der Infektion zur erhöhten inflammatorischen Reaktion und damit zunächst zum Infektionsschutz.

So besitzen IL-10^{-/-} Mäuse eine erhöhte Resistenz gegenüber *Listeria monocytogenes* (Dai et al., 1997), *Salmonella enteritica* (Arai et al., 1995), *Klebsiella pneumoniae* (Wang et al., 1999), *Staphylococcus aureus* (Sasaki et al., 2000) oder *Streptococcus pneumoniae* (van der et al., 1996). IL-1Ra^{-/-} Mäuse sind ebenfalls resistenter gegen *L. monocytogenes* (Hirsch et al., 1996), *Leishmania major* (Voronov et al., 2010) und *S. pneumoniae* (Kafka et al., 2008) als IL-1Ra^{+/+} Mäuse.

Ähnlich wie bei experimentellen Infektionen mit dem grampositiven Erreger *S. pneumoniae* konnten wir zeigen, dass nicht nur IL-10^{-/-} Mäuse (Sing et al., 2002a) sondern auch IL-1Ra^{-/-} Mäuse gegen eine intraperitoneale Infektion mit *Y. enterocolitica* deutlich resistenter als IL-1Ra^{+/+}.C57BL/6 Mäuse sind.

4.2 Immunhistologische Untersuchungen der Milzen von *ko*-Mäusen im uninfizierten und infizierten Zustand

Die intraperitoneale Infektion mit Yersinien führt zur Dissemination in lymphatische Organe wie z.B. die Milz. Es sollte deshalb untersucht werden, zu welchen histopathologischen Veränderungen die *Yersinia*-Infektion in der Milz führt.

Die Milz wird von einer Bindegewebskapsel umgeben, von der aus sich verzweigende Trabekel in das Organinnere ziehen und hier ein stützendes Gerüst aufbauen. Das Innere des Organs besteht aus zwei funktionell verschiedenen Einheiten: weiße und rote Pulpa. Die rote Pulpa ist für den Abbau gealterter Erythrozyten und Thrombozyten zuständig. Sie bildet ein komplexes Maschenwerk aus den Pulpasträngen und den Milzsinus. Die Milzsinus sind spezielle dünnwandige (nur Intima-Schicht) und weitlumige Blutgefäße. Die rote Pulpa enthält eine geringe Anzahl von Neutrophilen und ist reich an Makrophagen (Lippert H., 2003).

Die weiße Pulpa dient der Immunabwehr und ist aus periarteriellen Lymphozytenscheiden (T-Zellregionen) und den Milzknötchen, bei denen es sich um Lymphfollikel (B-Zellregionen) handelt, organisiert. Die Kompartimentierung der weißen Pulpa wird durch spezifische Chemokine kontrolliert, die die Migration von T- und B-Zellen zu den entsprechenden Zonen steuern (Mebius and Kraal, 2005). CXCL13 induziert die Migration von B-Zellen zu den Lymphfollikeln (Ansel et al., 2000), während CCL19 und CCL21 die Einwanderung von DZ

und T-Zellen in T-Zellregionen steuern (Gunn et al., 1999). Die Expression von CCL13, CCL19 und CCL21 steht unter der Kontrolle von Lymphotoxin- α_1/β_2 (LT- α_1/β_2) und TNF (Ngo et al., 1999). In den T-Zellregionen kommt es zur Interaktion von T-Zellen mit den DZ und B-Zellen, während in den Milzknötchen die klonale Expansion der aktivierten B-Zellen und die Differenzierung zu AK-produzierenden Plasmazellen erfolgt. Das Blut tritt in die Milz durch die Milzarterie ein, die sich in Balkenarterien aufspaltet. Diese dringen in die Pulpa vor und verzweigen sich in den Lymphozytenscheiden in Zentralarterien. Die Marginalzone (MZ) dient als Transitzone für die Blutbestandteile und stellt den Übergangsbereich von weißer zu roter Pulpa dar. Sie enthält neben T-/B-Lymphozyten und DZ spezielle Makrophagen-subpopulationen: Marginalzonen-Makrophagen (MZ-M Φ) und marginale metallophile Makrophagen (MM Φ). Bakterien und andere Antigene aus dem Blutkreislauf können hier effektiv von den Makrophagen und DZ den MZ-Lymphozyten präsentiert werden, bevor diese wieder in die Zirkulation zurücktreten (Mebius and Kraal, 2005; Lippert H., 2003).

In dieser Arbeit wurde deshalb zunächst untersucht, ob die typische Milzkompartimentierung sowie die Verteilung von T- und B-Lymphozyten, DZ, PMN und Mono/Mak von TLR- oder NOD-Signalwegen sowie von IL-10 und IL-1Ra beeinflusst wird. Die Milzen der verschiedenen *ko*-C57BL/6 Stämme und des Mutterstammes C57BL/6 wurden daher vor und nach der Infektion mittels FACS-Analyse und Immunhistologie auf die zelluläre Zusammensetzung und räumliche Verteilung untersucht.

In der immunhistologischen Untersuchung konnten im uninfizierten Zustand keine Unterschiede in der Gewebearchitektur und Zellverteilung zwischen den verschiedenen *ko*-Mausstämmen nachgewiesen werden. Um die Darstellung zu vereinfachen, wurden in dieser Arbeit Milzkryomikrotomschnitte von je einem repräsentativen Mausstamm aus jeder *Yersinia*-Empfänglichkeitsgruppe dargestellt:

- C57BL/6 Maus für die Ye-R-Gruppe,
- IL-10^{-/-} Maus für die Ye-HR-Gruppe und
- MyD88^{-/-} Maus für die Y-HS-Gruppe.

Milzen von C57BL/6, IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen zeigen einen typischen Aufbau aus weißer und roter Pulpa, wobei die weiße Pulpa sich aus klar definierten Kompartimenten von B- und T-Zellen zusammensetzt (Abb. 3.4, obere Reihe), während die rote Pulpa das umliegende Gewebe ausmacht, wo wenige aber homogen verteilte Neutrophile nachweisbar sind (Abb. 3.4, untere Reihe). Die Marginalzone bildet ein retikuläres Gerüst um die weiße Pulpa herum und wurde anhand von Marginalzonen-Makrophagen (MZ-M Φ) sichtbar gemacht (Abb. 3.4, mittlere Reihe).

Während einer *Yersinia*-Infektion finden dramatische Veränderungen in der Milzmorphologie statt. Als erstes schwillt die Milz im Laufe der Infektion an, so dass 3 Tage nach der ip-Infektion das Milzgewicht aller infizierten Mäuse stark zunimmt (Abb. 3.2). Die Milzvergrößerung oder Splenomegalie nach einer *Yersinia*-Infektion bei Mäusen ist bekannt und korreliert mit der Rekrutierung von den Immunzellen aus der Blutbahn (Autenrieth et al., 1993). Die immunhistologischen Untersuchungen zeigen, dass die *Yersinia*-Mikrokolonien zufällig (in der weißen Pulpa) und gleichmäßig in der Milz von C57BL/6 (Abb. 3.5) und IL-10^{-/-} Maus (Abb. 3.6) verteilt sind.

Die *Yersinia*-Mikrokolonien wachsen offensichtlich im Bereich der T-Zellareale zu sichtbaren kompakten abszessartigen Strukturen in den Milzen von C57BL/6 und IL-10^{-/-} Mäusen heran, was zur Zerstörung oder Abwanderung der T-Lymphozyten führt. Ähnliche Befunde wurden ebenfalls für alle anderen in dieser Arbeit untersuchten Milzen der Ye-R-Gruppe erhoben (Daten nicht gezeigt).

Dieses Phänomen ist ebenfalls für *Y. pseudotuberculosis* bekannt (Durand et al., 2010). Infektionsversuche mit einem T3SS-defizienten *Y. pseudotuberculosis* Stamm zeigten, dass diese Bakterien in den B- und T-Zellzonen der mesenterialen Lymphfollikeln überleben, aber in Lymphozyten-defizienten Mäusen (Rag1^{-/-}) nicht (Balada-Llasat and Mecsas, 2006). Die Autoren vermuten, dass lymphozytenreiche Regionen eine Überlebensnische für Yersinien darstellen, wo die Bakterien vor phagozytierenden Zellen besser geschützt sind.

Die Lokalisation der *Yersinia*-Mikrokolonien (MK) in der weißen Pulpa von C57BL/6 und IL-10^{-/-} Mäusen spricht dafür, dass einzelne Yersinien initial am Endothel der Zentralarteriole haften bleiben und nicht in den Marginalsinus gelangen, der die weiße Pulpa von der roten Pulpa durch die Marginalzone trennt. Die Aufgabe der Marginalzone besteht darin, das Blut zu filtrieren und damit auch die Erreger aus der Blutzirkulation zurückzuhalten, bevor diese wieder in die Blutbahn gelangen. Aufgrund der besonderen Position der Marginalzone an der Schnittstelle zwischen weißer und roter Pulpa ist die Marginalzone als Blutfilter sehr effizient (Mebius et al., 2004).

Für die Erkennung von Erregerbestandteilen exprimieren MZ-MΦ auf der Oberfläche neben den TLR auch weitere PRR wie C-Typ Lektin SIGN-R1 und Typ I „scavenger receptor“ MARCO (Morse, III et al., 2001). SIGN-R1 bindet Polysaccharid-Antigene, die auf der Zelloberfläche von verschiedenen Bakterien exponiert sind. So wurde gezeigt, dass SIGN-R1 für die Bindung und Internalisierung von *Mycobacterium tuberculosis* (Koppel et al., 2004), *Streptococcus pneumoniae* (Lanoue et al., 2004), *E. coli* und *Salmonella typhimurium* (Nagaoka et al., 2005) essentiell ist. SIGN-R1 erkennt ebenfalls das murine Adhäsionsprotein ICAM-2, welches ubiquitär auf Maus-Lymphozyten exprimiert wird. Dadurch stellt SIGN-R1 ein Verbindungsglied zwischen adaptiver und angeborener

Immunität dar (Geijtenbeek et al., 2002). Ein weiterer wichtiger PAMP-Rezeptor von MZ-M Φ ist MARCO („*macrophage scavenger receptor*“), der neben Kohlenhydratstrukturen auch LDL („*low density lipoprotein*“) erkennt (Morse, III et al., 2001). Die Expression von MARCO wird durch LPS hochreguliert. SIGN-R1 und MARCO zeigen Kreuzreaktionen mit mikrobiellen Komponenten. So erkennt MARCO zahlreiche bakterielle Erreger, wie z.B. *E. coli* und *Staphylococcus aureus* (Elomaa et al., 1995). Somit könnten Yersinien ebenfalls von den PRR der MZ-M Φ erkannt und in der weißen Pulpa zurückgehalten werden. Zusammenfassend sprechen aber die immunhistopathologische Untersuchungen für eine initiale Absiedelung von einzelnen Yersinien (klonale Dissemination) (Oellerich et al., 2007) in den Zentralarteriolen (Hülsenarteriolen bis hin zu den Pinselararteriolen). Offensichtlich vermeiden Yersinien so den risikoreichen Übergang in die rote Pulpa. Es bleibt zu prüfen, ob das Yersiniaadhäsın YadA für diese Lokalisierung verantwortlich ist.

Yersinia-MK wurden in den Milzen von IL-10^{-/-} Mäusen 2 dpi noch detektiert (wie bei IL-10^{+/+}.C57BL/6 Mäusen), während 3 dpi keine MK wegen schneller Eliminierung visualisiert werden konnten (Abb.3.6, untere Reihe). Im Gegensatz dazu, wurden bei Kryomikrotomschnitten von C57BL/6 Mäusen zahlreiche große abszessartige Yersinien-Läsionen 3 dpi detektiert (Abb. 3.5). Sowohl bei C57BL/6 als auch bei IL-10^{-/-} Milzen sind die Abszesse mit PMN assoziiert, die nicht mehr wie im uninfizierten Zustand homogen verteilt sind, sondern sphärenförmig die Kolonien umgeben und infiltrieren. Insgesamt fällt die hohe Rekrutierung von PMN im Gewebe auf. Diese Beobachtung geht auch mit der Splenomegalie einher. Interessanterweise konnte man noch ein Paar „Nester“ von PMN in den Milzkryoschnitten von IL-10^{-/-} Mäusen 3 dpi darstellen (Abb. 3.6, unten rechts), die aber weniger kompakt erschienen wie am zweiten Tag pi (Abb. 3.6, oben rechts), was auf eine Resolution der Infektion hindeutet. Darin war es möglich bei einer viel stärkeren Vergrößerung (400 x) MK-Reste zu visualisieren (Abb. 3.6 unten rechts, Bildausschnitt). Hier handelt es sich anscheinend um abgetötete und defragmentierte Bakterien. Offensichtlich sind IL-10^{-/-} Mäuse in der Lage *Yersinia*-Infektion viel schneller zu bekämpfen.

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen immunhistologischen Ergebnisse ergibt sich folgendes Bild für den *Yersinia*-Infektionsprozess in der Milz von C57BL/6 Maus und in den Milzen der *ko*-Mäuse der Ye-R-Gruppe, sowie in der Milz der IL-10^{-/-} Maus (Ye-HR-Gruppe) (2 dpi):

Einzelne *Yersinia*-Bakterien gelangen in die Milz durch die Milzarterie und anschließend durch Zentralarterie in die weiße Pulpa. Die Zentralarterie verzweigt sich anschließend in terminale Arteriolen, die in die Marginalsinus münden und dann in die rote Pulpa übergehen.

Die in dem Blut transportierten Yersinien bleiben am Endothel der Zentralarteriole haften (vermutlich über YadA-Adhäsion) und werden somit innerhalb der weißen Pulpa zurückgehalten. Da die Zentralarteriolen von den periarteriellen Lymphozytenscheiden ummantelt sind, erscheinen die Yersinien in den T-Zellregionen. Offenbar wachsen die Yersinien in den Zentralarteriolen zu Mikrokolonien. Dies führt zur Chemokinbildung und Rekrutierung von Neutrophilen und damit zu sichtbaren Entzündungsherden in der weißen Pulpa. Die massive Infiltration der Neutrophilen in die Peyer-Plaques bei oraler oder in die Milz bei parenteraler Inokulation von *Y. enterocolitica* wurde bereits 1974 beschrieben (Carter, 1975). Carter hat ebenfalls beobachtet, dass die *Yersinia*-Abszesse aus nekrotischem Gewebe mit Läsionen bestehen, die hauptsächlich PMN und Zelldebris (Eiter) enthalten. Diese Beschreibung geht mit unseren immunhistologischen Untersuchungen der Milzkryoschnitte einher, wodurch amorphe, nicht spezifisch anfärbbare Bereiche wie „schwarze Löcher“ im infizierten Milzgewebe sichtbar werden.

Die Immunhistologie ist nicht für die quantitative Analyse der Anfälligkeit der Mäuse und die Abschätzung der Keimzahl in der Milz geeignet. Die gleiche Schlussfolgerung wurde ebenfalls von Carter und Collins gezogen, da ein sehr hoher CFU-Wert aus einem einzigen Abszess im Organ hervorgehen kann (der immunhistologisch nicht erfasst wurde), während ein anderer Teil des gleichen Organs weniger oder sogar keine Bakterien enthalten kann (Carter and Collins, 1974).

Um den CFU-Wert in der Milz zu bestimmen ist es daher nötig, das gesamte Organ zu homogenisieren und als Verdünnungsreihe auszuplattieren. Im Fall von MyD88^{-/-} Mäusen ist es dagegen möglich aus den Kryotomschnitten auf die Empfindlichkeit dieser Mäuse zu schließen. Die hier gezeigten Kryoschnitte stammen von den Mäusen, die 2 Tage nach der Infektion wegen schlechten gesundheitlichen Zustands getötet wurden. Bereits 2 dpi bestehen die Milzen fast nur aus nekrotischem Gewebe und *Yersinia*-Mikrokolonien in der roten Pulpa (Abb. 3.7). Wider Erwarten bleiben die lymphatischen Follikel mit ausgeprägten B- und T-Zellzonen in der Milz von MyD88^{-/-} Maus trotz der enorm hohen Bakterienlast erhalten, was auf eine andere initiale Kolonisierung im Vergleich zur MyD88^{+/+} Maus hinweist. Es wurde ebenfalls eine erhöhte PMN-Anzahl nachgewiesen. Allerdings scheinen die Neutrophilen bei der MyD88^{-/-} Milz nicht direkt mit den Yersinien assoziiert zu sein. Für die hochempfindlichen MyD88^{-/-} Mäuse soll deshalb folgendes *Yersinia*-Kolonisierungsmodell vorgeschlagen werden:

Yersinia-Bakterien gelangen in die Milz durch die Milzarterie und anschließend durch Zentralarterie in die weiße Pulpa. Die Zentralarterie verzweigt sich anschließend in terminale Arteriolen, die in die Marginalsinus münden, ehe das Blut in die rote Pulpa übertritt. Die in dem Blut transportierten Yersinien werden durch MZ-MΦ und DZ nicht erkannt, da die

PAMP-TLR-Signalwege nicht funktionsfähig sind. Yersinien könnten dann die Marginalzone passieren und mit dem Blut in die Sinus der roten Pulpa transportiert werden. Da die *Yersinia*-PAMP-Erkennung sowie die IL-1 Signalkaskade in der akuten Phase der Infektion bei MyD88^{-/-} Mäusen defekt ist, können sich die Bakterien wahrscheinlich ungehemmt in der roten Pulpa replizieren. Die verzögerte PMN-Infiltration führt dann weniger zur Eliminierung der Yersinien stattdessen aber zur Gewebeschädigung.

4.3 Qualitative und Quantitative Analyse der Immunzelltypen in der Milz und in der Bauchhöhle uninfizierter Mäuse mittels FACS

Da eine quantitative Analyse der zellulären Milzzusammensetzung mittels immunhistologischer Methode keine zuverlässigen Ergebnisse ergibt, wurden FACS-Analysen von Milzsuspensionen der in Abb. 3.1 dargestellten Mausstämmen durchgeführt, um die relative Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Zelltypen (B-, T-Zellen, DZ, Mono/Mak, PMN) im uninfizierten Zustand zu vergleichen (Tabelle 3.4). Da bei der mechanischen Desintegration der Milzen partiell Zellen mit Gewebeteilen assoziiert bleiben und der Zellsuspension nach Siebtrennung verloren gehen, variieren die absoluten Zellzahlen stark. Darüber hinaus zeigen die Milzen eine individuelle Variationsbreite der absoluten Zellzahlen, so dass es nur sinnvoll ist, die relativen Zelltypanteile zum Vergleich heranzuziehen.

B-Zellen (CD19⁺) stellen bei allen Mausstämmen die größte Zellfraktion dar (50%-60% der hämatopoetischen Zellen). Die T-Zellen (CD3⁺) machen die zweitgrößte Zellfraktion (30%-35%) in der Milz aus. Da Monozyten aus der Blutzirkulation in Gewebe und Peritonealhöhle wandern und dort zu Makrophagen heranreifen, wird diese Zellpopulation als Monozyten/Makrophagen (Mono/Mak; F4/80⁺CD11b⁺) bezeichnet (Rydstrom and Wick, 2007a).

Die Anzahl von Mono/Mak-Zellen in uninfizierten Milzen liegt bei 5%-10%, wobei die Milzen von TLR2^{-/-}, NOD1^{-/-} und RIP2^{-/-} Mäusen höhere (ca. 10%) Anteile von Mono/Mak-Zellen aufweisen, während die Milzen von TRIF^{-/-}, MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen niedrigere (ca. 4,5%) Anteile besitzen (Tab. 3.2). Die Neutrophilen (PMN; Ly-6G⁺) sind die kleinste Zellpopulation in der Milz, die lediglich 1%-2,5% der hämatopoetischen Splenozyten ausmacht. In dieser Arbeit konnten marginale Unterschiede in den relativen Anteilen der PMN in den Milzen der verschiedenen *ko*-Mäuse festgestellt werden.

DZ (CD11c⁺) stellen ebenfalls eine relativ kleine (zw. 2,5%-6%) Zellpopulation dar. Hinsichtlich der %-Darstellung wurden bei TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, NOD2^{-/-}, RIP2^{-/-} und MyD88^{-/-} Milzen höhere Anteile (ca. 5%) von DZ nachgewiesen als bei den restlichen hier getesteten

Mausstämmen, wie z.B. IL-10^{-/-}, IL-1Ra^{-/-} oder CD14^{-/-} (ca. 2%-3%). Zusammenfassend entspricht die Verteilung der verschiedenen Zelltypen der Splenozytenpopulation bei allen untersuchten Mäusen im uninfizierten Zustand den Normalwerten (Kirby et al., 2002; Kaufmann and Kabelitz D., 2002). Die wenigen festgestellten Unterschiede sind statistisch nicht signifikant. Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Splenozyten-Zusammensetzung der untersuchten *ko*-Mäuse im uninfizierten Zustand sich nicht signifikant von den Wildtyp-C57BL/6 Mäusen unterscheidet.

Unter der Annahme, dass die initiale Rekrutierung von Phagozyten (Makrophagen, Neutrophilen) in die Bauchhöhle den Ausgang der intraperitonealen Infektion mitbestimmt, wurde die Zusammensetzung des zellulären Milieus im uninfizierten Zustand sowie der Verlauf der Zellinfiltraten in der Bauchhöhle während der Infektion analysiert.

Eine intraperitoneale Infektion induziert sowohl in residenten hämatopoetischen Zellen der Bauchhöhle als auch in peritonealen Mesothelzellen eine pro-inflammatorische Reaktion, die durch erhöhte vaskuläre Permeabilität, Aktivierung der residenten Zellen, Rekrutierung von Leukozyten aus der Blutbahn und dem Knochenmark und Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren charakterisiert ist.

Das Peritoneum oder Bauchfell kleidet als seröse Haut den Bauchraum aus und besteht aus einem einschichtigen Plattenepithel, dem Mesothel. Die Mesothelzellen sind befähigt, auf Verletzungen (DAMP) und Infektionen (PAMP) mit einer Entzündungsreaktion zu antworten (Peritonitis).

Die vergleichende Analyse der Zelltypen in den Bauchhöhlen von C57BL/6, IL-10^{-/-}, IL-1Ra^{-/-}, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, CD14^{-/-}, TLR2^{-/-}/CD14^{-/-}, NOD1^{-/-}, NOD2^{-/-}, NOD1^{-/-}/2^{-/-}, RIP2^{-/-}, TRIF^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen vor der Infektion ergab ein charakteristisches Zellmuster (Tabelle 3.5). So wurde bei allen untersuchten Mausstämmen folgende durchschnittliche Zellzusammensetzung gefunden: 40% (8x10⁵) B-Zellen (CD19⁺), 4% (1x10⁴) T-Zellen (CD3⁺), 50% (1x10⁶) Mono/Mak-Zellen (CD11b⁺F4/80⁺), 0,2% (5x10³) PMN (Ly-6G⁺) und ca. 4% (1x10⁴) DZ (CD11c⁺). Die mononukleären Phagozyten stellen demnach die vorherrschende Zellpopulation im gesunden Bauchraum dar, während Neutrophile lediglich in sehr geringer Anzahl vorhanden sind. Diese umfassende Charakterisierung der *ko*-Mausstämme wurde nach unseren Erkenntnissen zum ersten Mal durchgeführt. Die Zellzahlen der Untersuchung entsprechen den publizierten Daten über die von hämatopoetischen Zellen des Peritonealraums von O₂₀ Mäusen (Daems and Koerten, 1978) und C57BL/6 Maus (Ray and Dittel, 2010).

4.4 Qualitative und Quantitative Analyse der Immunzelltypen in der Milz und in der Bauchhöhle *Yersinia*-infizierter Mäuse mittels FACS

Die intraperitoneale *Yersinia*-Infektion führt sehr schnell zu einer Entzündungsreaktion. Bedingt durch Inflammation wandern neue Immunzellpopulation zum Infektionsort hin. Da *Yersinien* mit den injizierten Yops die Produktion von Zyto- und Chemokinen und somit die Migrationsfähigkeit von Zellen kontrollieren, wurde eine umfassende FACS-Analyse der Immunzellverteilung (B-, T-Zellen, DZ, Mono/Mak, PMN) während des *Yersinia*-Infektionsverlaufs in der Milz und der Peritonealhöhle verschiedener Mausstämmen durchgeführt.

Anhand von immunhistologischen Daten konnte festgestellt werden, dass *Yersinia*-MK in den T-Zellarealen abszessähnliche Strukturen bilden, was zur Zerstörung oder Abwanderung von T-Lymphozyten führt (Abb. 3.5/3.6). Diese Beobachtung wird auch von den Daten unterstützt, die mittels FACS-Analyse gewonnen wurden (Tab. 3.4). Daraus wird deutlich, dass der Prozentanteil von T-Zellen im Vergleich zur uninfizierten Milz bei allen hier infizierten *ko*-Mausstämmen von ca. 35% auf ca. 20% der Splenozyten sinkt. Der B-Zellanteil bleibt dagegen bei allen in der Tabelle 3.4 untersuchten Mäusen ziemlich konstant während des Infektionsverlaufs. Ähnliche Daten bzgl. der Abnahme von T-Zellen und Erhaltung der B-Zellen in der Milz wurden auch für die *Salmonella*-Infektion beschrieben (Kirby et al., 2002). Bei allen Stämmen kommt es zu einem starken Zustrom an Neutrophilen aus der Blutbahn in die Milz, was auch aus Kryomikrotomschnitten hervorgeht (Abb. 3.5-3.7). So steigt der Anteil von PMN 3 dpi in der Milz von durchschnittlich 2% auf über 15% im infizierten Zustand an (Tab. 3.2). Die massive Infiltration der Neutrophilen in die Milz von CD-1 Mäusen bei iv-Inokulation von *Y. enterocolitica* wurde bereits 1974 beschrieben (Carter, 1975). Bemerkenswert ist, dass die Milzen von IL-10^{-/-} Mäusen in den erst 4 Stunden nach Infektion eine signifikant höhere PMN-Infiltration (5%) und die Milzen von MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen eine signifikant niedrigere PMN-Infiltration (ca. 1%) als C57BL/6-Mäuse (2,5%) aufweisen (Abb.3.9 B und 3.12 B). Zwischen 4 und 24 hpi steigt der PMN-Anteil in der Milz von IL-10^{-/-} Mäusen an und bleibt auf dem konstanten Niveau von ca. 8% bis 72 hpi. Der PMN-Anteil in der Milz von C57BL/6 Mäusen steigt stetig im Zeitraum 4-72 h an. Einen ähnlichen Anstieg zeigen auch die PMN-Anteile in den Milzen von TLR2^{-/-}, CD14^{-/-}, TLR2^{-/-}/CD14^{-/-}, NOD2^{-/-}, NOD1^{-/-}/2^{-/-} und RIP2^{-/-} Mäusen. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass sowohl MyD88^{-/-} als auch TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäuse eine stark verzögerte PMN-Einwanderung in die Milz im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen zeigen. Bemerkenswert ist es aber, dass bei TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen eine schnellere PMN-Infiltration (nach ca. 12 hpi) als bei MyD88^{-/-} Mäusen (nach ca. 48 hpi) festgestellt wurde (Abb. 3.12 C-D). Bei MyD88^{-/-} Mäusen kommt es 48 hpi

zu einem massiven PMN-Einstrom in die Milz (ca. 25% Anteil), was zusammen mit der hohen *Yersinia*-Keimzahl wahrscheinlich zur starken Gewebeschädigung und Septikämie zw. 48-72 hpi führt.

Die Fraktionen (in %) von Mono/Mak-Zellen und DZ unterscheiden sich dagegen zwischen den untersuchten *ko*-Mausstämmen vor und nach 3 dpi nicht signifikant. Da die T- und B-Zellen eine wichtige Rolle bei der adaptiven Immunität spielen, kommt in der ersten Phase der bakteriellen Erkrankungen die entscheidende Rolle der angeborenen Immunität, hauptsächlich der PMN, zu. Des Weiteren wird berichtet, dass die PMN sich ebenfalls in hoher Anzahl während der prä-immunen Phase der Infektion mit *Listeria monocytogenes* oder *Salmonella typhimurium* in den Entzündungsherden in der Milz akkumulieren und für die Kontrolle der Infektion eine entscheidende Rolle spielen (MACKANESS, 1962; Conlan, 1997). Durch Serotherapie PMN-depletierte Mäuse konnten nach *Yersinia*-Infektion weder die bakterielle Vermehrung noch die Dissemination in weitere Organe kontrollieren und erwiesen sich als viel empfindlicher als nicht PMN-depletierte Mäuse. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass Neutrophile verschiedene anti-mikrobielle Funktionen ausüben, welche die Vermehrungsrate von Salmonellen, Listerien und Yersinien in der akuten Infektionsphase kontrollieren und dadurch die Entwicklung der adaptiven Immunität ermöglichen (Conlan, 1997).

Es gibt zahlreiche Untersuchungen zur Pathogenese der bakteriellen Peritonitis insbesondere nach Peritonealdialyse. Nach einer intraperitonealen Inokulation wird infizierte seröse Flüssigkeit durch Stomata im Mesothel gefiltert und absorbiert, worauf pro-inflammatorische Mediatoren in den Blutkreislauf freigesetzt werden. Zirkulierende Neutrophile können nicht durch das ruhende Mesothel durchwandern. Es wird angenommen, dass Neutrophilendiapedese in vivo 6-8 h nach Bakteriengabe die maximale Intensität erreicht. Die PMN-Infiltrationsrate erreicht bei der hier untersuchten *Yersinia*-Infektion von IL-10^{-/-} Mäusen anscheinend bereits 4 hpi das Maximum (Abb.3.9 A). Die Zahl von eingewanderten Neutrophilen bei IL-10^{-/-} Mäusen übersteigt die Anzahl von rekrutierten PMN in der Peritonealhöhle und in der Milz von C57BL/6 und MyD88^{-/-} Mäusen (Abb. 3.9 A und B). Bei IL-10^{-/-} Mäusen kommen mehrere PMN auf ein *Yersinia*-Bakterium (MOI≈0,2), wodurch eine rasche und vollständige Eliminierung erklärt werden kann. Die MyD88^{-/-} Mäuse zeigen eine stark verzögerte PMN-Infiltration in den Bauchraum, wodurch *Yersinien* in den 24 Stunden pi sich fast ungehemmt vermehren können (MOI≈10).

Ähnlich wie in der Milz, wurden die größten Veränderungen nach der *Yersinia*-Inokulation für die PMN-Anteile in der Bauchhöhle von allen untersuchten Mausstämmen festgestellt. So wurde gefunden, dass IL-10^{-/-} Mäuse (Y-HR) eine massive Infiltration mit Neutrophilen in der Bauchhöhle 4 hpi aufweisen (ca. 50%), wobei C57BL/6 und die *ko*-Mausstämme der Y-R-

Gruppe (TLR2^{-/-}, CD14^{-/-}, TLR2^{-/-}/CD14^{-/-}, NOD2^{-/-}, NOD1^{-/-}/2^{-/-} und RIP2^{-/-}) eine starke PMN-Infiltration (ca. 30%) (Abb. 3.13 und 3.15) und *Yersinia*-hoheempfindliche Stämme (Ye-HS) (MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-}) keine nennenswerte PMN-Infiltration (ca. 5%) in den Bauchraum aufweisen (Abb. 3.11). Nach dem maximalen Anstieg 4 hpi sinkt der PMN-Anteil in der Peritoneallavage bei IL-10^{-/-} Mäusen und stabilisiert sich 72 hpi auf ca. 25%. Der PMN-Anteil in der Bauchhöhle von C57BL/6 Mäusen und *ko*-Mäusen der Ye-R-Gruppe bleibt dagegen nach einem Anstieg auf ca. 25% 4 hpi auf diesem Niveau im Laufe der Infektion 4-72 hpi konstant (zw. 20%-30%). Auffällig ist, dass der PMN-Anteil in der Bauchhöhle von MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäusen erst nach einer Verzögerung 48 hpi stark ansteigt (ca. 50%), wobei der relative PMN-Anstieg in der Peritoneallavage von TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäusen früher einsetzt (>12 hpi) als bei MyD88^{-/-} Mäusen (>24 hpi). Diese unterschiedlichen PMN-Infiltrationsraten werden demnach von IL-1 via TLR2/4-MyD88 Signalwegen kontrolliert und bestimmen die *Yersinia*-Empfänglichkeit der untersuchten Mäuse. Für die Ye-HR-Gruppe ist eine frühe und hohe PMN-Infiltrationsrate typisch und für die Ye-HS-Gruppe eine stark verzögerte PMN-Infiltrationsrate. Die PMN-Infiltrationsrate bei der Ye-R-Gruppe verhält sich ähnlich und liegt unter der von der Ye-HR-Gruppe.

4.5 Abhängigkeit der Neutrophilenbakterizidie von TLR-Signalwegen

Neutrophile stellen die erste Barriere der angeborenen Immunität dar und spielen eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle bakterieller Infektionen. Neutrophile rekrutieren und aktivieren Monozyten, DZ und Lymphozyten entweder durch direkten Zellkontakt oder durch Sekretion von inflammatorischen Mediatoren (z.B. TNF, BlyS, IFN- γ) (Nathan, 2006).

Bakterien können von Neutrophilen phagozytiert und ROS-abhängig abgetötet werden. Zunächst werden Neutrophile durch PAMP stimuliert (engl.: „*priming*“), bevor sie ihr vollständiges bakterizides Potenzial entwickeln. Darüber hinaus gibt es auch eine ROS-unabhängige Bakterizidie, die über Defensine, sezernierte Proteasen, Lactoferrin u.a. wirkt (Nathan, 2006). Drei verschiedene Granula-Subtypen (primäre, sekundäre und tertiäre) enthalten zahlreiche anti-mikrobielle Proteine (wie z.B. Defensine, Proteasen, Lactoferrin, Elastasen) und vermitteln Sauerstoff-unabhängige Erregerabtötung (Urban et al., 2006). Die Bildung des Phagosoms induziert den Sauerstoff-abhängigen Mechanismus. Dabei werden verschiedene reaktive Sauerstoffradikale (z.B. O_2^- , HOCl) gebildet, die mikrobizid wirken (Klebanoff, 2005). Für die Sauerstoffradikal- (ROS-) Bildung ist ein Enzymkomplex NADPH-Oxidase zuständig, welches mit der Phagosom-Membran assoziiert ist (Sheppard et al., 2005). Neutrophile NADPH-Oxidase kann sich in verschiedenen Aktivierungszuständen befinden: ruhend, sensibilisiert/stimuliert („*primed*“), aktiviert oder inaktiviert (Walker and Ward, 1992). In der Regel befindet sich die NADPH-Oxidase in zirkulierenden Neutrophilen im ruhenden Zustand, während der Zustand „erhöhter Bereitschaft“ („*primed*“) durch Zelladhäsion, pro-inflammatorische Zytokine, LPS und andere Wirkstoffe induziert werden kann. Bei den „sensibilisierten“ („geprimed“) Neutrophilen kann der NADPH-Oxidase-Komplex viel schneller zusammengesetzt und aktiviert werden, was in einer stärkeren Antwort auf den zweiten Stimulus resultiert. Der aktivierte Zustand der NADPH-Oxidase wird entweder durch den Erreger direkt oder durch die freigesetzten PAMP an dem Inflammationsort induziert, während anti-inflammatorische Proteine den NADPH-Oxidase-Komplex in einen inaktivierten Zustand zurückversetzen (El-Benna et al., 2008).

Neutrophile reifen im Knochenmark vollständig aus und wandern anschließend in den Blutkreislauf (Athens et al., 1961). Da PMN die größte Zellpopulation im murinen Knochenmark sind, werden die Knochenmarkneutrophile (KM-PMN) oft für die Untersuchungen der Neutrophilen-Funktionen in vitro herangezogen (Itou et al., 2006). Da Sauerstoffradikalbildung von der PAMP-Erkennung über TLR abhängt, wurde angenommen, dass Zellen der MyD88^{-/-} Maus in der Sauerstoffradikalbildung stark beeinträchtigt sind. In dieser Arbeit wurde daher das Vermögen der Sauerstoffradikalbildung der Neutrophilen aus Knochenmark-Zellsuspension sowie Proteose-Pepton-induzierten peritonealen Neutrophilen

(PPiN) von C57BL/6, IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen untersucht. In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass KM-PMN von MyD88^{-/-} Mäusen ähnlich gut reaktive Sauerstoffradikale (ROS) nach *Yersinia*-Infektion in vitro produzieren wie die KM-PMN von IL-10^{-/-} und C57BL/6 Mäusen (Abb. 3.18). Diese *Yersinia*-Ergebnisse mit KM-PMN stehen in Kontrast zu den Untersuchungen von S. Laroux, der zeigte, dass KM-Neutrophile von MyD88^{-/-} Mäusen eine stark attenuierte ROS-Bildung bei der in vitro Infektion mit *E. coli* oder *S. typhimurium* aufweisen im Vergleich zu KM-PMN von C57BL/6 Mäusen (Laroux et al., 2005). Andererseits konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PPiN von MyD88^{-/-} Mäusen bei der in vitro Infektion mit *Yersinia* signifikant weniger Sauerstoffradikale freisetzen, als PPiN von IL-10^{-/-} und C57BL/6 Mäusen (Abb. 3.19 A). Außerdem weisen PPiN von MyD88^{-/-} Mäusen einen signifikant kleineren Anteil von Sauerstoffradikal-bildenden Neutrophilen auf als die PPiN von C57BL/6 und IL-10^{-/-} Mäusen (Abb. 3.19 B). Diese Ergebnisse werden wiederum von anderen Arbeiten unterstützt, die zeigen, dass PPiN von MyD88^{-/-} Mäusen keine ROS-Bildung nach LPS-Stimulation in vitro zeigen (Miletic et al., 2007).

Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass bei Peritonealmakrophagen von MyD88^{-/-} Mäusen eine stark verminderte ROS-Freisetzung nach in vitro Infektion mit *E. coli* oder *Salmonella typhimurium* im Vergleich zu Peritonealmakrophagen von C57BL/6 Mäusen gemessen wurde (Laroux et al., 2005). Die Autoren vermuten als Ursache der fehlenden ROS-Bildung von MyD88^{-/-} Mausmakrophagen einen Defekt in der NADPH-Oxidase Komplexbildung (z.B. fehlende Aktivierung oder Rekrutierung der einzelnen Komplexkomponenten).

Da NADPH-Oxidase sich in verschiedenen Aktivierungszuständen befinden kann, spielt der basale Aktivierungsgrad der PMN, die aus einer Maus isoliert wurden, die entscheidende Rolle für den Ausgang der Experimente. So konnte kein Unterschied bei der ROS-Bildung zw. KM-Neutrophilen von C57BL/6, IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen gefunden werden, weil die Neutrophilen hinsichtlich einer PAMP-Stimulierung sich refraktär verhalten, z.B. wegen fehlender Vorstimulierung („priming“) des NADPH-Oxidase-Komplexes. Anscheinend reichte die kurze Infektionszeit (30 Min) nicht aus, damit die NADPH-Oxidase ihre Wirkung vollständig entfaltet. In der Arbeit von S. Laroux wurden Neutrophile aus dem Knochenmark erst durch Dichtegradientenzentrifugation über Percoll aufgereinigt und dann für die Versuche verwendet (Laroux et al., 2005). So wäre es vorstellbar, dass Neutrophile im Zuge der Aufreinigung vorstimuliert werden können, was den Ausgang der Experimente beeinflusst. Die PPi-Neutrophilen werden dagegen mit Proteose-Pepton bereits stimuliert und können sofort bei der in vitro Infektion auf *Yersinia* reagieren. Die Studie von Itou hat ebenfalls bereits gezeigt, dass Neutrophile aus PP-induzierter Peritoneallavage bereits vollständig „geprimed“ sind, im Gegensatz zu den ruhenden Knochenmarkneutrophilen (Itou et al., 2006). Wahrscheinlich sind PPiN besser geeignet für die Untersuchungen von

Yersinia-Bakterizidie, da sie bereits extravadiert sind und damit eher den PMN der infizierten Peritonealhöhle gleichen als KM-Neutrophile.

Neutrophile spielen offenbar eine entscheidende Rolle für die Resistenz von IL-10^{-/-} Mäusen. Aus den in vitro Untersuchungen zur Produktion von ROS ging jedoch nicht hervor, dass die PMN von IL-10^{-/-} Mäusen einen stärkeren *oxidative burst* aufweisen als wt-Mäuse. Deshalb wäre es vorstellbar, dass die PMN aus IL-10^{-/-} Mäusen auf andere Weise auf *Yersinia* bakterizid wirken. Dabei wären Sauerstoff-unabhängige Erreger-Bakterizidie-mechanismen, wie Freisetzung von verschiedenen Granula-Proteinen (wie Elastasen, Proteasen und Defensinen) sowie erhöhte Phagozytose-Fähigkeit (s.g. „*Killing Assay*“) von IL-10^{-/-} Neutrophilen denkbar.

4.6 Kontrolle der *Yersinia*-Vermehrung/Kolonisierung in Abhängigkeit des angeborenen Infektionsabwehrpotentials

Die Analyse der Kolonisierungskinetik von Organen durch Yersinien gibt Aufschluss über das Abwehrpotential des Wirtes. Die CFU-Werte sind das Ergebnis aus *Yersinia*-Vermehrung und *Yersinia*-Eliminierung durch die Wirtsabwehr.

Yersinien wandern nach der ip-Injektion rasch in die Milz ein. 4 hpi sind die Bakterien bereits in der Milz. Allerdings ist nicht vollständig geklärt, wie die Erreger vom Bauchraum in die Milz disseminieren. Die Physiologie des Peritonealraums liefert allerdings eine nahe liegende Erklärung dafür:

Nach einer ip-Inokulation wird, wie bereits oben erwähnt, die kontaminierte intraperitoneale Flüssigkeit durch die Stomata im Mesothel absorbiert und gefiltert. Die Re-Absorption des kontaminierten Bauchrauminhaltes dient der Abnahme der Erregerkonzentration und führt zur stärkeren Phagozytose einerseits, andererseits kommt es zur Dissemination der Erreger und deren Toxin-Produkten direkt in den Blutkreislauf oder indirekt über die Lymphgefäße (Broche and Tellado, 2001). Yersinien gelangen wahrscheinlich vom venösen in den arteriellen Kreislauf und über die Milzarterie in die Milz.

Die Kinetik der Yersinien-CFU-Werte in den infizierten Mäusen ist für Milz und Peritonealraum ähnlich. Die CFU-Werte steigen stetig von 4 h bis 72 hpi in C57BL/6, TLR2^{-/-}, CD14^{-/-}, TLR2^{-/-}/CD14^{-/-}, NOD2^{-/-}, NOD1^{-/-}/2^{-/-} und RIP2^{-/-}, TLR2^{-/-}/4^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen an, wobei MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} einen signifikant stärkeren CFU-Anstieg aufweisen (zwei Log-Stufen höher als bei C57BL/6 Mäusen 48 hpi), was auf eine geringere Eliminierungsrate hinweisen könnte. 72 hpi erreichen die CFU-Werte in der Milz und in der Peritonealhöhle bei MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäusen 10⁹ bzw. 10⁸. Dies sind kritische CFU-Werte, die in der Regel mit einem septischen Krankheitsbild verbunden sind (Indikation für Abbruch des Versuchs).

Die Yersinien-Keimzahl im Bauchraum und in der Milz von IL-10^{-/-} Mäusen ist 4 hpi zunächst vergleichbar mit den CFU-Werten von infizierten Mausstämmen der Ye-R-Gruppe. Sie steigt 24 hpi an, bleibt dann 48 hpi konstant und fällt 72 hpi unterhalb der Detektionsgrenze ab. Somit kann von einer kompletten Beseitigung/Heilung von Yersinien bei IL-10^{-/-} Mäusen ausgegangen werden.

4.7 Vergleich der Zytokin- und Chemokinfreisetzung während der *Yersinia*-Infektion von Mäusen mit Defekten in der angeborenen Immunität

Die Bedeutung der Zytokine für die Kontrolle der systemischen *Yersinia*-Infektion im Mausmodell wurde bereits vor 15 Jahren erstmals beschrieben. So wird z.B. die erhöhte Resistenz von C57BL/6 Mäusen gegenüber *Yersinien* der frühen Induktion von Interferon (IFN)- γ , TNF- α oder IL-12 im Vergleich zu BALB/c Mäusen zugeschrieben (Autenrieth et al., 1994; Bohn and Autenrieth, 1996). Da die initiale Aktivierung der TLR-Signalkaskade das Muster der Zytokin / Chemokinantwort bestimmt, wurden daher Zyto- und Chemokinprofile in der Milz und der Peritoneallavage zu den verschiedenen Infektionszeitpunkten gemessen.

Chemokine werden am Inflammationsort von diversen Zelltypen lokal produziert und induzieren die Einwanderung von Leukozyten aus dem Blut (Collins et al., 1991; Ley, 2002). Die Produktion der inflammatorischen Zytokine und Chemokine kann über PAMP induziert werden (Takeda et al., 2003). Demzufolge ist die basale Expression der Zyto- und Chemokine im sterilen Gewebe sehr niedrig und steigt in kürzester Zeit nach einer Infektion stark an (Sporri et al., 2006).

Die Konzentrationen der wichtigsten Zyto-/Chemokine (IL-10, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, MCP-1, IFN- γ , KC, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, TNF, IL-12p70 und G-CSF) werden in der Peritoneallavage und in den Milzhomogenaten mittels Immunoassay bestimmt (CBATM und ELISA). In uninfizierten Mäusen liegen die Werte wie erwartet unter der Detektionsgrenze.

MyD88 vermittelt die Signalkaskade, die durch TLR-Stimulierung ausgelöst wird, was zur Aktivierung von NF- κ B- und MAPK-Signalwegen führt (Übersicht in Abb. 3.0). Beide Signalwege führen zur Induktion von pro-inflammatorischen Genen (frühe Phase der NF- κ B-Aktivierung) (Takeda and Akira, 2004). Andererseits ist die Aktivierung der Signalkaskade, die nach der Bindung von IL-1 an IL-18 induziert wird, ebenfalls MyD88-abhängig und führt auch zur Aktivierung von NF- κ B- und MAPK/AP-1-Signalwegen (Reiling et al., 2008). TRIF-abhängige Signalkaskade, die nach Stimulierung von TLR4 und TLR3 ausgelöst wird, aktiviert neben Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 (späte Phase der NF- κ B-Aktivierung) auch IRF-3 via TBK1 und IKK β , was zur IFN- α/β Expression führt (Takeda and Akira, 2004). IFN- β kann über IFN- β -Rezeptor die Expression von anti-inflammatorischem Zytokin IL-10 induzieren. Die Bindung von IL-10 an den IL-10-Rezeptor führt über STAT3 zur Induktion von anti-inflammatorischen Faktoren, die die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 oder KC inhibieren (Abb. 3.0) (Chang et al., 2007).

Das Mesothel stellt die erste Barriere der angeborenen Immunität gegen Erreger in der Bauchhöhle dar. Es ist bekannt, dass die Mesothelzellen TLR exprimieren und nach der PAMP-Bindung durch die Aktivierung von verschiedenen Signalwegen Inflammation

induzieren (Kato et al., 2004; Park et al., 2007). DAMP/PAMP induzieren in Mesothelzellen pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine (wie IL-1 α , IL-1 β , KC, IL-6 oder MCP-1), Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β , G-CSF), Matrixproteine und intrazelluläre Adhäsionsmoleküle (Tekstra et al., 1996). Darüber hinaus sind die peritonealen Mesothelzellen in der Lage, Antigene über MHC II-Komplex an die T-Zellen zu präsentieren (Mutsaers, 2002; Chan et al., 2003). Es wurde außerdem gezeigt, dass residente Peritonealmakrophagen ebenfalls Chemokine, wie z.B. MIP-2 sezernieren, und eine PMN-Infiltration in den Bauchraum induzieren können (Yung and Chan, 2009; Misawa et al., 2001).

Erwartungsgemäß konnten keine nennenswerten Unterschiede in den Zyto-/Chemokinprofilen zwischen den infizierten C57BL/6, RIP2^{-/-}, NOD2^{-/-}, NOD1^{-/-}/2^{-/-}, TLR2^{-/-}, CD14^{-/-} und TLR2^{-/-}/CD14^{-/-} Mäusen gefunden werden. Diese Mausstämme wurden hier der Ye-R-Gruppe zugeordnet (Tab. 3.1), was durch die Zyto-/Chemokindaten bestätigt wird. Wie oben bereits diskutiert, sind NOD- und TLR-Signalwege ähnlich und hinsichtlich pro-inflammatorischer Antwort (Zytokin-Freisetzung und Einstrom von Neutrophilen) redundant. Im Vergleich dazu wurden die größten Unterschiede in der Zyto-/Chemokinantwort zwischen den Ye-R-, Ye-HR- und Ye-HS-Gruppen gefunden (C57BL/6 vs. IL-10^{-/-} und vs. MyD88^{-/-} Mäuse).

Bereits 2 hpi wurden in der Peritoneallavage von IL-10^{-/-} Mäusen erheblich höhere Konzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, wie IL-1 α , G-CSF, KC und MIP-2, als bei C57BL/6 Mäusen gemessen (Abb. 3.10 A). Im Vergleich dazu wurden die niedrigsten Zytokin-/Chemokinkonzentrationen in dem Bauchraum von infizierten MyD88^{-/-} Mäusen gemessen, wobei G-CSF und IL-1 α / β sogar unter der Detektionsgrenze lagen. Tatsächlich wurde in der Peritoneallavage von infizierten IL-10^{-/-} Mäusen signifikant die höchste Konzentration von IL-1 α (ca. 200 pg/ml) 2 hpi gemessen, während keine detektierbare Menge von IL-1 α bei C57BL/6 und MyD88^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.10 A). Außerdem wurden vergleichbar hohe IL-1 β -Konzentrationen (ca. 1 μ g/ml) in der Peritoneallavage von C57BL/6 und IL-10^{-/-} 2 hpi gemessen, während in der Peritoneallavage von MyD88^{-/-} Mäusen kein IL-1 β 2 hpi detektiert werden konnte.

Diese Ergebnisse weisen auf eine kritische Rolle von IL-1 α für die Initiation der Immunabwehr hin. IL-1 α / β gilt als Initiator einer inflammatorischen Reaktion auf eine Infektion. Dabei stimuliert IL-1 α / β (wie TLR-PAMP) die Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen am Infektionsort und fördert die Leukozyten-Einwanderung zum Inflammationsort durch Hochregulierung von Adhäsionsrezeptoren am vaskulären Endothelium (Stylianou and Saklatvala, 1998). Dies erklärt dann die rapide Einwanderung von PMN in den Peritonealraum von infizierten IL-10^{-/-} Mäusen in der akuten Phase der

Infektion (4 hpi) (Abb. 3.9 A). Während IL-1 α in aktiver Form vorliegt, wird pro-IL-1 β erst nach der Spaltung mit Caspase-1 in eine aktive Form umgewandelt (Murphy et al., 2000). Dies erfordert die Aktivierung des Inflammasoms. Die Stimulierung von intrazellulären NLR über verschiedene Liganden (wie Bakterien, Viren) kann zum aktiven Inflammasom führen (Jin and Flavell, 2010). Beide Formen von IL-1 (IL-1 α und prozessiertes IL-1 β) binden an IL-1R1 und induzieren MyD88-abhängig die pro-inflammatorische Signalkaskade. IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1Ra) bindet kompetitiv an IL-1R1 und setzt damit die IL-1 vermittelte Immunantwort herab (Curfs et al., 1997). Die Vermutung liegt nahe, dass IL-1Ra^{-/-} Mäuse daher eine fast ungehemmte pro-inflammatorische IL-1 Antwort haben, die mit einer erhöhten Resistenz gegenüber der *Yersinia*-Infektion verbunden ist. In dieser Arbeit konnten aus Zeitgründen keine Zyto- und Chemokinetikanalysen der Peritoneallavagen und Milzhomogenaten von infizierten IL-1Ra^{-/-} Mäusen durchgeführt werden.

Da der IL-1/TLR-Signalweg MyD88-abhängig ist, kommt es folglich nur zu einer schwachen Zyto-/Chemokinantwort bei MyD88^{-/-} Mäusen in den ersten Stunden (\approx 2-12 h) nach der *Yersinia*-Infektion, was die Erreger-Nettovermehrung stark begünstigt. Es hat sich herausgestellt, dass MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäuse ein sehr ähnliches Zyto-/Chemokinsekretionsmuster mit kaum signifikanten Unterschieden aufweisen (Abb. 3.12). Dennoch kommt es bei TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäusen zur erheblich früheren PMN-Einwanderung (ca. 12 h früher) in den Peritonealraum und in die Milz als bei MyD88^{-/-} Mäusen (Abb. 3.11 C-D). Dies könnte darauf beruhen, dass Neutrophile bei TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäusen wegen des intakten IL-1-Signalweges schneller rekrutiert werden, als Neutrophile bei MyD88^{-/-} Mäusen, deren IL-1-Signalweg defekt ist. Das freigesetzte IL-1 α/β kann somit an den IL-1-Rezeptor binden und eine PAMP/TLR-ähnliche pro-inflammatorische Signalkaskade auslösen. MyD88^{-/-} Mäuse sind zwar ebenfalls in der Lage IL-1 α/β zu produzieren, allerdings kann IL-1 α/β bei diesen Mäusen nicht autokrin stimulierend wirken.

Es wird postuliert, dass IL-10 durch Hochregulierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B die Produktion von TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 inhibiert, deren Expression NF- κ B abhängig ist (Moore et al., 2001; Lentsch et al., 1997; Schottelius et al., 1999). Nach diesem Modell wird I κ B in IL-10^{-/-} Mäusen nach der anfänglichen Induktion der Immunantwort viel später re-aktiviert, was zu einer verlängerten und verstärkten NF- κ B-Aktivierung führt, und damit zu einer verlängerten Zyto-/Chemokinantwort (Chmiel et al., 2002).

Bisher ist unklar, ob IL-1 α oder IL-1 β direkt oder indirekt für die PMN-Rekrutierung aus der Blutbahn verantwortlich ist. So wurde z.B. gezeigt, dass das sezernierte IL-1 β in erster Linie die Neutrophilen-Einwanderung bei einer kutanen *S. aureus* Infektion (Miller et al., 2007) und einer intranasalen Infektion mit *S. pneumoniae* induziert (Kafka et al., 2008). Andererseits wurde beschrieben, dass von nekrotischen Zellen sezerniertes IL-1 α eine wichtige Rolle für

die PMN-Rekrutierung in die Peritonealhöhle spielt (Eigenbrod et al., 2008). Wahrscheinlich ist die chemotaktische Wirkung von IL-1 α / β sowohl Zelltyp- bzw. Gewebe- als auch Infektionstypabhängig. Außerdem bedingt offensichtlich auch die Herkunft von IL-1 α / β dessen chemotaktische Wirkung: IL-1 β wird hauptsächlich von phagozytierenden Zellen der Immunität sezerniert, während Epithelzellen (wie auch Mesothelzellen der Peritonealhöhle) hauptsächlich IL-1 α produzieren (Mizutani et al., 1991).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten ebenfalls darauf hin, dass IL-1 α für die Rekrutierung der Neutrophilen in den Peritonealraum der *Yersinia*-infizierten Mäuse in der akuten Phase der Infektion (0-2 hpi) essentiell ist. Als Antwort auf den IL-1 α Stimulus wird über NF- κ B- und MAPK-Aktivierung die Produktion von verschiedenen inflammatorischen Zyto- und Chemokinen wie z.B. G-CSF, KC, MIP-2 oder MCP-1 durch Mesothelzellen induziert (Hartupée et al., 2008; Park et al., 2007).

MCP-1 („*monocyte chemoattractant protein*“) ist ein starker Aktivator für Monozyten, DZ, Gedächtnis-T-Zellen und Basophile (Charo and Ransohoff, 2006). G-CSF ist ein Zytokin, das bei Entzündungen hauptsächlich von Endothelzellen und Makrophagen ausgeschüttet wird und das Überleben von reifen und die Proliferation von unreifen Granulozyten stimuliert. Durch G-CSF werden die neutrophilen Granulozyten aktiviert und chemotaktisch zum Infektionsherd gelenkt. Die akute Rekrutierung der Neutrophilen aus dem Knochenmark ist der erste kritische Schritt für die anschließende Extravasation und Migration zum Inflammationsherd. MIP-2 (CXCL2) ist dem humanen IL-8 in der Maus ortholog und wirkt wie IL-8 chemotaktisch und aktivierend auf Neutrophile (Iyoda and Kobayashi, 2004). KC (CXCL1) ist ein weiteres IL-8 Ortholog der Maus mit chemotaktischen Eigenschaften für Neutrophile (Schumacher et al., 1992). Es wurde gezeigt, dass G-CSF, MIP-2 und KC zusammen die Rekrutierung von Neutrophilen aus dem Knochenmark induzieren, wobei nur MIP-2 und KC an der PMN-Rekrutierung aus der Blutbahn zum Inflammationsort beteiligt sind (Furze and Rankin, 2008b). Außerdem wurde von der selben Gruppe gezeigt, dass G-CSF bereits 2 hpi die Rekrutierung von Neutrophilen induziert (Wengner et al., 2008). Eine andere Arbeitsgruppe bestätigte ebenfalls, dass KC und MIP-2 die Schlüsselchemokine für die PMN-Infiltration in den Peritonealraum sind und dass KC und MIP-2 deren Konzentrationsmaxima bereits 2 h nach intraperitonealer Injektion nekrotischer Zellen (DAMP) erreichen (Tanimoto et al., 2007). Diese Daten entsprechen sehr gut den Ergebnissen, die in dieser Arbeit für *Yersinia*-infizierte IL-10^{-/-} Mäuse gewonnen wurden (Abb. 3.10 A und B).

Nach einem kutanen Mausinfektionsmodell von *S. aureus*, sezernieren residente Epithelzellen TLR-abhängig und TLR-unabhängig IL-1 α und IL-1 β , die wiederum die

Produktion von KC und MIP-2 durch andere Zellen und anschließende Einwanderung von Neutrophilen in die betroffenen Hautregionen induzieren (Miller et al., 2007).

Die Ergebnisse des Staphylokokken-Infektionsmodells können auf das in dieser Arbeit untersuchte *Yersinia*-Infektionsmodell übertragen werden. Nach *Yersinia*-Inokulation sezernieren Mesothelzellen und aktivierte residente Makrophagen zuerst IL-1 α/β , welches die Einwanderung von PMN induziert. Daraus kann man ableiten, dass IL-1Ra^{-/-} eine erhöhte PMN-Infiltration in den Bauchraum nach der *Yersinia*-Inokulation aufweisen sollte im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen, was dann zur schnelleren Eliminierung der Yersinien beitragen sollte. Diese Vermutung wurde bestätigt im *S. pneumoniae* Lungeninfektionsmodell unter Verwendung von IL-1Ra^{-/-} Mäusen (Kafka et al., 2008).

Infiltrierte Neutrophile setzen typischerweise die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (wie KC, MIP-2, MIP-1 α/β und MCP-1) fort, was zur Verstärkung der Neutrophilenrekrutierung führt (Kafka et al., 2008; Gamero and Oppenheim, 2006; Scapini et al., 2000). Durch diese positive Rückkopplung resultiert eine erhöhte Konzentration von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und die massive Einwanderung von weiteren Neutrophilen. Dieser Mechanismus erklärt, warum in den ersten 4 hpi in dem Peritonealraum und in der Milz von IL-10^{-/-} Mäusen eine stark erhöhte Konzentration von G-CSF, IL-6, MCP-1 und MIP-2 sowie eine hohe PMN-Einwanderung, im Vergleich zu C57BL/6 und MyD88^{-/-} Mäusen, feststellbar ist (Abb. 3.9). Eine exzessive Zytokinproduktion verbunden mit einer massiven Neutrophilen-Einwanderung wurde auch im *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionsmodell von infizierten IL-10^{-/-} Mäusen beschrieben (Chmiel et al., 2002).

Im Vergleich zur IL-10^{-/-} und C57BL/6 Maus, konnten sehr geringe Konzentrationen von G-CSF, IL-6, KC, MIP-2 und IL-1 β in der Peritoneallavage von MyD88^{-/-} Mäusen 4 hpi gemessen werden (Abb. 3.10 C). Es wurde bereits gezeigt, dass MyD88 für die Zytokininduktion nach Stimulierung mit verschiedenen Liganden, wie z.B. IL-1 β , IL-18, LPS oder CpG essentiell ist (Janssens and Beyaert, 2002). Dies erklärt wiederum eine stark verzögerte PMN-Einwanderung in den Bauchraum in den ersten 24 h der Infektion. Chemokine, die nach der PAMP-Stimulierung sekretiert werden, können als Vermittler zwischen Erreger und der angeborenen zellulären Immunantwort bewertet werden.

24 hpi gleichen sich die Zytokinkonzentrationen in der Peritoneallavage bei C57BL/6, IL-10^{-/-} und MyD88^{-/-} Mäusen an (außer G-CSF). 48 hpi steigen die Konzentrationen von G-CSF, KC, MCP-1 und MIP-2 stark an (Abb. 3.10 G), was zur massiven Neutrophilen-Infiltration 48 hpi führt (Abb. 3.9 A). Die verzögerte Zytokin- und Chemokinproduktion in der Peritonealhöhle von MyD88^{-/-} Mäusen kann auf die verzögerte TLR4/TRIF-Signaltransduktion (späte NF- κ B-Aktivierung) zurückgeführt werden (Cai et al., 2009). Diese Ergebnisse stehen

im Einklang mit den Daten, die im *S. aureus*-Infektionsmodell gewonnen wurden, wo ebenfalls gezeigt wurde, dass MyD88^{-/-} Mäuse erheblich niedrigere Konzentrationen von IL-1 β , KC und MIP-2 im Vergleich zu MyD88^{+/+}.C57BL/6J Mäusen 6 h nach kutanen Applikation aufwiesen; dieser Unterschied war 24 hpi jedoch nicht mehr auffällig (Miller et al., 2006).

Daraus wird deutlich, dass die frühe Zytokin- und Chemokinantwort in der akuten Phase der Infektion (0-4 hpi) für den Ausgang der Infektion entscheidend ist. Eine massive PMN-Einwanderung nach 24 h bedingt durch die verzögerte Chemokinfreisetzung in MyD88^{-/-} Mäusen ist nicht mehr ausreichend, um die starke Erregervermehrung (intraperitoneal 10⁶ CFU/MyD88^{-/-} vs. 10³ CFU/MyD88^{+/+} 24 hpi) zu hemmen (Abb. 3.8 A). Wie immunhistopathologisch in der Milz gezeigt, führen die massive *Yersinia*-Vermehrung und die starke Neutrophileninfiltration zur Zerstörung der Milzarchitektur (Abb. 3.7), wie es für septisches Organversagen typisch ist. Wie bereits oben diskutiert, disseminieren Yersinien sehr früh von der Bauchhöhle in die Milz, so dass bereits 4 hpi die Hälfte der Inokulationsdosis von 5x10³ CFU in der Milz nachweisbar ist (Abb. 3.8). Dort werden die Bakterien vermutlich von den residenten Splenozyten, wie z.B. Makrophagen und Neutrophilen aufgespürt, was zu einer Induktion der Signaltransduktionswege und Sekretion von pro-inflammatorischen Chemokinen, wie KC, MCP-1 und MIP-2 führt. Es kann aber auch sein, dass *Yersinia*-PAMP bereits bei der ip-Inokulation die Zytokinproduktion in der Milz induzieren. Erstaunlich ist, dass in den Milzhomogenaten infizierter Mäuse ein ähnliches Zytokinsekretionsmuster wie in der Peritoneallavage zu verzeichnen ist und zwar auch schon nach 4 hpi.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Schlussfolgerung zu, dass eine schnelle und starke (0-4 hpi) pro-inflammatorische Zytokin-/Chemokinantwort durch eine intakte TLR2/TLR4-Signalkaskade und besonders durch das Fehlen des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 für den Ausgang der *Yersinia*-Infektion in vivo entscheidend ist. Dieses Modell lässt sich schematisch, wie in Abb. 4.1 gezeigt, darstellen.

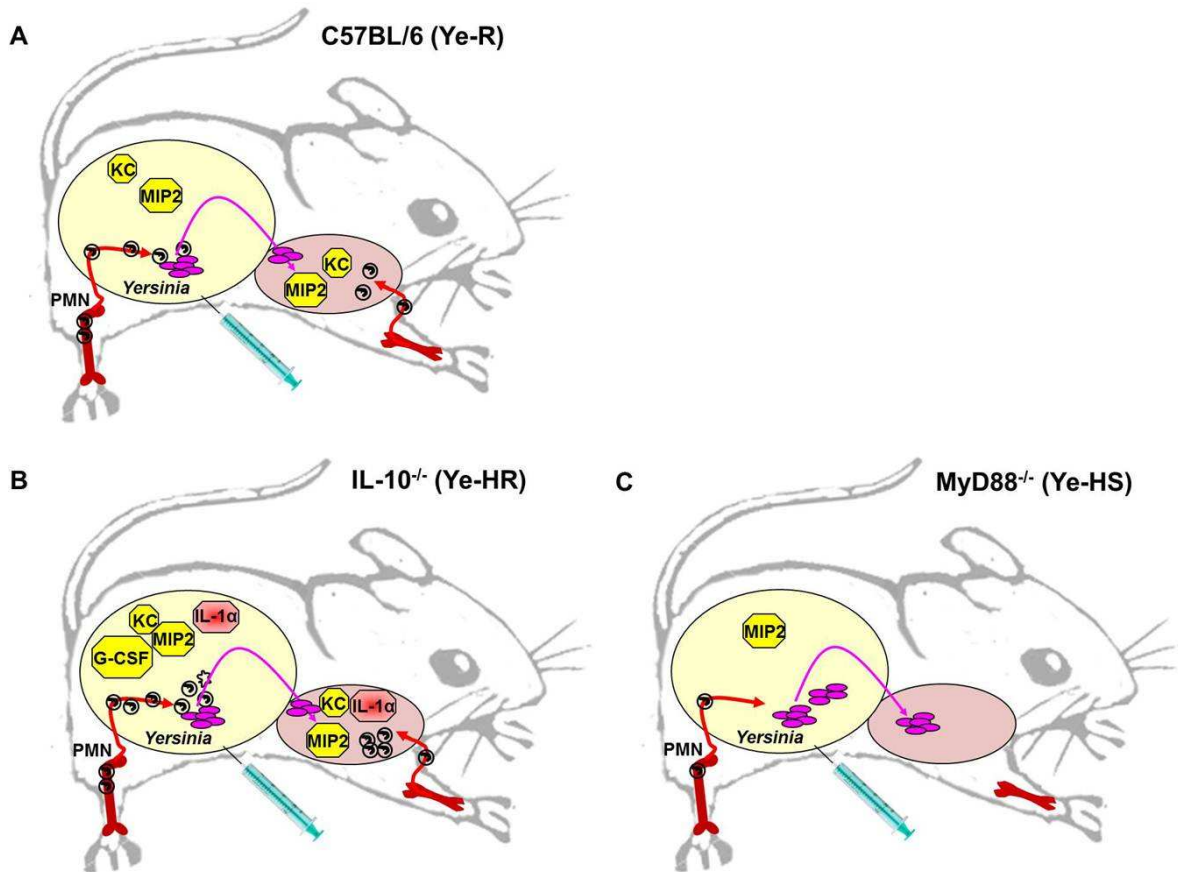


Abb. 4.1: *Yersinia*-Infektionsmodell der C57BL/6 Maus (A), IL-10^{-/-} Maus (B) und MyD88^{-/-} Maus (C). **A.** In der frühen Phase (2-4 h) nach intraperitonealer *Yersinia*-Inokulation sezernieren residente Zellen und Mesothelzellen Chemokine KC und MIP-2, die die PMN-Einwanderung in die Peritonealhöhle induzieren. Von der Bauchhöhle disseminieren *Yersinien* in die Milz, wo residente Splenozyten ebenfalls chemotaktische Chemokine freisetzen und PMN-Einwanderung aus dem Blut und dem Knochenmark induzieren. **B.** In der akuten Phase der Infektion produzieren Mesothelzellen und Splenozyten der IL-10^{-/-} Maus hohe Konzentrationen von IL-1α/β, KC, G-CSF und MIP-2. Diese Erhöhte Zytokin- und Chemokinproduktion führt zur massiven PMN-Einwanderung in den Bauchraum und in die Milz von IL-10^{-/-} Mäusen und schließlich zur *Yersinien*-Eliminierung. **C.** MyD88^{-/-} Mäuse weisen stark verzögerte pro-inflammatorische Immunantwort auf. In den ersten 2-4 h nach der Infektion verzeichnen Mesothelzellen und Splenozyten minimale Zytokinfreisetzung, was wiederum in einer stark attenuierten PMN-Einwanderung resultiert. *Yersinien* können somit ungehindert in die Milz disseminieren und sich sowohl im Bauchraum als auch in der Milz replizieren.

In vitro Infektionsversuche mit Knochenmarkzellen (KM) haben ebenso gezeigt, dass KM von IL-10^{-/-} Mäusen viel früher pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine als Antwort auf *Yersinien* sezernieren als KM von C57BL/6, MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} Mäusen. Bereits 2 hpi nach einer in vitro Infektion produzieren IL-10^{-/-} Knochenmarkzellen signifikant höhere Konzentrationen von G-CSF, IL-6 und KC als die KM der anderen drei Mausstämme (Abb. 3.17 A), wobei die Konzentrationen von diesen Chemokinen im Laufe der weiteren Stimulation mit abgetöteten *Yersinien* (PAMP) stark ansteigt. So sezernieren IL-10^{-/-} Knochenmarkzellen 17 hpi relativ hohe Konzentrationen (8 ng-400 µg) von G-CSF, IFN-γ, IL-6, KC, MCP-1 und MIP-2, wobei weder MyD88^{-/-} noch TLR2^{-/-}/4^{-/-} diese Zytokine zu den gemessenen Zeitpunkten (2 h, 5 h und 17 h) freisetzen (Abb. 3.17 C). Auffällig ist, dass IL-10^{-/-} Knochenmarkzellen in vitro erst 17 hpi IL-1α und IL-1β produzieren (im Vergleich zur frühzeitigen IL-1α/β-Sekretion in vivo), während kein IL-1α/β bei TLR2^{-/-}/4^{-/-} und MyD88^{-/-} KM-Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.17 C). Bemerkenswert ist, dass C57BL/6, MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/4^{-/-} KM-Zellen bereits 5 hpi IL-10 produzieren, dessen Konzentration 17 hpi stark erhöht bleibt.

Eine weitere interessante Tatsache war, dass die Knochenmarkzellen von MyD88^{-/-} und TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-} Mäusen fast identische Zytokin- und Chemokinmuster nach der Stimulation mit *Yersinia*-PAMP in vitro aufweisen (1 und 5 h nach Gentamicin-Zugabe) (Abb. 3.17 A, B). Auffällig war jedoch der Befund, dass die KM-Zellen von TLR2^{-/-}/4^{-/-} und C57BL/6 Mäusen signifikant höhere Konzentration von IL-10 und MCP-1 nach 17 h der *Yersinia*-PAMP-Stimulation im Vergleich zu den KM-Zellen von MyD88^{-/-} Mäusen produzieren (Abb. 3.17 C). Diese Ergebnisse sprechen für IL-1α/β-Stimulation, da IL-1 nach der Bindung an IL-1R ähnlich wie ein PAMP wirkt und die Produktion von sowohl pro-inflammatorischen Zytokinen (MCP-1) als auch anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-10) fordert. Des Weiteren, wird aus dieser Untersuchung deutlich, dass IL-10 offensichtlich die Produktion oder Freisetzung von G-CSF, IFN-γ, IL-6, KC, MCP-1 und IL-1α/β negativ beeinflusst, da bei fehlendem IL-10 diese pro-inflammatorische Zyto-/Chemokine hoch reguliert bleiben; hingegen hat IL-10 anscheinend keinen Einfluss auf die Produktion von MIP-2, TNF und MIP-1α/β (Abb. 3.17 C).

Literaturverzeichnis

Adkins,I., Koberle,M., Grobner,S., Bohn,E., Autenrieth,I.B., and Borgmann,S. (2007). Yersinia outer proteins E, H, P, and T differentially target the cytoskeleton and inhibit phagocytic capacity of dendritic cells. *Int. J. Med. Microbiol* 297, 235-244.

Aepfelbacher,M. (2004). Modulation of Rho GTPases by type III secretion system translocated effectors of Yersinia. *Rev. Physiol Biochem Pharmacol.* 152, 65-77.

Akira,S. and Takeda,K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499-511.

Akira,S., Uematsu,S., and Takeuchi,O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.

Anas,A., van der,P.T., and de Vos,A.F. (2010). Role of CD14 in lung inflammation and infection. *Crit Care* 14, 209.

Anderson,K.V. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product.

Anisimov,A.P., Lindler,L.E., and Pier,G.B. (2004). Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. *Clin. Microbiol Rev.* 17, 434-464.

Ansel,K.M., Ngo,V.N., Hyman,P.L., Luther,S.A., Forster,R., Sedgwick,J.D., Browning,J.L., Lipp,M., and Cyster,J.G. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 406, 309-314.

Arai,T., Hiromatsu,K., Nishimura,H., Kimura,Y., Kobayashi,N., Ishida,H., Nimura,Y., and Yoshikai,Y. (1995). Endogenous interleukin 10 prevents apoptosis in macrophages during *Salmonella* infection. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 213, 600-607.

Arend,W.P. (2002). The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 323-340.

Arend,W.P. and Gabay,C. (2000). Physiologic role of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Res.* 2, 245-248.

Athens,J.W., Haab,O.P., Raab,S.O., Mauer,A.M., Ashengrucker,H., Cartwright,G.E., and Wintrobe,M.M. (1961). Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J. Clin. Invest* 40, 989-995.

Auerbuch,V. and Isberg,R.R. (2007). Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice occurs independently of Toll-like receptor 2 expression and induction of interleukin-10. *Infect. Immun.* 75, 3561-3570.

Ault,K.A. and Springer,T.A. (1981). Cross-reaction of a rat-anti-mouse phagocyte-specific monoclonal antibody (anti-Mac-1) with human monocytes and natural killer cells. *J. Immunol.* *126*, 359-364.

Autenrieth,I.B., Beer,M., Bohn,E., Kaufmann,S.H., and Heesemann,J. (1994). Immune responses to *Yersinia enterocolitica* in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon. *Infect. Immun.* *62*, 2590-2599.

Autenrieth,I.B. and Heesemann,J. (1992). In vivo neutralization of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma abrogates resistance to *Yersinia enterocolitica* infection in mice. *Med. Microbiol Immunol.* *181*, 333-338.

Autenrieth,I.B., Vogel,U., Preger,S., Heymer,B., and Heesemann,J. (1993). Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in euthymic and T-cell-deficient athymic nude C57BL/6 mice: comparison of time course, histomorphology, and immune response. *Infect. Immun.* *61*, 2585-2595.

Baggiolini,M., Dewald,B., and Moser,B. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* *55*, 97-179.

Balada-Llasat,J.M. and Mecsas,J. (2006). *Yersinia* has a tropism for B and T cell zones of lymph nodes that is independent of the type III secretion system. *PLoS Pathog.* *2*, e86.

Banchereau,J. and Steinman,R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245-252.

Barz,C., Abahji,T.N., Trulzsch,K., and Heesemann,J. (2000). The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett.* *482*, 139-143.

Berkman,N., John,M., Roesems,G., Jose,P.J., Barnes,P.J., and Chung,K.F. (1995). Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *J. Immunol.* *155*, 4412-4418.

Black,D.S. and Bliska,J.B. (2000). The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol. Microbiol* *37*, 515-527.

Black,R.E., Jackson,R.J., Tsai,T., Medvesky,M., Shayegani,M., Feeley,J.C., MacLeod,K.I., and Wakelee,A.M. (1978). Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *N. Engl. J. Med.* *298*, 76-79.

Bliska,J.B. and Black,D.S. (1995). Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. *Infect. Immun.* *63*, 681-685.

Bockemuhl,J. and Roggentin,P. (2004). [Intestinal yersiniosis. Clinical importance, epidemiology, diagnosis, and prevention]. *Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz.* *47*, 685-691.

- Bohn,E. and Autenrieth,I.B. (1996). IL-12 is essential for resistance against *Yersinia enterocolitica* by triggering IFN-gamma production in NK cells and CD4+ T cells. *J. Immunol.* *156*, 1458-1468.
- Bohn,E., Sing,A., Zumbihl,R., Bielfeldt,C., Okamura,H., Kurimoto,M., Heesemann,J., and Autenrieth,I.B. (1998). IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice. *J. Immunol.* *160*, 299-307.
- Boland,A. and Cornelis,G.R. (1998). Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. *Infect. Immun.* *66*, 1878-1884.
- Boonstra,A., Rajsbaum,R., Holman,M., Marques,R., Sselin-Paturel,C., Pereira,J.P., Bates,E.E., Akira,S., Vieira,P., Liu,Y.J., Trinchieri,G., and O'Garra,A. (2006). Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J. Immunol.* *177*, 7551-7558.
- Borjesson,D.L., Kobayashi,S.D., Whitney,A.R., Voyich,J.M., Argue,C.M., and Deleo,F.R. (2005). Insights into pathogen immune evasion mechanisms: *Anaplasma phagocytophilum* fails to induce an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *J. Immunol.* *174*, 6364-6372.
- Bottone,E.J. (1997). *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol Rev.* *10*, 257-276.
- Broche,F. and Tellado,J.M. (2001). Defense mechanisms of the peritoneal cavity. *Curr Opin Crit Care* *7*, 105-116.
- Brubaker,R.R. (1991). Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae. *Clin. Microbiol Rev.* *4*, 309-324.
- Brubaker,R.R. (2003). Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to Yersiniae: roles of Yops and LcrV (V antigen). *Infect. Immun.* *71*, 3673-3681.
- BURROWS,T.W. (1956). An antigen determining virulence in *Pasteurella pestis*. *Nature* *177*, 426-427.
- Butler,T. (2009). Plague into the 21st century. *Clin. Infect. Dis.* *49*, 736-742.
- Cai,S., Batra,S., Shen,L., Wakamatsu,N., and Jeyaseelan,S. (2009). Both. *J. Immunol.* *183*, 6629-6638.
- Cannistra,S.A. and Griffin,J.D. (1988). Regulation of the production and function of granulocytes and monocytes. *Semin. Hematol.* *25*, 173-188.
- Carl,V.S., Brown-Steinke,K., Nicklin,M.J., and Smith,M.F., Jr. (2002). Toll-like receptor 2 and 4 (TLR2 and TLR4) agonists differentially regulate secretory interleukin-1 receptor antagonist gene expression in macrophages. *J. Biol. Chem.* *277*, 17448-17456.

Carter,P.B. (1975). Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice. *Infect. Immun.* 11, 164-170.

Carter,P.B. and Collins,F.M. (1974). Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in mice: kinetics of growth. *Infect. Immun.* 9, 851-857.

Carter,R.S., Pennington,K.N., Ungurait,B.J., Arrate,P., and Ballard,D.W. (2003). Signal-induced ubiquitination of I kappaB Kinase-beta. *J. Biol. Chem.* 278, 48903-48906.

Cassatella,M.A. (1999). Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.* 73, 369-509.

Cassatella,M.A., Meda,L., Bonora,S., Ceska,M., and Constantin,G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 178, 2207-2211.

Chamaillard,M., Hashimoto,M., Horie,Y., Masumoto,J., Qiu,S., Saab,L., Ogura,Y., Kawasaki,A., Fukase,K., Kusumoto,S., Valvano,M.A., Foster,S.J., Mak,T.W., Nunez,G., and Inohara,N. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* 4, 702-707.

Chan,T.M., Leung,J.K., Tsang,R.C., Liu,Z.H., Li,L.S., and Yung,S. (2003). Emodin ameliorates glucose-induced matrix synthesis in human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* 64, 519-533.

Chang,E.Y., Guo,B., Doyle,S.E., and Cheng,G. (2007). Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. *J. Immunol.* 178, 6705-6709.

Charo,I.F. and Ransohoff,R.M. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* 354, 610-621.

Chen,G., Shaw,M.H., Kim,Y.G., and Nunez,G. (2009). NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu. Rev. Pathol.* 4, 365-398.

Chmiel,J.F., Konstan,M.W., Saadane,A., Krenicky,J.E., Lester,K.H., and Berger,M. (2002). Prolonged inflammatory response to acute *Pseudomonas* challenge in interleukin-10 knockout mice. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 165, 1176-1181.

Collins,P.D., Jose,P.J., and Williams,T.J. (1991). The sequential generation of neutrophil chemoattractant proteins in acute inflammation in the rabbit in vivo. Relationship between C5a and proteins with the characteristics of IL-8/neutrophil-activating protein 1. *J. Immunol.* 146, 677-684.

Conlan,J.W. (1997). Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 65, 630-635.

- Cornelis,G.R. (1998). The *Yersinia* deadly kiss. J. Bacteriol. 180, 5495-5504.
- Cornelis,G.R. (2002). The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3, 742-752.
- Cornelis,G.R. and Van,G.F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. Annu. Rev. Microbiol 54, 735-774.
- Curfs,J.H., Meis,J.F., and Hoogkamp-Korstanje,J.A. (1997). A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. Clin. Microbiol Rev. 10, 742-780.
- Daems,W.T. and Koerten,H.K. (1978). The effects of various stimuli on the cellular composition of peritoneal exudates in the mouse. Cell Tissue Res. 190, 47-60.
- Dai,W.J., Kohler,G., and Brombacher,F. (1997). Both innate and acquired immunity to *Listeria monocytogenes* infection are increased in IL-10-deficient mice. J. Immunol. 158, 2259-2267.
- de Waal,M.R., Abrams,J., Bennett,B., Figdor,C.G., and de Vries,J.E. (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J. Exp. Med. 174, 1209-1220.
- DeBord,K.L., Lee,V.T., and Schneewind,O. (2001). Roles of LcrG and LcrV during type III targeting of effector Yops by *Yersinia enterocolitica*. J. Bacteriol. 183, 4588-4598.
- Dieckmann K., Bockemühl J., and Kühn H. (1993). Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch. Epidemiologie, Pathologie, Klinik, Diagnostik und Bekämpfung. (Stuttgart: Thieme Verlag).
- Delves,P.J. and Roitt,I.M. (2000). The immune system. First of two parts. N. Engl. J. Med. 343, 37-49.
- Denecker,G., Totemeyer,S., Mota,L.J., Troisfontaines,P., Lambermont,I., Youta,C., Stainier,I., Ackermann,M., and Cornelis,G.R. (2002). Effect of low- and high-virulence *Yersinia enterocolitica* strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells. Infect. Immun. 70, 3510-3520.
- Dinareello,C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood 87, 2095-2147.
- Dore,M., Slauson,D.O., and Neilsen,N.R. (1990). Membrane NADPH oxidase activity and cell size in bovine neonatal and adult neutrophils. Pediatr. Res. 28, 327-331.
- Dukuzumuremyi,J.M., Rosqvist,R., Hallberg,B., Akerstrom,B., Wolf-Watz,H., and Schesser,K. (2000). The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. J. Biol. Chem. 275, 35281-35290.
- Durand,E.A., Maldonado-Arocho,F.J., Castillo,C., Walsh,R.L., and Meccas,J. (2010). The presence of professional phagocytes dictates the number of host cells targeted for Yop translocation during infection. Cell Microbiol 12, 1064-1082.

Eigenbrod,T., Park,J.H., Harder,J., Iwakura,Y., and Nunez,G. (2008). Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells. *J. Immunol.* *181*, 8194-8198.

El Kasmi,K.C., Holst,J., Coffre,M., Mielke,L., de,P.A., Lhocine,N., Smith,A.M., Rutschman,R., Kaushal,D., Shen,Y., Suda,T., Donnelly,R.P., Myers,M.G., Jr., Alexander,W., Vignali,D.A., Watowich,S.S., Ernst,M., Hilton,D.J., and Murray,P.J. (2006). General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response. *J. Immunol.* *177*, 7880-7888.

El-Benna,J., Dang,P.M., and Gougerot-Pocidallo,M.A. (2008). Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin. Immunopathol.* *30*, 279-289.

Elomaa,O., Kangas,M., Sahlberg,C., Tuukkanen,J., Sormunen,R., Liakka,A., Thesleff,I., Kraal,G., and Tryggvason,K. (1995). Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell* *80*, 603-609.

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

Fallman,M., Persson,C., and Wolf-Watz,H. (1997). *Yersinia* proteins that target host cell signaling pathways. *J. Clin. Invest* *99*, 1153-1157.

Feng,C.G., Scanga,C.A., Collazo-Custodio,C.M., Cheever,A.W., Hieny,S., Caspar,P., and Sher,A. (2003). Mice lacking myeloid differentiation factor 88 display profound defects in host resistance and immune responses to *Mycobacterium avium* infection not exhibited by Toll-like receptor 2 (TLR2)- and TLR4-deficient animals. *J. Immunol.* *171*, 4758-4764.

Fenton,M.J. (1992). Review: transcriptional and post-transcriptional regulation of interleukin 1 gene expression. *Int. J. Immunopharmacol.* *14*, 401-411.

Fields,K.A., Nilles,M.L., Cowan,C., and Straley,S.C. (1999). Virulence role of V antigen of *Yersinia pestis* at the bacterial surface. *Infect. Immun.* *67*, 5395-5408.

Fields,K.A. and Straley,S.C. (1999). LcrV of *Yersinia pestis* enters infected eukaryotic cells by a virulence plasmid-independent mechanism. *Infect. Immun.* *67*, 4801-4813.

Fiorentino,D.F., Zlotnik,A., Mosmann,T.R., Howard,M., and O'Garra,A. (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* *147*, 3815-3822.

Fleming,T.J., Fleming,M.L., and Malek,T.R. (1993). Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J. Immunol.* *151*, 2399-2408.

Franchi,L., Warner,N., Viani,K., and Nunez,G. (2009). Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol. Rev.* *227*, 106-128.

Freeman,B.D. and Buchman,T.G. (2001). Interleukin-1 receptor antagonist as therapy for inflammatory disorders. *Expert. Opin Biol. Ther.* 1, 301-308.

Furze,R.C. and Rankin,S.M. (2008a). Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* 125, 281-288.

Furze,R.C. and Rankin,S.M. (2008b). The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB J.* 22, 3111-3119.

Galan,J.E. and Collmer,A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284, 1322-1328.

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

Gamero,A.M. and Oppenheim,J.J. (2006). IL-1 can act as number one. *Immunity* 24, 16-17.

Geijtenbeek,T.B., Groot,P.C., Nolte,M.A., van Vliet,S.J., Gangaram-Panday,S.T., van Duijnhoven,G.C., Kraal,G., van Oosterhout,A.J., and van,K.Y. (2002). Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo. *Blood* 100, 2908-2916.

Girardin,S.E., Boneca,I.G., Viala,J., Chamaillard,M., Labigne,A., Thomas,G., Philpott,D.J., and Sansonetti,P.J. (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 278, 8869-8872.

Girardin,S.E., Tournebise,R., Mavris,M., Page,A.L., Li,X., Stark,G.R., Bertin,J., DiStefano,P.S., Yaniv,M., Sansonetti,P.J., and Philpott,D.J. (2001). CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep.* 2, 736-742.

Goure,J., Broz,P., Attree,O., Cornelis,G.R., and Attree,I. (2005). Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *J. Infect. Dis.* 192, 218-225.

Granfors,K., Merilahti-Palo,R., Luukkainen,R., Mottonen,T., Lahesmaa,R., Probst,P., Marker-Hermann,E., and Toivanen,P. (1998). Persistence of *Yersinia* antigens in peripheral blood cells from patients with *Yersinia enterocolitica* O:3 infection with or without reactive arthritis. *Arthritis Rheum.* 41, 855-862.

Gunn,M.D., Kyuwa,S., Tam,C., Kakiuchi,T., Matsuzawa,A., Williams,L.T., and Nakano,H. (1999). Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J. Exp. Med.* 189, 451-460.

Hancock,G.E., Schaedler,R.W., and MacDonald,T.T. (1986). *Yersinia enterocolitica* infection in resistant and susceptible strains of mice. *Infect. Immun.* 53, 26-31.

Hancock,G.E., Schaedler,R.W., and MacDonald,T.T. (1988). Multigenic control of resistance to *Yersinia enterocolitica* in inbred strains of mice. *Infect. Immun.* 56, 532-533.

Hart,P.H., Hunt,E.K., Bonder,C.S., Watson,C.J., and Finlay-Jones,J.J. (1996). Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10. *J. Immunol.* 157, 3672-3680.

Hartupee,J., Li,X., and Hamilton,T. (2008). Interleukin 1alpha-induced NFkappaB activation and chemokine mRNA stabilization diverge at IRAK1. *J. Biol. Chem.* 283, 15689-15693.

Hashimoto,C., Hudson,K.L., and Anderson,K.V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279.

Hawn,T.R., Smith,K.D., Aderem,A., and Skerrett,S.J. (2006). Myeloid differentiation primary response gene (88)- and toll-like receptor 2-deficient mice are susceptible to infection with aerosolized *Legionella pneumophila*. *J. Infect. Dis.* 193, 1693-1702.

Hawrylowicz,C.M. and O'Garra,A. (2005). Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 271-283.

Hazuda,D.J., Lee,J.C., and Young,P.R. (1988). The kinetics of interleukin 1 secretion from activated monocytes. Differences between interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta. *J. Biol. Chem.* 263, 8473-8479.

Heesemann,J. (2001). Die Gattung *Yersinia*, Yersiniosen. (München, Jena: Urban & Fischer Verlag).

Heesemann,J., Algermissen,B., and Laufs,R. (1984). Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 46, 105-110.

Heesemann,J., Gross,U., Schmidt,N., and Laufs,R. (1986). Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infect. Immun.* 54, 561-567.

Heesemann,J. and Laufs,R. (1983). Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J. Bacteriol.* 155, 761-767.

Heesemann,J., Sing,A., and Trulzsch,K. (2006). *Yersinia*'s stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Curr Opin Microbiol* 9, 55-61.

Hill,J., Leary,S.E., Griffin,K.F., Williamson,E.D., and Titball,R.W. (1997). Regions of *Yersinia pestis* V antigen that contribute to protection against plague identified by passive and active immunization. *Infect. Immun.* 65, 4476-4482.

Hirsch,E., Irikura,V.M., Paul,S.M., and Hirsh,D. (1996). Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 11008-11013.

Horai,R., Saijo,S., Tanioka,H., Nakae,S., Sudo,K., Okahara,A., Ikuse,T., Asano,M., and Iwakura,Y. (2000). Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J. Exp. Med.* 191, 313-320.

Hornig,T., Barton,G.M., Flavell,R.A., and Medzhitov,R. (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420, 329-333.

Hoshino,K., Takeuchi,O., Kawai,T., Sanjo,H., Ogawa,T., Takeda,Y., Takeda,K., and Akira,S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 162, 3749-3752.

Hsu,Y.M., Zhang,Y., You,Y., Wang,D., Li,H., Duramad,O., Qin,X.F., Dong,C., and Lin,X. (2007). The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nat. Immunol.* 8, 198-205.

Huber,M., Kalis,C., Keck,S., Jiang,Z., Georgel,P., Du,X., Shamel,L., Sovath,S., Mudd,S., Beutler,B., Galanos,C., and Freudenberg,M.A. (2006). R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells. *Eur. J. Immunol.* 36, 701-711.

Inohara,N., Koseki,T., Lin,J., del,P.L., Lucas,P.C., Chen,F.F., Ogura,Y., and Nunez,G. (2000). An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 275, 27823-27831.

Inohara,N. and Nunez,G. (2001). The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* 20, 6473-6481.

Inohara,N. and Nunez,G. (2003). NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 371-382.

Isberg,R.R. and Barnes,P. (2001). Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. *J. Cell Sci.* 114, 21-28.

Itou,T., Collins,L.V., Thoren,F.B., Dahlgren,C., and Karlsson,A. (2006). Changes in activation states of murine polymorphonuclear leukocytes (PMN) during inflammation: a comparison of bone marrow and peritoneal exudate PMN. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 575-583.

Iyoda,T. and Kobayashi,Y. (2004). Involvement of MIP-2 and CXCR2 in neutrophil infiltration following injection of late apoptotic cells into the peritoneal cavity. *Apoptosis.* 9, 485-493.

Janeway,C.A., Jr. and Medzhitov,R. (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197-216.

Janeway,C.A., Murphy K., Travers P., and Walport M. (2008). *Janeway's Immunobiology*. (New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC).

Janssens,S. and Beyaert,R. (2002). A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem Sci.* 27, 474-482.

Jerala,R. (2007). Structural biology of the LPS recognition. *Int. J. Med. Microbiol* 297, 353-363.

Jeyaseelan,S., Young,S.K., Fessler,M.B., Liu,Y., Malcolm,K.C., Yamamoto,M., Akira,S., and Worthen,G.S. (2007). Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF)-mediated signaling contributes to innate immune responses in the lung during *Escherichia coli* pneumonia. *J. Immunol.* *178*, 3153-3160.

Jiang,Z., Georgel,P., Du,X., Shamel,L., Sovath,S., Mudd,S., Huber,M., Kalis,C., Keck,S., Galanos,C., Freudenberg,M., and Beutler,B. (2005). CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat. Immunol.* *6*, 565-570.

Jin,C. and Flavell,R.A. (2010). Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *J. Clin. Immunol.* *30*, 628-631.

Kafka,D., Ling,E., Feldman,G., Benharroch,D., Voronov,E., Givon-Lavi,N., Iwakura,Y., Dagan,R., Apte,R.N., and Mizrahi-Nebenzahl,Y. (2008). Contribution of IL-1 to resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection. *Int. Immunol.* *20*, 1139-1146.

Kang,Y.S., Kim,J.Y., Bruening,S.A., Pack,M., Charalambous,A., Pritsker,A., Moran,T.M., Loeffler,J.M., Steinman,R.M., and Park,C.G. (2004). The C-type lectin SIGN-R1 mediates uptake of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* in the marginal zone of mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 215-220.

Kang,Y.S., Yamazaki,S., Iyoda,T., Pack,M., Bruening,S.A., Kim,J.Y., Takahara,K., Inaba,K., Steinman,R.M., and Park,C.G. (2003). SIGN-R1, a novel C-type lectin expressed by marginal zone macrophages in spleen, mediates uptake of the polysaccharide dextran. *Int. Immunol.* *15*, 177-186.

Kanneganti,T.D., Lamkanfi,M., and Nunez,G. (2007). Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* *27*, 549-559.

Kato,S., Yuzawa,Y., Tsuboi,N., Maruyama,S., Morita,Y., Matsuguchi,T., and Matsuo,S. (2004). Endotoxin-induced chemokine expression in murine peritoneal mesothelial cells: the role of toll-like receptor 4. *J. Am. Soc. Nephrol.* *15*, 1289-1299.

Kaufmann,S.H. and Kabelitz D. (2002). *Methods in Microbiology*. Academic Press).

Kawahara,K., Tsukano,H., Watanabe,H., Lindner,B., and Matsuura,M. (2002). Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. *Infect. Immun.* *70*, 4092-4098.

Kawai,T., Adachi,O., Ogawa,T., Takeda,K., and Akira,S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* *11*, 115-122.

Kawai,T. and Akira,S. (2007). TLR signaling. *Semin. Immunol.* *19*, 24-32.

Keet,E.E. (1974). *Yersinia enterocolitica* septicemia. Source of infection and incubation period identified. *N. Y. State J. Med.* *74*, 2226-2230.

Kennedy,A.D. and DeLeo,F.R. (2009). Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol. Res.* *43*, 25-61.

Kerschen,E.J., Cohen,D.A., Kaplan,A.M., and Straley,S.C. (2004). The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. *Infect. Immun.* 72, 4589-4602.

Kim,J.G., Lee,S.J., and Kagnoff,M.F. (2004). Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect. Immun.* 72, 1487-1495.

Kirby,A.C., Yrlid,U., and Wick,M.J. (2002). The innate immune response differs in primary and secondary *Salmonella* infection. *J. Immunol.* 169, 4450-4459.

Kishimoto,T.K., Jutila,M.A., Berg,E.L., and Butcher,E.C. (1989). Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 245, 1238-1241.

Klebanoff,S.J. (1970). Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. *Science* 169, 1095-1097.

Klebanoff,S.J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 77, 598-625.

Kobayashi,K., Inohara,N., Hernandez,L.D., Galan,J.E., Nunez,G., Janeway,C.A., Medzhitov,R., and Flavell,R.A. (2002). RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* 416, 194-199.

Kobayashi,S.D., Braughton,K.R., Whitney,A.R., Voyich,J.M., Schwan,T.G., Musser,J.M., and DeLeo,F.R. (2003a). Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 10948-10953.

Kobayashi,S.D., Voyich,J.M., Braughton,K.R., and DeLeo,F.R. (2003b). Down-regulation of proinflammatory capacity during apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 170, 3357-3368.

Koppel,E.A., Ludwig,I.S., Hernandez,M.S., Lowary,T.L., Gadikota,R.R., Tuzikov,A.B., Vandenbroucke-Grauls,C.M., van,K.Y., Appelmelk,B.J., and Geijtenbeek,T.B. (2004). Identification of the mycobacterial carbohydrate structure that binds the C-type lectins DC-SIGN, L-SIGN and SIGNR1. *Immunobiology* 209, 117-127.

Kraal,G. and Mebius,R. (2006). New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen. *Int. Rev. Cytol.* 250, 175-215.

Krop,I., Shaffer,A.L., Fearon,D.T., and Schlissel,M.S. (1996). The signaling activity of murine CD19 is regulated during cell development. *J. Immunol.* 157, 48-56.

Kuhn,R., Lohler,J., Rennick,D., Rajewsky,K., and Muller,W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263-274.

Land,W.G. (2005). The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation* 79, 505-514.

Lanoue,A., Clatworthy,M.R., Smith,P., Green,S., Townsend,M.J., Jolin,H.E., Smith,K.G., Fallon,P.G., and McKenzie,A.N. (2004). SIGN-R1 contributes to protection against lethal pneumococcal infection in mice. *J. Exp. Med.* 200, 1383-1393.

Laroux,F.S., Romero,X., Wetzler,L., Engel,P., and Terhorst,C. (2005). Cutting edge: MyD88 controls phagocyte NADPH oxidase function and killing of gram-negative bacteria. *J. Immunol.* 175, 5596-5600.

Larson,R.S. and Springer,T.A. (1990). Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol. Rev.* 114, 181-217.

Leary,S.E., Williamson,E.D., Griffin,K.F., Russell,P., Eley,S.M., and Titball,R.W. (1995). Active immunization with recombinant V antigen from *Yersinia pestis* protects mice against plague. *Infect. Immun.* 63, 2854-2858.

Lemaitre,B., Nicolas,E., Michaut,L., Reichhart,J.M., and Hoffmann,J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.

Lentsch,A.B., Shanley,T.P., Sarma,V., and Ward,P.A. (1997). In vivo suppression of NF-kappa B and preservation of I kappa B alpha by interleukin-10 and interleukin-13. *J. Clin. Invest* 100, 2443-2448.

Leo,O., Foo,M., Sachs,D.H., Samelson,L.E., and Bluestone,J.A. (1987). Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 1374-1378.

Ley,K. (2002). Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol. Rev.* 186, 8-18.

Lippert H. (2003). *Lehrbuch Anatomie.* (München · Jena: Urban & Fischer Verlag).

Liu,Y., Wei,S.H., Ho,A.S., de Waal,M.R., and Moore,K.W. (1994). Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J. Immunol.* 152, 1821-1829.

Lutfalla,G., Gardiner,K., and Uze,G. (1993). A new member of the cytokine receptor gene family maps on chromosome 21 at less than 35 kb from IFNAR. *Genomics* 16, 366-373.

MACKANESS,G.B. (1962). Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* 116, 381-406.

Malorny,U., Michels,E., and Sorg,C. (1986). A monoclonal antibody against an antigen present on mouse macrophages and absent from monocytes. *Cell Tissue Res.* 243, 421-428.

Masumoto,J., Dowds,T.A., Schaner,P., Chen,F.F., Ogura,Y., Li,M., Zhu,L., Katsuyama,T., Sagara,J., Taniguchi,S., Gumucio,D.L., Nunez,G., and Inohara,N. (2003). ASC is an activating adaptor for NF-kappa B and caspase-8-dependent apoptosis. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 303, 69-73.

Matsukawa,A. and Yoshinaga,M. (1998). Sequential generation of cytokines during the initiative phase of inflammation, with reference to neutrophils. *Inflamm. Res.* *47 Suppl 3*, S137-S144.

Mayer-Scholl,A., Aaverhoff,P., and Zychlinsky,A. (2004). How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol* *7*, 62-66.

McDonald,C., Vacratsis,P.O., Bliska,J.B., and Dixon,J.E. (2003). The *yersinia* virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J. Biol. Chem.* *278*, 18514-18523.

McNally,A., Cheasty,T., Fearnley,C., Dalziel,R.W., Paiba,G.A., Manning,G., and Newell,D.G. (2004). Comparison of the biotypes of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs, cattle and sheep at slaughter and from humans with yersiniosis in Great Britain during 1999-2000. *Lett. Appl. Microbiol* *39*, 103-108.

Mebius,R.E. and Kraal,G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 606-616.

Mebius,R.E., Nolte,M.A., and Kraal,G. (2004). Development and function of the splenic marginal zone. *Crit Rev. Immunol.* *24*, 449-464.

Medzhitov,R. and Janeway,C.A., Jr. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* *296*, 298-300.

Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., Kopp,E., Stadlen,A., Chen,C., Ghosh,S., and Janeway,C.A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* *2*, 253-258.

Meinzer,U., Esmiol-Welterlin,S., Barreau,F., Berrebi,D., Dussailant,M., Bonacorsi,S., Chareyre,F., Niwa-Kawakita,M., Alberti,C., Sterkers,G., Villard,C., Lesuffleur,T., Peuchmaur,M., Karin,M., Eckmann,L., Giovannini,M., Ollendorff,V., Wolf-Watz,H., and Hugot,J.P. (2008). Nod2 mediates susceptibility to *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. *PLoS One* *3*, e2769.

Metlay,J.P., Witmer-Pack,M.D., Agger,R., Crowley,M.T., Lawless,D., and Steinman,R.M. (1990). The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* *171*, 1753-1771.

Meylan,E., Burns,K., Hofmann,K., Blancheteau,V., Martinon,F., Kelliher,M., and Tschopp,J. (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat. Immunol.* *5*, 503-507.

Miletic,A.V., Graham,D.B., Montgrain,V., Fujikawa,K., Kloeppe,T., Brim,K., Weaver,B., Schreiber,R., Xavier,R., and Swat,W. (2007). Vav proteins control MyD88-dependent oxidative burst. *Blood* *109*, 3360-3368.

Miller,L.S., O'Connell,R.M., Gutierrez,M.A., Pietras,E.M., Shahangian,A., Gross,C.E., Thirumala,A., Cheung,A.L., Cheng,G., and Modlin,R.L. (2006). MyD88 mediates neutrophil

recruitment initiated by IL-1R but not TLR2 activation in immunity against *Staphylococcus aureus*. *Immunity* 24, 79-91.

Miller,L.S., Pietras,E.M., Uricchio,L.H., Hirano,K., Rao,S., Lin,H., O'Connell,R.M., Iwakura,Y., Cheung,A.L., Cheng,G., and Modlin,R.L. (2007). Inflammasome-mediated production of IL-1beta is required for neutrophil recruitment against *Staphylococcus aureus* in vivo. *J. Immunol.* 179, 6933-6942.

Mills,S.D., Boland,A., Sory,M.P., van der,S.P., Kerbouch,C., Finlay,B.B., and Cornelis,G.R. (1997). *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, 12638-12643.

Misawa,R., Kawagishi,C., Watanabe,N., and Kobayashi,Y. (2001). Infiltration of neutrophils following injection of apoptotic cells into the peritoneal cavity. *Apoptosis.* 6, 411-417.

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

Miyake,K. (2004). Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol* 12, 186-192.

Mizutani,H., Black,R., and Kupper,T.S. (1991). Human keratinocytes produce but do not process pro-interleukin-1 (IL-1) beta. Different strategies of IL-1 production and processing in monocytes and keratinocytes. *J. Clin. Invest* 87, 1066-1071.

Monack,D.M., Mecsas,J., Ghori,N., and Falkow,S. (1997). *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 10385-10390.

Montminy,S.W., Khan,N., McGrath,S., Walkowicz,M.J., Sharp,F., Conlon,J.E., Fukase,K., Kusumoto,S., Sweet,C., Miyake,K., Akira,S., Cotter,R.J., Goguen,J.D., and Lien,E. (2006). Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nat. Immunol.* 7, 1066-1073.

Moore,K.W., de Waal,M.R., Coffman,R.L., and O'Garra,A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683-765.

Moreira,L.O., El Kasmi,K.C., Smith,A.M., Finkelstein,D., Fillon,S., Kim,Y.G., Nunez,G., Tuomanen,E., and Murray,P.J. (2008). The TLR2-MyD88-NOD2-RIPK2 signalling axis regulates a balanced pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory cytokine response to Gram-positive cell walls. *Cell Microbiol* 10, 2067-2077.

Morse,H.C., III, Kearney,J.F., Isaacson,P.G., Carroll,M., Fredrickson,T.N., and Jaffe,E.S. (2001). Cells of the marginal zone--origins, function and neoplasia. *Leuk. Res.* 25, 169-178.

Mota,L.J. (2006). Type III secretion gets an LcrV tip. *Trends Microbiol* 14, 197-200.

- Mukherjee,S., Keitany,G., Li,Y., Wang,Y., Ball,H.L., Goldsmith,E.J., and Orth,K. (2006). *Yersinia* YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* 312, 1211-1214.
- Murphy,J.E., Robert,C., and Kupper,T.S. (2000). Interleukin-1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity. *J. Invest Dermatol.* 114, 602-608.
- Murray,P.J. (2006a). STAT3-mediated anti-inflammatory signalling. *Biochem Soc. Trans.* 34, 1028-1031.
- Murray,P.J. (2006b). Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol.* 6, 379-386.
- Murros-Kontinen,A.E., Johansson,P., Niskanen,T., Fredriksson-Ahomaa,M., Korkeala,H., and Bjorkroth,J. (2010). *Yersinia pekkanenii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Mutsaers,S.E. (2002). Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology.* 7, 171-191.
- Nagaoka,K., Takahara,K., Tanaka,K., Yoshida,H., Steinman,R.M., Saitoh,S., Kashi-Takamura,S., Miyake,K., Kang,Y.S., Park,C.G., and Inaba,K. (2005). Association of SIGIRR with TLR4-MD-2 enhances signal transduction by recognition of LPS in gram-negative bacteria. *Int. Immunol.* 17, 827-836.
- Nathan,C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 173-182.
- Netea,M.G., Suttmoller,R., Hermann,C., Van der Graaf,C.A., Van der Meer,J.W., van Krieken,J.H., Hartung,T., Adema,G., and Kullberg,B.J. (2004). Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol.* 172, 3712-3718.
- Ngo,V.N., Korner,H., Gunn,M.D., Schmidt,K.N., Riminton,D.S., Cooper,M.D., Browning,J.L., Sedgwick,J.D., and Cyster,J.G. (1999). Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen. *J. Exp. Med.* 189, 403-412.
- Nicklin,M.J., Hughes,D.E., Barton,J.L., Ure,J.M., and Duff,G.W. (2000). Arterial inflammation in mice lacking the interleukin 1 receptor antagonist gene. *J. Exp. Med.* 191, 303-312.
- O'Farrell,A.M., Liu,Y., Moore,K.W., and Mui,A.L. (1998). IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 17, 1006-1018.
- Oellerich,M.F., Jacobi,C.A., Freund,S., Niedung,K., Bach,A., Heesemann,J., and Trulzsch,K. (2007). *Yersinia enterocolitica* infection of mice reveals clonal invasion and abscess formation. *Infect. Immun.* 75, 3802-3811.

Oertelt,C., Lindner,B., Skurnik,M., and Holst,O. (2001). Isolation and structural characterization of an R-form lipopolysaccharide from *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. Eur. J. Biochem 268, 554-564.

Ogasawara,M., Granfors,K., Kono,D.H., Hill,J.L., and Yu,D.T. (1985). A *Yersinia enterocolitica* serotype 0:3 lipopolysaccharide-specific monoclonal antibody reacts more strongly with bacteria cultured at room temperature than those cultured at 37 degrees C. J. Immunol. 135, 553-559.

Orth,K., Palmer,L.E., Bao,Z.Q., Stewart,S., Rudolph,A.E., Bliska,J.B., and Dixon,J.E. (1999). Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. Science 285, 1920-1923.

Oshiumi,H., Sasai,M., Shida,K., Fujita,T., Matsumoto,M., and Seya,T. (2003). TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. J. Biol. Chem. 278, 49751-49762.

Ozinsky,A., Underhill,D.M., Fontenot,J.D., Hajjar,A.M., Smith,K.D., Wilson,C.B., Schroeder,L., and Aderem,A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97, 13766-13771.

Palmer,L.E., Hobbie,S., Galan,J.E., and Bliska,J.B. (1998). YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. Mol. Microbiol 27, 953-965.

Park,J.H., Kim,Y.G., Shaw,M., Kanneganti,T.D., Fujimoto,Y., Fukase,K., Inohara,N., and Nunez,G. (2007). Nod1/RICK and TLR signaling regulate chemokine and antimicrobial innate immune responses in mesothelial cells. J. Immunol. 179, 514-521.

Perez-Gutierrez,C., Llobet,E., Llompарт,C.M., Reines,M., and Bengoechea,J.A. (2010). Role of lipid A acylation in *Yersinia enterocolitica* virulence. Infect. Immun. 78, 2768-2781.

Perry,R.D. and Fetherston,J.D. (1997). *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. Clin. Microbiol Rev. 10, 35-66.

Persson,C., Carballeira,N., Wolf-Watz,H., and Fallman,M. (1997). The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. EMBO J. 16, 2307-2318.

Persson,C., Nordfelth,R., Andersson,K., Forsberg,A., Wolf-Watz,H., and Fallman,M. (1999). Localization of the *Yersinia* PTPase to focal complexes is an important virulence mechanism. Mol. Microbiol 33, 828-838.

Pettersson,J., Holmstrom,A., Hill,J., Leary,S., Frithz-Lindsten,E., von Euler-Matell,A., Carlsson,E., Titball,R., Forsberg,A., and Wolf-Watz,H. (1999). The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. Mol. Microbiol 32, 961-976.

- Portnoy,D.A. and Falkow,S. (1981). Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. J. Bacteriol. 148, 877-883.
- Power,M.R., Li,B., Yamamoto,M., Akira,S., and Lin,T.J. (2007). A role of Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta in the host response to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. J. Immunol. 178, 3170-3176.
- Power,M.R., Peng,Y., Maydanski,E., Marshall,J.S., and Lin,T.J. (2004). The development of early host response to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is critically dependent on myeloid differentiation factor 88 in mice. J. Biol. Chem. 279, 49315-49322.
- Prentice,M.B., Cope,D., and Swann,R.A. (1991). The epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infection in the British Isles 1983-1988. Contrib. Microbiol Immunol. 12, 17-25.
- Pujol,C. and Bliska,J.B. (2005). Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. Clin. Immunol. 114, 216-226.
- Quinn,M.T., Ammons,M.C., and Deleo,F.R. (2006). The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. Clin. Sci. (Lond) 111, 1-20.
- Ray,A. and Dittel,B.N. (2010). Isolation of mouse peritoneal cavity cells. J. Vis. Exp.
- Rebeil,R., Ernst,R.K., Jarrett,C.O., Adams,K.N., Miller,S.I., and Hinnebusch,B.J. (2006). Characterization of late acyltransferase genes of *Yersinia pestis* and their role in temperature-dependent lipid A variation. J. Bacteriol. 188, 1381-1388.
- Reiling,N., Ehlers,S., and Holscher,C. (2008). MyDths and un-TOLled truths: sensor, instructive and effector immunity to tuberculosis. Immunol. Lett. 116, 15-23.
- Reithmeier-Rost D. Immunmodulation durch Interaktion des *Yersinia enterocolitica* V-Antigens mit Rezeptoren des angeborenen Immunsystems. 2005. Universität Regensburg, Fakultät für Chemie und Pharmazie. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Rieger M. and Schroeder T. (2007). Hämatopoetische Stammzellen. Biospektrum.
- Robert Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin. Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und public health. Robert Koch - Institut. 15. 18-4-2011. Brandenburgische Universitätsdruckerei und Verlagsgesellschaft Potsdam mbH. Ref Type: Report
- Rollins,B.J. (1997). Chemokines. Blood 90, 909-928.
- Roppenser,B., Roder,A., Hentschke,M., Ruckdeschel,K., and Aepfelbacher,M. (2009). *Yersinia enterocolitica* differentially modulates RhoG activity in host cells. J. Cell Sci. 122, 696-705.
- Rosner,B.M., Stark,K., and Werber,D. (2010). Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008. BMC Public Health 10, 337.

Ruckdeschel,K. (2002). Immunomodulation of macrophages by pathogenic *Yersinia* species. Arch Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) 50, 131-137.

Ruckdeschel,K., Harb,S., Roggenkamp,A., Hornef,M., Zumbihl,R., Kohler,S., Heesemann,J., and Rouot,B. (1998). *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. J. Exp. Med. 187, 1069-1079.

Ruckdeschel,K., Pfaffinger,G., Haase,R., Sing,A., Weighardt,H., Hacker,G., Holzmann,B., and Heesemann,J. (2004). Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages. J. Immunol. 173, 3320-3328.

Ruckdeschel,K., Roggenkamp,A., Schubert,S., and Heesemann,J. (1996). Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. Infect. Immun. 64, 724-733.

Rydstrom,A. and Wick,M.J. (2007a). Monocyte recruitment, activation, and function in the gut-associated lymphoid tissue during oral *Salmonella* infection. J. Immunol. 178, 5789-5801.

Rydstrom,A. and Wick,M.J. (2007b). Monocyte recruitment, activation, and function in the gut-associated lymphoid tissue during oral *Salmonella* infection. J. Immunol. 178, 5789-5801.

Sander,B., Hoiden,I., Andersson,U., Moller,E., and Abrams,J.S. (1993). Similar frequencies and kinetics of cytokine producing cells in murine peripheral blood and spleen. Cytokine detection by immunoassay and intracellular immunostaining. J. Immunol. Methods 166, 201-214.

Saraiva,M. and O'Garra,A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. Nat. Rev. Immunol. 10, 170-181.

Sasaki,S., Nishikawa,S., Miura,T., Mizuki,M., Yamada,K., Madarame,H., Tagawa,Y.I., Iwakura,Y., and Nakane,A. (2000). Interleukin-4 and interleukin-10 are involved in host resistance to *Staphylococcus aureus* infection through regulation of gamma interferon. Infect. Immun. 68, 2424-2430.

Sato,S., Ono,N., Steeber,D.A., Pisetsky,D.S., and Tedder,T.F. (1996). CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. J. Immunol. 157, 4371-4378.

Sato,S., Sugiyama,M., Yamamoto,M., Watanabe,Y., Kawai,T., Takeda,K., and Akira,S. (2003). Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. J. Immunol. 171, 4304-4310.

Sauvonnet,N., Lambermont,I., van der,B.P., and Cornelis,G.R. (2002). YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Mol. Microbiol 45, 805-815.

- Savill,J., Fadok,V., Henson,P., and Haslett,C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today* 14, 131-136.
- Scapini,P., Lapinet-Vera,J.A., Gasperini,S., Calzetti,F., Bazzoni,F., and Cassatella,M.A. (2000). The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol. Rev.* 177, 195-203.
- Schaller,E., Macfarlane,A.J., Rupec,R.A., Gordon,S., McKnight,A.J., and Pfeffer,K. (2002). Inactivation of the F4/80 glycoprotein in the mouse germ line. *Mol. Cell Biol.* 22, 8035-8043.
- Schotte,P., Denecker,G., Van Den,B.A., Vandenabeele,P., Cornelis,G.R., and Beyaert,R. (2004). Targeting Rac1 by the *Yersinia* effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta. *J. Biol. Chem.* 279, 25134-25142.
- Schottelius,A.J., Mayo,M.W., Sartor,R.B., and Baldwin,A.S., Jr. (1999). Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J. Biol. Chem.* 274, 31868-31874.
- Schubert,S., Rakin,A., and Heesemann,J. (2004). The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int. J. Med. Microbiol* 294, 83-94.
- Schumacher,C., Clark-Lewis,I., Baggiolini,M., and Moser,B. (1992). High- and low-affinity binding of GRO alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 10542-10546.
- Setsukinai,K., Urano,Y., Kakinuma,K., Majima,H.J., and Nagano,T. (2003). Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J. Biol. Chem.* 278, 3170-3175.
- Sheppard,F.R., Kelher,M.R., Moore,E.E., McLaughlin,N.J., Banerjee,A., and Silliman,C.C. (2005). Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J. Leukoc. Biol.* 78, 1025-1042.
- Sing,A., Reithmeier-Rost,D., Granfors,K., Hill,J., Roggenkamp,A., and Heesemann,J. (2005). A hypervariable N-terminal region of *Yersinia* LcrV determines Toll-like receptor 2-mediated IL-10 induction and mouse virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 16049-16054.
- Sing,A., Roggenkamp,A., Geiger,A.M., and Heesemann,J. (2002a). *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, 1315-1321.
- Sing,A., Rost,D., Tvardovskaia,N., Roggenkamp,A., Wiedemann,A., Kirschning,C.J., Aepfelbacher,M., and Heesemann,J. (2002b). *Yersinia* V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J. Exp. Med.* 196, 1017-1024.
- Skrzypek,E., Cowan,C., and Straley,S.C. (1998). Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol. Microbiol* 30, 1051-1065.

Smith,J.A. (1994). Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukoc. Biol.* 56, 672-686.

Sobotta J. (2005). *Atlas Histologie: Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie.* (München · Jena: Urban & Fischer Verlag).

Sporri,R., Joller,N., Albers,U., Hilbi,H., and Oxenius,A. (2006). MyD88-dependent IFN-gamma production by NK cells is key for control of *Legionella pneumophila* infection. *J. Immunol.* 176, 6162-6171.

Springer,T., Galfre,G., Secher,D.S., and Milstein,C. (1979). Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* 9, 301-306.

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

Strober,W., Murray,P.J., Kitani,A., and Watanabe,T. (2006). Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 9-20.

Stylianou,E. and Saklatvala,J. (1998). Interleukin-1. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 30, 1075-1079.

Sugimoto,M., Germain,R.N., Chedid,L., and Benacerraf,B. (1978). Enhancement of carrier-specific helper T cell function by the synthetic adjuvant, N-acetyl muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP). *J. Immunol.* 120, 980-982.

Takeda,K. and Akira,S. (2004). TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 16, 3-9.

Takeda,K., Kaisho,T., and Akira,S. (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335-376.

Takeuchi,O., Hoshino,K., and Akira,S. (2000). Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol.* 165, 5392-5396.

Tanimoto,N., Terasawa,M., Nakamura,M., Kegai,D., Aoshima,N., Kobayashi,Y., and Nagata,K. (2007). Involvement of KC, MIP-2, and MCP-1 in leukocyte infiltration following injection of necrotic cells into the peritoneal cavity. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 361, 533-536.

Tansini,A. and de Medeiros,B.M. (2009). Susceptibility to *Yersinia pseudotuberculosis* infection is linked to the pattern of macrophage activation. *Scand. J. Immunol.* 69, 310-318.

Tekstra,J., Visser,C.E., Tuk,C.W., Brouwer-Steenbergen,J.J., Burger,C.W., Krediet,R.T., and Beelen,R.H. (1996). Identification of the major chemokines that regulate cell influxes in peritoneal dialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 7, 2379-2384.

Testro,A.G. and Visvanathan,K. (2009). Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 24, 943-954.

Trinchieri,G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 133-146.

Trulzsch,K., Oellerich,M.F., and Heesemann,J. (2007). Invasion and dissemination of *Yersinia enterocolitica* in the mouse infection model. *Adv. Exp. Med. Biol.* 603, 279-285.

Trulzsch,K., Sporleder,T., Leibiger,R., Russmann,H., and Heesemann,J. (2008). *Yersinia* as oral live carrier vaccine: influence of *Yersinia* outer proteins (Yops) on the T-cell response. *Int. J. Med. Microbiol* 298, 59-67.

Uematsu,S. and Akira,S. (2006). Toll-like receptors and innate immunity. *J. Mol. Med.* 84, 712-725.

Urban,C.F., Lourido,S., and Zychlinsky,A. (2006). How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol* 8, 1687-1696.

Van Der Laan,L.J., Dopp,E.A., Haworth,R., Pikkarainen,T., Kangas,M., Elomaa,O., Dijkstra,C.D., Gordon,S., Tryggvason,K., and Kraal,G. (1999). Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo. *J. Immunol.* 162, 939-947.

van der,P.T., Marchant,A., Keogh,C.V., Goldman,M., and Lowry,S.F. (1996). Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. *J. Infect. Dis.* 174, 994-1000.

van Erp K., Dach,K., Koch,I., Heesemann,J., and Hoffmann,R. (2006). Role of strain differences on host resistance and the transcriptional response of macrophages to infection with *Yersinia enterocolitica*. *Physiol Genomics* 25, 75-84.

ves-Filho,J.C., de,F.A., Spiller,F., Souto,F.O., and Cunha,F.Q. (2008). The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock* 30 *Suppl* 1, 3-9.

Viola,A. and Luster,A.D. (2008). Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48, 171-197.

Voronov,E., Dotan,S., Gayvoronsky,L., White,R.M., Cohen,I., Krelin,Y., Benchetrit,F., Elkabets,M., Huszar,M., El-On,J., and Apte,R.N. (2010). IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. *Int. Immunol.* 22, 245-257.

Walker,B.A. and Ward,P.A. (1992). Priming and signal transduction in neutrophils. *Biol. Signals* 1, 237-249.

Wang,M., Jeng,K.C., and Ping,L.I. (1999). Exogenous cytokine modulation or neutralization of interleukin-10 enhance survival in lipopolysaccharide-hyporesponsive C3H/HeJ mice with *Klebsiella* infection. *Immunology* 98, 90-97.

Wehinger,J., Gouilleux,F., Groner,B., Finke,J., Mertelsmann,R., and Weber-Nordt,R.M. (1996). IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Lett.* 394, 365-370.

Weiss,D.S., Raupach,B., Takeda,K., Akira,S., and Zychlinsky,A. (2004). Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J. Immunol.* 172, 4463-4469.

Wengner,A.M., Pitchford,S.C., Furze,R.C., and Rankin,S.M. (2008). The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood* 111, 42-49.

Wieland,C.W., Florquin,S., Maris,N.A., Hoebe,K., Beutler,B., Takeda,K., Akira,S., and van der,P.T. (2005). The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable haemophilus influenzae from the mouse lung. *J. Immunol.* 175, 6042-6049.

Wiersinga,W.J., Wieland,C.W., Roelofs,J.J., and van der,P.T. (2008). MyD88 dependent signaling contributes to protective host defense against *Burkholderia pseudomallei*. *PLoS One* 3, e3494.

Williams,L.M., Ricchetti,G., Sarma,U., Smallie,T., and Foxwell,B.M. (2004). Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle. *Immunology* 113, 281-292.

Wyllie,D.H., Kiss-Toth,E., Visintin,A., Smith,S.C., Boussof,S., Segal,D.M., Duff,G.W., and Dower,S.K. (2000). Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J. Immunol.* 165, 7125-7132.

Yamamoto,M., Sato,S., Hemmi,H., Hoshino,K., Kaisho,T., Sanjo,H., Takeuchi,O., Sugiyama,M., Okabe,M., Takeda,K., and Akira,S. (2003a). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643.

Yamamoto,M., Sato,S., Hemmi,H., Uematsu,S., Hoshino,K., Kaisho,T., Takeuchi,O., Takeda,K., and Akira,S. (2003b). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4, 1144-1150.

Yamamoto,M., Sato,S., Mori,K., Hoshino,K., Takeuchi,O., Takeda,K., and Akira,S. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 169, 6668-6672.

Yao,T., Meccas,J., Healy,J.I., Falkow,S., and Chien,Y. (1999). Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH. *J. Exp. Med.* 190, 1343-1350.

Yung,S. and Chan,T.M. (2009). Intrinsic cells: mesothelial cells -- central players in regulating inflammation and resolution. *Perit. Dial. Int.* 29 Suppl 2, S21-S27.

Zhang,Z.Y., Clemens,J.C., Schubert,H.L., Stuckey,J.A., Fischer,M.W., Hume,D.M., Saper,M.A., and Dixon,J.E. (1992). Expression, purification, and physicochemical characterization of a recombinant *Yersinia* protein tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* 267, 23759-23766.

Zhao,H., Leu,S.W., Shi,L., Dedaj,R., Zhao,G., Garg,H.G., Shen,L., Lien,E., Fitzgerald,K.A., Shiedlin,A., Shen,H., Quinn,D.A., and Hales,C.A. (2010). TLR4 is a negative regulator in noninfectious lung inflammation. *J. Immunol.* 184, 5308-5314.

Zilbauer,M., Dorrell,N., Elmi,A., Lindley,K.J., Schuller,S., Jones,H.E., Klein,N.J., Nunez,G., Wren,B.W., and Bajaj-Elliott,M. (2007). A major role for intestinal epithelial nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) in eliciting host bactericidal immune responses to *Campylobacter jejuni*. *Cell Microbiol* 9, 2404-2416.

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

Anhang

A1 Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit werden in folgenden Beiträgen zur Veröffentlichung vorbereitet:

Artikel

Ekaterina Lenk and Jürgen Heesemann

The role of the innate immune response in the experimental murine *Yersinia enterocolitica* infection

In Vorbereitung

Ekaterina Lenk and Jürgen Heesemann

Yersinia adhesion YadA head region directs *Yersinia enterocolitica* to the white pulp of the spleen in the murine infection model

In Vorbereitung

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen bereits veröffentlicht:

Vorträge

Heesemann J, **Vlasova E.**

Yersinia-Empfänglichkeit und angeborene Immunität

8th FBI-Zoo Meeting, 31.03 – 01.04.2011, München, Deutschland

E. Vlasova, Heesemann J.

Immunological analysis of *Yersinia enterocolitica* infection susceptibility of mice with defined defects of the innate immunity

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

Posterpräsentationen

E. Vlasova, Heesemann J.

Role of the innate Immunity in *Yersinia enterocolitica* infection

40th Annual Meeting DGfI, 22 – 25. September 2010, Leipzig, Deutschland

E. Vlasova, Heesemann J.

Immunological analysis of *Yersinia enterocolitica* infection susceptibility of mice with defined defects of the innate immunity

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

A2 Danksagung

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

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

Prof. Dr. Elisabeth Weiß danke ich für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens, für die externe Betreuung und Ratschläge zu meiner Arbeit und dass sie sich ohne zu zögern bereit erklärt hat, diese Arbeit in der Fakultät für Biologie der LMU München zu vertreten.

PD Dr. Konrad Trülzsch für die Yersinien-Stämme und Einarbeitung in die Tierversuche, ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Bei dem Tierstallteam Christian Giller, Olga Seelbach, Saib Hussein und Jenny Sperling möchte ich mich für die Aufzucht, Pflege und Haltung der Versuchstiere bedanken.

Ich sage Danke meinen lieben Kolleginnen aus dem gemeinsamen Labor für eine schöne Zusammenarbeit, gegenseitige Aufmunterung und nette Frauengespräche. Kristin Adler und Susanna Röder für eine praktische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und Maus-Genotypisierung. Dr. Julia Niefnecker danke ich besonders für ihre Unterstützung bei den kniffligen Formatierungsfragen. Außerdem bedanke ich mich bei allen anderen Kollegen, die das Arbeitsklima am Max von Pettenkofer-Institut so angenehm gestalten.

Nicht zuletzt gilt ein großes Dankeschön meinem lieben Mann, Alexander, und meiner Familie für ihren unerschütterlichen Glauben an mich und jegliche Unterstützung.