

Aus dem Max von Pettenkofer Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Lehrstuhl Bakteriologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann

**Untersuchungen zur
Yersinia enterocolitica-stimulierten Genexpression
in Epithelzellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Daniel Kampik
aus München

2001

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. I.B. Autenrieth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. T. Löscher
Prof. Dr. G. Riethmüller

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. R. Schulte

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Dezember 2001

INHALT

A EINLEITUNG

A.1	Mukosale Immunität: Epithelzellen als Sensoren für mikrobielle Pathogene	1
A.2	Zytokine	2
A.3	Zytokine bei bakteriellen Infektionen	3
A.4	Übersicht über die untersuchten Zytokine	5
A.5	<i>Yersinia enterocolitica</i>	8
A.5.1	Klinik der <i>Y. enterocolitica</i> -Infektion	8
A.5.2	Pathogenität von <i>Y. enterocolitica</i>	9
A.5.3	Infektionsbiologie von <i>Y. enterocolitica</i>	10
A.6	Ziele dieser Arbeit	11

B MATERIAL UND METHODEN

B.1	Material	
B.1.1	Geräte	12
B.1.2	Sonstige Materialien	13
B.1.3	Chemikalien	13
B.1.4	Zell-Linien	14
B.1.5	Bakterienstämme	14
B.1.6	Medien und Zusatzlösungen	14
B.1.6.1	Medien und Zusatzlösungen für die Zellkultur	14
B.1.6.2	Medien für die Bakterienkultur	15
B.1.7	Zellbiologisch wirksame Substanzen	16
B.1.8	Proteine und Enzyme	16
B.1.9	Inhibitoren	17
B.1.10	Synthetische Oligonukleotide	18

B.1.11	Puffer und Lösungen.....	19
B.1.11.1	Agarosegel-Elektrophorese.....	19
B.1.11.2	Lösungen für ELISAs	19
B.1.12	Kits.....	20
B.2	Methoden	
B.2.1	Zellkultur.....	20
B.2.1.1	Wachstumsbedingungen	20
B.2.1.2	Passagieren der Zellen	20
B.2.1.3	Gewinnung apolarer Monolayer für die Infektionsversuche	21
B.2.1.4	Bestimmung der Lebend-Zellzahl mit Trypan-Blau.....	21
B.2.2	Bakterien	22
B.2.2.1	Medien und Wachstumsbedingungen.....	22
B.2.2.2	Gewinnung einer Bakterienkultur definierter Keimzahl für Infektionsversuche	22
B.2.2.3	Herstellung von hitzegetöteten Yersinien für Infektionsversuche	23
B.2.3	Infektion bzw. Stimulation der Zellen und zeitlicher Ablauf	23
B.2.4	Materialgewinnung und –konservierung	24
B.2.4.1	Sezernierte Proteine im Zellkulturüberstand	24
B.2.4.2	Intrazelluläre Proteine im Zell-Lysat.....	24
B.2.4.3	Gesamt-RNA-Isolierung	25
B.2.4.4	Maßnahmen im Umgang mit RNA.....	26
B.2.5	Messung der Zytokin-Aktivität auf RNA-Ebene: RT-PCR.....	26
B.2.5.1	Bestimmung der RNA-Menge über die Optische Dichte	27
B.2.5.2	Reverse Transkription	28
B.2.5.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	29
B.2.5.4	Gelelektrophorese der PCR-Produkte.....	30
B.2.5.5	Fehlerquellen der RT-PCR und die Minimierung deren Einfluss auf das Ergebnis.....	31
B.2.5.6	Semiquantitative RT-PCR	32

B.2.6	Messung der Zytokin-Aktivität auf Protein-Ebene: ELISA	33
B.2.7	Statistische Analysen	34
C	ERGEBNISSE	
C.1	IL-8-Transkription und –Sekretion bei HeLa-Zellen nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i> pYV ⁺ und pYV ⁻	35
C.2	Kinetik der <i>Y. enterocolitica</i> -induzierten pro-inflam- matorischen Zytokin-mRNA-Produktion bei HeLa-Zellen	38
C.3	Verstärken sezernierte Zytokine die Zytokin-Antwort?	40
C.3.1	Nur IL-8, MCP-1 und GM-CSF werden von HeLa-Zellen sekretiert, nicht aber IL-1 α und IL-1 β	40
C.3.2	IL-1 α , nicht jedoch IL-8 stimuliert eine Zytokin-Antwort bei HeLa-Zellen	42
C.4	Von welchen Faktoren ist die Zytokin-Aktivität nach <i>Y. enterocolitica</i> -Infektion abhängig?	43
C.4.1	LPS induziert keine Zytokin-Antwort in HeLa-Zellen	43
C.4.2	Die Adhäsion von <i>Yersinia</i> an HeLa-Zellen genügt, um bei HeLa-Zellen eine Zytokin-Antwort auszulösen	45
C.4.3	Das <i>Yersinia</i> -Invasin Protein löst die Zytokin-mRNA- Produktion aus	47
C.4.4	Getötete Yersinien induzieren eine Zytokin-Antwort in HeLa- Zellen	47
D	DISKUSSION	
D.1	HeLa-Zellen als Modell für die Wirt-Pathogen-Interaktion während einer <i>Y. enterocolitica</i> -Infektion	50
D.2	Epithelzellen als Initiatoren einer Zytokin-vermittelten zellulären Immunreaktion auf <i>Yersinia</i>	52
D.2.1	IL-8 als initiales Signal an das Immunsystem	52
D.2.2	MCP-1 als Verstärker der Chemotaxis	53
D.2.3	GM-CSF als weiterer Aktivator der Immunzellen	53
D.2.4	Untergeordnete Rolle von TNF- α	54

D.2.5	Parakrine Wirkung von IL-1 α und IL-1 β auf epitheliale Zellen	54
D.2.5.1	Parakrine Wirkung von IL-1 bei der Infektion mit anderen Pathogenen	54
D.2.5.2	Intrazelluläres IL-1 als Reserve-Zytokin für eine verstärkte Immunantwort auf <i>Yersinia</i> ?.....	55
D.2.5.3	Keine parakrine Wirkung der nach <i>Yersinia</i> -Infektion sezernierten Zytokine auf Epithelzellen.....	56
D.3	Mechanismen der Interaktion zwischen <i>Yersinia</i> und Wirtszelle	57
D.3.1	Bakterielle Adhäsion, nicht Invasion, ist ausreichend für eine Zytokin-Induktion	57
D.3.2	Invasin-Bindung löst die Zytokin-Produktion aus	58
D.3.3	Induktion von NF- κ B durch Invasin.....	59
D.3.4	Störung des Zytokin-Netzwerks durch <i>Yersinia</i> outer proteins.....	59
D.4	Mögliches Szenario der <i>Y. enterocolitica</i> -Infektion in vivo.....	61
D.5	Die <i>Yersinia</i> -induzierte Entzündungsreaktion: Wer profitiert, Wirt oder Bakterium?	63
D.6	Schlussfolgerungen im Hinblick auf neue Therapiekonzepte.....	63
E	ZUSAMMENFASSUNG	65
F	LITERATUR	67
G	ABKÜRZUNGEN	90
H	DANKSAGUNG	95
I	LEBENS LAUF	97

A Einleitung

A.1 Mukosale Immunität: Epithelzellen als Sensoren für mikrobielle Pathogene

Mukosale Oberflächen des gastrointestinalen, respiratorischen und urogenitalen Trakts stellen die wichtigste Eintrittspforte mikrobieller Pathogene in den Wirtsorganismus dar und sind somit Schauplatz mikrobiell induzierter Krankheiten (98).

Epitheliale Zellen als Abschluss mukosaler Oberflächen erfüllen drei wichtige Funktionen. Zum einen trennen sie das interne Milieu des Wirtes von der äußeren Umwelt: die Mikroorganismen der Umwelt, z.B. Darmbakterien des distalen Gastrointestinaltraktes, dringen nicht in Epithelzellen ein. Neben dieser mechanischen Barriere nehmen Epithelzellen spezifische Funktionen der verschiedenen Organsysteme wahr: Im Gastrointestinaltrakt beispielsweise bewerkstelligen sie Ionentransport sowie Flüssigkeitsaufnahme und -sekretion. Drittens besitzen Epithelzellen eine wesentliche Funktion innerhalb des angeborenen Immunsystems: aufgrund ihrer Barrierefunktion sind sie diejenigen Zellen, die als Erste mit eventuellen Pathogenen räumlich in Kontakt treten. Diese Interaktion stimuliert Epithelzellen dazu, Signalstoffe (Zytokine) zu sekretieren, die auf die Zellen des Immunsystems eine aktivierende, „warnende“ Wirkung haben. Somit fungieren Epithelzellen als die primären Sensoren für mikrobielle Pathogene, als „Wachhunde des Immunsystems“ (50).

In der unmittelbar unter der epithelialen Zellschicht liegenden Mukosa finden sich verstreut Ansammlungen lymphatischer Zellen, die in ihrer Gesamtheit als Mukosa-assoziiertes Lymphoides Gewebe (MALT) bezeichnet werden. Das MALT stellt eine hochspezialisierte Komponente des Immunsystems dar: es beherbergt weit über die Hälfte des gesamten Lymphozyten-Pools des Menschen (71,105). Man unterscheidet zwei Komponenten: (a) lokale Ansammlungen lymphatischer Zellen in spezifischen, ‚geordneten‘ anatomischen Strukturen (organisiertes MALT, O-MALT) und (b) diffus

verteilte lymphatische Zellen ohne Strukturen höherer Ordnung (diffuses MALT, D-MALT) (76,76,104,137,137). Zum O-MALT gehören die einfachen Lymphfollikel, wie man sie in allen mukosalen Oberflächen findet, sowie organspezifische Strukturen aus aggregierten Follikeln: die Peyer'schen Plaques des Dünndarms, die Appendix des Dickdarms oder die Tonsillen im Gaumen-Rachenbereich (107,147). Zum D-MALT werden intraepitheliale Lymphozyten (IEL), Lamina-propria-Lymphozyten (LPL), IgA-produzierende Plasmazellen, aber auch nicht-lymphoide Zellen wie Monozyten, Mastzellen und dendritische Zellen gezählt (76,118).

Untersuchungen der letzten Jahre bewiesen den hohen Stellenwert epithelialer Zellen innerhalb des Immunsystems, wenn es darum geht, Signale für das MALT zu generieren (50,52,96,98,151,178). So etablierte sich das Konzept eines Kommunikationsnetzwerks des Immunsystems, in dem Epithelzellen als Vermittler zwischen den luminalen, potentiell pathogenen Mikroorganismen und den Immunzellen des Wirtes in der Mukosa dienen (71,98,181). Als wichtigste Botenstoffe innerhalb dieser Kommunikation dienen Zytokine.

A.2 Zytokine

Zytokine dienen als Signale der interzellulären Kommunikation. Der Begriff Zytokin umfasst eine uneinheitliche Gruppe löslicher Proteine und Peptide von kurzer Halbwertszeit, die als humorale Regulatoren in nano- bis pikomolaren Konzentrationen wirken und die – unter normalen wie unter pathologischen Bedingungen – die Aktivitäten einzelner Zellen oder Gewebe modulieren (86,178). Sie können zwar auch systemisch als klassische endokrine Hormone wirken, charakteristisch ist jedoch vor allem ihr parakrines oder autokrines Verhalten (Wirkung auf die Zellen der unmittelbaren Umgebung bzw. Wirkung auf die Herkunftszelle des Zytokins selbst). So koordinieren sie die Aktivitäten der Zielzellen, indem sie an spezifische, hoch-affine Rezeptoren binden und einzelne oder ganze Kaskaden von zellspezifischen Aktionen auslösen (189). Selten jedoch agiert ein Zytokin allein, vielmehr induziert oder inhibiert es andere Zytokine, was schließlich eine ganze Zytokin-Population – oder Netzwerk – entstehen lässt, worauf die Zellen entsprechend reagieren.

Zytokine wurden historisch unterteilt in die Familie der Interleukine, der Chemokine, der Interferone etc. Diese historisch gewachsene Klassifikation ist jedoch nicht besonders nützlich und teilweise irreführend (189). Die Interleukine z.B. vermitteln keinesfalls nur zwischen Leukozyten, sondern wirken nahezu auf alle Zell- und Gewebetypen. Gerade diese Pleiotropie ist eines der Charakteristika der Zytokine, was jedoch nicht mit Redundanz gleichgesetzt werden darf.

Das Spektrum der Funktionen, die von Zytokinen koordiniert werden, ist vielseitig. Ihre Wirkung wurde zuerst im Rahmen der Hämatopoese und des Immunsystems untersucht, wo sie drei grundlegende Zellaktivitäten regulieren: *Wachstum* (z.B. GM-CSF, der die Proliferation von Vorläuferzellen der Makrophagen und Erythrozyten stimuliert, (60), *Differenzierung* (z.B. IL-6 als Differenzierungsfaktor für B-Zellen zu Immunglobulin-sezierenden Plasmazellen, (103,113) und *Aktivierung* (z.B. IL-1 als Aktivator von T-Zellen zur Expression weiterer inflammatorischer Zytokine, (45). Ein weiterer Effekt ist die *Chemotaxis*: entsprechende Zytokine werden zu einer eigenen Untergruppe, den Chemokinen, gezählt. IL-8 beispielsweise, das klassische Chemokin, lockt spezifisch polymorphnukleäre Neutrophile in entzündetes Gewebe (10,157,158). Auch Apoptose, der programmierte Zelltod, wird durch Zytokine eingeleitet und kontrolliert: TNF- α induziert die Zytolyse vieler maligner Zellarten (110,190). Angiogene Aktivität wurde beispielsweise bei IL-8, TNF- α und anderen Zytokinen festgestellt (61,101,180,196). Auch systemische Reaktionen wie Fieber, septischer Schock, Akute-Phase-Reaktion sowie Wundheilungsprozesse können durch Zytokine vermittelt werden (26,53). Selbst psychische Stress-Situationen beantwortet der gesunde Körper mit einer Umstellung in der Produktion regulatorischer Zytokine (121).

A.3 Zytokine bei bakteriellen Infektionen

Der Kontakt zwischen Bakterien und Wirtszellen hat häufig die Freisetzung von Zytokinen zur Folge – welche Zytokine das sind, hängt von der Natur des Bakteriums sowie der Wirtszelle ab. Die Zytokin-Reaktion stellt einen wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems dar: hiermit leitet der Wirtsorganismus seine Abwehrmechanismen gegen das Pathogen ein. Sein Ziel ist es, schnell ein geeignetes Zytokin-Netzwerk aufzubauen, welches die Aktionen aller Komponenten des Immunsystems

gegen das Bakterium koordiniert: beispielsweise die Rekrutierung von Makrophagen, B-, T-Killer- und T-Helfer- und anderen Immunzellen durch Chemokine sowie deren Aktivierung durch weitere pro-inflammatorische Zytokine. Das Zytokin-Netzwerk initiiert die Aktivierung des Komplementsystems (106,172), die Hyperämisierung des infizierten Gewebes und auch systemische Effekte wie Fieber. Von der Effektivität dieses Zytokin-Netzwerks hängt wesentlich der weitere Verlauf der Infektion ab: im Idealfall die Heilung durch Abtöten der Bakterien, oder aber Vermehrung und Ausbreitung der Bakterien bis zur Sepsis oder gar die langfristige Persistenz der Bakterien im Organismus mit entsprechender Chronizität der Infektion (189).

Das bekannteste bakterielle Produkt, das in verschiedensten Wirtszelltypen Zytokine induziert, ist Lipopolysaccharid (LPS) aus der Zellwand gramnegativer Bakterien. Mittlerweile kennt man mindestens 15 weitere Klassen bakterieller Oberflächenbestandteile mit dieser Fähigkeit: z.B. Peptidoglykane, Teichonsäuren, Bestandteile der Fimbrien, etc. (77,78). Auch Prozesse wie Adhäsion oder Invasion der Bakterien an / in Wirtszellen können eine Zytokin-Reaktion auslösen. Beispielsweise löst die Invasion von enteropathogenen Bakterien wie *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, oder enteroinvasiven *Escherichia coli* bei Epithelzellen eine sofortige Zytokin-Antwort aus, die die frühe Phase der Immunreaktionen einschließlich der Einleitung der zellulären Immunreaktion beeinflusst (48,49,59,96)

In den letzten Jahren wurde jedoch bekannt, dass Pathogene auch in der Lage sind, diese Zytokin-Antwort zu stören, um so dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen (ein Übersichtsartikel findet sich unter (189)). Dies kann etwa durch Inhibition essentieller Zytokine geschehen, was das Ausbleiben bestimmter Aktionen des Immunsystems zur Folge hat. Eine Inhibition der Zytokinfreisetzung durch bakterielle Produkte wurde für *Yersinia enterocolitica*, *Brucella suis*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, und *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben (17,27,83,112,168,179).

Andere Bakterien stören das Zytokin-Netzwerk, indem sie gezielt eine *gesteigerte* Produktion bestimmter Zytokine provozieren, was eine pathologische Überreaktion des Immunsystems bewirkt. So induziert ein von *Helicobacter pylori* sezerniertes Produkt gezielt eine Reihe von pro-inflammatorischen Zytokinen, was maßgeblich zur Pathogenese der chronischen Gastritis und des Ulcus duodeni beiträgt (38,97,135,193).

Die Zytokin-Reaktion auf eine bakterielle Infektion dient somit dem Schutz des Wirtsorganismus. Besitzt das Bakterium jedoch Strategien, um diese Zytokin-Reaktion zu seinen Gunsten zu manipulieren, kann dies dem Wirt zum Verhängnis werden. Die für diese Manipulation notwendigen bakteriellen Strukturen können als bakterielle Virulenzfaktoren betrachtet werden.

A.4 Übersicht über die untersuchten Zytokine

Eine knappe Übersicht über die wichtigsten Charakteristika der untersuchten Zytokine gibt Tabelle 1. Die Vielzahl der Wirkungen auf die verschiedenen Zellen kann hier nicht im Einzelnen aufgelistet werden, es werden nur grundlegende Merkmale aufgeführt.

Einen schnellen aber doch ausführlichen Überblick über die Eigenschaften aller derzeit bekannten Zytokine mit Verweis auf entsprechende Originalliteratur bietet COPE, der Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia von Horst Ibelgaufts (86) bzw. die gedruckte, jedoch weniger aktuelle Version (85). Auf die entsprechende Literatur im einzelnen wird in der Diskussion eingegangen.

Tabelle 1: Übersicht über die Rolle der untersuchten Zytokine *in vivo*

Zytokin	Genort, -größe	mRNA- Länge	Proteingröße, -struktur	Herkunftszellen	wichtigste Zielzellen, Rezeptor	wichtigste Wirkung
IL-8 Interleukin-8	4q12- q21 5,1 kb	1,6 kb	8 kDa (72 AS ¹), CXC Chemo- kin	Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Epithelzel- len, Endothelzellen, u.a.	Neutrophile Granulozyten, Monozyten, T-, B-Lym- phozyten Rezeptoren: CXCR1, CXCR2	Aktivierung von Neutrophilen Granulozy- ten, chemotaktische Wirkung auf alle beweglichen Immunzellen, anti- inflammatorische Wirkung auf B-Zellen, u.a.
IL-1 α Interleukin-1 α	(k.A.) ⁴ 12 kb	2 – 2,3 kb	17 kDa (159 AS)	Monozyten, aktivierte Makrophagen, periphere neutrophile Granulozyten, B-, T-Zellen, Epithelzel- len, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblas- ten, u.v.a.	T-, B-Lymphozyten, Neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Monozyten Rezeptoren: CD121a,b	direkte Aktivierung von T-Helferzellen zur Produktion von IL-2, Aktivierung von B- Zellen und NK-Zellen sowie Stimulierung zur Proliferation, indirekte Wirkung über die Induktion der Synthese anderer Boten- stoffe (z.B. IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF, ACTH, u.v.a.), chemotaktische Wirkung auf Leukozyten, u.a.; somit wichtiger Vermittler bei allen entzündlichen Reaktio- nen
IL-1 β Interleukin-1 β	(k.A.) ⁴ 9,7 kb	1,6 – 1,7 kb	17 kDa (153 AS)	nahezu identisch mit IL-1 α	nahezu identisch mit IL-1 α , da Interaktion mit den gleichen Rezeptoren: CD121a,b	nahezu identisch mit IL-1 α

GM-CSF Granulozyten- Markophagen- CSF ²	5q22-31 2,5 kb	(k.A.) ⁴	14 kDa bzw. 35 kDa ³ (127 AS)	aktivierte T-Zellen, Makrophagen, Endothel- zellen, Fibroblasten, Epithelzellen, u.a.	Blutzellen der myeloischen Reihe, Epithelzellen, Endothelzellen, u.a. Rezeptoren: GM-R α , β	Stimulation von Wachstum und Differen- zierung von Vorläuferzellen von Mye- loblasten, Monoblasten und anderen hämatopoetischen Vorläuferzellen sowie Aktivierung der entsprechenden reifen Formen, chemotaktische Wirkung auf Neutrophile, u.a.
MCP-1 Monozyten- Chemotakti- sches Protein	17q11.2 -q21.1 (k.A.) ⁴	(k.A.) ⁴	8,7 kDa (76 AS) CC Chemo- kin	Monozyten, Endothelzel- len, Epithelzellen, glatte Muskelzellen u.a.	Monozyten, Makrophagen, Basophile Granulozyten, NK-Zellen, u.a. Rezeptoren: CCR1-8	Aktivierung von Basophilen Granulozyten (Degranulation und Histaminfreisetzung) sowie Monozyten, Makrophagen und Killerzellen, Chemotaktische Wirkung auf Monozyten, u.a.
TNF- α Tumor- Nekrose- Faktor- α	6p23- 6q12 3,6 kb	2,7 kb	17 kDa (157 AS)	aktivierte Makrophagen, Monozyten, T-Zellen, NK- Zellen, Neutrophile Granulozyten, Epithelzel- len, u.a.	alle somatischen Zell- Typen außer Erythrozyten Rezeptoren: TNF-R1,2; neuer Name: CD120a,b	Induktion von Zytolyse in vielen Tumorzel- len <i>in vitro</i> , Induktion der Synthese anderer pro-inflammatorischer Zytokine, Aktivator der Angiogenese, durch Überexpression mitverantwortlich für diverse pathologische Reaktionen wie Septischer Schock, Thrombose, Arteriosklerose, Vaskulitis, etc., Vermittler bei der zellulären Immunität gegen Bakterien, u.v.a.

¹ AS: Aminosäuren; ² CSF: Kolonie Stimulierender Faktor; ³ abhängig vom Grad der Glykosylierung; ⁴ in der Literatur keine Angaben gefunden

A.5 *Yersinia enterocolitica*

Die Gattung *Yersinia* umfasst elf Spezies, von denen drei für den Mensch wie auch für Nager pathogen sind: *Y. pestis*, der Erreger der Pest, sowie die beiden enteropathogenen Arten *Y. pseudotuberculosis* und – beim Menschen am häufigsten – *Y. enterocolitica*, welche eine selbstlimitierende akute Enteritis oder akute mesenteriale Lymphadenitis verursachen können (37,84,140). *Y. enterocolitica* gehört zu den Enterobacteriaceae, einer Familie gramnegativer Stäbchenbakterien. Es ist fakultativ anaerob, bei 26 °C peritrich begeißelt und beweglich, bei 37 °C unbegeißelt und nicht beweglich. Sein Wachstumsoptimum liegt bei 28–30 °C, es ist jedoch auch bei Temperaturen von 2–6 °C vermehrungsfähig (72).

A.5.1 Klinik der *Y. enterocolitica*-Infektion

Y. enterocolitica stellt in den Industrieländern neben *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* und *Shigella spp.* die vierthäufigste Ursache bakterieller Gastroenteritiden dar (56). Ausgelöst wird die enterale Yersiniose durch die Ingestion bestimmter *Y. enterocolitica*-Stämme, besonders Serotyp O:3 und O:9 (18). Der Infektionsweg ist fäkal-oral: vor allem kontaminiertes Trinkwasser, Milch, auch Schweinefleisch sind Infektionsquellen (3,37). Am häufigsten betroffen sind Kinder zwischen 1 und 4 Jahren (56). Nach einer Inkubationszeit von 24 bis 48 h manifestiert sich beim Erwachsenen eine Ileitis oder Enterokolitis mit wässriger Diarrhö, Übelkeit, Fieber und Bauchschmerzen (37). Jugendliche erkranken vor allem an einer Lymphadenitis („Pseudoappendizitis“), Kleinkinder an einer Enterokolitis (82,120). Je nach Abwehrlage des Patienten wird die Infektion entweder in diesem Stadium limitiert und es erfolgt auch ohne spezielle Behandlung eine Restitutio ad integrum nach etwa 1 bis 3 Wochen. Oder aber sie breitet sich systemisch aus: vor allem bei Immunsupprimierten, bei Diabetes oder Leberzirrhose kann es zur Sepsis mit Leber- und Milzabszessen kommen, deren Letalität bei 50 % liegt (23,150).

In 2–3 % der Fälle treten ca. 4 Wochen nach akuter Yersiniose parainfektiose Komplikationen wie Erythema nodosum, Uveitis, Episkleritis, Konjunktivitis oder eine

reaktive (sterile) Arthritis vor allem des Knie-, Sprung- oder Handgelenks auf (2,25). Diese entwickeln sich unabhängig vom vorausgehenden Krankheitsverlauf, selbst nahezu asymptomatisch abgelaufene Yersiniosen können von einer Arthritis gefolgt sein, die sich in der Regel nach 1–6 Monaten zurückbildet. 50–80 % dieser Patienten sind Träger des HLA-B27-Antigens oder verwandter Antigene wie B7 (42). Die Pathogenese dieser Phänomene ist nicht vollständig geklärt: Durch eine Homologie in der Aminosäuresequenz von YadA, einem Adhäsionsprotein von *Y. enterocolitica*, mit dem körpereigenen HLA-B27-Antigen könnten autoimmunologische Prozesse ausgelöst werden (molekulare Mimikry) (46,108,116). Befunde aus dem experimentellen Ratten-Infektionsmodell sprechen wiederum für eine transiente septische Arthritis, die in der Folge als sterile Arthritis im Sinne einer Immunreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV) manifest wird (64,149).

Diagnostizieren lässt sich eine Yersiniose durch den Erregernachweis in Stuhlproben oder Biopsien mittels Kultur oder PCR sowie indirekt durch Widal-Agglutination, ELISA oder Immunoblot (73,73,81). Eine Antibiotikatherapie mit Flurchinolonen (Ciprofloxacin), evtl. kombiniert mit einem Cephalosporin der dritten Generation, ist nur bei septischen Verläufen indiziert (66,80). Bei Komplikationen im Sinne einer reaktiven Arthritis verbessern Antibiotika nach derzeit vorliegenden Studien *nicht* den Verlauf (62).

A.5.2 Pathogenität von *Y. enterocolitica*

Die für die Pathogenität von *Y. enterocolitica* ursächlichen Proteine, die Virulenzfaktoren, sind teils chromosomal, teils auf einem Plasmid (Yersinia-Virulenz-Plasmid, pYV) von 40–50 MDa Größe codiert (109). In den letzten Jahren wurden immer wieder neue Virulenzfaktoren von *Y. enterocolitica* beschrieben: beispielsweise die chromosomal kodierten Proteine Inv (Invasin, ein für die Invasion und Adhäsion notwendiges Membranprotein, (24,90,129,144,146), Ail (ebenfalls ein für Invasion und Adhäsion sowie für Komplementresistenz verantwortliches Protein, (20,129), Yst (ein sezerniertes Enterotoxin, das Diarrhöe verursacht, (41,142) oder Myf (ein Fimbrien-Protein, (88,89). Wichtige pYV-kodierte Virulenzfaktoren sind YadA, ein Adhäsionsprotein (15,170,175), sowie etwa zwölf *Yersinia outer proteins* (Yops), die über einen Typ III-Sekretionsmechanismus sezerniert oder direkt in Wirtszellen eingeschleust werden.

Dort induzieren sie z.B. Apoptose (YopJ/YopP, (130,132), hemmen die Phagozytose durch Makrophagen (YopH, eine Tyrosin-Phosphatase, (19,54,147,161), verhindern die bakterielle Aufnahme in Zellen (ebenfalls YopH, (148,153), zerstören das Aktinskelett der Wirtszelle (YopE, (155), oder inhibieren die Zytokinsekretion (YopB, YopD, YopP (22,168), Übersichtsartikel: (32-35).

A.5.3 Infektionsbiologie von *Y. enterocolitica*

Besonders gut untersucht wurde die *Y. enterocolitica*-Infektion im Mausinfektionsmodell, die hier ähnlich wie beim Menschen abläuft (28,29,74). Durch Zusammenspiel aller Virulenzfaktoren lässt sich nach orogastraler Infektion von Mäusen mit *Y. enterocolitica* folgendes Szenario beobachten:

Um die Barrierefunktion des Darmepithels zu überlisten, invadiert *Y. enterocolitica* selektiv M-Zellen, die sich im Follikel-assoziierten Epithel der Peyer'schen Plaques befinden (5,67,75,99). Diese dienen als primäre Eintrittspforte des Pathogens in den Wirtsorganismus: Yersinien binden über ihr membranständiges Invasionsprotein Invasin (Inv) an β 1-Integrine der Wirtszelle (37,90,91); durch Transzytose der M-Zellen gelangt das Bakterium in das Gewebe der Peyer'schen Plaques, wo es sich vermehrt und eine enorme Anzahl von polymorphkernigen Neutrophilen und mononukleären Phagozyten anlockt (5,7,67,136,138). Dies führt zur Ausbildung von Mikroabszessen und zur Zerstörung der Zytoarchitektur des Peyer'schen Plaques (70). Von hier ausgehend disseminieren die Bakterien über die Lymphwege, Abszesse tauchen auch in den mesenterialen Lymphknoten auf, um sich dann sogar in weiter entfernten Regionen wie Leber und Milz zu vermehren (5).

Der zu Beginn der Infektion beobachtete massive Einstrom von Immunzellen in infiziertes mukosales Gewebe und deren gleichzeitige Aktivierung wird vermittelt durch die Aktivität verschiedener Zytokine, welche u.a. von den Epithelzellen freigesetzt werden. IL-8 beispielsweise, ein Zytokin der Familie der CXC-Chemokine, das unmittelbar als Reaktion auf Invasion durch *Y. enterocolitica* von Epithelzellen freigesetzt wird, wirkt chemotaktisch vor allem auf Neutrophile, aber auch Monozyten und T-Lymphozyten (10,11,96).

Welche Zytokine während der *Y. enterocolitica*-Infektion wann freigesetzt werden und welche Rolle sie spielen, ist bisher nicht klar. Ebenso unzureichend untersucht sind

die Mechanismen der Bakterium-Wirtszell-Interaktion, die für diese Zytokin-Reaktion Voraussetzung sind.

A.6 Ziele dieser Arbeit

Im HeLa-Zell-Infektionsmodell sollten zunächst mittels Reverser Transkriptions-PCR wichtige pro-inflammatorische Zytokine identifiziert werden, deren Expression während einer Infektion mit Plasmid-haltigen und Plasmid-losen *Y. enterocolitica* in epithelialen Zellen stimuliert wird. Ausserdem interessierte der zeitliche Verlauf der Genexpression der einzelnen Zytokine.

Um die Funktion der identifizierten Zytokine näher zu charakterisieren, sollten zusätzlich durch Proteinbestimmung Informationen über die extrazelluläre oder intrazelluläre Lokalisation der Zytokine gewonnen werden. Außerdem sollte durch Stimulationsexperimente mit rekombinanten humanen Zytokinen eine mögliche parakrine Wirkung der Zytokine auf die produzierenden Zellen selbst analysiert werden.

Im nächsten Schritt sollten wichtige Faktoren ausfindig gemacht werden, von denen die Zytokin-Expression nach *Y. enterocolitica*-Infektion abhängig ist: insbesondere die Abhängigkeit von bakterieller Invasion oder Adhäsion sowie von bakterieller metabolischer Aktivität sollte untersucht werden. Mittels verschiedener bakterieller Mutantensämme sollte des weiteren die Bedeutung des *Yersinia*-Oberflächenproteins Invasin analysiert werden.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit sollte die Rolle von Epithelzellen als Vermittler zwischen lumenalem Milieu im Darm und darunterliegender Mukosa während der frühen Phase einer *Y. enterocolitica*-Infektion charakterisiert und das Verständnis des frühen Zytokin-Netzwerks bei mukosalen Infektionen vertieft werden. Außerdem sollte die Rolle von Invasin als Pathogenitätsfaktor von *Y. enterocolitica* definiert werden.

B Material und Methoden

B.1 Material

B.1.1 Geräte

Analysewaagen	R160P; PT 1200	Sartorius, Göttingen
Brutschränke	BBD6220; Thermicon T; cytoperm 2	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammern	Flachbett-Kammern Protean II; Mini Protean	von Keutz, Reiskirchen Bio-Rad, München
Elektroblot-Apparatur	Trans Blot Cell	Bio-Rad, München
ELISA-Reader	Elx 808	Bio-Tek Instruments, Overath
ELISA Auswertungssoftware	MikroWin 3.0	Mikrotek Laborsysteme, Overath
Tischinkubator	TR-L288 Thermostat 5350	Liebisch, Bielefeld Eppendorf, Hamburg
Mikroskope	Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Neubauer Zählkammer		Brand, Landshut
PCR Thermocycler	GeneAmp System 2400 GeneAmp System 9600	Perkin-Elmer, Überlingen
pH-Meter	Modell pH530	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorfpipetten; Multistepper Finnpipette Digital Pipetman	Eppendorf, Hamburg Life Sciences Int., Laborsysteme Osvath, Geretsried Gilson, Middleton, WI, USA
Quarzküvetten für Photometer	QS 1000 blue point	Hellma, Müllheim
Schüttelinkubatoren	Certomat BS-1	B.Braun Melsungen
Spannungsquellen	Modelle 200/2,0; 3000 xi	Bio-Rad, München
Spektralphotometer	Ultrospec 3000	Pharmacia, Freiburg
Sterilwerkbank	BDK Hera safe	Sonnenbühl-Genkingen Heraeus, Hanau
UV-Transluminator		Bachofer, Reutlingen

Gel-Dokumentationssystem	E.A.S.Y. RH	Herolab, Wiesloch
	Fluor-S MultiImager	Bio-Rad, München
Gel-Auswertungssoftware	E.A.S.Y. Win 16 Bit	Herolab, Wiesloch
	Multi-Analyst 1.1 Build 33	Bio-Rad, München
Video-Printer		Mitsubishi, Tokyo
Zentrifugen	Bactifuge; Biofuge 1.5;	
	Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
	Kühlzentrifuge 3MK	Sigma, Deisenhofen
	Eppendorf 5417 R	Eppendorf, Hamburg

B.1.2 Sonstige Materialien

Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Nunc, Roskilde, Dänemark; Sartorius, Göttingen; Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg; B. Braun, Melsungen; Eppendorf, Hamburg; Schleicher & Schuell, Dassel; Greiner, Nürtingen.

B.1.3 Chemikalien

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien und Feinchemikalien von den Firmen Biomol, Hamburg; E. Merck, Darmstadt; Serva, Heidelberg und Sigma, Deisenhofen bezogen.

Acrylamid, Bisacrylamid	National Diagnostics, USA
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München
DEPC (Diethyl-Pyrocbonat)	Sigma, Deisenhofen
dNTP (dTTP, dGTP, dCTP, dATP)	Boehringer Mannheim, Mannheim
MgCl ₂ 25 mM	Boehringer Mannheim
TRIzol Total RNA Isolation Reagent	Gibco BRL, Karlsruhe
Trypan-Blau	Sigma, Deisenhofen

B.1.4 Zell-Linien

HeLa

Humane epitheliale Zervix-Karzinomzellen wurden von der American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA, bezogen (ATCC CCL-2.1).

B.1.5 Bakterienstämme

Yersinia enterocolitica Serotyp O:8

Stämme	Genotyp / Phänotyp	Quelle
<i>Y. e.</i> WA-314, WA-P (pYV+)	Klinisches Isolat; Wildtyp; mit Virulenzplasmid pYV08	J. Heesemann et R. Laufs, 1983 (75)
<i>Y. e.</i> WA-C (pYV-)	Plasmidloses Derivat von Stamm WA-314 („plasmid-cured“)	J. Heesemann et R. Laufs, 1983 (75)
<i>Y. e.</i> WA-C (pYV-) <i>inv</i> -	Mutante von WA-C mit zerstörtem <i>inv</i> - Lokus	K. Ruckdeschel et al., 1996 (161)

Escherichia coli HB101

Stämme	Genotyp / Phänotyp	Quelle
<i>E. c.</i> HB101	nicht-invasiver Laborstamm	
<i>E. c.</i> HB101 (pInv1914), <i>inv</i> +	Mutante von <i>E. c.</i> HB101, die das <i>Y. enterocolitica</i> O:9- <i>inv</i> -Gen exprimiert (In das Plasmid pINV1914 wurde ein 3157 bp <i>Pvu</i> I- <i>Mlu</i> I-Fragment aus pINV1907 (57) kloniert)	Fauconnier et al., 1997 (57), 1998 (58); sowie diese Arbeit

B.1.6 Medien und Zusatzlösungen

B.1.6.1 Medien und Zusatzlösungen für die Zellkultur

Medien und Zusätze für die Zellkultur wurden von den Firmen Biochrom KG, Berlin, und Gibco BRL, Karlsruhe, bezogen.

Zellkulturmedium für HeLa-Zellen:

supplementiertes RPMI 1640	VLE-RPMI 1640 mit 2,0 g/l NaOH ohne L-Glutamin (Biochrom)	
	hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum	10 %
	(Gibco BRL)	
	L-Glutamin (Gibco BRL)	2 mM
Antibiotika nur bei Bedarf:	Penicillin (Biochrom)	100 U/ml
	Streptomycin (Biochrom)	100 µg/ml

Das fetale Kälberserum (FCS) wurde zur Inaktivierung des Komplementsystems durch 30-minütige Inkubation bei 60 °C hitzeinaktiviert.

Zusatzlösungen für die Zellkultur:

PBS (Phosphate Buffered Saline)	ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , autoklaviert (Biochrom)
EDTA (Versen) 1 %	in PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ (Biochrom)
Trypsin/EDTA-Lösung	Trypsin 0,05 %, EDTA 0,02 %, in PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ (Biochrom)

B.1.6.2 Medien für die Bakterienkultur

Medien für die Bakterienkultur lieferte die Firma Difco, Detroit, MI, USA.

Luria-Bertani (LB)-Medium:

	NaCl (E. Merck)	5 g
	Bacto Hefeextrakt (Difco)	5 g
	Bacto Trypton (Difco)	10 g
	in 1 l A. bidest. lösen, pH 7,4–7,6 mit NaOH (E. Merck) einstellen	
Antibiotika:		
für <i>Y. enterocolitica</i> :	Nalidixin (Boehringer Mannheim)	25 µg/ml
für <i>E. coli</i> :	Ampicillin (Boehringer Mannheim)	25 µg/ml

Einfriermedium für Bakterien: 20% Glycerin (E. Merck) in LB-Medium

Müller-Hinton-Agarplatten: 15 g Bacto Agar (Difco) in 1 Liter LB-Medium

B.1.7 Zellbiologisch wirksame Substanzen

Antibiotika: Penicillin, Streptomycin	Biochrom KG, Berlin
Curcumin (Stock-Lösung in Ethanol)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Endotoxin (= LPS, von <i>Escherichia coli</i> 055:B5, von <i>Salmonella typhimurium</i>)	Bacto Lipopolysaccharides, Difco, Detroit, MI, USA
IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactopyranosid, Stock-Lösung in A. bidest.)	Sigma-Aldrich
PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate, Stock-Lösung in DMSO)	Sigma-Aldrich
Wortmannin (Stock-Lösung in DMSO)	Sigma-Aldrich

B.1.8 Proteine und Enzyme

Rekombinante humane Zytokine

rhIL-8 Pharmingen, San Diego, CA, USA

rhIL-1 α , rhIL-1 β , rhMCP-1, rhGM-CSF, R&D Systems, Wiesbaden
rhTNF- α

Antikörper für die Immunpräzipitation (jeweils gegen humanes IL-8 gerichtet)

Monoklonaler Antikörper aus der Maus Pharmingen, San Diego, CA, USA
Biotin-markierter monoklonaler
Antikörper aus der Maus

Enzyme für den ELISA

Avidin-Biotin-Alkalische Phosphatase- Strept ABC-AP Kit; Dako, Glostrup,
Komplex Dänemark

Reverse Transkriptase

SuperScript II RNase H⁻, 200 U/ μ l Gibco BRL, Karlsruhe

Taq DNA-Polymerase

Ampli-Taq, 5 U/ μ l Perkin-Elmer, Überlingen
Ampli-Taq Gold, 5 U/ μ l

B.1.9 Inhibitoren

Proteinase-Inhibitoren

PMSF (Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid), Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Inhibitor von Serin-Proteasen
Compete Protease Inhibitor Cocktail Boehringer Mannheim

Ribonuklease-Inhibitor

RNAasin, 40 U/ μ l Promega, Madison, WI, USA
H₂O+DEPC (mit Diethyl-Pyrocbonat Sigma-Aldrich, Deisenhofen
behandeltes, steriles A. bidest.; Ribonuklea-
se-freies Wasser, siehe B.2.4.4, Seite 26)

B.1.10 Synthetische Oligonukleotide

Für die Reverse Transkription wurde Oligo-d(T)₁₂₋₁₈-Primer (Stock: 0,5 µg/µl) von der Firma Gibco BRL, Karlsruhe, bezogen.

Die für die PCR verwendeten synthetische Oligonukleotide wurden bei Roth, Karlsruhe, synthetisiert und von H.C. Jung, L. Eckmann et al. 1995 (96) beschrieben (Tabelle 2). Aus derselben Veröffentlichung stammt die Plasmid-DNA für die Positivkontrollen der PCR.

Tabelle 2. Oligonukleotid-Primerpaare und Größen der PCR-Produkte für die untersuchten Zytokine sowie β-Actin nach H.C. Jung, L. Eckmann et al. 1995 (96). Als Standard-RNA dienten Plasmide, siehe unter B.2.5.5, S. 31 sowie Abb. 1, S. 32.

mRNA- Art	5' - Primer	3' - Primer	Größe des PCR- Produktes	
			Standard- RNA	Ziel- RNA
			bp	
IL-1α	5'-GTCTCTGAATCAGAA ATCCTCTATC-3'	5'-CATGTCAAATTTTCAC TGCTTCATCC-3'	530	420
IL-1β	5'-AAACAGATGAAGTGC TCCTTCCAGG-3'	5'-TGGAGAACACCACT TGTTGCTCCA-3'	528	388
IL-8	5'-ATGACTTCCAAGCTG GCCGTGGCT-3'	5'-TCTCAGCCCTCTTCA AAAACCTTCTC-3'	401	289
TNF-α	5'-CGGGACGTGGAGCTG GCCGAGGAG-3'	5'-CACCAGCTGGTTATC TCTCAGCTC-3'	432	355
MCP-1	5'-TCTGTGCCTGCTGCTC ATAGC-3'	5'-GGGTAGAACTGTGGT TCAAGAGG-3'	381	510
GM-CSF	5'-ACACTGCTGAGATGA ATGAAACAGTAG-3'	5'-TGGACTGGCTCCCAG CAGTCAAAGGGGATG-3'	337	286
β-Actin	5'-TGACGGGGTCACCCA CACTGTGCCCATCTA-3'	5'-CTAGAAGCATTGCGG TGGACGATGGAGGG-3'	520	661

Als Elektrophoresemarker für die resultierenden PCR-Produkte eignet sich eine 100 bp-Leiter für den Bereich 100–1500 bp wie z.B. der DNA Molecular Weight Marker XIV von Roche Molecular Biochemicals, Mannheim.

B.1.11 Puffer und Lösungen

B.1.11.1 Agarosegel-Elektrophorese

10x TAE-Puffer	0,4 M Tris-HCl (Gibco BRL) 50 mM Natriumacetat (E. Merck) 10 mM EDTA (E. Merck), pH 7,6
10x Probenpuffer (PCR-loading buffer)	0,25% (w/v) Bromphenolblau (Sigma) 25% (v/v) Ficoll 400 (Biomol)
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml Ethidiumbromid (Sigma) in A. bidest.
10x Tris PCR-Puffer pH 8,3	GeneAmp 10x PCR Buffer; Perkin-Elmer
RT 5x-Puffer	5x First Strand Buffer, Gibco BRL (250 mM Tris-HCl, pH8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl ₂)
DTT 0,1 M	Gibco BRL
B.1.11.2 Lösungen für ELISAs	
Waschpuffer	PBS 0,05 % Tween-20
Blockierungspuffer	PBS 10 % FCS
Substratpuffer	48,5 ml Diethanolamin, 100 mg NaN ₃ , 400 mg MgCl ₂ x 6 H ₂ O, ad 500 ml A. bidest., pH 9,8 mit HCl

im Verhältnis 1:3 bis 1:6 verteilt: Altes Medium wurde abgesaugt. Zur Komplexierung der für die Adhäsion der Zellen an Oberflächen notwendigen Ca^{2+} -Ionen wurde der Monolayer kurz mit 2 ml 1%-iger EDTA-Lösung überspült. Durch Inkubation in 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei 37 °C werden Adhäsionsproteine der Zelloberfläche gespalten bzw. deaktiviert: Die Zellen lassen sich nun leicht durch Klopfen an die Flaschenseite vom Untergrund lösen. Trypsin-EDTA wurde durch Zugabe von 6–8 ml Medium inaktiviert. Je nach Bedarf wurde 1/3 bis 1/6 dieser Zellen in eine neue Flasche mit Medium überführt.

B.2.1.3 Gewinnung apolarer Monolayer für die Infektionsversuche

Für die Infektionen wurden HeLa-Zellen am Vortag des Versuchs gewonnen wie oben beschrieben und in 6-well-plates (Zellkulturgefäßen) aus Polystyren (Nunc) ausgesetzt. Für den Gefäßboden mit einer Oberfläche von $9,6 \text{ cm}^2$ erwiesen sich $1,5 \cdot 10^6$ Zellen pro well als ausreichend, um nach ca. 24 h einen konfluenten Monolayer ohne Polarisation (ohne Differenzierung in eine apikale und basolaterale Seite) zu erzeugen. Die Anzahl der Zellen wurde bestimmt wie unten beschrieben und durch Verdünnen mit Medium auf eine Konzentration von 0,75 Zellen/ml eingestellt, um dann 2 ml Medium mit Zellen pro well auszusetzen. Alle wells wurden zuvor mit jeweils 2 ml frischem Medium gefüllt und bis zum Aussetzen der Zellen im Brutschrank inkubiert, um das Medium auf einer optimalen Temperatur zu halten und die Zellen möglichst wenig Stress auszusetzen.

B.2.1.4 Bestimmung der Lebend-Zellzahl mit Trypan-Blau

Zur Bestimmung der Anzahl an Zellen pro Milliliter Medium wurde ein Aliquot des Mediums mit Zellen im Verhältnis 1 : 3 mit Trypan-Blau behandelt (50 μl Trypan-Blau ad 150 μl Zell-Medium). Tote Zellen werden so blau gefärbt. In einer Neubauer-Zählkammer ließ sich dann die Anzahl der lebenden Zellen unter dem Mikroskop abzählen und auf das gesamte Zell-Medium hochrechnen: Die Anzahl der ungefärbten Zellen pro 1 mm^2 -Zählquadrat wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (4/3) mit 10^4 multipliziert und lieferte so die Anzahl lebender Zellen pro ml Medium.

B.2.2 Bakterien

B.2.2.1 Medien und Wachstumsbedingungen

Yersinien wurden bei 27 °C, *Escherichia coli* bei 37 °C in Luria-Bertani-(LB)-Medium evtl. versetzt mit Antibiotika in Schüttelinkubatoren angezchtet. Für *Y. enterocolitica* wurde 25 µg/ml Nalidixin, für den Invasin-depletierten Stamm *Y. enterocolitica* WA-C *inv*⁻ zusätzlich 25 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Die Anzucht von Wildtyp-*E. coli* erfolgte ohne Antibiotika, lediglich die des Expressionsplasmidhaltigen Bakteriums *E. coli* HB101 (pInv1914) erfolgte in Anwesenheit von zusätzlich 25 µg/ml Kanamycin.

Am Vorabend des Infektionsversuchs wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt: 4 ml LB-Medium wurde direkt aus einer Glycerin-Einfrierkultur mit dem entsprechenden Bakterium beimpft und in Anwesenheit von entsprechenden Antibiotika (siehe unter B.1.6.2 oben) über Nacht im Inkubator geschüttelt. Ein Teil davon wurde am Tag der Infektion 1 : 10 in neuem Medium mit Antibiotikum verdünnt, um nach 2–3 h Inkubation eine Kultur zu erhalten, in der sich die Bakterien in ihrer logarithmischen Wachstumsphase befinden. Bei *E. coli* HB101 (pInv1914) musste die Expression von Invasin durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid, 0,1 mM) 30 min vor Infektion induziert werden.

B.2.2.2 Gewinnung einer Bakterienkultur definierter Keimzahl für Infektionsversuche

Für die Infektion von HeLa-Zell-Monolayern in 6-well-plates erwies sich eine (theoretische) Infektionsdosis (MOI, multiplicity of infection) von 100–150 Bakterien pro HeLa-Zelle als ausreichend, um eine submaximale Stimulation der Zellen hinsichtlich ihrer Zytokin-Antwort zu erzielen.

Die Bakterienkultur in der log-Phase wurde zunächst abzentrifugiert (5 min bei max. 5000 rpm / 2500 g), um den Überstand abzusaugen und durch steriles vorgewärmtes PBS zu ersetzen. Die optische Dichte der Bakterien in PBS wurde photometrisch bei 600 nm Wellenlänge gegen einen Leerwert (Küvette mit reinem PBS) bestimmt

(= OD₆₀₀) und daraus durch Multiplikation¹ mit 10⁹ die ungefähre Anzahl Bakterien pro Milliliter errechnet. Diese Lösung wurde mit PBS auf eine OD₆₀₀ von 2,0 verdünnt. Davon wurden im Infektionsversuch pro well 100 µl eingesetzt, was etwa 2 · 10⁸ Bakterien pro well oder 100-150 Bakterien pro HeLa-Zelle entspricht. Zur Bestimmung der genauen Anzahl inokulierter Bakterien zur Kontrolle wurde die Lösung in geeigneten seriellen 1:10 Verdünnungsstufen als Dreifachbestimmungen auf Müller-Hinton-Agarplatten ausplattiert und die Keimzahl (CFU, colony forming units) nach 36 h Bebrütungszeit bei 27 °C ausgezählt.

B.2.2.3 Herstellung von hitzegetöteten Yersinien für Infektionsversuche

Zur Herstellung hitzegetöteter Bakterien wurde eine Übernachtskultur von *Yersinia enterocolitica* bei 27 °C angelegt. Die Bakterienkultur wurde anschließend 1:20 verdünnt und für 4–6 h bei 37 °C subkultiviert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Bakterien für 2–4 h bei 60 °C inaktiviert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration durch OD-Messung wurde die Suspension auf einen einheitlichen Wert verdünnt und die hitzegetöteten Bakterien bis zu ihrem Gebrauch bei –20 °C aufbewahrt. Die Inaktivierung wurde kontrolliert durch Ausplattieren mehrerer Aliquots auf Müller-Hinton-Agarplatten und einwöchiger Inkubation bei 27 °C.

B.2.3 Infektion bzw. Stimulation der Zellen und zeitlicher Ablauf

Am Tag der Infektion wurde zuerst jedes well mit Zellen im invertierten Zellkulturmikroskop auf atypische Zellmorphologie, übermäßig viele tote, nicht-adhärenente Zellen, Desintegrität des Monolayers oder Pilzbefall hin kontrolliert und gegebenenfalls einzelne wells verworfen. Ca. 2–3 h vor Infektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und pro well 2 ml frisches Medium *ohne* Antibiotika hinzugegeben.

Der „Zeitpunkt Null“ des Versuchs war definiert mit der Zugabe des Stimulus zu den HeLa-Zellen: Bakterien definierter Anzahl in 100 µl PBS bzw. rekombinante humane Zytokine oder andere zellwirksame Substanzen definierter Konzentration

¹ Der Faktor 10⁹ wurde empirisch ermittelt durch den Vergleich von OD₆₀₀-Werten mit der absoluten Anzahl Bakterien pro ml (errechnet durch Ausplattieren und Bebrüten von Verdünnungsreihen auf Nähragar und anschließendem Auszählen der CFUs).

wurden in die jeweiligen wells pipettiert und durch leichtes Schwenken verteilt. In der Regel wurden die Monolayer mit dem Stimulus für 1 h bei 37 °C inkubiert, so dass Bakterien an die Zellen adhäreren oder sie invadieren konnten (Stunde 1 p.i., post infectionem). Nach Entfernen des Zellmediums wurden Bakterien bzw. Stimulus durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt; um eventuell noch verbleibende Bakterien abzutöten, wurde neues Medium mit 100 µg/ml Gentamicin, ein rein extrazellulär wirkendes Antibiotikum, auf die Zellen gegeben. Je nach Fragestellung wurden sie für 1 bis zu 23 h weiter inkubiert (Stunde 2–24 p.i.), um dann den Zellkulturüberstand oder die Gesamt-RNA der Zellen für spätere Analysen zu konservieren.

B.2.4 Materialgewinnung und -konservierung

Nach Infektion oder Stimulation der Zellen wurden aus verschiedenen Materialien Informationen über die Zytokin-Aktivierung gewonnen:

- durch direkte Messung der sezernierten Zytokin-Proteine im Zellkulturüberstand,
- durch Messung der intrazellulären Zytokin-Proteine im Zell-Lysat,
- sowie durch Messung der gebildeten Zytokin-mRNA nach Isolierung der Gesamt-RNA.

B.2.4.1 Sezernierte Proteine im Zellkulturüberstand

Um in den Zellkulturüberstand sezernierte Proteine mittels ELISA (siehe unten unter B.2.6, Seite 33) zu bestimmen, wurde zum gewünschten Zeitpunkt nach Infektion der Zellkulturüberstand abgenommen und in 1000- oder 2000 µl-Reaktionsgefäße überführt. Eventuell darin befindliche Zellen und andere feste Bestandteile wurden abzentrifugiert (10 min, 15000 g), der Überstand in ein neues Gefäß gekippt und bei – 20 °C aufbewahrt.

B.2.4.2 Intrazelluläre Proteine im Zell-Lysat

Um intrazelluläre Zytokine nach Zell-Lyse mittels ELISA zu bestimmen, wurden die Monolayer zunächst zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen, um eine Beeinflussung durch Reste von Kulturüberstand auszuschließen. Zur Lyse wurden pro well 2 ml A. bidest. versetzt mit Proteinase-Inhibitoren (PMSF [Phenyl-Methyl-Sulfonyl-

Fluorid], Sigma, Deisenhofen und Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten, Boehringer Mannheim) verwendet, um einen vorzeitigen Abbau der Zytokine durch intrazelluläre Proteinase zu verhindern. Durch kräftiges „Spülen“ mit der Pipette wurden die Zellen vom Gefäßboden gelöst, bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren und wieder aufgetaut. Dieser osmotische, mechanische und thermische Stress genügt, um die Zellen zu lysieren, nicht-lösliche Zellfragmente wurden abzentrifugiert (20 min, 15000 g), der Überstand in ein neues Gefäß gekippt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

B.2.4.3 Gesamt-RNA-Isolierung

Durch Extraktion der Gesamt-RNA der Zellen nach Infektion / Stimulation wurde der Aktivierungszustand der Zellen auf mRNA-Ebene zur späteren Analyse fixiert, um später mittels RT-PCR die Zytokin-Aktivität zu messen (siehe unten B.2.4.4):

1. Nach Entfernen des Überstands zweimaliges Waschen der Monolayer mit PBS
2. Zugabe von 1 ml TRIzol-Reagenz (Gibco BRL, Karlsruhe) auf jedes well, Homogenisieren der Zellen und TRIzol mit Hilfe der Pipette
3. Nach 5 min Ruhen bei Raumtemperatur Suspension in Reaktionsgefäße überführen
4. Zugabe von 200 μl reinem Chloroform
5. Gründliches Vortexen bis homogene, weißliche Emulsion entsteht
6. Zentrifugieren 15 min bei 12000 g bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
7. Proteine und DNA sammeln sich in Inter- und organischer Phase, die RNA in der wässrigen Phase lässt sich mit einer 200 μl -Pipette vorsichtig abnehmen und in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
8. Zugabe von 500 μl Isopropanol, gut vermischen, jedoch nicht vortexen.

Die RNA-Extraktion kann hier unterbrochen werden und die bisher gewonnene RNA-Chloroform-Isopropanol-Suspension (ca. 1000 μl) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über mehrere Tage konservieren.

9. Zentrifugieren 12 000 g, 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; RNA wird als kleines Pellet am Rand des Reaktionsgefäßes sichtbar
10. Abnehmen des Überstands mit einer 1000 μl -Pipette, kurz abzentrifugieren, mit 200 μl -Pipette Flüssigkeitsreste absaugen
11. Pellet waschen mit 1000 μl Ethanol (75 %), Pellet vom Gefäßboden ablösen durch kurzes Vortexen
12. Zentrifugieren 7500 g, 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

13. Abnehmen des Überstands mit einer 1000 µl-Pipette, kurz abzentrifugieren, mit 200µl-Pipette Flüssigkeitsreste absaugen
14. Pellet auflösen in 20 µl H₂O+DEPC (mit DEPC behandeltes, Ribonuklease-freies steriles A. bidest., siehe folgender Abschnitt B.2.4.4) durch 10 min Erwärmen bei 55-60 °C
15. Kurz abzentrifugieren, konservieren bei -20 °C

B.2.4.4 Maßnahmen im Umgang mit RNA

Da RNA ohnehin schon sehr viel instabiler ist als DNA und zusätzlich noch den ubiquitären RNasen ausgesetzt ist, war besondere Sorgfalt im Umgang mit RNA notwendig: Tragen von Einmalhandschuhen, Verwendung eines gesonderten Pipettensatzes und eigens für den Umgang mit RNA bestimmter Plastikmaterialien.

Das in weiteren Schritten verwendete Wasser, das mit RNA in Berührung kam, wurde zuvor mit DEPC (Diethyl-Pyrocyanat) behandelt (im folgenden als „H₂O-DEPC“ bezeichnet), um RNasen zu inaktivieren: Zu einer frisch autoklavierten Flasche A. bidest. wurde DEPC zugegeben, um eine Konzentration von 0,01 % zu erhalten. Nach 12 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Flasche erneut autoklaviert, um verbleibendes DEPC zu entfernen.

B.2.5 Messung der Zytokin-Aktivität auf RNA-Ebene: RT-PCR

Um die zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle ‚in Produktion befindlichen‘ / aktivierten Zytokine zu bestimmen, wurde die Methode der Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) gewählt. Durch ihre hohe Sensitivität erlaubte sie eine genaue Auswertung des bei Zellkulturversuchen nur in geringer Quantität vorhandenen Untersuchungsmaterials.

Bei der Bildung von Proteinen in eukaryotischen Zellen spielen sich vereinfacht folgende Schritte ab: Nach Aktivierung bestimmter Gene durch Transkriptionsfaktoren werden zunächst im Zellkern Kopien eines entsprechenden Gens in Form von RNA erstellt (= Transkription). Diese *messenger* RNA (mRNA) wird ins Zytosol der Zelle transportiert, um dort als Matrize für die eigentliche Proteinproduktion zu dienen (= Translation). Je nach Anzahl der gebildeten mRNA-Moleküle wird später eine

unterschiedliche Menge des Proteins, z.B. eines bestimmten Zytokins, gebildet. Die RT-PCR detektiert die Menge der zu einem Zeitpunkt in der Zelle kursierenden mRNA-Moleküle für ein bestimmtes Protein. Somit lässt sich der Aktivierungszustand der Zelle auf dem Niveau der mRNA, also der Transkription, einfrieren und bestimmen.

Folgende Schritte sind notwendig, um in stimulierten Zellen die mRNA zu detektieren:

1. Isolierung der Gesamt-RNA (siehe oben B.2.4.3)
2. Bestimmung der im folgenden einzusetzenden RNA-Menge durch OD-Messung (siehe unten B.2.5.1)
3. Reverse Transkription der RNA in cDNA (siehe unten B.2.5.2), da nur DNA, nicht aber RNA mittels PCR detektiert werden kann
4. Detektierung der cDNA durch Vervielfältigung mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR; siehe unten B.2.5.3)
5. Visualisierung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese (siehe unten B.2.5.4), evtl. Quantifizierung der RT-PCR (siehe unten B.2.5.5)

B.2.5.1 Bestimmung der RNA-Menge über die Optische Dichte

Da die isolierte Gesamt-RNA-Menge abhängig von der ursprünglichen Zellzahl in der Probe und der Sorgfalt der RNA-Präparation variiert, muss nun für jede Probe individuell der RNA-Gehalt bestimmt werden, um für das weitere Vorgehen von jeder Probe identische RNA-Mengen zu verwenden.

RNA kann bei 260 nm photometrisch quantifiziert werden: 1 OD₂₆₀-Einheit entspricht dabei einer Konzentration von 40 µg/ml Einzelstrang-RNA. Verwendet wurden Quarzküvetten mit 10 mm Schichtdicke. Das Photometer wurde zunächst mittels einer mit reinem H₂O-DEPC gefüllten Küvette auf einen Null-Wert kalibriert. Für unsere Verhältnisse eignete sich eine Verdünnung der Gesamt-RNA-Proben von 1:200 in H₂O-DEPC, um genaue Werte bei der RNA-Quantifizierung zu erhalten (1 µl Proben-Aliquot auf 199 µl H₂O-DEPC). Der RNA-Gehalt der Probe errechnete sich wie folgt:

$$\text{Gemessener OD-Wert bei 260 nm} \cdot \text{Verdünnungsfaktor 200} \cdot 40 \text{ µg/ml}$$

In der Regel erhielt man Werte zwischen 10 und 20 µg/ml.

Das Verhältnis aus den Absorptionswerten bei 260 nm und bei 280 nm (absorbance ratio) liefert eine Aussage über die Reinheit der RNA-Lösung und somit über die Qualität der Präparation der Gesamt-RNA. Der theoretisch optimale Wert ist 2,0; hier

wurden Werte im Bereich von 1,5–1,8 erreicht. Bei Werten außerhalb dieses Bereichs wurde die Probe verworfen, bei Werten im Grenzbereich wurde in Kauf genommen, dass diese entsprechend geringere RNA-Mengen enthielten.

Für die eigentliche RT-PCR wurden jeweils 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Anhand des so bestimmten RNA-Gehalts wurde für jede Probe mittels Dreisatz die einzusetzende Menge in µl errechnet: somit waren zwischen 1,0 und 2,0 µl RNA-Lösung notwendig.

B.2.5.2 Reverse Transkription

Durch die Reverse Transkription wird von sämtlichen mRNA-Strängen der Probe mit Hilfe des Enzyms *Reverse Transkriptase* eine Kopie in DNA erstellt. Erst diese cDNA (für copy DNA) kann mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) detektiert werden. (RNA lässt sich durch die PCR nicht vervielfältigen).

mRNA-Stränge unterscheiden sich von anderen RNA-Formen (rRNA der Ribosomen, tRNA = Transfer-RNA zur Übertragung von Aminosäuren) durch ein Ende mit mehreren Adenin-Basen (Poly-A-Sequenz). So lässt sich die mRNA spezifisch markieren, indem man DNA-Stränge aus Thymidin-Basen (Oligo-dT) den Proben hinzugibt: sie lagern sich aufgrund der spezifischen Basenpaarung nach Watson & Crick als Primer an die Poly-A-Sequenz an (Primer-Annealing). Hier kann dann das Enzym *Reverse Transkriptase* ansetzen, um den Strang komplett in DNA zu übersetzen. Folgende Schritte wurden im einzelnen durchgeführt (wie beschrieben in E. Bohn et al., 1994 (21):

Primer-Annealing:

1. Errechnete Gesamt-RNA-Menge von 5 µg (siehe oben B.2.5.1) in ein Reaktionsgefäß vorlegen (ca. 1–2 µl)
2. Zugabe von 1 µl Oligo-dT (entspricht 500 ng) + einer entsprechenden Menge H₂O-DEPC, so dass ein Gesamtvolumen von 10 µl entsteht
3. Inkubation 10 min bei 65 °C

Reverse Transkription:

4. Zugabe der für die Reverse Transkription nötigen Reagenzien (insgesamt 11 µl):

RT 5x-Puffer	5,0 µl	
RNAsin	1,0 µl	(entspricht 40 U)
DTT 0,1 M	2,0 µl	
Nukleotide-Mix	2,0 µl	(entspricht 200 mM Endkonzentration je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Reverse Transkriptase	1,0 µl	(entspricht 200 Units)
	11,0 µl	

5. Inkubation 60 min bei 37 °C

6. Inaktivierung: Inkubation 5 min bei 90 °C

Die erhaltene cDNA wurde 1:10 mit DEPC-H₂O verdünnt (+180 µl DEPC-H₂O) und bei -20° C aufbewahrt. Im Gegensatz zur RNA ist sie wesentlich stabiler.

Zur Kontrolle von Verunreinigungen wurde pro Experiment eine Probe ohne RNA der Reversen Transkription (und später der PCR) ausgesetzt.

B.2.5.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Einzelne Stränge der gewonnenen cDNA lassen sich nun selektiv mittels PCR exponentiell vervielfältigen (amplifizieren), um sie dann durch einen fluoreszierenden Farbstoff sichtbar zu machen und zu quantifizieren.

Durch spezifische Primer werden selektiv nur cDNA-Stränge der gewünschten Sequenz (z.B. für das Zytokin IL-8) markiert. Hier setzt das Enzym *Polymerase* an: pro PCR-Zyklus erstellt es eine Kopie von jedem markierten cDNA-Strang, so dass bei anfänglichen n cDNA-Strängen nach z.B. 25 Zyklen theoretisch n^{24} Kopien vorliegen.

1. Vorlegen von 5 µl (entspricht 5 µg) cDNA in die PCR-Reagenz-Tubes

2. Zugabe einer Mischung aus folgende Reagenzien (insgesamt 45 µl)

H ₂ O-DEPC	25,1 µl	
10x-Tris PCR Puffer (10 mM)	5,0 µl	
MgCl ₂ (25 mM)	1,0 µl	(entspricht 2,5 mM Endkonzentration)
Nukleotide-Mix	1,0 µl	(entspricht 200 mM Endkonzentration je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Primer-Mix	12,5 µl	(entspricht 25 pmol jedes 5' und 3' Primers)
DNA Polymerase	0,4 µl	(entspricht 2 U)
	45,0 µl	

Primer: Die Primersequenzen wurden der Veröffentlichung von H.C. Jung, L. Eckmann et al., 1995 (96) entnommen (siehe oben B.1.10, Tabelle 2, Seite 18). Der Primer-Mix bestand aus jeweils 2 μM 5' und 3' Primers.

Nukleotide: Der Nukleotide-Mix bestand aus jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP.

Die PCR-Temperaturprofile wurden verwendet wie von H.C. Jung, L. Eckmann et al. 1995 (96) beschrieben (siehe Tabelle 3). Die Anzahl der PCR-Zyklen wurde für jedes Zytokin so angepasst, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen Proben optimal sichtbar wurden.

Tabelle 3. PCR-Temperaturprofile und Anzahl der PCR-Zyklen

1.	Nur bei Verwendung von AmpliTaq Gold (für IL-8 und TNF- α): Aktivierung des Enzyms	10 min	90° C	
2.	Denaturierung	1 min	95° C	
3.	Primer Annealing und Extension	2,5 min		
	für IL-1 α , IL-8, MCP-1		60° C	25 Zyklen
	für IL-1 β		60° C	30 Zyklen
	für GM-CSF		65° C	30 Zyklen
	für TNF- α		72° C	35 Zyklen
	für β -Actin		72° C	22 Zyklen
4.	Ende	10 min	72° C	
5.	Konservierung		4° C	

B.2.5.4 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt und durch einen fluoreszierenden Farbstoff unter UV-Licht als Banden sichtbar gemacht. Der Vergleich der einzelnen Zytokin-Banden untereinander erlaubt eine zuverlässige qualitative Aussage über die Zytokin-Aktivität der Zelle zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion.

Herstellung des Gels: 3 g Agarose in 1:10 verdünntem 10x TAE-Puffer zum Kochen bringen, um die Agarose vollständig zu lösen. Nach Abkühlung auf etwa 60° C wird 5 μl Ethidium-Bromid-Lösung hinzugegeben und das Gel in eine passende Form gegossen.

Elektrophorese: Jeweils 10 µl PCR-Produkt wird mit 1 µl 10x Probenpuffer (loading buffer zum Markieren der PCR-Produkte) in einen Gelschlitz gegeben und 40 min einer Spannung von 120 V ausgesetzt. Zur Kontrolle der Größe der PCR-Produkte wurden 2 µl einer 100 bp-Leiter für den Bereich zwischen 100–1500 bp als Marker an den Anfang jeder Gelzeile auftragen.

Die Gele wurden mit einer Videokamera unter UV-Licht digital abfotografiert und die Bilder zur weiteren Dokumentation auf dem Computer gespeichert.

B.2.5.5 Fehlerquellen der RT-PCR und die Minimierung deren Einfluss auf das Ergebnis

Entsprechend der großen Anzahl der Schritte vom Zellkulturexperiment zum eigentlichen Ergebnis der RT-PCR bietet diese Methode viele Möglichkeiten für Fehler. Die meisten lassen sich zwar durch entsprechende Sorgfalt minimieren, jedoch nie alle ausschließen. Daher wurden mehrere Kontrollen an verschiedenen Schritten eingeführt.

b-Actin als Kontrolle

Ein geringerer Reinheitsgrad der extrahierten RNA (z.B. bei einer geringeren Zellzahl der Probe) führt zur Verringerung der eingesetzten RNA-Menge, was sich in einer geringeren Zytokin-Banden-Intensität in der RT-PCR bemerkbar macht. Daher wurde in jedem Versuch neben den Zytokin-RT-PCRs auch eine RT-PCR für β -Actin, ein in eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimiertes Gen, durchgeführt. Eine unerwartet schwache Zytokin-Bande musste relativiert werden, wenn deren zugehörige β -Actin-Bande ebenfalls schwach war – oder umgekehrt. Bei großen Unterschieden zwischen den β -Actin-Banden wurde der Versuch wiederholt.

Negativkontrollen der RT-PCR

Zum Nachweis von Verunreinigungen mit RNA oder DNA wurden Negativkontrollen eingeführt: Pro Versuch wurde sowohl eine Reverse Transkription ohne Zugabe von RNA als auch eine PCR ohne cDNA durchgeführt; beide Proben durften keine Banden liefern – weder für Zytokine noch β -Actin.

Positivkontrollen der RT-PCR

Für die Positivkontrollen dienten mehrere von Jung, Eckmann et al. 1995 (96) konstruierte DNA-Plasmide (pHCQ1 bis pHCQ3), auf denen die DNA-Sequenzen aller untersuchten Zytokine enthalten waren (siehe Abb. 1). Diese standen, nach Standardme-

thoden in *E. coli* vervielfältigt, isoliert und geschnitten, als Plasmid-DNA für die Arbeit zur Verfügung und wurden mit jeder PCR in einem gesonderten Reaktions-Tube in definierter Menge mitamplifiziert. Die Banden der einzelnen Zytokine der Positivkontrolle befanden sich im Agarosegel auf gleicher Höhe wie die der eigentlichen Proben.

Mehrfachproben

Für jede Kondition des Versuchs wurden mindestens zwei, meist drei Proben durchgeführt. Traten bei einem Experiment Abweichungen innerhalb einer Mehrfachprobe auf, wurde der Versuch wiederholt.

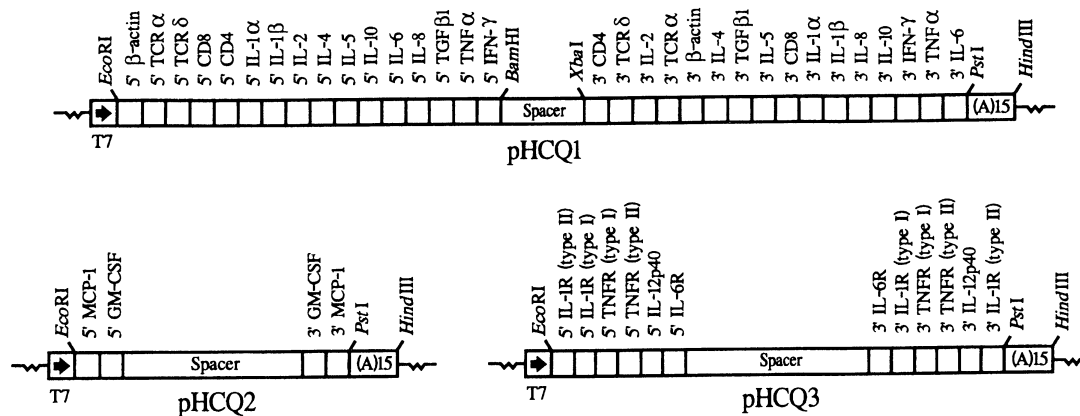


Abb. 1. Die für die Positivkontrollen verwendeten Plasmide pHCQ1 und pHCQ2. Das Plasmid pHCQ1 besitzt 5'- und 3'-Bindungsstellen u.a. für die Primer der Zytokine IL-8, IL-1α, IL-1β, TNF-α sowie für β-Actin. pHCQ2 diente als Positivkontrolle für MCP-1 und GM-CSF. (Abbildung entnommen aus H.C. Jung, L. Eckmann et al. 1995, (96).

B.2.5.6 Semiquantitative RT-PCR

Um die Banden innerhalb eines Experiments auch quantitativ miteinander vergleichen zu können, wurden die Gele mit dem rechnergestützten Geldokumentationssystem FluorS MultiImager von Bio-Rad, München, ausgewertet. Die Gele wurden mit hoher Auflösung und Farbempfindlichkeit digital unter UV-Licht eingescannt, um dann mit entsprechender Software (Multi-Analyst 1.1; Bio-Rad) Intensität und Dicke der Zytokin-Banden zu vermessen. Nach entsprechender Kalibrierung erhielt man Prozentwerte („Rohdaten“) zwischen 0 % (= Intensität des Gels ohne Bande) und 100 % (= Intensität der Positivkontrolle von definierter DNA-Menge). Um Werte unabhängig von der

(selbst innerhalb eines Experiments schwankenden) Güte der RNA-Präparation zu erhalten, wurde das Verhältnis aus dem „Rohwert“ einer Zytokin-Bande und dem „Rohwert“ ihrer entsprechenden β -Actin-Bande gebildet. Proben mit sehr schlechter RNA-Ausbeute (geringere Zellzahl, nicht-konfluenten Monolayer, viele tote Zellen) und entsprechend schwachen Zytokin-Banden, aber auch entsprechend schwachen β -Actin-Banden, blieben somit vergleichbar mit Proben guter RNA-Ausbeute.

Nachteil dieser Methode: sie liefert keine absoluten Werte – als semiquantitative Auswertung lässt sie lediglich Vergleiche zwischen den Banden eines Zytokins innerhalb eines Versuchs zu, nicht jedoch zwischen den Zytokinen untereinander, und schon gar nicht zwischen verschiedenen Versuchen. Für unsere Fragestellung war eine semiquantitative Auswertung aber ausreichend, jede absolut quantitative Methode hätte den enormen Mehraufwand nicht gerechtfertigt.

B.2.6 Messung der Zytokin-Aktivität auf Protein-Ebene: ELISA

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) eignete sich durch seine hohe Sensitivität, um die geringen Mengen Zytokin-Protein (im Pikogramm-Bereich) im Zellkulturüberstand und im Zell-Lysat quantitativ nachzuweisen. Dabei reagiert das zu messende Zytokin in einer Antigen-Antikörper-Reaktion als Antigen mit einem monoklonalen Primärantikörper (*capture antibody*), der an einer Mikrotiterplatte anheftet. Ein hinzugegebener, enzymgekoppelter Sekundärantikörper (*detection antibody*) bindet ebenfalls an das Zytokin und katalysiert gleichzeitig eine Farbreaktion. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional der Zytokin-Konzentration und kann photometrisch bestimmt werden. Anhand einer Standardkurve mit rekombinanten Zytokinen wurde die absolute Konzentration ermittelt.

1. Adsorption von 50 μ l des entsprechenden monoklonalen Primärantikörpers (*capture antibody*, z.B. muriner anti-IL-8 mAK) in einer Konzentration von 3 μ g/ml PBS über Nacht bei 4 °C an eine Mikrotiterplatte (Nunc Maxisorb)
2. Entfernen überschüssigen Antikörpers durch dreimaliges Waschen mit PBS/Tween
3. Blockieren unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation mit Blockierungspuffer über 4 h bei Raumtemperatur

4. Nach dreimaligem Waschen Hinzugabe von Standard-Lösung und Proben, evtl. 1:1 verdünnt in Zellkulturmedium, Inkubation über Nacht bei 4 °C zur Bildung von Antigen (= Zytokin)-Antikörper-Komplexen
5. Nach dreimaligem Waschen Zugabe von 50 µl des entsprechenden Sekundärantikörpers (*detection antibody*, z.B. biotinylierter muriner anti-IL-8 mAK) in einer Konzentration von 0,5 µg/ml PBS, Inkubation für 4 h bei Raumtemperatur
6. Nach viermaligem Waschen Zugabe von 50 µl Konjugat (verdünnt 1:50 in PBS), Inkubation über 1 h bei 37 °C
7. Nach viermaligem Waschen Zugabe von 50 µl Substratpuffer in einer Endkonzentration von 1 mg/ml, Inkubation über 20 min bei 37 °C im Dunkeln
8. Bestimmung der optischen Dichte im ELISA-Reader bei 405 nm Wellenlänge (Referenzwellenlänge 490 nm)

Nach den Angaben des Herstellers leicht modifiziert wurde das Protokoll für die ELISA-Kits, bei denen der *capture antibody* schon fertig an die Mikrotiterplatten angeheftet war, wodurch die Schritte 1.–3. wegfielen.

B.2.7 Statistische Analysen

Die Daten wurden mit dem Student's T-Test analysiert. *P*-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Alle Versuche wurden mehrmals wiederholt und ergaben vergleichbare Ergebnisse.

C Ergebnisse

C.1 IL-8-Transkription und Sekretion bei HeLa-Zellen nach Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV⁺ und pYV⁻

Um zu zeigen, ob *Y. enterocolitica* in Epithelzellen eine Zytokinantwort hervorrufen kann, wurden HeLa-Zellen mit Plasmid-haltigen und Plasmid-losen *Y. enterocolitica* (pYV⁺ bzw. pYV⁻) infiziert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach Infektion (1–6 h p. inf.) wurde die Gesamt-RNA extrahiert und mittels RT-PCR auf das Chemokin IL-8 untersucht (Abb. 2A).

Auf Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ reagieren HeLa-Zellen nach ca. 2 h mit einer gesteigerten mRNA-Produktion für IL-8, die bei 4 h ihren Maximalwert erreicht, um dann langsam wieder abzufallen. Nach Infektion mit Plasmid-haltigen *Y. enterocolitica* pYV⁺ lässt sich jedoch nahezu keine IL-8-Expression beobachten: sie wurde auf Werte im Bereich der nicht-infizierten Negativkontrollen supprimiert.

Zur Positivkontrolle wurden Zellen mit TNF- α stimuliert: die IL-8-mRNA-Antwort erfolgte wesentlich schneller als bei Yersinia-Infektion. Der Maximalwert war schon nach etwa 1 h post inf. erreicht, 5 Stunden später wurde fast keine mRNA mehr vorgefunden.

Im gleichen Experiment wurde der Zellkulturüberstand mittels ELISA auf sezerniertes Zytokin-Protein hin untersucht (Abb. 2B). Die Proteinproduktion erfolgte mit etwa 1 h Verzögerung zur mRNA-Expression: als Reaktion auf TNF- α -Stimulation wurde IL-8 in den ersten 2 h post inf. produziert, danach war kaum ein Anstieg mehr feststellbar. Als Reaktion auf *Y. enterocolitica* pYV⁻-Infektion war IL-8 erst nach ca. 4 h post inf. nachweisbar und stieg dann nicht weiter an. Erwartungsgemäß lag nach Infektion mit Plasmid-haltigen *Y. enterocolitica* pYV⁺ die IL-8-Sekretion nicht über der nicht-infizierten Kontrollen.

Somit wurde gezeigt, dass *Y. enterocolitica* die *de novo*-Synthese von IL-8 induziert. Diese kann jedoch durch Plasmid-kodierte Virulenzfaktoren (Yops) supprimiert werden, worauf schon frühere Untersuchungen von Schulte et al. hinwiesen (166,168).

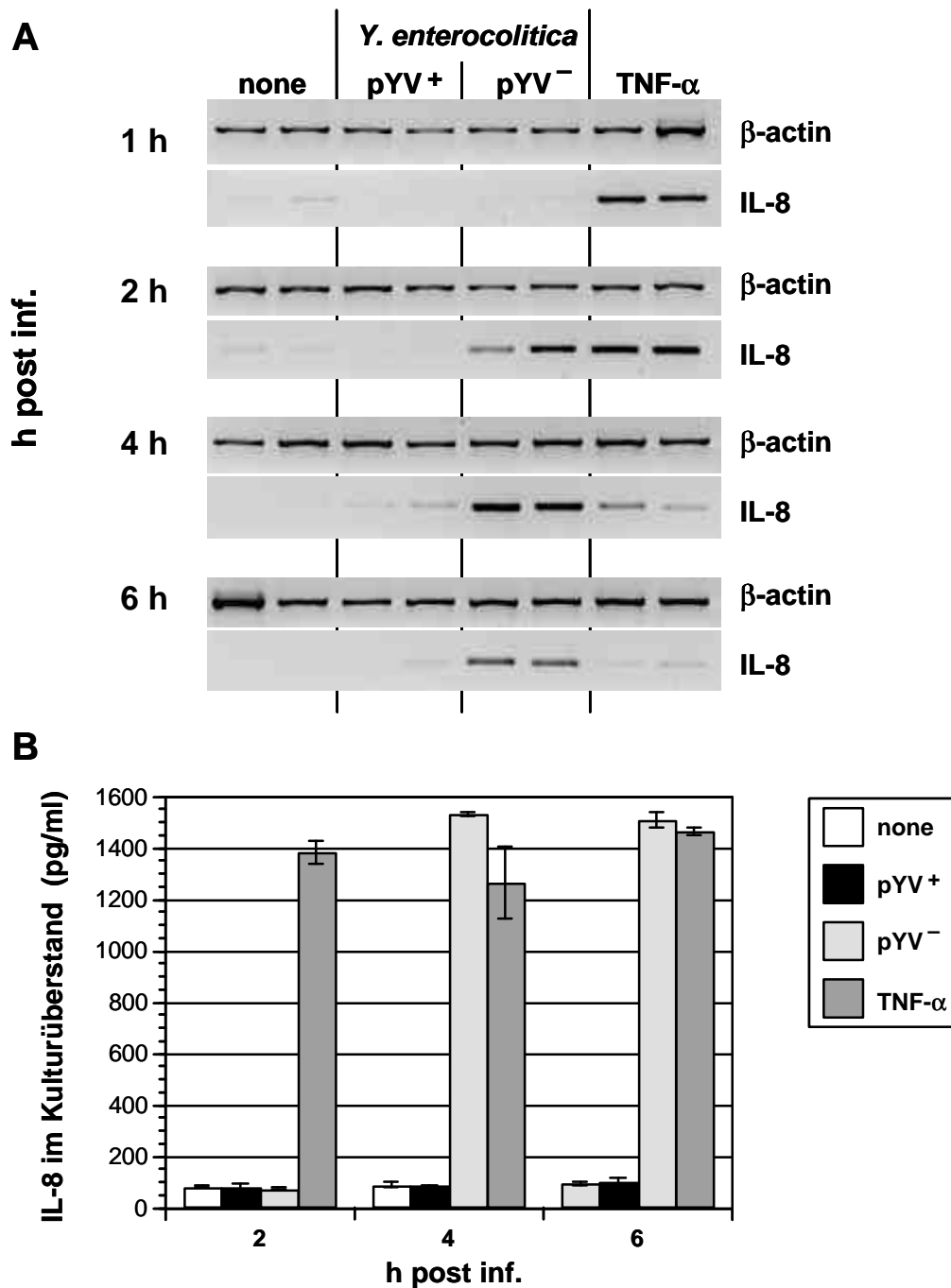


Abb. 2. Kinetik der IL-8-Produktion nach Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV⁺ und pYV⁻. HeLa-Zellen wurden mit Bakterien (MOI ~150 Bakterien pro Zelle) bzw. TNF- α (50 ng/ μ l) als Positivkontrolle inkubiert. Nach 1 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um Bakterien / TNF- α zu entfernen und die Gesamt-RNA sowie Kulturüberstand konserviert (1 h p. inf.) bzw. in Anwesenheit von Gentamicin (100 mg/ml) zur Abtötung eventuell extrazellulär verbleibender Bakterien weiter inkubiert. Nach insgesamt 2, 4 und 6 h wurde ebenfalls RNA und Überstand konserviert. Uninfizierte Zellen als Negativkontrollen erfuhren die gleiche Behandlung nur ohne bakterielle Infektion (none). Für jede Kondition wurden zwei Proben durchgeführt. **A.** Kinetik der mRNA-Expression für IL-8 (RT-PCR). **B.** Kumulation des IL-8-Proteins im Zellkulturüberstand (ELISA, 1 h post inf. waren noch keine Zytokin-Proteine detektierbar).

C.2 Kinetik der *Y. enterocolitica*-induzierten pro-inflammatorischen Zytokin-mRNA-Produktion bei HeLa-Zellen

Es interessierte zunächst das Zytokin-Netzwerk, das von epithelialen Zellen als Reaktion auf eine *Y. enterocolitica*-Infektion initiiert wird. Welche weiteren Zytokine werden induziert? Wann werden sie produziert?

Die Arbeiten anderer Gruppen an Epithelzellen konnten zeigen, dass die Sekretion von IL-8 und anderen Zytokinen nach Infektion mit *Helicobacter pylori* oder *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Epithelzellen vermittelt wurde (79,135). NF- κ B spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation vieler immunologischer und inflammatorischer Prozesse. Er wurde ursprünglich als ein für die B-Zell-spezifische Genexpression notwendiger Faktor entdeckt; heute weiß man, dass er ubiquitär exprimiert wird und als wichtiger Regulator der induzierbaren Expression vieler Gene dient (Übersichtsartikel: (9,13,124)). So fokussierten wir weitere Untersuchungen auf andere pro-inflammatorische Zytokine, von denen ebenfalls eine Abhängigkeit von NF- κ B festgestellt wurde.

Um den durch Yops vermittelten inhibitorischen Effekt auf die Zytokin-Expression zu eliminieren, wurden für die folgenden Versuche Plasmid-freie *Y. enterocolitica* pYV⁻ verwendet. So konnte die Situation des frühen Infektionsstadiums simuliert werden, noch bevor Yops sezerniert werden.

Zur genaueren Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Zytokin-Produktion wurden die Ergebnisse einer Kinetik der Zytokin-mRNA-Expression nach *Y. enterocolitica*-Infektion von HeLa-Zellen semiquantitativ mit Hilfe eines Fluoroimagers analysiert. Die in Abb. 3 dargestellten Daten zeigen, dass mRNA von IL-8, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , MCP-1 und GM-CSF innerhalb 1 h nach Infektion hochreguliert wird, um ein Maximum nach 3 h zu erreichen. Nur MCP-1 zeigte eine leicht verzögerte Spitze zwischen 3 und 4 h p. inf. Während der folgenden 3 bis 5 h fiel die mRNA-Konzentration auf Werte vor der Infektion ab. Um in etwa die Reihenfolge der Expression der einzelnen Zytokine darzustellen, wurden anhand der Graphen die Zeitpunkte halbmaximaler mRNA-Expression errechnet. Wie aus Abb. 3B ersichtlich, wurde IL-8 als erstes exprimiert, etwa 20 bis 30 min vor IL-1 α und MCP-1. Diesen folgten eng IL-1 β , TNF- α und GM-CSF.

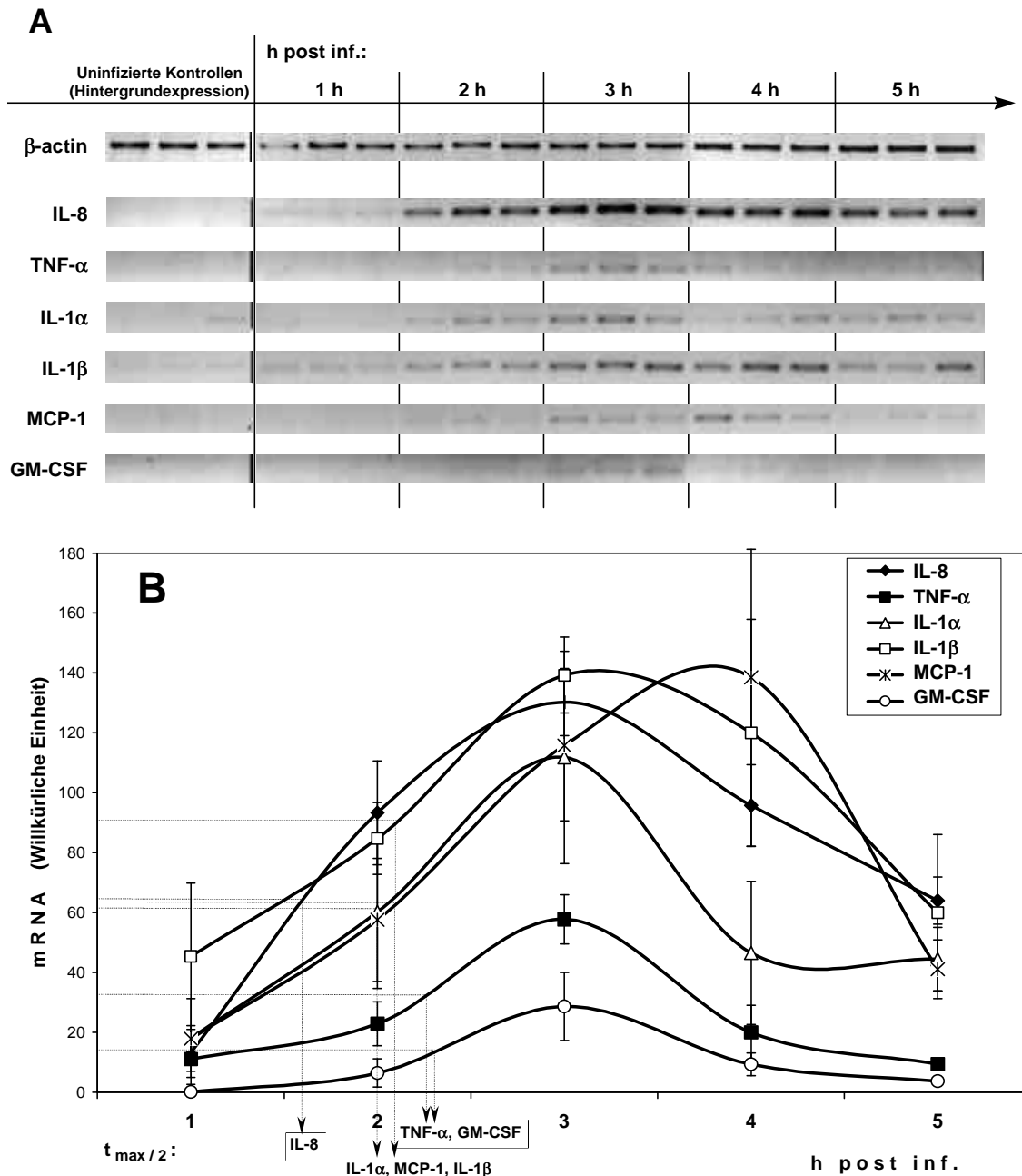


Abb. 3. Zeitverlauf der Zytokin-mRNA-Expression in HeLa-Zellen nach *Y. enterocolitica*-Infektion. HeLa-Zell-Monolayer wurden 1 h lang mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ (MOI ~150 Bakterien/Zelle) infiziert, danach die Bakterien von den Zellkulturen durch Waschen mit PBS entfernt und in Anwesenheit von Gentamicin (100 mg/ml) 5 h lang weiter inkubiert. Uninfizierte Zellen als Negativkontrollen erfuhren die gleiche Behandlung nur ohne bakterielle Infektion (Hintergrundexpression). Für jede Kondition wurden drei Proben durchgeführt. **A.** Qualitative RT-PCR-Analyse. **B.** Semiquantitative mRNA-Bestimmung durch digitales Einscannen der Banden und Berechnung der Intensität der einzelnen Banden durch einen Fluoroimager. Die Werte sind dargestellt in einer willkürlichen Einheit als Relation der Zytokin-mRNA-Werte zu den entsprechenden β -Actin-Werten (Mittelwerte \pm Standardabweichung, interpolierte Graphen; siehe auch Material und Methoden, B.2.5.6, Seite 32). Die Zeitpunkte halbmaximaler Zytokin-Expression ($t_{max/2}$) sind angegeben.

C.3 Verstärken sezernierte Zytokine die Zytokin-Antwort?

Von vielen Zytokinen ist bekannt, dass sie selbst andere Zytokine induzieren können: wie beispielsweise in C.1 (Seite 35) gezeigt, induziert TNF- α eine IL-8-Produktion. Wir stellten uns die Frage, ob die im Laufe einer Infektion sezernierten Zytokine die bakteriell stimulierten Zytokin-Antworten verstärken können.

Es musste zunächst untersucht werden, welche Zytokine überhaupt sekretiert werden. Gleichzeitig musste herausgefunden werden, welche Zytokine die Fähigkeit besitzen, andere Zytokine zu induzieren.

C.3.1 Nur IL-8, MCP-1 und GM-CSF werden von HeLa-Zellen sekretiert, nicht aber IL-1 α und IL-1 β

Welche Zytokine werden überhaupt in signifikanten Mengen sekretiert? Hierzu wurde zunächst Zytokin-Protein sowohl in Zellkultur-Überstand als auch Zell-Lysat von *Y. enterocolitica*-infizierten HeLa-Zellen gemessen. Die Ergebnisse in Tabelle 4 zeigen, dass 4 bis 6 h p. inf. beträchtliche Mengen an IL-8, MCP-1 und GM-CSF von HeLa-Zellen in den Zellkulturüberstand sezerniert werden. IL-1 α und IL-1 β konnte aber nur intrazellulär in den Zell-Lysaten bestimmt werden. MCP-1 war ebenso in den Zell-Lysaten aufzufinden, jedoch nur in geringen Mengen. TNF- α konnte durch ELISA weder in Überständen noch in Zell-Lysaten detektiert werden. Auch 24 h p. inf. blieb IL-1 α und IL-1 β intrazellulär in langsam abnehmender Konzentration, und keines der beiden Zytokine wurde sekretiert. MCP-1 hingegen wurde nach 24 h wie IL-8 nur extrazellulär in den Überständen aufgefunden. TNF- α konnte, wie schon nach 4–6 h beobachtet, durch ELISA auch nach 24 h in keinen Überständen oder Lysaten detektiert werden (die Daten wurden nicht in die Tabelle aufgenommen).

Tabelle 4. Zytokin-Produktion bei HeLa-Zellen nach *Y. enterocolitica*-Infektion

Zytokin	Konzentration (pg/ml) ¹							
	Kontrolle ²				<i>Y. enterocolitica</i>			
	Überstand ³		Lysat ⁴		Überstand		Lysat	
	4–6 h	24 h	4 h	24 h	4–6 h	24 h	4 h	24 h
IL-8	29 ± 2.4	218 ± 0.0	< 5	< 5	890 ± 10.3*	897 ± 83.8*	< 5	< 5
TNF-α	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15	< 15
IL-1α	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	107 ± 12.5*	52 ± 27.5*
IL-1β	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	26 ± 8.6*	4 ± 5.4*
MCP-1	< 10	141 ± 56.3	< 10	< 10	304 ± 18.3*	817 ± 32.5*	26 ± 12.8*	< 10
GM-CSF	< 2.8	n.d.	< 2.8	n.d.	137 ± 8.7*	n.d.	< 2.8	n.d.

¹ Mittelwert ± Standardabweichung von Dreifach-Proben eines repräsentativen Versuchs. * markiert eine statistische Signifikanz mit $P < 0,05$. n.d.: nicht durchgeführt.

² HeLa-Zellen wurden 1 h lang entweder reinem Medium (Kontrolle) oder *Y. enterocolitica* pYV⁻ (MOI ~150) ausgesetzt. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und Gentamicin-haltiges Medium hinzugegeben, um extrazelluläre Bakterien abzutöten.

³ Die Zytokinkonzentration im Kulturüberstand wurde mittels ELISA zu den angegebenen Zeitpunkten post infectionem bestimmt.

⁴ Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten wie unter Material und Methoden angegeben (siehe B.2.4.2, Seite 24) lysiert, um die intrazelluläre Zytokin-Konzentration mittels ELISA zu bestimmen.

C.3.2 IL-1 α , nicht jedoch IL-8 stimuliert eine Zytokin-Antwort bei HeLa-Zellen

Um festzustellen, ob IL-8, das nach *Yersinia*-Infektion als erstes und in den größten Mengen sezernierte Zytokin, die Fähigkeit besitzt, die Zytokin-Produktion in epithelialen Zellen zu verstärken, wurden HeLa-Zellen mit unterschiedlichen Mengen IL-8 stimuliert. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurde mittels RT-PCR nach Zytokin-mRNA gesucht (Abb. 4) und Zell-Überstände wie –Lysate mittels ELISA untersucht. Als Positivkontrollen dienten *Yersinia*- oder IL-1-stimulierte HeLa-Zellen. Die Größenordnung der Menge des Stimulus-Zytokins richtete sich hierbei nach den zuvor im Überstand gemessenen Konzentrationen (siehe oben Tabelle 4, C.3.1). Die Ergebnisse zeigen in Abb. 4, dass IL-8 *nicht* die Zytokin-Produktion bei HeLa-Zellen stimuliert. *Yersinia* und IL-1 hingegen stimulieren die Produktion aller untersuchten Zytokine (IL-8, IL-1 α , IL-1 β und MCP-1), abhängig von der Konzentration des Stimulus. Auch die Stimulation mit MCP-1 und GM-CSF in unterschiedlichen Konzentrationen induzierte keine signifikante Zytokin-Antwort (nicht in der Abbildung gezeigt).

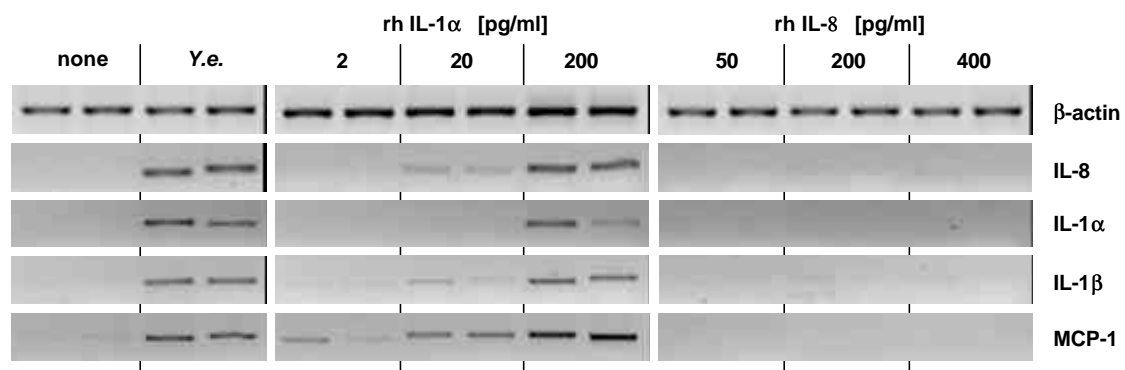


Abb. 4. Zytokin-mRNA-Produktion bei HeLa-Zellen nach *Y. enterocolitica* pYV⁻-Infektion oder nach Stimulation mit IL-1 oder IL-8. Die Zellen wurden 1 h lang verschiedenen Mengen rekombinatem humanem IL-1 α oder IL-8 ausgesetzt, dann gewaschen und für weitere 2 h mit Medium inkubiert, um danach die Gesamt-RNA zu extrahieren und mittels RT-PCR auf Zytokin-mRNA zu untersuchen. Als Negativkontrollen erfuhren Zellen die gleiche Behandlung nur ohne Stimulus (none). Für jede Kondition wurden zwei Proben durchgeführt.

C.4 Von welchen Faktoren ist die Zytokin-Aktivität nach *Y. enterocolitica*-Infektion abhängig?

Interessant war es jetzt herauszufinden, welche Faktoren für die Induktion einer Zytokin-Antwort in Epithelzellen eine Rolle spielen. Untersucht wurde der Einfluss von bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS), der Einfluss von bakterieller Adhäsion an und Invasion in die Epithelzellen, sowie die Notwendigkeit einer bakteriellen metabolischen Aktivität.

C.4.1 LPS induziert keine Zytokin-Antwort in HeLa-Zellen

LPS, Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, ist eines der bekanntesten Produkte, das u.a. in Epithelzellen eine Zytokin-Antwort induzieren kann (z.B. in T84-Zellen, (16). Um herauszufinden, ob die Zytokin-Antwort epithelialer Zellen auf *Y. enterocolitica*-Infektion durch bakterielles LPS ausgelöst wird, wurden HeLa-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von LPS (gewonnen aus *E. coli* oder *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium) stimuliert. In Anlehnung an Beatty et Sansonetti, 1997 (16), wurde auch Normales Humanes Serum (NHS, gewonnen aus dem Blut eines gesunden Mitarbeiters des Labors), hinzugegeben: NHS enthält LPS binding protein und lösliches CD14, Faktoren notwendig für die Bindung von LPS an menschliche Zellen (69,191). Als Positivkontrolle dienten *Y. enterocolitica*-infizierte Zellen.

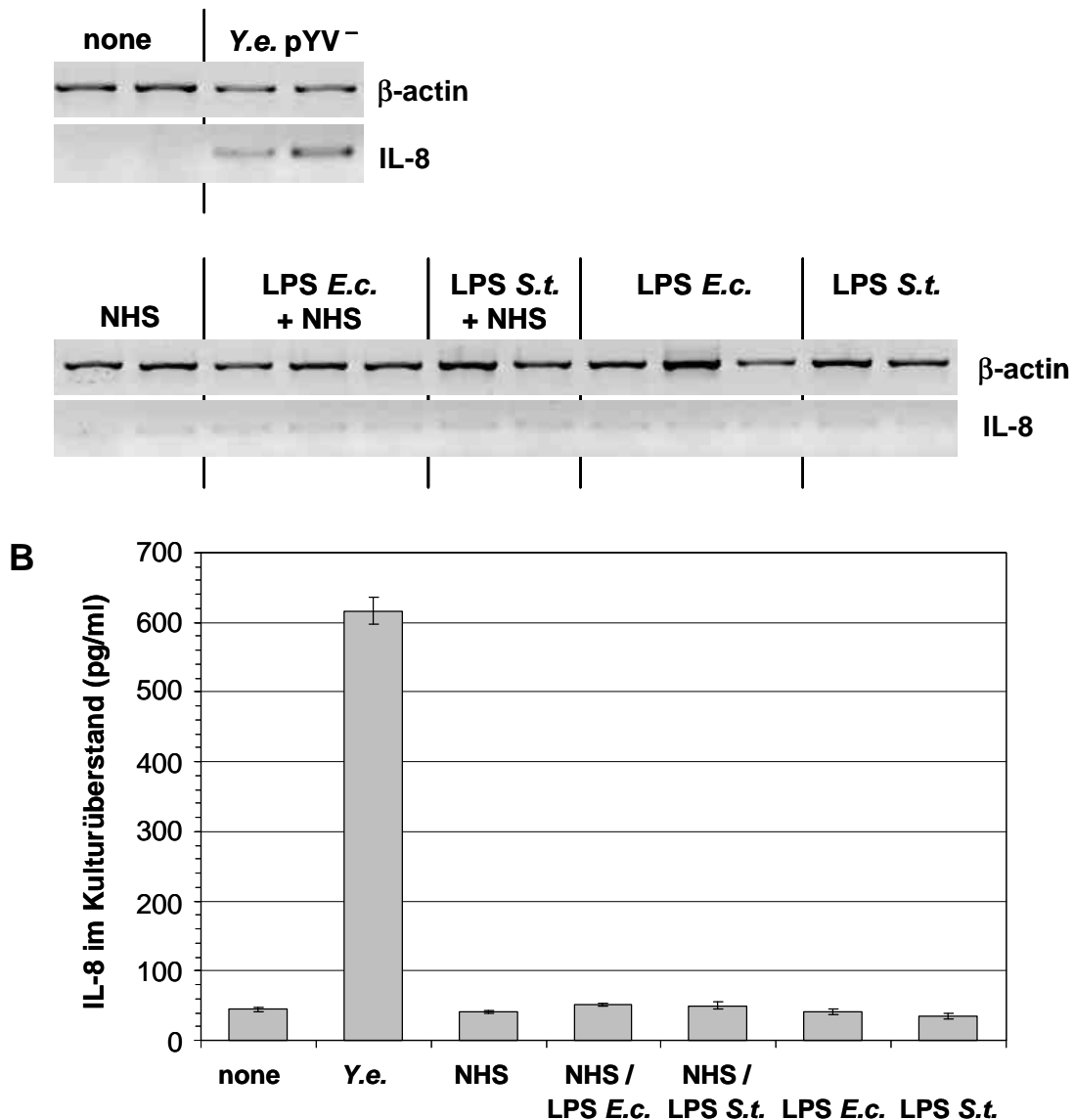


Abb. 5. Zytokin-mRNA-Produktion durch HeLa-Zellen nach Stimulation mit LPS (50 ng/ml) aus *E. coli* (*E.c.*) und *Salmonella typhimurium* (*S.t.*), jeweils mit und ohne Normalem Humanem Serum (NHS, 2 %). HeLa-Zellen wurden 1 h lang mit dem Stimulus inkubiert, dann mit PBS gewaschen und weitere 3 h mit Medium inkubiert, um danach die Gesamt-RNA zu isolieren und den Kulturüberstand zu konservieren. Als Negativkontrollen erfuhren Zellen die gleiche Behandlung jedoch ohne Stimulus (none). Als Positivkontrollen diente *Y. enterocolitica* pYV⁻. NHS allein hatte keinen Effekt auf die Zytokin-mRNA-Produktion. Für jede Kondition wurden mindestens zwei Proben durchgeführt. **A.** IL-8-mRNA-Expression (RT-PCR). **B.** IL-8-Protein im Zellkulturüberstand (ELISA).

Wie aus Abb. 5 ersichtlich, induziert LPS in HeLa-Zellen keine IL-8-Zytokin-Antwort, auch nicht in Anwesenheit von NHS. Ebenso fielen die Untersuchungen auf andere Zytokine (IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, GM-CSF, TNF- α) aus. Es müssen also andere Faktoren als LPS für die Zytokin-Aktivierung durch *Y. enterocolitica* notwendig sein.

C.4.2 Die Adhäsion von *Yersinia* an HeLa-Zellen genügt, um bei HeLa-Zellen eine Zytokin-Antwort auszulösen

Ob bei der Yersinien-Infektion die Invasion des Bakteriums in die Epithelzelle oder die Adhäsion an die Zelle entscheidend ist für das Auslösen der Zytokin-Antwort war bisher nicht bekannt.

Schulte und Mitarbeiter verglichen in unserem Labor mehrere Inhibitoren der Signaltransduktion bei Wirtszellen und konnten zeigen, dass Wortmannin die Invasion von *Y. enterocolitica* in epitheliale Zellen blockiert; die IL-8-Sekretion blieb davon unbeeinflusst (169). Wortmannin, ein Pilz-Metabolit, inhibiert die Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase (PI3-K), die bei der Invasion von Bakterien (z.B. *Listeria monocytogenes*, (87) in Wirtszellen eine wichtige Rolle spielt.

So wurden HeLa-Zellen 20 min vor der Yersinien-Infektion mit Wortmannin inkubiert, um die bakterielle Invasion zu unterbinden. Mittels RT-PCR und ELISA wurde dann die Zytokin-Expression bzw. -Produktion untersucht. Abb. 6 zeigt die *Yersinia*-induzierte mRNA-Expression von IL-8, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , MCP-1 und GM-CSF, die in Anwesenheit von Wortmannin nicht verändert wird. Wortmannin selbst induziert keine Zytokin-mRNA-Expression in HeLa-Zellen (vgl. nicht-infizierte Zellen als Negativkontrolle in Abb. 6B).

Somit konnte gezeigt werden, dass nicht die bakterielle Invasion, sondern allein schon die Adhäsion eine pro-inflammatorische Zytokin-Antwort in epithelialen Zellen induziert.

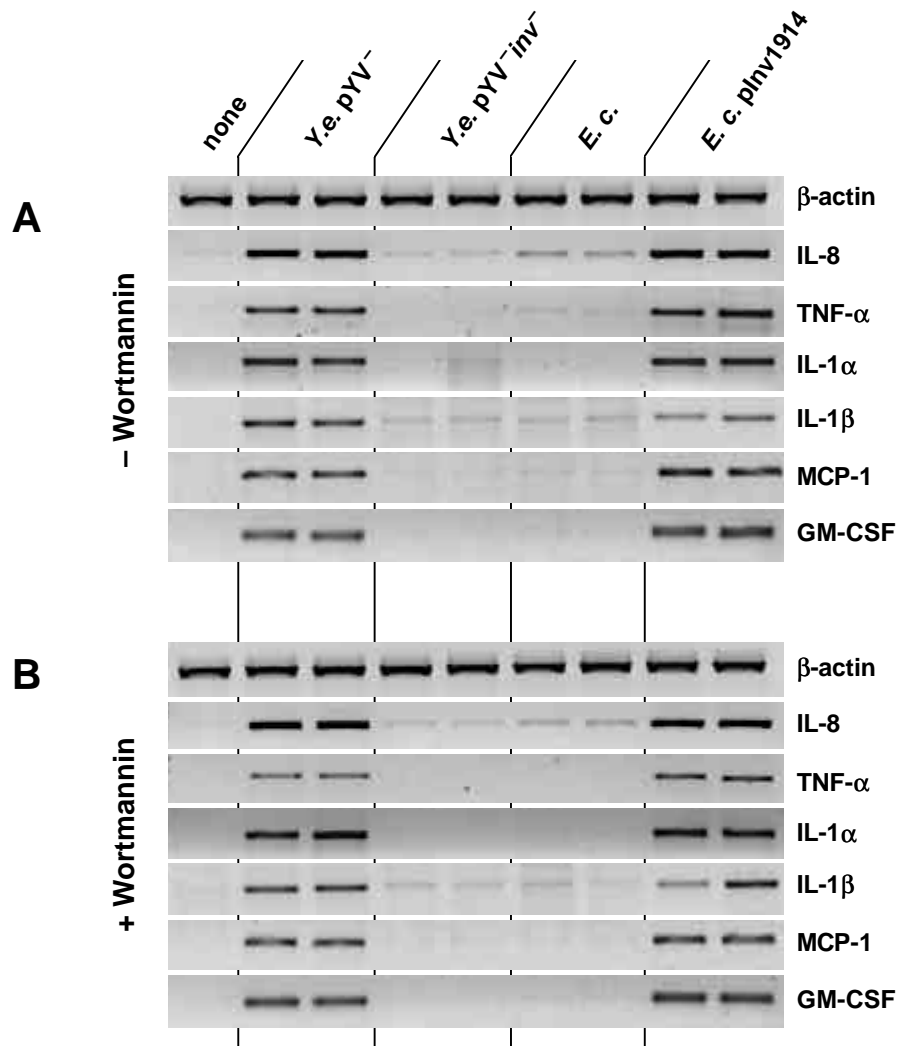


Abb. 6. Zytokin-mRNA-Produktion bei HeLa-Zellen nach Infektion mit *Y. enterocolitica* in Abhängigkeit der bakteriellen Invasion. **A.** HeLa-Zellen wurden mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ oder einem *inv*-defizienten Stamm sowie mit *E. coli* (*E.c.*) oder *E. coli* pInv1914, welcher *Y. enterocolitica* *inv* exprimiert, infiziert (MOI ~150 Bakterien/Zelle). Nach 1 h wurden die Zellen gewaschen und in Anwesenheit von Gentamicin (100 µg/ml) für 2 weitere Stunden inkubiert, um dann die Gesamt-RNA aus den Zellen zu extrahieren. **B.** Die bakterielle Invasion wurde blockiert, indem HeLa-Zellen 20 min vor der Infektion mit Wortmannin (100 ng/ml) behandelt wurden. Uninfizierte Zellen als Negativkontrollen erfuhren die gleiche Behandlung nur ohne bakterielle Infektion (none). Für jede Kondition wurden zwei Proben durchgeführt.

C.4.3 Das *Yersinia*-Invasin Protein löst die Zytokin-mRNA-Produktion aus

Wenn nicht die Invasion das entscheidende Kriterium für die Zytokin-Induktion ist, welche anderen Faktoren sind hierfür wichtig?

Isberg und Leong konnten 1990 zeigen, dass die Invasion durch das Invasin Inv von *Y. enterocolitica* vermittelt wird, indem es an β 1-Integrine auf der Wirtszelloberfläche bindet (91). Pepe und Miller fanden 1993 heraus, dass eine *inv*-defiziente *Y. enterocolitica*-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr die Fähigkeit besitzt, Epithelzellen zu invadieren (144,145). So richtete sich unsere Aufmerksamkeit auf die Rolle von Inv bei der Yersinien-induzierten Zytokin-Produktion.

Dazu analysierten wir die Auswirkungen der *inv*-Mutation bei *Y. enterocolitica* auf die Zytokin-Induktion in Abhängigkeit der bakteriellen Invasion, d.h. mit oder ohne vorherige Behandlung mit Wortmannin. Um isoliert die Wirkung von Inv untersuchen zu können, infizierten wir HeLa-Zellen außerdem mit einem von Schulte et al. konstruierten *E. coli*-Stamm, der das *Y. enterocolitica inv*-Gen exprimiert (*E. coli* pInv1914, (169)). Als Vergleich dienten die jeweiligen Mutterstämme, *Y. enterocolitica* pYV⁻ bzw. *E. coli*.

Abb. 6A zeigt, dass der *inv*-defiziente *Yersinia*-Stamm (*Y.e.* pYV⁻ *inv*⁻) im Gegensatz zu seinem Mutterstamm nicht mehr in der Lage ist, Zytokin-mRNA-Expression in HeLa-Zellen zu induzieren. Umgekehrt konnte der *inv*-exprimierende *E. coli*-Stamm (*E. coli* pInv1914) die mRNA-Expression von IL-8, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , MCP-1 und GM-CSF induzieren. Selbst wenn die Invasion dieses *inv*-exprimierenden *E. coli*-Stammes durch Wortmannin gehemmt wurde, änderte das nicht die Zytokin-mRNA-Produktion.

Dies lässt vermuten, dass Adhäsion und die darauf folgende pro-inflammatorische Zytokin-Induktion durch Invasin vermittelt werden, was unabhängig von der bakteriellen Invasion geschieht.

C.4.4 Getötete Yersinien induzieren eine Zytokin-Antwort in HeLa-Zellen

Für mehrere Pathogene wie *Salmonella* spp., *H. pylori* und *Chlamydia* spp. wurde gezeigt, dass metabolische Aktivität oder ein aktives Typ-III-Sekretionssystem Voraussetzung ist für die Induktion einer Zytokin-Antwort in infizierten Zellen (125,151,171).

Nachdem wie gezeigt anscheinend das Invasin-Protein essentiell zum Auslösen einer Zytokin-Antwort in epithelialen Zellen ist, wollten wir nun metabolisch inaktive, Invasin exprimierende Yersinien auf ihre Fähigkeit untersuchen, Zytokine zu induzieren.

Dazu wurden Invasin exprimierende *Y. enterocolitica* pYV⁻-Bakterien durch Behandlung mit Gentamicin oder Hitze abgetötet (siehe Material und Methoden, B.2.2.3, Seite 23). HeLa-Zellen wurden mit Suspensionen der getöteten Bakterien infiziert und die Zytokin-Produktion gemessen. Wie in Abb. 7 gezeigt, induzieren getötete *Y. enterocolitica* pYV⁻-Zellen eine IL-8-mRNA-Expression und -Produktion in einem ähnlichen Maße wie lebende Bakterien. Die Infektion der HeLa-Zellen mit unterschiedlichen Mengen Bakterien zeigte eine dosisabhängige IL-8-Antwort auf mRNA- wie auf Protein-Ebene.

Die Daten zeigen, dass für die Invasin-vermittelte Zytokin-Produktion bei HeLa-Zellen keine metabolische Aktivität nötig ist.

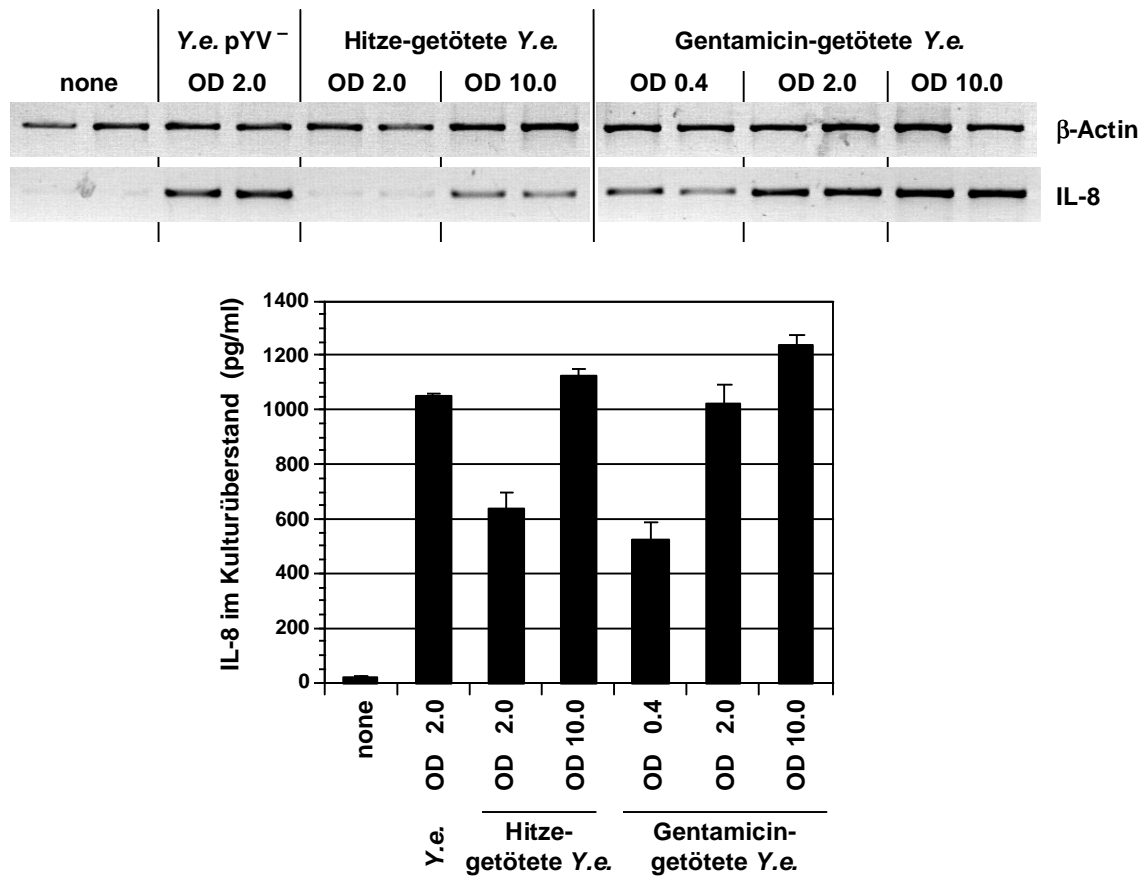


Abb. 7. Rolle der metabolischen Aktivität von *Y. enterocolitica* bei der IL-8-Produktion bei HeLa-Zellen. Die Zellen wurden lebenden, Hitze-getöteten oder durch Gentamicin getöteten (100 μ g/ml über 1 h) *Y. enterocolitica* pYV⁻ ausgesetzt; nach 3 h wurde IL-8-mRNA-Produktion mittels RT-PCT (oben) sowie IL-8-Protein-Sekretion in den Überstand mittels ELISA (unten) bestimmt. Die angegebenen OD-Werte der inokulierten Bakterien-Suspensionen korrespondieren mit unterschiedlichen MOI-Werten: eine OD von 2,0 ist äquivalent mit einer MOI von ~ 150 Bakterien/Zelle.

D Diskussion

Die Entzündungsreaktion, die auf eine *Y. enterocolitica*-Infektion folgt, wurde bisher vor allem histomorphologisch untersucht: Schon 1980 beschrieben Pai et. al. histopathologische Veränderungen in Jejunum, Ileum und Kolon *Yersinia*-infizierter Hasen (143). Autenrieth et al. beschrieben 1993 die zelluläre Immunantwort der Mukosa auf *Y. enterocolitica in vivo* in einem Maus-Infektionsmodell (6,8). Noch immer nicht geklärt ist jedoch, welche Signale des Pathogens oder des Wirtes diese Reaktion auslösen oder begünstigen.

Da Epithelzellen die ersten Zellen sind, auf die Yersinien nach orogastraler Infektion treffen, wird ihnen eine Schlüsselrolle zugesprochen: sie generieren die nötigen Signale für die darunterliegende Mukosa, um die Immunantwort des Wirtes zu initiieren. Diese Funktion der Epithelzellen bei intestinalen Entzündungen während einer *Yersinia*-Infektion wurde in der vorliegenden Dissertation genauer untersucht. Zusätzlich sollte herausgefunden werden, welche bakteriellen Faktoren Voraussetzung für die Initiation der Immunreaktion sind und über welche Mechanismen diese initiiert wird.

So gliedert sich die Diskussion in folgende Abschnitte:

1. Erläuterung des HeLa-Zell-Infektionsmodells
2. Die Rolle der von Epithelzellen produzierten Zytokine während einer *Y. enterocolitica*-Infektion
3. Mechanismen der Interaktion zwischen *Yersinia* und Epithelzellen, die zur Zytokin-Produktion (bzw. -Inhibition) führen
4. Schlussfolgerungen für die Infektionsimmunologie von *Y. enterocolitica*

D.1 HeLa-Zellen als Modell für die Wirt-Pathogen-Interaktion während einer *Y. enterocolitica*-Infektion

In vivo interagieren bei der Entzündungsreaktion eine nahezu unüberschaubare Vielzahl von Zelltypen. Um isoliert die Aktionen der Epithelzellen analysieren zu können,

entschieden wir uns für ein Zellkultur-Infektionsmodell. So konnten die Einflüsse von Immunzellen, die *in vivo* schon zu Anfang der Immunreaktion in das Infektionsgebiet strömen und wiederum auf Epithelzellen einwirken, eliminiert werden.

Für unsere Zwecke erwiesen sich HeLa-Zellen als ideal. Die humane zervikale epitheliale Zell-Linie ist undifferenziert, adhärent an Kulturgefäßböden und einfach in der Handhabung. Trotz ihres eigentlichen Ursprungsorgans, der Zervix uteri, gelten HeLa-Zellen aufgrund ihrer Undifferenziertheit heute als Modell für alle epithelialen Zellen.

Frühere Arbeiten von Schulte et al. in unserem Labor untersuchten die Barrierefunktion der Darm-Epithelzellen bei der Yersinien-Infektion: er entwickelte ein Infektionsmodell mit polarisierten Monolayern, die – wie in der Dünndarmwand – in eine apikale und eine basolaterale Seite differenziert sind (166). Hiermit konnte er zeigen, dass Invasion und Zytokin-Antwort nach *Yersinia*-Infektion auch vom Differenzierungsgrad der Zellen abhängig ist: *Y. enterocolitica* ist nicht in der Lage, differenzierte, d.h. polarisierte intestinale Epithelzellen (T84-Zellen) von der apikalen Seite zu invadieren oder dort eine IL-8-Sekretion auszulösen; einer Infektion von basolateral aus folgte hingegen die Invasion und IL-8-Antwort, wie sie auch bei undifferenzierten Zellen beobachtet wird. Daraus lässt sich folgern, dass Yersinien erst die Epithelzellbarriere von der apikalen Seite durchbrechen müssen, um von der basolateralen Seite eine Darmentzündung auszulösen.

Dieses Modell polarisierter Epithelzellen wäre sicherlich näher an den Bedingungen der Realität. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag jedoch auf der Untersuchung der Geschehnisse *nach* Durchbrechung der Epithelzellbarriere. Für diese Ziele erwies sich die Handhabung eines polarisierten Zellkultur-Modells als zu aufwendig. Wie Vorversuche zu dieser Arbeit zeigten, konnten nur unter großem Material- und Zeitaufwand die für die RT-PCR nötigen Zell-Mengen gewonnen werden, außerdem wiesen die Zellen eine hohe Zytokin-Hintergrundexpression auf. So simulierten wir in unserem einfacheren HeLa-Zell-Infektionsmodell die Situation unmittelbar nachdem *Y. enterocolitica* Zugang zur basolateralen Oberfläche des Darmepithels gewonnen hat.

D.2 Epithelzellen als Initiatoren einer Zytokin-vermittelten zellulären Immunreaktion auf *Yersinia*

Der Infektion von HeLa-Zellen mit *Y. enterocolitica* folgt die mRNA-Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine: IL-8, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , MCP-1 und GM-CSF. Allerdings werden nur IL-8, MCP-1 und GM-CSF in die extrazelluläre Umgebung abgegeben, IL-1 wird zwar produziert, aber nicht sekretiert. TNF- α -Protein konnte überhaupt nicht detektiert werden.

Diese Erkenntnisse lassen sich in Beziehung setzen zu den histomorphologischen Beobachtungen während der *Y. enterocolitica*-Infektion: Jedes der untersuchten Zytokine leistet seinen Beitrag zur Koordinierung der intestinalen Entzündungsreaktion.

D.2.1 IL-8 als initiales Signal an das Immunsystem

IL-8, dessen Expression in unserem HeLa-Zell-Infektionsmodell sehr schnell nach *Yersinia*-Infektion hochreguliert wurde, ist das klassische CXC-Chemokin¹: es lockt spezifisch Neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten in das Entzündungsgebiet (10,11,157,158). Hierzu muss das von den infizierten Epithelzellen gebildete IL-8 zunächst durch Diffusion in die Nähe der Kapillaren gelangen, um dann durch Transzytose durch die Endothelzellen auf deren luminaler Seite dem Blutstrom präsentiert zu werden (128). Durch die vermehrte Expression bestimmter leukozytärer Adhäsine und Integrine wird über IL-8 dann die Endothel-Adhäsion und Extravasion der Leukozyten gesteuert, was letztlich deren Rekrutierung in das Entzündungsgebiet bewirkt (117,177). Ob während einer *Yersinia*-Infektion auch die angiogenetische Eigenschaft von IL-8 (1,101,180) zum Tragen kommt, ist nicht bekannt, kann aber bei länger persistierender Infektion vermutet werden.

¹ Chemokine werden klassifiziert nach der Anordnung zweier Cystein (C)-Reste innerhalb einer hochkonservierten Region nahe dem N-terminalen Ende: bei den CXC-Chemokinen (= α -Chemokinen) sind die Cysteine durch eine einzige (variable) Aminosäure (X) getrennt, bei den CC-Chemokinen (= β -Chemokinen) liegen sie direkt nebeneinander, bei den CXXC- und CXXXC-Chemokinen sind sie durch zwei bzw. drei Aminosäuren getrennt (152). Diese Anordnung bestimmt wesentliche chemische Eigenschaften wie chemotaktische Wirkung und Rezeptorbindung.

D.2.2 MCP-1 als Verstärker der Chemotaxis

Das CC-Chemokin MCP-1, dessen Expression in unserem Modell zeitlich eng hinter IL-8 liegt, besitzt eine noch spezifischere chemotaktische Wirkung auf Monozyten und Basophile, nicht jedoch Neutrophile (11,114). Bei Basophilen bewirkt es gleichzeitig die Freisetzung von Histamin und Peptido-Leukotrienen, die selbst wiederum eine pro-inflammatorische Wirkung besitzen (12). In entzündeten Gebieten können, wie kürzlich gezeigt wurde, auch Neutrophile direkt über eine Änderung der Chemokin-Rezeptorexpression auf MCP-1 chemotaktisch reagieren (94).

D.2.3 GM-CSF als weiterer Aktivator der Immunzellen

GM-CSF, das hier etwas verzögert nach den oben beschriebenen Zytokinen exprimiert wird, stellt einen starken chemotaktischen Reiz für Neutrophile und Eosinophile dar (187). Außerdem stimuliert es die Proliferation und Differenzierung von neutrophilen, eosinophilen und Monozyten-Zell-Linien (40,126). GM-CSF sorgt auch für die funktionelle Aktivierung der entsprechenden reifen Formen dieser Zellen, indem es z.B. bei Neutrophilen die Phagozytose von Bakterien intensiviert (60,188).

Alle die hier erwähnten Effekte von IL-8, MCP-1 und GM-CSF könnten dazu beitragen, eine zelluläre Immunantwort gegen *Yersinia* zu initiieren, wie sie auch im Maus-Infektionsmodell beobachtet wird. Somit konnten hier wichtige Mediatoren der Epithelzellen auf mRNA- und Protein-Ebene identifiziert werden, die für die histologisch beobachtete Entzündungsreaktion verantwortlich ist: Bei Mäusen werden 24 h nach *Yersinia*-Infektion polymorphnukleäre Leukozyten in die infizierten Peyer'schen Plaques rekrutiert, wodurch sich Mikroabszesse bilden (5,6). Einige Tage später emigrieren weitere inflammatorische Zellen einschließlich mononukleärer Phagozyten in die durch *Yersinia* schon zerstörten Peyer'schen Plaques und fördern die weitere Gewebestruktion.

Die frühe Immunantwort des Wirtes auf *Y. enterocolitica* könnte somit von Epithelzellen initiiert und unterhalten werden, indem sie IL-8, MCP-1 und GM-CSF sekretieren.

D.2.4 Untergeordnete Rolle von TNF- α

TNF- α konnte nach *Y. enterocolitica*-Infektion von HeLa-Zellen lediglich als mRNA in der RT-PCR nachgewiesen werden, nicht jedoch als Protein im Kulturüberstand oder Zell-Lysat. Zwar können wir nicht ausschließen, dass die ELISAs zur Protein-Detektion nicht sensitiv genug waren. Die Expression von TNF- α mRNA war jedoch erst nach 35 PCR-Zyklen detektierbar, was auf sehr geringe Mengen mRNA (und somit auch Protein) schließen lässt. TNF- α scheint daher bei der Initiation der inflammatorischen Reaktion durch die Epithelzellen eine untergeordnete Rolle zu spielen. Ob TNF- α in Epithelzellen überhaupt translatiert wird ist unklar.

D.2.5 Parakrine Wirkung von IL-1 α und IL-1 β auf epitheliale Zellen

Für IL-1 sind zahlreiche Funktionen beschrieben (43-45): es aktiviert direkt T-Helferzellen zur Produktion von IL-2, es aktiviert B-Zellen und natürliche Killerzellen und stimuliert deren Proliferation, und es wirkt indirekt pro-inflammatorisch, indem es bei verschiedenen Zelltypen die Synthese anderer Mediatoren (z.B. IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF, ACTH, u.v.a.) stimuliert (63,100). Des Weiteren besitzt es chemotaktische Wirkung auf Leukozyten (39). Somit ist IL-1 ein wichtiger Vermittler bei allen entzündlichen Reaktionen.

Während IL-8, MCP-1 und GM-CSF bei der *Y. enterocolitica*-Infektion von HeLa-Zellen sezerniert wurden, wurden sowohl IL-1 α wie IL-1 β zwar produziert, jedoch nicht sezerniert und blieben über mehr als 24 h intrazellulär. Dies lässt auf eine spezielle Rolle von IL-1 α und IL-1 β schließen, vor allem da unter den untersuchten Zytokinen nur IL-1 in der Lage war, selbst pro-inflammatorische Zytokine in HeLa-Zellen zu induzieren. Dieser Effekt wurde auch für andere epitheliale Zellen beschrieben (51,96).

D.2.5.1 Parakrine Wirkung von IL-1 bei der Infektion mit anderen Pathogenen

Die spezielle Rolle von IL-1 wurde auch bei anderen mukosalen Pathogenen beschrieben. Während einer Infektion mit *Entamoeba histolytica*, dem zu den Protozoen zählenden Erreger der Amöbiasis, induzieren *Entamoeba*-Trophozoiten bei Epithelzel-

len die vermehrte Expression einer Reihe pro-inflammatorischer Zytokine, ähnlich wie hier bei der *Y. enterocolitica*-Infektion beobachtet. Bei *Entamoeba* ist diese Zytokin-Expression jedoch direkt zurückzuführen auf die parakrine Wirkung von IL-1 α , welches von den Zellen konstitutiv exprimiert wird und erst nach *Entamoeba*-induzierter Zytolyse freigesetzt wird (51). Somit wird die pro-inflammatorische Zytokin-Kaskade nicht unmittelbar durch das Pathogen selbst, sondern durch eine Folge der *Entamoeba*-Infektion, nämlich die Zytolyse und IL-1-Freisetzung, initiiert.

Bei der Infektion epithelialer Zellen mit *Chlamydia trachomatis* oder *psittaci* beobachtet man ebenfalls einen Anstieg von mRNA und Protein-Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine. Ähnlich wie bei der *Entamoeba*-Infektion konnte für diese Zytokin-Hochregulation vor allem die parakrine Wirkung von IL-1 α verantwortlich gemacht werden, welches passiv von *Chlamydia*-geschädigten Epithelzellen freigesetzt wurde (151). (Allerdings wurde hier auch ein *direkter* Weg zur Zytokin-Aktivierung gefordert).

Nach Infektion mit *Shigella flexneri*, dem Erreger der Bakterienruhr, begehen Makrophagen Apoptose (199). Diese geht einher mit der Freisetzung großer Mengen von prä-synthetisiertem IL-1 α , welchem die Schlüsselrolle als Verursacher der Entzündungskaskade zugesprochen wird. *Shigella* selbst hingegen ist nicht fähig, direkt die *de novo*-Synthese von Zytokinen zu induzieren (162,197,198).

Bei Infektionen mit *Shigella*, *Entamoeba* oder *Chlamydia* ist somit IL-1 α der eigentliche Auslöser der Produktion und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, was dann zur Entzündungsreaktion des Gewebes führt.

D.2.5.2 Intrazelluläres IL-1 als Reserve-Zytokin für eine verstärkte Immunantwort auf *Yersinia*?

Anders verhielt es sich in unseren Versuchen mit *Y. enterocolitica*. Im Gegensatz zur Infektion mit *Entamoeba histolytica*, *Chlamydia spp.* oder *S. flexneri* war die Produktion und Sekretion von IL-8 bei der *Yersinia*-Infektion nicht Folge der Freisetzung von intrazellulärem IL-1. In unseren Experimenten beobachteten wir bei *Y. enterocolitica* pYV⁻-infizierten HeLa-Zellen weder apoptotische Vorgänge noch andere Formen der Zellschädigung, was in Übereinstimmung mit anderen Publikationen steht (130,132,160). So blieben IL-1 α und IL-1 β länger als 24 h post inf. intrazellulär.

Y. enterocolitica muss also die Fähigkeit besitzen, direkt ohne den Umweg über IL-1 ein inflammatorisches Zytokin-Netzwerk zu induzieren. (Auslöser dieser direkten Zytokin-Induktion ist *Yersinia* Invasin, siehe unten).

Für die Freisetzung von intrazellulärem IL-1 bei *Yersinia*-Infektion wäre eine weitere Provokation der Zelle, z.B. durch bakterielle Zytotoxizität, notwendig. Tatsächlich besitzen pathogene Yersinien (*Y. enterocolitica* pYV⁺) ein Virulenzplasmid, das u.a. für mehrere Yop-Effektorproteine kodiert, u.a. für YopE, welches durch Zerstörung des Aktinskeletts zytotoxische Wirkung auch auf Epithelzellen besitzt (155,156). Auch YopJ/YopP könnten durch Induktion von Apoptose in Makrophagen (130,132) zu einer Freisetzung von intrazellulärem IL-1 führen, ähnlich des bei der *Shigella flexneri*-Infektion beobachteten Mechanismus (162,197,198). Somit lässt sich vermuten, dass *in vivo* einige Stunden post inf. durch Yops die (passive) Freisetzung von IL-1 aus defekten Epithelzellen und Makrophagen vermittelt wird. Dieses freigesetzte IL-1 α und IL-1 β könnte parakrin auf die umliegenden Zellen wirken als ein zweiter Stimulus zur Induktion einer weiteren pro-inflammatorischen Zytokin-Kaskade bzw. zur Verstärkung der initialen Zytokin-Antwort. Auch bisher nicht infizierte Zellen in der Nachbarschaft würden so zu einer zusätzlichen Zytokin-Produktion stimuliert. IL-1 könnte somit bei der Yersinien-Infektion die Funktion eines „Reserve-Zytokins“ für einen weiteren Entzündungs-Schub besitzen.

D.2.5.3 Keine parakrine Wirkung der nach *Yersinia*-Infektion sezernierten Zytokine auf Epithelzellen

Im Gegensatz zu IL-1 war unter den während der *Y. enterocolitica*-Infektion aktiv sezernierten Zytokinen (IL-8, MCP-1 und GM-CSF) keines in der Lage, selbst die pro-inflammatorische Zytokin-Antwort bei HeLa-Zellen zu verstärken.

Diese Beobachtung steht in Einklang mit neueren Publikationen, die ein spezielles Muster der Zytokin-Rezeptor-Expression auf epithelialen humanen Kolonzellen (T84, Caco-2, HT-29) aufzeigen (47,95). Demnach werden die CC-Chemokin-Rezeptoren CCR1–8 und die CXC-Chemokin-Rezeptoren CXCR4–5 konstitutiv auf diesen Zellen exprimiert, wohingegen CXCR1 und CXCR2 wenig, wenn überhaupt, exprimiert werden. Da nun IL-8 an CXCR1 und CXCR2 bindet und GM-CSF und MCP-1 an CCR2 oder CCR10 binden, wird klar, dass diese Zytokine nicht an epithelialen Zellen

wirken können. Obwohl HeLa-Zellen nicht in die oben genannten Studien miteinbezogen waren, implizieren unsere Versuche, dass HeLa-Zellen nicht CXCR1, CXCR2, CCR2 oder CCR10 exprimieren, da sie vollkommen unreaktiv auf IL-8, MCP-1 oder GM-CSF waren. Dies unterstreicht die Theorie, dass eine verstärkende Wirkung der untersuchten Zytokine auf die inflammatorische Reaktion nur von IL-1 ausgeht.

D.3 Mechanismen der Interaktion zwischen *Yersinia* und Wirtszelle

D.3.1 Bakterielle Adhäsion, nicht Invasion, ist ausreichend für eine Zytokin-Induktion

Neben *Y. enterocolitica* sind zahlreiche invasive Pathogene bekannt, die in Epithelzellen eine IL-8-Antwort oder andere pro-inflammatorische Zytokine auslösen können, so z.B. *Salmonella*, *Shigella*, enteropathogene *Escherichia coli* oder *Listeria monocytogenes* (48-50,96,163,168). Bis heute sind die Mechanismen, die zur Zytokin-Induktion und -Sekretion führen, nicht geklärt. Eckmann et al. gingen 1993 davon aus, dass die bakterielle Invasion in die Wirtszelle notwendig sei: Bei einer nicht-invasiven *S. dublin invA*-Mutante beobachtete er im Gegensatz zum Wildtyp keine IL-8-Sekretion. Ebenso blieb nach Hemmung der Invasion mittels Cytochalasin D (einem Inhibitor der Actin-Polymerisation) die IL-8-Sekretion bei *S. dublin*-Infektion aus (49). Auch bei enteroinvasiven *E. coli* ist deren Invasion in die Zelle zur Zytokin-Induktion notwendig (49). Schulte et al. fanden jedoch heraus, dass virulente *Y. enterocolitica* auch ohne signifikante Invasion in der Lage sind, eine IL-8-Antwort zu induzieren (166).

Um diese Frage – Adhäsion oder Invasion – zu klären, hemmten wir die bakterielle Invasion mittels Wortmannin, einem selektiven Inhibitor der PI3-Kinase: auch ohne bakterielle Invasion in die Wirtszelle wurde die gleiche Zytokin-Antwort auf transkriptioneller wie auf Protein-Ebene ausgelöst. Nicht die Invasion, sondern lediglich die Adhäsion von *Y. enterocolitica* an die Epithelzelle ist somit ausreichend, um eine pro-inflammatorische Zytokin-Antwort zu induzieren.

D.3.2 Invasin-Bindung löst die Zytokin-Produktion aus

Es war bekannt, dass das äußere Membranprotein *Yersinia* Invasin an β 1-Integrine von Säugetier-Zellen bindet und dadurch beispielsweise die bakterielle Invasion in die Wirtszelle vermittelt (91). Wie R. Schulte aus dieser Arbeitsgruppe in früheren Versuchen zeigen konnte, besitzt eine *inv*-defiziente *Y. enterocolitica*-Mutante nicht mehr die Fähigkeit, Epithelzellen zu invadieren (166). In dieser Arbeit fanden wir heraus, dass das *Y. enterocolitica* Invasin Protein auch für die Induktion einer pro-inflammatorischen Zytokin-Antwort notwendig ist: Infektion von Epithelzellen mit der *inv*-defizienten Mutante hatte keine Zytokin-Produktion zur Folge.

Versuche mit einer *inv*-exprimierenden *E. coli*-Mutante (*E. coli* pInv1914) zeigten, dass Invasin einem in der Wildtyp-Form nicht-invasiven *E. coli*-Stamm die Fähigkeit verleiht, Epithelzellen zu invadieren. Zusätzlich fanden wir heraus, dass dieser *E. coli* pInv1914 im Gegensatz zum Wildtyp in der Lage ist, in HeLa-Zellen pro-inflammatorische Zytokine zu induzieren. Dies geschah unabhängig von der bakteriellen Invasion.

Anscheinend genügt allein die Bindung von membranständigem Invasin, exprimiert von *Y. enterocolitica* oder *E. coli*, an β 1-Integrine der Wirtszelle, um eine pro-inflammatorische Zytokin-Antwort zu induzieren. Wir können nicht ausschließen, dass noch weitere bakterielle Komponenten in die Zytokin-Induktion involviert sind. LPS, ein verbreitetes bakterielles Oberflächenprotein, spielt hier jedoch keine Rolle, da LPS keinen Effekt auf HeLa-Zellen hatte. Auch schienen keine anderen von den Yersinien sekretierten Produkte als Ursache für die Zytokin-Induktion in Frage zu kommen, da sogar tote Yersinien die gleiche Zytokin-Antwort bewirkten wie metabolisch aktive Yersinien.

Die *Yersinia*-induzierte Zytokin-Produktion konnte somit direkt auf die Aktivität eines Virulenzfaktors, *Yersinia* Invasin, zurückgeführt werden. Den endgültigen Beweis dafür lieferten inzwischen R. Schulte und G. Grassl aus unserer Arbeitsgruppe: sie konnten zeigen, dass auch die Bindung von isoliertem *Yersinia* Invasin, gekoppelt an inerte Latexpartikel, an β 1-Integrine eine IL-8-Produktion auslöst (167).

D.3.3 Induktion von NF- κ B durch Invasin

Von allen hier untersuchten Zytokinen ist bekannt, dass bei ihrer Induktion der Transkriptionsfaktor nuclear factor κ B (NF- κ B) eine wichtige Rolle spielt. So enthält die Promotorregion des humanen IL-8-Gens Bindungsstellen u.a. für NF- κ B, und die NF- κ B-Bindung daran ist notwendig für die transkriptionelle Aktivierung von IL-8 (123,133,134,194). Für die Induktion von MCP-1 ist die NF- κ B-Bindungsstelle in der Promotorregion des Zytokin-Gens notwendig (zusammen mit der AP-1-Bindungsstelle, (122)). Entsprechende Erkenntnisse liegen auch für die Zytokine IL-1 α , IL-1 β , GM-CSF und TNF- α vor (siehe dazu die Übersichtsartikel (9,13,102,124,141,173,183)).

Da nun alle hier untersuchten Zytokine, die durch *Yersinia* Invasin-Bindung induziert werden, von NF- κ B abhängig sind, liegt die Vermutung nahe, dass Invasin selbst NF- κ B aktiviert. Dies konnten R. Schulte, G. Grassl et al. aus unserer Arbeitsgruppe zeigen: Sie konnten bei *Y. enterocolitica*-infizierten HeLa-Zellen eine NF- κ B-Bindung an die entsprechende Promotorregion des IL-8-Gens nachweisen. Diese NF- κ B-Aktivierung zeigte sich auch bei Infektion mit Invasin-exprimierenden *E. coli* pInv1940 oder nach Inkubation mit Invasin-gekoppelten Latexpartikeln.

D.3.4 Störung des Zytokin-Netzwerks durch *Yersinia* outer proteins

Wie schon erwähnt, konnten wir zeigen, dass auch metabolisch inaktive Yersinien eine Zytokin-Antwort induzierten. Gegenteilig verhält es sich bei vielen anderen Bakterien, die epitheliale Oberflächen infizieren: Für *Salmonella* spp. (79), *H. pylori* (135,171) oder *Chlamydia* spp. (151) beispielsweise konnte gezeigt werden, dass bakterielle Proteinsynthese oder ein Typ III- oder Typ IV-Protein-Sekretionssystem nötig sind, um Zytokin-Antworten auszulösen.

Bei der *Y. enterocolitica*-Infektion hingegen ist das Typ III-Sekretionssystem für die Invasin-induzierte Zytokin-Produktion nicht notwendig – im Gegenteil, es scheint diese zu hemmen: bei virulenten, Plasmid-tragenden Yersinien, die das Typ III-Sekretionssystem besitzen, beobachten Schulte et al. eine Inhibition der IL-8-Sekretion von Epithelzellen, die auf die Aktivität verschiedener sezernierter „*Yersinia* outer proteins“ (Yops) zurückzuführen ist (168). Dies konnten wir auch auf transkriptioneller Ebene

bestätigen: Plasmid-tragende *Y. enterocolitica* pYV⁺ löste im Gegensatz zu *Y. enterocolitica* pYV⁻ keine IL-8-mRNA-Produktion in HeLa-Zellen aus. Auch die Transkription aller anderen untersuchten Zytokine (IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, GM-CSF, TNF- α) wurden durch Plasmid-tragende Yersinien inhibiert.

Dies steht im Einklang mit neueren Publikationen, die zeigen konnten, dass YopP (*Y. enterocolitica*) bzw. YopJ (*Y. pseudotuberculosis*) NF- κ B inhibiert (139, 159, 165, (139,159,165,176). Diese NF- κ B-Inhibition wird in engem Zusammenhang gesehen mit der Fähigkeit von *Yersinia*, Apoptose in Makrophagen zu induzieren: Um dem Zelluntergang durch Apoptose zu entkommen, benötigen Makrophagen die *aktive* (translozierte) Form von NF- κ B (115,184-186). Durch die Hemmung von NF- κ B via YopP/YopJ verfügt *Yersinia* somit über die Fähigkeit, Makrophagen abzutöten. Dies erst ermöglicht in Mäusen die systemische Ausbreitung der Infektion (131,132).

Y. enterocolitica besitzt also zum einen den Virulenzfaktor Invasin, welcher gezielt pro-inflammatorische Zytokine im infizierten Gebiet induziert und somit zu einer starken – vielleicht überschüssenden – zellulären Immunantwort führt. Zum anderen verfügt *Yersinia* dank bestimmter sezernierter Proteine über einen effektiven Mechanismus, diese Zytokine wieder zu hemmen und somit die Immunantwort des Wirtes zu stören.

Welcher Effekt in vivo nun überwiegt, der pro-inflammatorische Effekt von Invasin oder der anti-inflammatorische von YopP, ist noch nicht geklärt. Wir vermuten, dass zu Beginn der Infektion die Induktion von NF- κ B über Invasin wichtig ist: durch eine überschießende Entzündungsreaktion mit Zerstörung des Peyer'schen Plaques wird den Yersinien eine Ausbreitung im Wirtsgewebe ermöglicht. Darauf weisen auch andere Untersuchungen hin, die zeigen, dass Invasin bei der Kolonisierung der Peyer'schen Plaques eine wichtige Rolle spielt (30,145). Erst im späteren Verlauf der Infektion überwiegt dann die Inhibition von NF- κ B: sie leitet bei Makrophagen die Apoptose ein und trägt somit indirekt auch zur Resistenz gegen Phagozytose durch Makrophagen bei (65,131,132).

D.4 Mögliches Szenario der *Y. enterocolitica*-Infektion in vivo

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit und anderen vorausgehenden Veröffentlichungen schlagen wir folgendes Szenario bei der *Y. enterocolitica*-Infektion in vivo vor (Abb. 8):

Invasin-exprimierende Yersinien werden schnell durch M-Zellen transloziert, wobei Invasin eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Peyer-Plaue-Infektion spielt (5,30,145). Über die Interaktion mit β 1-Integrinen auf der Oberfläche der Wirtszellen löst Invasin die Produktion und Sekretion inflammatorischer Zytokine und Chemokine aus. Dies führt zur Rekrutierung von Entzündungszellen (polymorphnukleäre Neutrophile, Makrophagen, B-, T-Zellen, u.a.), zur Abszessbildung und schließlich zur Destruktion des Peyer'schen Plaques und der Epithelzellbarriere. Später exprimieren Yersinien Plasmid-kodierte Pathogenitätsfaktoren (5,93), um dem angeborenen Immunsystem des Wirtes zu entkommen: Yersinien könnten Effektorproteine wie YopE, YopH, YopJ und YopP in das Zytosol der Wirtszelle translozieren (35,36). YopE könnte die Wirtszellen angreifen, indem es das Aktinskelett der Zelle zerstört (155), YopJ/YopP könnten in Makrophagen Apoptose induzieren (130,132). YopE und YopH vermitteln außerdem eine Resistenz der Yersinien gegen Phagozytose durch Makrophagen (153,154). Wahrscheinlich führen diese Ereignisse schließlich zur Freisetzung von sowohl präformiertem als auch Invasin-induziertem, de novo synthetisiertem IL-1. Die ursprüngliche pro-inflammatorische Immunantwort, ausgelöst durch Invasin-induziertes IL-8, MCP-1 und GM-CSF, würde dadurch weiter verstärkt werden.

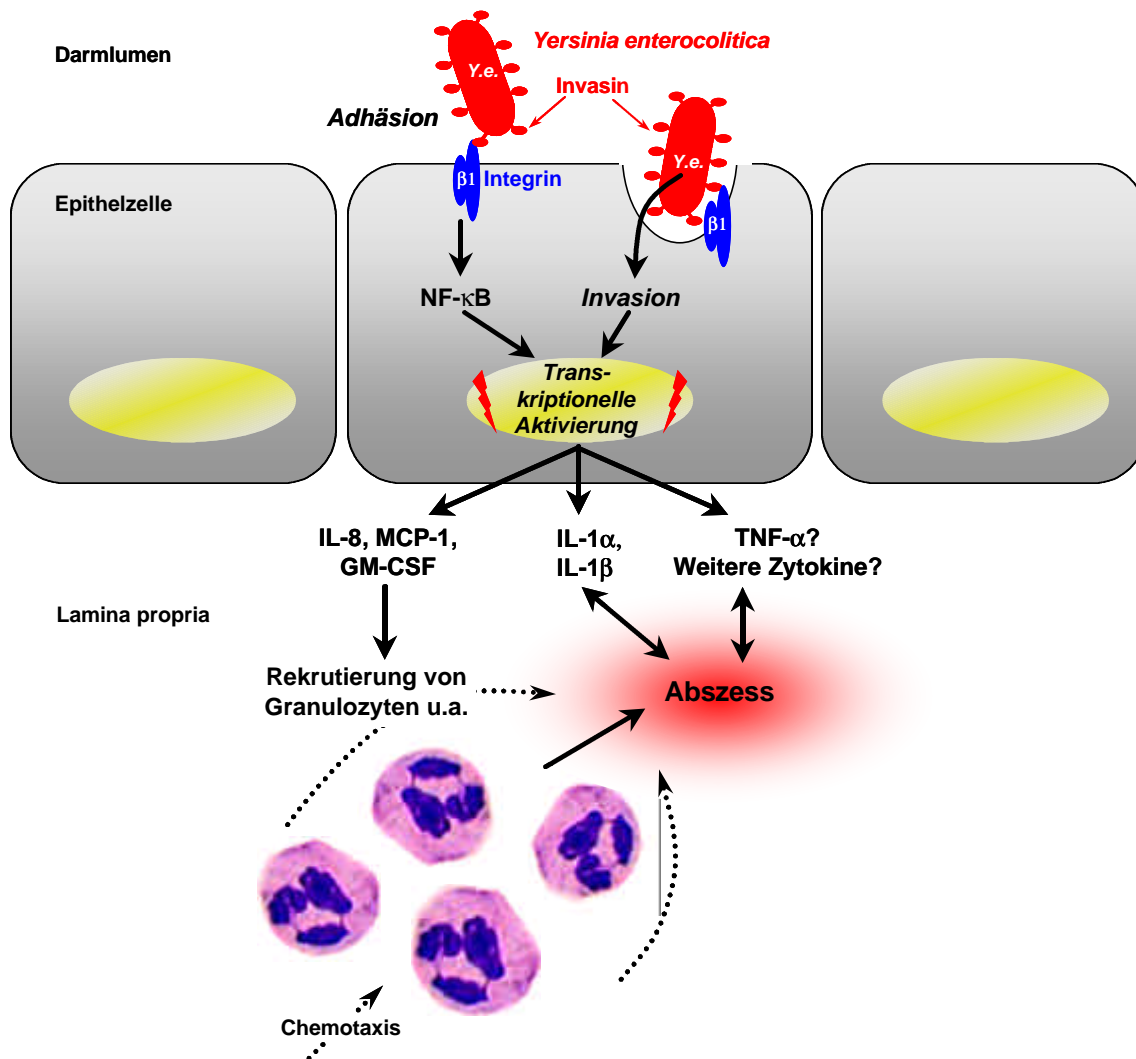


Abb. 8. Schematische Darstellung des Szenarios der frühen *Y. enterocolitica*-Infektion. *Y. enterocolitica* dockt über *Yersinia* Invasin an $\beta 1$ -Integrine der Epithelzelle an. Diese Adhäsion führt direkt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Alternativ hat auch die bakterielle Invasion in die Wirtszelle eine (NF- κ B-vermittelte?) transkriptionelle Aktivierung zur Folge. Adhäsion und Invasion induzieren die *de novo* Synthese von Zytokinen, von denen zunächst die chemotaktisch wirksamen Zytokine IL-8, MCP-1 und GM-CSF sekretiert werden, was eine zelluläre Entzündungsreaktion im Infektionsgebiet (Peyer'scher Plaque, Mukosa) im Sinne eines Abszesses hervorruft. Durch Destruktion infizierter Zellen kommt es wahrscheinlich sekundär zur Freisetzung von IL-1, was die Entzündungsreaktion verstärken könnte. Ob TNF- α und weitere Zytokine eine Rolle spielen, ist nicht geklärt.

D.5 Die *Yersinia*-induzierte Entzündungsreaktion: Wer profitiert, Wirt oder Bakterium?

Man kann spekulieren, für wen nun die von *Yersinia* induzierte inflammatorische Immunantwort letztlich von Nutzen ist – für den Wirt oder das Pathogen. Generell zielt eine Entzündungsreaktion darauf ab, das auslösende Pathogen zu eliminieren oder wenigstens seine Verbreitung einzuschränken.

Wie hier gezeigt werden konnte, besitzt *Y. enterocolitica* mit Invasin einen Pathogenitätsfaktor, der gezielt eine solche Entzündungsreaktion initiiert: sie führt schnell dazu, dass die intakte Epithelzellbarriere des Darms durch die Invasion der Entzündungszellen zerstört wird. So verschafft sich *Yersinia* eine weitere, direkte Eintrittspforte in den Wirtsorganismus, über die die Bakterien einfach und ohne die Passage der M-Zellen disseminieren können. *Y. enterocolitica* ist so seinem Wirt in der Initialphase der Infektion überlegen.

D.6 Schlussfolgerungen im Hinblick auf neue Therapiekonzepte

Das Verständnis der Interaktion zwischen Wirt und Pathogen und des dabei entstehenden Zytokin-Netzwerks ist notwendig zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte, die gezielt in dieses Zytokin-Netzwerk eingreifen. Eine Hemmung der Epithelzell-induzierten, wahrscheinlich überschüssigen zellulären Immunreaktion auf *Y. enterocolitica* wäre im Initialstadium der Infektion wünschenswert. Ob eine anti-inflammatorische Behandlung im Anfangsstadium einer Enteritis mit invasiven Pathogenen einen therapeutischen Erfolg hat, muss noch untersucht werden. Gerade bei gefährdeten Patienten wie Diabetikern oder Immunsupprimierten, wo die Yersiniose einen tödlichen Verlauf nehmen kann, ist eine Therapieoptimierung wichtig (23).

Aber vor allem bei nicht-infektiösen, chronisch-inflammatorischen Erkrankungen oder Krebsleiden kann man schon heute neue Therapiestrategien auf Zytokin-Ebene beobachten. Der Trend geht zum einen hin zur sehr spezifischen Hemmung einzelner

Zytokine durch rekombinant hergestellte monoklonale Antikörper: mit Infliximab beispielsweise, einem Antikörper gegen TNF- α , hat man im letzten Jahr sehr gute Erfolge bei der Behandlung schwerer Formen von Morbus Crohn erzielt, die auf eine Therapie mit konventionellen Medikamenten nicht mehr ansprachen (31,55). Zum anderen wird versucht, auf breiter Ebene die Produktion vieler pro-inflammatorischer Zytokine zu inhibieren, indem man NF- κ B als deren gemeinsamen Transkriptionsfaktor hemmt (14,182,192). Spezifische NF- κ B-Inhibitoren wurden bisher nur *in vitro* eingesetzt: z.B. das pflanzliche Präparat Curcumin, die Proteinkinase-Inhibitoren Staurosporin und Genistein, oder Proteasom-Inhibitoren (68,92,174). Bei vielen schon lange erprobten anti-inflammatorischen Medikamenten wurde ein Wirkmechanismus über eine NF- κ B-Inhibition entdeckt, z.B. bei Aspirin (195), Glukokortikoiden (4,164) oder Cyclosporin A (119,127). Bei einer breiten NF- κ B-Inhibition ist ein genaues Verständnis der Nebenwirkungen wichtig, wie beispielsweise die Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen (111).

E Zusammenfassung

Epithelzellen spielen im Immunsystem eine wichtige Rolle als Vermittler zwischen äußerem Milieu und darunterliegender Mukosa. Epithelzellen treten als Erste mit potentiellen Pathogenen in Kontakt: durch die Sekretion von Zytokinen als Warnsignale an umliegende Zellen können sie eine Entzündungsreaktion einleiten. *Yersinia enterocolitica* ist ein enteropathogener, vorwiegend extrazellulär lokalisierter Erreger, der eine akute Enterokolitis, Sepsis und immunologische Folgeerkrankungen verursacht. Die Rolle der intestinalen Epithelzellen bei der Infektion mit *Y. enterocolitica* ist bisher nicht ausreichend erörtert. Ziel dieser Arbeit war zum einen die Untersuchung des von Epithelzellen initiierten Zytokin-Netzwerks während der frühen Phase der *Y. enterocolitica*-Infektion. Hierzu wurden HeLa-Zell-Monolayer mit verschiedenen *Y. enterocolitica*-Stämmen infiziert und mittels Reverser Transkriptions (RT)-PCR zunächst wichtige Zytokine identifiziert. Die Kinetik der Zytokin-Produktion wurde durch semiquantitative RT-PCR analysiert sowie die intra- oder extrazelluläre Lokalisation der Zytokine mittels ELISA quantitativ erfasst. Die Stimulation von epithelialen Zellen mit rekombinanten humanen Zytokinen lieferte weitere Informationen über die Funktion der einzelnen Zytokine. Zum anderen wurden die Mechanismen der Wirt-Pathogen-Interaktion analysiert, die das Zytokin-Netzwerk während der initialen Phase der *Y. enterocolitica*-Infektion auslösen. Die Auswirkungen der Hemmung der bakteriellen Invasion (durch PI3-Kinase-Inhibitoren) sowie der bakteriellen Proteinsynthese (mittels Antibiotika) wurden untersucht. Durch die Infektion von Epithelzellen mit verschiedenen bakteriellen Mutantenstämmen gelang es, die Bedeutung des chromosomal kodierten Oberflächenproteins Yersinia Invasin zu charakterisieren.

Folgende Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit erzielt:

1. *Y. enterocolitica* pYV⁻ induziert eine Stunde nach Infektion von HeLa-Zellen die *de novo*-Synthese von IL-8-, IL-1 α -, MCP-1-, IL-1 β -, GM-CSF- und TNF- α -mRNA. *Y. enterocolitica* pVY⁺ hemmt durch bestimmte Yersinia outer proteins die *de novo*-Synthese aller untersuchten Zytokine in HeLa-Zellen.

2. Die Zytokin-mRNA-Produktion in HeLa-Zellen nach *Y. enterocolitica* pYV⁻-Infektion erreicht nach 3 h ihr Maximum, um 5–6 h nach Infektion wieder auf Normalwerte abzufallen. IL-8 wird hierbei als Erstes und in den größten Mengen produziert. Diese pro-inflammatorische Zytokin-Antwort ist wahrscheinlich verantwortlich für den histopathologisch beobachteten massiven Einstrom von Immunzellen in infizierte Peyer'sche Plaques, was deren Zerstörung zur Folge hat.
3. Nur IL-8, MCP-1 und GM-CSF werden von HeLa-Zellen sekretiert, IL-1 α und IL-1 β verbleiben intrazellulär. IL-1 α stimuliert bei HeLa-Zellen eine pro-inflammatorische Zytokin-Antwort, nicht jedoch IL-8, MCP-1 oder GM-CSF. Dies spricht für eine spezielle Rolle von IL-1: es könnte als ‚Verstärker-Zytokin‘ dienen, das erst im späteren Verlauf der Infektion, nach Lyse der infizierten Zellen, freigesetzt wird und eine erneute Zytokin-Produktion verursacht.
4. Die Zytokin-Induktion nach *Y. enterocolitica*-Infektion von HeLa-Zellen ist wahrscheinlich nicht LPS-vermittelt.
5. Auch nach Hemmung der bakteriellen Invasion durch Wortmannin, einem PI3-Kinase-Inhibitor, beobachtet man die gleichen Zytokin-Antwort: schon die Adhäsion der Bakterien an die Wirtszelle genügt, um eine inflammatorische Zytokin-Reaktion auszulösen.
6. Wir zeigten, dass die Zytokin-Induktion durch die Bindung von Yersinia Invasin an β 1-Integrine der Wirtszelle vermittelt wird: Eine Invasin-defiziente *Y. enterocolitica*-Mutante löst (ebenso wie ein nicht-invasiver *E. coli*-Stamm) keine Zytokin-Reaktion in HeLa-Zellen aus. Der Transfer des Invasin-Gens in *E. coli* hingegen vermittelt diesem die Fähigkeit, eine inflammatorische Zytokin-Antwort auszulösen.
7. Die Invasin-induzierte Zytokin-Antwort nach *Y. enterocolitica* pYV⁻ ist unabhängig von bakterieller Proteinbiosynthese oder einem intakten Typ III-Sekretionssystem: auch Gentamicin- oder Hitze-getötete Yersinien induzieren eine inflammatorische Zytokin-Antwort wie metabolisch aktive Yersinien.

Diese Ergebnisse verdeutlichen zum einen die wichtige Rolle von Epithelzellen bei der Generierung von Signalen zur Initiation der Abwehrreaktion des Immunsystems gegen *Y. enterocolitica*. Zum anderen wurde Yersinia Invasin als Pathogenitätsfaktor charakterisiert, der gezielt eine zelluläre Entzündungsreaktion der Darmmukosa auf eine *Y. enterocolitica*-Infektion initiiert.

F Literatur

1. **Addison, C. L., T. O. Daniel, M. D. Burdick, H. Liu, J. E. Ehlert, Y. Y. Xue, L. Buechi, A. Walz, A. Richmond, and R. M. Strieter.** 2000. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR(+) CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J. Immunol.* **165**:5269-5277.
2. **Ahvonon, P. and K. Dickhoff.** 1974. Uveitis, episcleritis and conjunctivitis associated with *Yersinia* infection. *Acta Ophthalmol. Suppl* **123**:209-212.
3. **Aleksic, S. and J. Bockemuhl.** 1990. Microbiology and epidemiology of *Yersinia* infections. *Immun. Infekt.* **18**:178-185.
4. **Auphan, N., J. A. Didonato, C. Rosette, A. Helmberg, and M. Karin.** 1995. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* **270**:286-290.
5. **Autenrieth, I. B. and R. Firsching.** 1996. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J. Med. Microbiol.* **44**:285-294.
6. **Autenrieth, I. B., P. Hantschmann, B. Heymer, and J. Heesemann.** 1993. Immunohistological characterization of the cellular immune response against *Yersinia enterocolitica* in mice: evidence for the involvement of T lymphocytes. *Immunobiology* **187**:1-16.
7. **Autenrieth, I. B., V. Kempf, T. Sprinz, S. Preger, and A. Schnell.** 1996. Defense mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against *Yersinia enterocolitica* involve integrins and cytokines. *Infect. Immun.* **64**:1357-1368.
8. **Autenrieth, I. B., U. Vogel, S. Preger, B. Heymer, and J. Heesemann.** 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.
9. **Baeuerle, P. A. and T. Henkel.** 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **12**:141-179.
 10. **Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis.** 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* **307**:97-101.
 11. **Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser.** 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* **55**:97-179.
 12. **Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser.** 1997. Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:675-705.
 13. **Baldwin, A. S. J.** 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* **14**:649-83:649-683.
 14. **Baldwin, A. S., Jr.** 2001. Series Introduction: The transcription factor NF-kappaB and human disease. *J. Clin. Invest* **107**:3-6.
 15. **Balligand, G., Y. Laroche, and G. Cornelis.** 1985. Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. *Infect. Immun.* **48**:782-786.
 16. **Beatty, W. L. and P. J. Sansonetti.** 1997. Role of lipopolysaccharide in signaling to subepithelial polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* **65**:4395-4404.
 17. **Beuscher, H. U., F. Rodel, A. Forsberg, and M. Rollinghoff.** 1995. Bacterial evasion of host immune defense: *Yersinia enterocolitica* encodes a suppressor for tumor necrosis factor alpha expression. *Infect. Immun.* **63**:1270-1277.
 18. **Bissett, M. L., C. Powers, S. L. Abbott, and J. M. Janda.** 1990. Epidemiologic investigations of *Yersinia enterocolitica* and related species: sources, frequency, and serogroup distribution. *J. Clin. Microbiol.* **28**:910-912.

19. **Bliska, J. B., J. C. Clemens, J. E. Dixon, and S. Falkow.** 1992. The Yersinia tyrosine phosphatase: specificity of a bacterial virulence determinant for phosphoproteins in the J774A.1 macrophage. *J. Exp. Med.* **176**:1625-1630.
20. **Bliska, J. B. and S. Falkow.** 1992. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of Yersinia enterocolitica. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:3561-3565.
21. **Bohn, E., J. Heesemann, S. Ehlers, and I. B. Autenrieth.** 1994. Early gamma interferon mRNA expression is associated with resistance of mice against Yersinia enterocolitica. *Infect. Immun.* **62**:3027-3032.
22. **Boland, A. and G. R. Cornelis.** 1998. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during Yersinia infection. *Infect. Immun.* **66**:1878-1884.
23. **Bouza, E., A. Dominguez, M. Meseguer, L. Buzon, D. Boixeda, M. J. Revillo, L. de Rafael, and J. Martinez-Beltran.** 1980. Yersinia enterocolitica Septicemia. *Am. J. Clin. Pathol.* **74**:404-409.
24. **Brett, S. J., A. V. Mazurov, I. G. Charles, and J. P. Tite.** 1993. The invasin protein of Yersinia spp. provides co-stimulatory activity to human T cells through interaction with beta 1 integrins. *Eur. J. Immunol.* **23**:1608-1614.
25. **Brubaker, R. R.** 1991. Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**:309-324.
26. **Cannon, J. G., R. G. Tompkins, J. A. Gelfand, H. R. Michie, G. G. Stanford, J. W. van der Meer, S. Endres, G. Lonnemann, J. Corsetti, and B. Chernow.** 1990. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J. Infect. Dis.* **161**:79-84.
27. **Caron, E., A. Gross, J. P. Liautard, and J. Dornand.** 1996. Brucella species release a specific, protease-sensitive, inhibitor of TNF-alpha expression, active on human macrophage-like cells. *J. Immunol.* **156**:2885-2893.

28. **Carter, P. B.** 1975. Animal model of human disease. *Yersinia enterocolitica*. Animal model: oral *Yersinia enterocolitica* infection of mice. *Am. J. Pathol.* **81**:703-706.
29. **Carter, P. B.** 1975. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice. *Infect. Immun.* **11**: 164-170.
30. **Clark, M. A., B. H. Hirst, and M. A. Jepson.** 1998. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect. Immun.* **66**:1237-1243.
31. **Cohen, R. D., J. F. Tsang, and S. B. Hanauer.** 2000. Infliximab in Crohn's disease: first anniversary clinical experience. *Am. J. Gastroenterol.* **95**:3469-3477.
32. **Cornelis, G. R.** 1992. *Yersinia*, finely tuned pathogens, pp. 231-265. In C. W. Penn and C. J. Smyth (Herausgeber), *Molecular biology of bacterial infection. Current status and future perspectives.* Society for General Microbiology symposium no. 49. Cambridge University Press, Cambridge, England.
33. **Cornelis, G. R.** 1994. *Yersinia* pathogenicity factors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **192**: 243-263.
34. **Cornelis, G. R.** 1998. The *Yersinia* deadly kiss. *J. Bacteriol.* **180**:5495-5504.
35. **Cornelis, G. R., A. Boland, A. P. Boyd, C. Geuijen, M. Iriarte, C. Neyt, M. P. Sory, and I. Stainier.** 1998. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1315-1352.
36. **Cornelis, G. R. and W. H. Wolf.** 1997. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* **23**:861-867.
37. **Cover, T. L. and R. C. Aber.** 1989. *Yersinia enterocolitica*. *N. Engl. J. Med.* **321**:16-24.
38. **Crabtree, J. E., J. I. Wyatt, L. K. Trejdosiewicz, P. Peichl, P. H. Nichols, N. Ramsay, J. N. Primrose, and I. J. Lindley.** 1994. Interleukin-8 expression in

- Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. *J. Clin. Pathol.* **47**:61-66.
39. **Cybulsky, M. I., D. J. McComb, and H. Z. Movat.** 1988. Neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin. Mediator roles of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha 1. *J. Immunol.* **140**:3144-3149.
40. **Danis, V. A., G. M. Franic, D. A. Rathjen, and P. M. Brooks.** 1991. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-2, interferon-gamma (IFN-gamma), tumour necrosis factor-alpha (TNF- alpha) and IL-6 on the production of immunoreactive IL-1 and TNF-alpha by human monocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **85**:143-150.
41. **Delor, I. and G. R. Cornelis.** 1992. Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect. Immun.* **60**:4269-4277.
42. **Dequeker, J., R. Jamar, and M. Walravens.** 1980. HLA-B27, arthritis and *Yersinia enterocolitica* infection. *J. Rheumatol.* **7**:706-710.
43. **di Giovine, F. S. and G. W. Duff.** 1990. Interleukin 1: the first interleukin. *Immunol. Today* **11**:13-20.
44. **Dinarello, C. A.** 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**:2095-2147.
45. **Dinarello, C. A., J. G. Cannon, J. W. Mier, H. A. Bernheim, G. LoPreste, D. L. Lynn, R. N. Love, A. C. Webb, P. E. Auron, and R. C. Reuben.** 1986. Multiple biological activities of human recombinant interleukin 1. *J. Clin. Invest* **77**:1734-1739.
46. **Dulphy, N., M. A. Peyrat, V. Tieng, C. Douay, C. Rabian, R. Tamouza, S. Laoussadi, F. Berenbaum, A. Chabot, M. Bonneville, D. Charron, and A. Toubert.** 1999. Common intra-articular T cell expansions in patients with reactive arthritis: identical beta-chain junctional sequences and cytotoxicity toward HLA-B27. *J. Immunol.* **162**:3830-3839.

47. **Dwinell, M. B., L. Eckmann, J. D. Leopard, N. M. Varki, and M. F. Kagnoff.** 1999. Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **117**:359-367.
48. **Eckmann, L., H. C. Jung, M. C. Schurer, A. Panja, W. E. Morzycka, and M. F. Kagnoff.** 1993. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8 [comment]. *Gastroenterology* **105**:1689-1697.
49. **Eckmann, L., M. F. Kagnoff, and J. Fierer.** 1993. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect. Immun.* **61**:4569-4574.
50. **Eckmann, L., M. F. Kagnoff, and J. Fierer.** 1995. Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system. *Trends. Microbiol.* **3**:118-120.
51. **Eckmann, L., S. L. Reed, J. R. Smith, and M. F. Kagnoff.** 1995. Entamoeba histolytica trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha. *J. Clin. Invest.* **96**:1269-1279.
52. **Eckmann, L., W. F. Stenson, T. C. Savidge, D. C. Lowe, K. E. Barrett, J. Fierer, J. R. Smith, and M. F. Kagnoff.** 1997. Role of intestinal epithelial cells in the host secretory response to infection by invasive bacteria. Bacterial entry induces epithelial prostaglandin h synthase-2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production. *J. Clin. Invest.* **100**:296-309.
53. **Endres, S., J. W. van der Meer, and C. A. Dinarello.** 1987. Interleukin-1 in the pathogenesis of fever. *Eur. J. Clin. Invest* **17**:469-474.
54. **Fallman, M., K. Andersson, S. Hakansson, K. E. Magnusson, O. Stendahl, and H. Wolf-Watz.** 1995. Yersinia pseudotuberculosis inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. *Infect. Immun.* **63**:3117-3124.
55. **Farrell, R. J., S. A. Shah, P. J. Lodhavia, M. Alsahli, K. R. Falchuk, P. Michetti, and M. A. Peppercorn.** 2000. Clinical experience with infliximab

- therapy in 100 patients with Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* **95**:3490-3497.
56. **Fauci, A. S., E. Braunwald, K. J. Isselbacher, J. D. Wilson, J. D. Martin, D. L. Kasper, S. L. Hauser, and D. L. Longo.** 1999. Harrison's Online - Harrison's Principles of Internal Medicine. <http://www.harrissononline.com/>.
57. **Fauconnier, A., A. Allaoui, A. Campos, A. Van Elsen, G. R. Cornelis, and A. Bollen.** 1997. Flagellar flhA, flhB and flhE genes, organized in an operon, cluster upstream from the inv locus in *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology.* **143**:3461-3471.
58. **Fauconnier, A., A. Van Elsen, and A. Bollen.** 1998. Construction and sequencing of new derivatives of the pIN-III-ompA secretion vector. *Genet. Anal.* **14**:129-131.
59. **Fierer, J., L. Eckmann, and M. Kagnoff.** 1993. IL-8 secreted by epithelial cells invaded by bacteria. *Infect. Agents Dis.* **2**:255-258.
60. **Fleischmann, J., D. W. Golde, R. H. Weisbart, and J. C. Gasson.** 1986. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils. *Blood* **68**:708-711.
61. **Frater-Schroder, M., W. Risau, R. Hallmann, P. Gautschi, and P. Bohlen.** 1987. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**:5277-5281.
62. **Fryden, A., A. Bengtsson, U. Foberg, B. Svenungsson, B. Castor, A. Karnell, R. Schvarcz, B. Lindblom, and E. Kihlstrom.** 1990. Early antibiotic treatment of reactive arthritis associated with enteric infections: clinical and serological study. *BMJ* **301**:1299-1302.
63. **Fujishima, S., A. R. Hoffman, T. Vu, K. J. Kim, H. Zheng, D. Daniel, Y. Kim, E. F. Wallace, J. W. Larrick, and T. A. Raffin.** 1993. Regulation of neutrophil interleukin 8 gene expression and protein secretion by LPS, TNF-alpha, and IL-1 beta. *J. Cell Physiol.* **154**:478-485.

64. **Gaede, K., D. Mack, and J. Heesemann.** 1992. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rats: analysis of the immune response to plasmid-encoded antigens of arthritis-susceptible Lewis rats and arthritis-resistant Fischer rats. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* **181**:165-172.
65. **Gao, L. Y. and Y. A. Kwaik.** 2000. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends Microbiol.* **8**:306-313.
66. **Gayraud, M., M. R. Scavizzi, H. H. Mollaret, L. Guillevin, and M. J. Hornstein.** 1993. Antibiotic treatment of *Yersinia enterocolitica* septicemia: a retrospective review of 43 cases. *Clin. Infect. Dis.* **17**:405-410.
67. **Grützkau, A., C. Hanski, H. Hahn, and E. O. Riecken.** 1990. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* **31**:1011-1015.
68. **Haas, M., S. Page, M. Page, F. J. Neumann, N. Marx, M. Adam, H. H. Ziegler, D. Neumeier, and K. Brand.** 1998. Effect of proteasome inhibitors on monocytic IkappaB-alpha and -beta depletion, NF-kappaB activation, and cytokine production. *J. Leukoc. Biol.* **63**:395-404.
69. **Hailman, E., T. Vasselon, M. Kelley, L. A. Busse, M. C. Hu, H. S. Lichtenstein, P. A. Detmers, and S. D. Wright.** 1996. Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of lipopolysaccharide and soluble CD14. *J. Immunol.* **156**:4384-4390.
70. **Hanski, C., U. Kutschka, H. P. Schmoranzler, M. Naumann, A. Stallmach, H. Hahn, H. Menge, and E. O. Riecken.** 1989. Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect. Immun.* **57**:673-678.
71. **Hedges, S. R., W. W. Agace, and C. Svanborg.** 1995. Epithelial cytokine responses and mucosal cytokine networks. *Trends Microbiol.* **3**:266-270.
72. **Heesemann, J.** 1994. Die Gattung *Yersinia*, Yersiniosen, pp. 425-436. *In* H. Brandis, W. Köhler, H. J. Eggers, and G. Pulverer (Herausgeber), *Lehrbuch der*

- Medizinischen Mikrobiologie, 7 Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.
73. **Heesemann, J., C. Eggers, and J. Schroder.** 1987. Serological diagnosis of yersiniosis by immunoblot technique using virulence-associated antigen of enteropathogenic *Yersiniae*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **9**:285-289.
 74. **Heesemann, J., K. Gaede, and I. B. Autenrieth.** 1993. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rodents: a model for human yersiniosis. *APMIS* **101**:417-429.
 75. **Heesemann, J. and R. Laufs.** 1983. Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J. Bacteriol.* **155**:761-767.
 76. **Hein, W. R.** 1999. Organization of mucosal lymphoid tissue. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **236**:1-15.
 77. **Henderson, B., S. Poole, and M. Wilson.** 1996. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol. Rev.* **60**:316-341.
 78. **Henderson, B. and M. Wilson.** 1996. Cytokine induction by bacteria: beyond lipopolysaccharide. *Cytokine* **8**:269-282.
 79. **Hobbie, S., L. M. Chen, R. J. Davis, and J. E. Galan.** 1997. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* **159**:5550-5559.
 80. **Hoogkamp-Korstanje, J. A.** 1987. Antibiotics in *Yersinia enterocolitica* infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **20**:123-131.
 81. **Hoogkamp-Korstanje, J. A. and J. de Koning.** 1990. Klinik, Diagnostik und Therapie von *Yersinia enterocolitica*-Infektionen. *Immun. Infekt.* **18**:192-197.
 82. **Hoogkamp-Korstanje, J. A. and V. M. Stolk-Engelaar.** 1995. *Yersinia enterocolitica* infection in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **14**:771-775.

83. **Hoover, D. L., A. M. Friedlander, L. C. Rogers, I. K. Yoon, R. L. Warren, and A. S. Cross.** 1994. Anthrax edema toxin differentially regulates lipopolysaccharide-induced monocyte production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by increasing intracellular cyclic AMP. *Infect. Immun.* **62**:4432-4439.
84. **Hubbert, W. T., C. W. Petenyi, L. A. Glasgow, C. T. Uyeda, and S. A. Creighton.** 1971. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in the United States. Speticema, appendicitis, and mesenteric lymphadenitis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **20**:679-684.
85. **Ibelgrauf, H.** 1995. *Dictionary of Cytokines*. 1 Auflage. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York.
86. **Ibelgrauf, H.** 1999. COPE - Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia. Version 3. 1 <http://www.copewithcytokines.de/>.
87. **Ireton, K., B. Payrastra, H. Chap, W. Ogawa, H. Sakaue, M. Kasuga, and P. Cossart.** 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* **274**:780-782.
88. **Iriarte, M. and G. R. Cornelis.** 1995. MyfF, an element of the network regulating the synthesis of fibrillae in *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **177**:738-744.
89. **Iriarte, M., J. C. Vanooteghem, I. Delor, R. Diaz, S. Knutton, and G. R. Cornelis.** 1993. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **9**:507-520.
90. **Isberg, R. R.** 1989. Mammalian cell adhesion functions and cellular penetration of enteropathogenic *Yersinia* species. *Mol. Microbiol.* **3**:1449-1453.
91. **Isberg, R. R. and J. M. Leong.** 1990. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* **60**:861-871.

92. **Ishikawa, Y., N. Mukaida, K. Kuno, N. Rice, S. Okamoto, and K. Matsushima.** 1995. Establishment of lipopolysaccharide-dependent nuclear factor kappa B activation in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* **270**:4158-4164.
93. **Jacobi, C. A., A. Roggenkamp, A. Rakin, R. Zumbihl, L. Leitritz, and J. Heesemann.** 1998. In vitro and in vivo expression studies of yopE from *Yersinia enterocolitica* using the gfp reporter gene. *Mol. Microbiol.* **30**:865-882.
94. **Johnston, B., A. R. Burns, M. Suematsu, T. B. Issekutz, R. C. Woodman, and P. Kubes.** 1999. Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1. *J. Clin. Invest* **103**:1269-1276.
95. **Jordan, N. J., G. Kolios, S. E. Abbot, M. A. Sinai, D. A. Thompson, K. Petraki, and J. Westwick.** 1999. Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells. *J. Clin. Invest* **104**:1061-1069.
96. **Jung, H. C., L. Eckmann, S. K. Yang, A. Panja, J. Fierer, W. E. Morzycka, and M. F. Kagnoff.** 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* **95**:55-65.
97. **Jung, H. C., J. M. Kim, I. S. Song, and C. Y. Kim.** 1997. Helicobacter pylori induces an array of pro-inflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: quantification of mRNA for interleukin- 8, -1 alpha/beta, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1 and tumour necrosis factor-alpha. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **12**:473-480.
98. **Kagnoff, M. F. and L. Eckmann.** 1997. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J. Clin. Invest.* **100**:6-10.
99. **Kaneko, K., K. Uehara, and M. Ogawa.** 1991. Uptake of killed *Yersinia enterocolitica* cells by epithelial cells in the Peyer's patches of mice. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **12**:156-158.
100. **Kimura, T., T. Yamamoto, K. Ota, M. Shoji, M. Inoue, K. Sato, M. Ohta, T. Funyu, and K. Yoshinaga.** 1993. Central effects of interleukin-1 on blood pres-

- sure, thermogenesis, and the release of vasopressin, ACTH, and atrial natriuretic peptide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **689**:330-345.
101. **Koch, A. E., P. J. Polverini, S. L. Kunkel, L. A. Harlow, L. A. DiPietro, V. M. Elner, S. G. Elner, and R. M. Strieter.** 1992. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* **258**:1798-1801.
 102. **Kopp, E. B. and S. Ghosh.** 1995. NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv. Immunol.* **58:1-27**:1-27.
 103. **Korholz, D., S. Gerdau, J. Enczmann, N. Zessack, and S. Burdach.** 1992. Interleukin 6-induced differentiation of a human B cell line into IgM-secreting plasma cells is mediated by c-fos. *Eur. J. Immunol.* **22**:607-610.
 104. **Kraehenbuhl, J. P. and M. R. Neutra.** 1992. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev.* **72**:853-879.
 105. **Kuby, J.** 1994. *Immunology*. 2 Auflage. W.H. Freeman and Company.
 106. **Kulics, J., A. Circolo, R. C. Strunk, and H. R. Colten.** 1994. Regulation of synthesis of complement protein C4 in human fibroblasts: cell- and gene-specific effects of cytokines and lipopolysaccharide. *Immunology* **82**:509-515.
 107. **Kuper, C. F., P. J. Koornstra, D. M. Hameleers, J. Biewenga, B. J. Spit, A. M. Duijvestijn, P. J. Breda Vriesman, and T. Sminia.** 1992. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* **13**:219-224.
 108. **Lahesmaa, R., M. Skurnik, M. Vaara, M. Leirisalo-Repo, M. Nissila, K. Granfors, and P. Toivanen.** 1991. Molecular mimicry between HLA B27 and Yersinia, Salmonella, Shigella and Klebsiella within the same region of HLA alpha 1-helix. *Clin. Exp. Immunol.* **86**:399-404.
 109. **Laroche, Y., B. M. Van, and G. Cornelis.** 1984. A restriction map of virulence plasmid pVYE439-80 from a serogroup 9 Yersinia enterocolitica strain. *Plasmid* **12**:67-70.

110. **Larrick, J. W. and S. C. Wright.** 1990. Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor-alpha. *FASEB J.* **4**:3215-3223.
111. **Lavon, I., I. Goldberg, S. Amit, L. Landsman, S. Jung, B. Z. Tsuberi, I. Barshack, J. Kopolovic, E. Galun, H. Bujard, and Y. Ben Neriah.** 2000. High susceptibility to bacterial infection, but no liver dysfunction, in mice compromised for hepatocyte NF-kappaB activation. *Nat. Med.* **6**:573-577.
112. **Leal-Berumen, I., D. P. Snider, C. Barajas-Lopez, and J. S. Marshall.** 1996. Cholera toxin increases IL-6 synthesis and decreases TNF-alpha production by rat peritoneal mast cells. *J. Immunol.* **156**:316-321.
113. **Lee, F., C. P. Chiu, J. Wideman, P. Hodgkin, S. Hudak, L. Troutt, T. Ng, C. Moulds, R. Coffman, and A. Zlotnik.** 1989. Interleukin-6. A multifunctional regulator of growth and differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **557**:215-28, discussion.
114. **Leonard, E. J. and T. Yoshimura.** 1990. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol. Today* **11**:97-101.
115. **Liu, Z. G., H. Hsu, D. V. Goeddel, and M. Karin.** 1996. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* **87**:565-576.
116. **Lopez-Larrea, C., S. Gonzalez, and J. Martinez-Borra.** 1998. The role of HLA-B27 polymorphism and molecular mimicry in spondylarthropathy. *Mol. Med. Today* **4**:540-549.
117. **Luster, A. D.** 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* **338**:436-445.
118. **MacDonald, T. T.** 1999. Effector and regulatory lymphoid cells and cytokines in mucosal sites. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **236**:113-135.
119. **Marienfeld, R., M. Neumann, S. Chuvpilo, C. Escher, B. Kneitz, A. Avots, A. Schimpl, and E. Serfling.** 1997. Cyclosporin A interferes with the inducible

- degradation of NF-kappa B inhibitors, but not with the processing of p105/NF-kappa B1 in T cells. *Eur. J. Immunol.* **27**:1601-1609.
120. **Marks, M. I., C. H. Pai, L. Lafleur, L. Lackman, and O. Hammerberg.** 1980. *Yersinia enterocolitica* gastroenteritis: a prospective study of clinical, bacteriologic, and epidemiologic features. *J. Pediatr.* **96**:26-31.
121. **Marshall, G. D., Jr., S. K. Agarwal, C. Lloyd, L. Cohen, E. M. Henninger, and G. J. Morris.** 1998. Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain Behav. Immun.* **12**:297-307.
122. **Martin, T., P. M. Cardarelli, G. C. Parry, K. A. Felts, and R. R. Cobb.** 1997. Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1. *Eur. J. Immunol.* **27**:1091-1097.
123. **Matsusaka, T., K. Fujikawa, Y. Nishio, N. Mukaida, K. Matsushima, T. Kishimoto, and S. Akira.** 1993. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:10193-10197.
124. **May, M. J. and S. Ghosh.** 1998. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol. Today* **19**:80-88.
125. **McCormick, B. A., S. P. Colgan, A. C. Delp, S. I. Miller, and J. L. Madara.** 1993. *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J. Cell Biol.* **123**:895-907.
126. **Metcalf, D.** 1986. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* **67**:257-267.
127. **Meyer, S., N. G. Kohler, and A. Joly.** 1997. Cyclosporine A is an uncompetitive inhibitor of proteasome activity and prevents NF-kappaB activation. *FEBS Lett.* **413**:354-358.

128. **Middleton, J., S. Neil, J. Wintle, I. Clark-Lewis, H. Moore, C. Lam, M. Auer, E. Hub, and A. Rot.** 1997. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* **91**:385-395.
129. **Miller, V. L. and S. Falkow.** 1988. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.* **56**:1242-1248.
130. **Mills, S. D., A. Boland, M. P. Sory, S. P. van-der, C. Kerbouch, B. B. Finlay, and G. R. Cornelis.** 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.
131. **Monack, D. M., J. Mecsas, D. Bouley, and S. Falkow.** 1998. *Yersinia*-induced apoptosis in vivo aids in the establishment of a systemic infection of mice. *J. Exp. Med.* **188**:2127-2137.
132. **Monack, D. M., J. Mecsas, N. Ghori, and S. Falkow.** 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.
133. **Mukaida, N., Y. Mahe, and K. Matsushima.** 1990. Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* **265**:21128-21133.
134. **Mukaida, N., S. Okamoto, Y. Ishikawa, and K. Matsushima.** 1994. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* **56**:554-558.
135. **Munzenmaier, A., C. Lange, E. Glocker, A. Covacci, A. Moran, S. Bereswill, P. A. Baeuerle, M. Kist, and H. L. Pahl.** 1997. A secreted/shed product of *Helicobacter pylori* activates transcription factor nuclear factor-kappa B. *J. Immunol.* **159**:6140-6147.

136. **Neutra, M. R. and J. P. Kraehenbuhl.** 1993. The role of transepithelial transport by M cells in microbial invasion and host defense. *J. Cell Sci. Suppl* **17**:209-215.
137. **Neutra, M. R., E. Pringault, and J. P. Kraehenbuhl.** 1996. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **14**:275-300:275-300.
138. **Niedergang, F. and J. P. Kraehenbuhl.** 2000. Much ado about M cells. *Trends Cell Biol.* **10**:137-141.
139. **Orth, K., L. E. Palmer, Z. Q. Bao, S. Stewart, A. E. Rudolph, J. B. Bliska, and J. E. Dixon.** 1999. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector. *Science* **285**:1920-1923.
140. **Paff, J. R., D. A. Triplett, and T. N. Saari.** 1976. Clinical and laboratory aspects of Yersinia pseudotuberculosis infections, with a report of two cases. *Am. J. Clin. Pathol.* **66**:101-110.
141. **Pahl, H. L.** 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**:6853-6866.
142. **Pai, C. H. and V. Mors.** 1978. Production of enterotoxin by Yersinia enterocolitica. *Infect. Immun.* **19**:908-911.
143. **Pai, C. H., V. Mors, and T. A. Seemayer.** 1980. Experimental Yersinia enterocolitica enteritis in rabbits. *Infect. Immun.* **28**:238-244.
144. **Pepe, J. C. and V. L. Miller.** 1993. The biological role of invasin during a Yersinia enterocolitica infection. *Infect. Agents Dis.* **2**:236-241.
145. **Pepe, J. C. and V. L. Miller.** 1993. Yersinia enterocolitica invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**:6473-6477.
146. **Pepe, J. C., M. R. Wachtel, E. Wagar, and V. L. Miller.** 1995. Pathogenesis of defined invasion mutants of Yersinia enterocolitica in a BALB/c mouse model of infection. *Infect. Immun.* **63**:4837-4848.

147. **Perry, M. and A. Whyte.** 1998. Immunology of the tonsils. *Immunol. Today* **19**:414-421.
148. **Persson, C., N. Carballeira, H. Wolf-Watz, and M. Fallman.** 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.
149. **Probst, P., E. Hermann, K. H. Meyer zum Buschenfelde, and B. Fleischer.** 1993. Identification of the *Yersinia enterocolitica* urease beta subunit as a target antigen for human synovial T lymphocytes in reactive arthritis. *Infect. Immun.* **61**:4507-4509.
150. **Rabson, A. R., A. F. Hallett, and H. J. Koornhof.** 1975. Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. *J. Infect. Dis.* **131**:447-451.
151. **Rasmussen, S. J., L. Eckmann, A. J. Quayle, L. Shen, Y. X. Zhang, D. J. Anderson, J. Fierer, R. S. Stephens, and M. F. Kagnoff.** 1997. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J. Clin. Invest.* **99**:77-87.
152. **Rollins, B. J.** 1997. Chemokines. *Blood* **90**:909-928.
153. **Rosqvist, R., I. Bolin, and H. Wolf-Watz.** 1988. Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein. *Infect. Immun.* **56**:2139-2143.
154. **Rosqvist, R., A. Forsberg, M. Rimpilainen, T. Bergman, and H. Wolf-Watz.** 1990. The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol. Microbiol.* **4**:657-667.
155. **Rosqvist, R., A. Forsberg, and H. Wolf-Watz.** 1991. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect. Immun.* **59**:4562-4569.

156. **Rosqvist, R. and H. Wolf-Watz.** 1986. Virulence plasmid-associated HeLa cell induced cytotoxicity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microb. Pathog.* **1**:229-240.
157. **Rot, A.** 1991. Chemotactic potency of recombinant human neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) for polymorphonuclear leukocytes of different species. *Cytokine* **3**:21-27.
158. **Rot, A.** 1993. Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism. *Eur. J. Immunol.* **23**:303-306.
159. **Ruckdeschel, K., S. Harb, A. Roggenkamp, M. Hornef, R. Zumbihl, S. Kohler, J. Heesemann, and B. Rouot.** 1998. *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF- κ B: 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.
160. **Ruckdeschel, K., A. Roggenkamp, V. Lafont, P. Mangeat, J. Heesemann, and B. Rouot.** 1997. Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. *Infect. Immun.* **65**:4813-4821.
161. **Ruckdeschel, K., A. Roggenkamp, S. Schubert, and J. Heesemann.** 1996. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect. Immun.* **64**:724-733.
162. **Sansonetti, P. J., J. Arondel, J. M. Cavaillon, and M. Huerre.** 1995. Role of interleukin-1 in the pathogenesis of experimental shigellosis. *J. Clin. Invest* **96**:884-892.
163. **Savkovic, S. D., A. Koutsouris, and G. Hecht.** 1997. Activation of NF- κ B in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Am. J. Physiol.* **273**:C1160-C1167.
164. **Scheinman, R. I., P. C. Cogswell, A. K. Lofquist, and A. S. Baldwin, Jr.** 1995. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* **270**:283-286.

165. **Schesser, K., A. K. Spiik, J. M. Dukuzumuremyi, M. F. Neurath, S. Pettersson, and H. Wolf-Watz.** 1998. The yopJ locus is required for Yersinia-mediated inhibition of NF- κ B activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol. Microbiol.* **28**:1067-1079.
166. **Schulte, R. and I. B. Autenrieth.** 1998. Yersinia enterocolitica-induced interleukin-8 secretion by human intestinal epithelial cells depends on cell differentiation. *Infect. Immun.* **66**:1216-1224.
167. **Schulte, R., G. A. Grassl, S. Preger, S. Fessele, C. A. Jacobi, M. Schaller, P. J. Nelson, and I. B. Autenrieth.** 2000. Yersinia enterocolitica invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J.* **14**:1471-1484.
168. **Schulte, R., P. Wattiau, E. L. Hartland, B. R. Robins, and G. R. Cornelis.** 1996. Differential secretion of interleukin-8 by human epithelial cell lines upon entry of virulent or nonvirulent Yersinia enterocolitica. *Infect. Immun.* **64**:2106-2113.
169. **Schulte, R., R. Zumbihl, D. Kampik, A. Fauconnier, and I. B. Autenrieth.** 1998. Wortmannin blocks Yersinia invasin-triggered internalization, but not interleukin-8 production by epithelial cells. *Med. Microbiol. Immunol. Berl.* **187**:53-60.
170. **Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, M. von der, and F. Emmrich.** 1992. Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic yersiniae to various types of collagen. *Infect. Immun.* **60**:2153-2159.
171. **Sharma, S. A., M. K. Tummuru, G. G. Miller, and M. J. Blaser.** 1995. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to Helicobacter pylori stimulation in vitro. *Infect. Immun.* **63**:1681-1687.

172. **Shuster, D. E., J. Kehrli-ME, P. Rainard, and M. Paape.** 1997. Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **65**:3286-3292.
173. **Siebenlist, U., G. Franzoso, and K. Brown.** 1994. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**:405-455.
174. **Singh, S. and B. B. Aggarwal.** 1995. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *J. Biol. Chem.* **270**:24995-25000.
175. **Skurnik, M., Y. el Tahir, M. Saarinen, S. Jalkanen, and P. Toivanen.** 1994. YadA mediates specific binding of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* to human intestinal submucosa. *Infect. Immun.* **62**:1252-1261.
176. **Spiik, A. K., L. K. Meijer, A. Ridderstad, and S. Pettersson.** 1999. Interference of eukaryotic signalling pathways by the bacteria *Yersinia* outer protein YopJ. *Immunol. Lett.* **68**:199-203.
177. **Springer, T. A.** 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**:301-314.
178. **Stadnyk, A. W.** 1994. Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J.* **8**:1041-1047.
179. **Staugas, R. E., D. P. Harvey, A. Ferrante, M. Nandoskar, and A. C. Allison.** 1992. Induction of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) by *Pseudomonas aeruginosa* and exotoxin A-induced suppression of lymphoproliferation and TNF, lymphotoxin, gamma interferon, and IL-1 production in human leukocytes. *Infect. Immun.* **60**:3162-3168.
180. **Strieter, R. M., P. J. Polverini, S. L. Kunkel, D. A. Arenberg, M. D. Burdick, J. Kasper, J. Dzuiba, J. Van Damme, A. Walz, and D. Marriott.** 1995. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **270**:27348-27357.

181. **Svanborg, C., G. Godaly, and M. Hedlund.** 1999. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:99-105.
182. **Tak, P. P. and G. S. Firestein.** 2001. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest* **107**:7-11.
183. **Thanos, D. and T. Maniatis.** 1995. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* **80**:529-532.
184. **Van Antwerp, D. J., S. J. Martin, T. Kafri, D. R. Green, and I. M. Verma.** 1996. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* **274**:787-789.
185. **Van Antwerp, D. J., S. J. Martin, I. M. Verma, and D. R. Green.** 1998. Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B. *Trends. Cell Biol.* **8**:107-111.
186. **Wang, C. Y., M. W. Mayo, and A. S. Baldwin, Jr.** 1996. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* **274**:784-787.
187. **Warringa, R. A., L. Koenderman, P. T. Kok, J. Kreukniet, and P. L. Bruinzeel.** 1991. Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Blood* **77**:2694-2700.
188. **Weisbart, R. H., D. W. Golde, S. C. Clark, G. G. Wong, and J. C. Gasson.** 1985. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a neutrophil activator. *Nature* **314**:361-363.
189. **Wilson, M., R. Seymour, and B. Henderson.** 1998. Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infect. Immun.* **66**:2401-2409.
190. **Wright, S. C., P. Kumar, A. W. Tam, N. Shen, M. Varma, and J. W. Lar-rick.** 1992. Apoptosis and DNA fragmentation precede TNF-induced cytolysis in U937 cells. *J. Cell Biochem.* **48**:344-355.

191. **Wright, S. D., R. A. Ramos, A. Hermanowski-Vosatka, P. Rockwell, and P. A. Detmers.** 1991. Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *J. Exp. Med.* **173**:1281-1286.
192. **Yamamoto, Y. and R. B. Gaynor.** 2001. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappa B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest* **107**:135-142.
193. **Yamaoka, Y., M. Kita, T. Kodama, N. Sawai, and J. Imanishi.** 1996. Helicobacter pylori cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterology* **110**:1744-1752.
194. **Yasumoto, K., S. Okamoto, N. Mukaida, S. Murakami, M. Mai, and K. Matsushima.** 1992. Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF- κ B-like binding sites of the interleukin 8 gene. *J. Biol. Chem.* **267**: 22506-22511.
195. **Yin, M. J., Y. Yamamoto, and R. B. Gaynor.** 1998. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* **396**:77-80.
196. **Yoshida, S., M. Ono, T. Shono, H. Izumi, T. Ishibashi, H. Suzuki, and M. Kuwano.** 1997. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol. Cell Biol.* **17**:4015-4023.
197. **Zychlinsky, A., C. Fitting, J. M. Cavaillon, and P. J. Sansonetti.** 1994. Interleukin 1 is released by murine macrophages during apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *J. Clin. Invest* **94**:1328-1332.
198. **Zychlinsky, A., J. J. Perdomo, and P. J. Sansonetti.** 1994. Molecular and cellular mechanisms of tissue invasion by *Shigella flexneri*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **730**:197-208.

-
199. **Zychlinsky, A., M. C. Prevost, and P. J. Sansonetti.** 1992. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* **358**:167-169.

G Abkürzungen

A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Ail	attachement invasion locus
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
Ca	Calcium
CD	cluster of differentiation
CFU	colony forming units
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DMSO	Dimehtyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	Dithiothreitol
<i>E.c.</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calw serum
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde
HLA	human leukocyte antigen
IL	Interleukin
Inv	Invasin
IPTG	Isopropyl β -D –Thiogalactopyranosid
kb	Kilo-Basen

kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
mAK	monoklonaler Antikörper
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
MCP	Monozyten-chemotaktisches Protein
Mda	Mega-Dalton
Mg	Magnesium
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
Myf	mucoid <i>yersinia</i> factor
M-Zelle	membranöse Zelle
n.d.	nicht durchgeführt
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
p.i.	post infectionem
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pg	Pikogramm
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
PNPP	<i>p</i> -Nitrophenyl-Phosphat-Dinatrium
pYV	<i>Yersinia</i> -Virulenzplasmid
rcf	relative centrifugation force
rhIL-8	rekombinantes humanes Interleukin-8
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute Medium (Kulturmedium)
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SD	standard deviation
sec	Sekunde
spp.	Species
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	Units
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
v/v	volume / volume (Vol.-%)
w/v	weight per volume (Gewichts-%)
<i>Y.</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Y.e.</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Yad	Yersinia Adhäsın
Yop	Yersinia outer protein

Nukleoside

Adenosin	A	Guanosin	G
Thymin	T	Cytosin	C

Publikationen, die aus dieser Arbeit hervorgingen:

1. Schulte R, Zumbihl R, **Kampik D**, Fauconnier A, Autenrieth IB. 1998. Wortmannin blocks *Yersinia* invasin-triggered internalization, but not interleukin-8 production by epithelial cells. *Med Microbiol Immunol* 187(1):53-60.
2. **Kampik D**, R. Schulte, and I. B. Autenrieth. 2000. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in *Yersinia* infections. *Infect. Immun.* 68:2484-2492.

Kongressbeiträge, die aus dieser Arbeit hervorgingen:

1. Schulte R, Zumbihl R, **Kampik D**, Autenrieth IB. 1998. *Yersinia enterocolitica* Invasin triggered IL-8 secretion in epithelial cells.
Vortrag und Poster. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 1998.
2. **Kampik D**, Schulte R, Autenrieth IB. 1999. Cytokine gene expression in epithelial cells after *Yersinia enterocolitica* infection.
Vortrag und Poster. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Hannover, 1999.

H Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth für die Bereitstellung des Themas, für seine hervorragende Betreuung und die kritische Durchsicht der Manuskripte.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dr. Ralf Schulte, dem direkten Betreuer der Arbeit. Ohne seine ausgezeichnete Einweisung in die mikrobiologischen Arbeitstechniken, seine unzähligen Anregungen sowie seine ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft wäre die Dissertation nicht in dieser Form möglich gewesen.

Allen Kollegen im Max von Pettenkofer Institut danke ich für ihre gute Zusammenarbeit, die freundschaftliche Hilfe und das angenehme Arbeitsklima. Vor allem Nicole Bücheler und Sonja Preger trugen durch ihre Mitarbeit und ihr Fachwissen in der Zellkultur viel zum Gelingen dieser Arbeit bei. Ebenfalls herzlichen Dank an Guntram Grassl, Joachim Hein, Christoph Jacobi, Volkhard Kempf, Sigrid Klinke, Uwe Kramer, Annette Noll, Andreas Sing, Marc Waidmann und Silvia DiGenaro!

Meinen Eltern bin ich dankbar für die Unterstützung jeglicher Art, die weit über das Korrekturlesen des Manuskriptes hinausging.

I Lebenslauf

Name	Daniel Kampik
geboren	am 5.7.1973 in München ledig
Eltern	Ursula und Anselm Kampik
Geschwister	Felicitas Maunz und Theresa Kampik
Schulausbildung	
9/1984 – 10/1987	Gymnasium Pullach, München
10/1987 – 7/1993	Wirsberg-Gymnasium Würzburg
1993	Abitur in Würzburg
Zivildienst	
08/1993 – 10/1994	Zivildienst als Krankenpfleger an der Augenklinik Herzog Carl Theodor, München
Studium	
11/1994 – 11/2000	Studium der Humanmedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München
8/1996	Physikum
8/1997	1. Staatsexamen
3/2000	2. Staatsexamen
5/2001	3. Staatsexamen an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Praktisches Jahr	
4 – 8/2000	Centre Hospitalier Universitaire de Fort de France, Martinique, Frankreich
8 – 12/2000	Medizinische Klinik Innenstadt, Ludwig-Maximilians- Universität München
12/2000 – 4/2001	Universitäts-Augenklinik, Julius-Maximilians- Universität Würzburg
Arzt im Praktikum	
seit 8/2001	Arzt im Praktikum an der Universitäts-Augenklinik Würzburg

