

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische  
Mikrobiologie der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

**Der Einfluss von *Yersinia*-Effektoren auf  
podosomale Adhäsionsstrukturen primärer humaner  
Makrophagen**

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

vorgelegt von  
Aziz AWA  
aus Kabul  
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. M. Schleicher  
Prof. Dr. med. Th. Brocker

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

---

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

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2004

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
<b>2. STAND DER FORSCHUNG .....</b>	<b>6</b>
2.1 <i>Yersinia outer proteins</i> .....	6
2.2 Primäre Humanmakrophagen und Monozyten .....	8
2.3 Struktur und Funktion von Podosomen.....	11
2.4 Rho GTPasen und ihr Einfluss auf das Zytoskelett.....	15
<b>3. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
4.1 Zellgewinnung/Monozytenpräparation .....	20
4.2 Zellkultur .....	20
4.3 Bakterienstämme und Plasmide .....	21
4.4 Infektion .....	22
4.5 Aktinfärbung .....	23
4.6 Mikroskopie .....	23
<b>5. ERGEBNISSE .....</b>	<b>24</b>
5.1 Infektion von Makrophagen mit <i>WA-314 und WA-C</i> .....	24
5.2 Infektion von Makrophagen mit <i>WA-C(pYV-515)</i> .....	27
5.3 Infektion von Makrophagen mit <i>WA(pYLCR)</i> .....	28
5.4 Infektion von Makrophagen mit <i>WA-C(pYLCR+E)</i> und <i>WA-C(pYLCR+E<sub>R144A</sub>)</i> ....	30
5.5 Infektion von Makrophagen mit <i>WA-C(pYV08ΔE)</i> .....	33
<b>6. DISKUSSION .....</b>	<b>35</b>
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>37</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>38</b>
<b>9. DANKSAGUNG .....</b>	<b>44</b>
<b>10. LEBENS LAUF .....</b>	<b>45</b>

**Verzeichnis verwendeter Abkürzungen**

EZM	<u>extrazelluläre Matrix</u>
fMLP	<u>formyl-Methionyl Leucyl-Phenylalanin</u>
GAP	<i>GTPase activating protein</i> = <u>GTPase aktivierendes Protein</u>
GDI	<i>Guanin nucleotide dissociation inhibitor</i> = <u>Guanosin Nukleotid Dissoziations-Inhibitor</u>
GDP	<u>Guanin Diphosphat</u>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i> = <u>Guanosin Nukleotid Austausch-Faktor</u>
GST	<u>Gluthation-S-Transferase</u>
GTP	<u>Guanosin Triphosphat</u>
LPS	<u>Lipopolysaccharid</u>
N-WASP	<u>neuronales Wiskott Aldrich Syndrome Protein</u>
PIP <sub>2</sub>	<u>Phosphatidyl-inositol-bis phosphat</u>

## 1. Einleitung

Enteropathogene *Yersinien* (*Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*) gehören zur Gruppe der invasiven Mikroorganismen, die Enteritis, Lymphadenitis sowie extraintestinale Manifestationen wie Vaskulitis, Synovialitis und Erythema nodosum verursachen. Mit einem plasmidkodierten Protein-Typ III Sekretions-/Translokationssystem, „injizieren“ sie ihre Effektorproteine (*Yersinia outer proteins*; *Yops*) in die Wirtszelle. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, daß viele der Effektoren, die durch das Typ III Sekretions-/Translokationssystem sezerniert werden, hoch spezialisierte Proteine sind, die ganz bestimmte Signaltransduktionswege eukaryoter Zellen modulieren. Bisher sind sechs Effektoren bekannt, wovon mindestens vier bei der Umlagerung des Aktinzytoskeletts beteiligt sind (YopH, YpkA/YopO, YopT und YopE). Aktinumlagerungen spielen eine entscheidende Rolle sowohl bei der Zelladhäsion, Phagozytose und Chemotaxis als auch bei der Gentranskription und Enzymaktivitäten. Die derzeitige Vorstellung ist, daß insbesondere in phagozytären Zellen, wie neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, solche aktinabhängigen Funktionen durch die Yops gestört werden. Viele Zellen der Monozytenreihe, wie zum Beispiel primäre Humanmakrophagen sind in der Lage, dynamische Adhäsionsstrukturen, sogenannte Podosomen, zu bilden. Diese Strukturen spielen eine entscheidende Rolle im Migrations- und Invasionsverhalten der Makrophagen. Der Einfluß von Effektoren enteropathogener *Yersinien* auf Podosomen wurde bisher nur wenig untersucht und ist Gegenstand der vorliegenden Dissertation. Dabei wurde vornehmlich das Rho GTPase aktivierende Protein YopE und dessen Einfluß auf die Bildung, Umgestaltung und Zerstörung von Podosomen in primären humanen Makrophagen untersucht.

## 2. Stand der Forschung

### 2.1 *Yersinia outer proteins*

Zu den pathogenen Arten der Gattung *Yersinien* gehören *Y. pestis*, der die Pest verursacht, sowie *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*, Erreger Nahrungsmittel induzierter Enteritiden. Ihre gemeinsame Fähigkeit, im Wirt extrazellulär zu persistieren und sich in lymphatischen Geweben zu vermehren, beruht auf dem 70 Kilobasen großen Virulenzplasmid, pYV (= *Yersinia virulence plasmid*). Dieses Plasmid kodiert unter anderem i) das Protein Typ III Sekretions- und Translokationssystem, ii) ein Arsenal von mindestens sechs Effektorproteinen, die sogenannten *Yersinia outer proteins* (*Yops*), iii) Regulatorproteine für die Genexpression sowie die Yop-Sekretion und –translokation und iv) *Yersinia* Adhäsine, *YadA*, das die Anlagerung an Wirtszellen ermöglicht. Eine genaue Beschreibung des pYV-Plasmids mit ihren Regelmechanismen bietet die Übersichtsarbeit von Cornelis (Cornelis *et al.*, 1998).

Nach dem gegenwärtigen Modell erreichen enteropathogene *Yersinien* über kontaminierte Nahrungsmittel das Lumen des Intestinums. Das chromosomale Gen für das *outer membrane protein Invasin* wird verstärkt transkribiert bei gleichzeitiger Hemmung der Mehrzahl plasmidkodierter Gene. *Invasin* ist ein 95 kDa Protein, das spezifisch mit  $\beta$ 1-Integrinen von Zellen des Magen-Darm-Trakts, z.B. den genannten M-Zellen, interagiert. Die  $\beta$ 1-Ligation ist die Voraussetzung der Translokation der *Yersinien* durch die M-Zellen in die Submukosa zu den Peyer Plaques. Erst in dieser Nische kommt es zu einer Hochregulierung der pYV-Plasmid kodierten Gene, mit deren Hilfe *Yersinien* die natürliche zelluläre Immunabwehr des Wirts paralisieren und der Phagozytose durch Immunzellen entkommen können, um extrazellulär zu proliferieren (Abbildung 1). Diverse Mechanismen, unter anderem die Inhibierung der Produktion von Superoxidanionen und des Tumor Nekrose Faktors  $\alpha$ , werden den Yop-Effektoren zugeschrieben (Aepfelbacher, 1999).

Der Typ III Sekretionsapparat spielt dabei eine bedeutende Rolle, er ist für die Translokation der Yop-Effektoren in die Wirtszellen unabdingbar (Aepfelbacher *et al.*, 1999). Bisher sind sechs Effektorproteine mit verschiedenen Angriffspunkten und –mechanismen beschrieben worden, für die das Virulenzplasmid pYV kodiert: YopH, YopO (YpkA in *Y. pseudotuberculosis*), YopP (YopJ *Y. pseudotuberculosis*), YopE, YopM und YopT. Bereits der erste Kontakt von *Yersinien* mit Abwehrzellen induziert eine gerichtete Injektion dieser Effektoren in das Zytoplasma der Wirtszelle. Untersuchungen haben gezeigt, daß vier Effektoren, YopE, YopT, YopO/YpkA und YopH, auf das Aktinzytoskelettnetzwerk der Wirtszelle einwirken und bestimmte Signaltransduktionswege innerhalb der Zelle blockieren (Cornelis, 2000). Bis auf YopH, einer Tyrosinphosphatase, führen die Effektoren dies über eine Funktionsänderung der kleinen GTP bindenden Rho Proteine durch. YopH spielt eine Rolle bei der Resistenz gegen Phagozytose (Aepfelbacher *et al.*, 1999). Der Effekt von YopH beruht auf der Dephosphorylierung von Proteinen des fokalen Adhäsionskomplexes wie p130<sup>Cas</sup>, FAK und Paxilin. YopO/YpkA, eine Serin-Threonin-Kinase, wird durch Aktin aktiviert, bindet Rho GTPasen und soll durch diese Aktivitäten für die Phosphorylierung sowie Zerstörung von Aktin verantwortlich gemacht werden. (Juris *et al.*, 2000). YopT ist eine Cystein-Protease, die die C-terminale Isoprenoidgruppe von Rho GTPasen entfernt und dadurch diese Protease deaktiviert (Shao *et al.*, 2002; Shao *et al.*, 2003; Aepfelbacher *et al.*, 2003).

YopE wirkt als GTPase aktivierendes Protein (GAP) und damit als Inaktivator für Rho GTPasen. Es verhindert gemeinsam mit YopH die Phagozytose von pathogenen *Yersinien* (Cornelis, 1998). Bei Injektion von YopE in das Zytoplasma einer eukaryoten Zelle ist mindestens ein weiteres Yop, YopD, beteiligt (Cornelis, 1998). YopD ist ein membranärer Bestandteil des Typ III Sekretionssystems. In HeLa-Zellen eingebrachtes YopE führt zu einer drastischen Zellrundung und Ablösen der Zellen von der extrazellulären Matrix (EZM; Bliska, 2000). YopE hat Homologien zum Effektor ExoS von *Pseudomonas aeruginosa* und zum





natürliche Killerzellen (NK-Zellen), polymorphkernige Leukozyten und Makrophagen wirksam. Letztere sind mononukleäre Leukozyten und haben ihre Bedeutung vor allem in der Frühphase der Immunreaktion. Sie differenzieren sich aus hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark zu Monozyten, zirkulieren etwa 24 Stunden im Blutgefäßsystem und kommen danach in lymphatischen (Lymphknoten, Milz) genauso wie in extralymphatischen Organen (Magen-Darm-Trakt, Lunge, Gehirn) vor.

Um bei einer lokalen Infektion zum Ort des Geschehens zu gelangen, vermögen frei im Blut schwimmende Monozyten, durch Adhäsion an aktivierte Endothelzellen und Transmigration, das Gefäßsystem zu verlassen (Habilitationsschrift S. Linder, 2002). Chemokine und andere körpereigene Zytokine können die Migration beeinflussen, aber auch bakterielle Produkte wie formyl-Methionyl Leucyl-Phenylalanin (fMLP) oder Lipopolysaccharid (LPS). Makrophagen erfüllen in Entzündungsherden zweierlei Funktionen, zum einen als professionelle Phagozyten, die Mikroorganismen internalisieren, zum anderen als antigen-präsentierende Zellen, die anderen Zellarten der Immunabwehr, wie T-Lymphozyten, prozessiertes fremdes Material (=Antigene) auf Oberflächenrezeptoren (Proteine des *Major Histocompatibility Complex II*, sogenannte MHC Klasse II-Moleküle) darbieten. Des weiteren spielen Makrophagen die Rolle der „hauseigenen“ Müllabfuhr, die auch apoptotische körpereigene Zellen oder Zellfragmente phagozytiert und verdaut.

Diese Vorgänge der Polarisierung, Adhäsion, Migration und Phagozytose setzen eine hohe Dynamik der Zellform voraus, die auf einem „komplexen und streng regulierten Umbau des Zytoskeletts, insbesondere der Aktin-Filamente“<sup>1</sup> beruht. In ruhenden nicht adhärenen Blutmonozyten sind Aktin und Aktin-assoziierte Proteine wie Vinculin, Myosin und  $\alpha$ -Actinin homogen über die Zelle verteilt. Verläßt die Zelle bei einer Infektion das Gefäßsystem, um an den Entzündungsherd zu gelangen, werden durch ständige fein regulierte

---

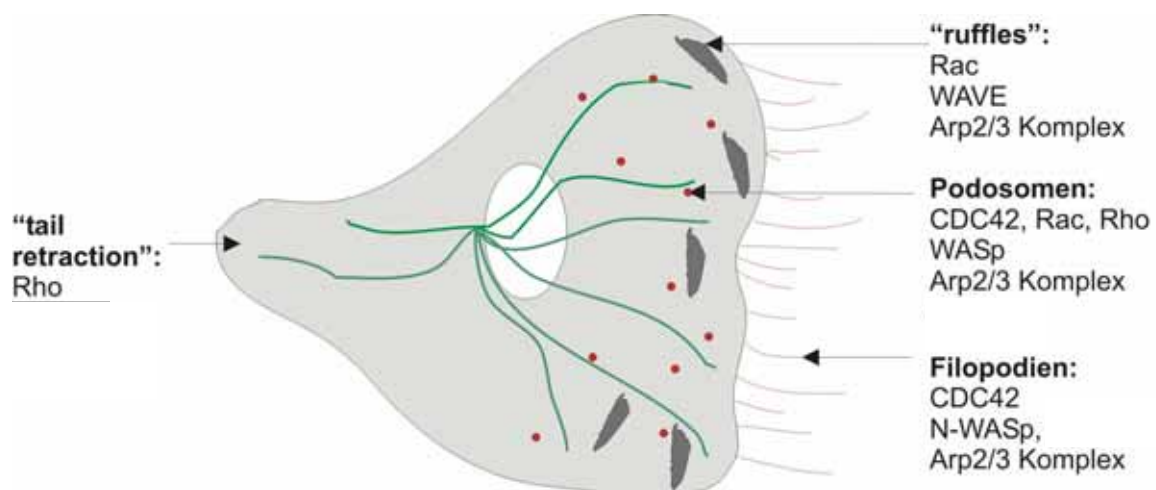
<sup>1</sup> Originalzitat aus der Habilitationsschrift von S. Linder, 2002, Seite 8

Umbauvorgänge der zellulären Zytoarchitektur erst Polarisation, Adhäsion, Migration und Phagozytose ermöglicht. Die für die Vorgänge erforderlichen Strukturen werden im folgenden im einzelnen beschrieben (siehe auch Abbildung 2).

Filopodien werden als Chemosensoren wandernder Zellen betrachtet und spielen daher eine große Rolle bei der Ausrichtung von Zellen. Diese auch als „*microspikes*“ bekannten fadenförmigen hochdynamischen Zellausläufer sind 0,2-10  $\mu\text{m}$  lang und aus unipolaren Bündeln von Aktinfilamenten aufgebaut. An ihren Spitzen werden sie durch assoziierte Proteine vernetzt.

Nach Endothelzell- bzw. Oberflächenkontakt bilden Zellen auf ihrer Ventralseite punktförmige F-Aktinreiche Adhäsionsstrukturen, sogenannte Podosomen, auf die weiter unten näher eingegangen wird (siehe Kapitel 2.3).

Unmittelbar nach der Adhäsion formieren die Zellen bei der Ausbreitung an ihrem Vorderende aktinreiche planare Ausstülpungen unterschiedlicher Größe, die je nach Lokalisation Lamellipodien (Vorderfront) oder „*ruffles*“ (alle übrigen Lokalisationen) genannt werden. Die Bedeutung dieser Strukturen liegt in der Migration und Phagozytose von Mikroorganismen und deren Bestandteilen.



**Abbildung 2: Beitrag Aktin-regulatorischer Moleküle zur Bildung von Aktin-Strukturen und zur Zellpolarisation am schematischen Beispiel eines polarisierten Monozyten (Grau).**

*Rechte Seite* (Vorderende der Zelle): Durch Ausstülpung von Lamellipodien (dunkelgraue Halbmonde) und durch Lösung Integrin-vermittelter Kontakte am Hinterende bewegt sich die Zelle fort. Entstehung von Lamellipodien wird durch Rac-WAVE-Arp2/3 Komplex induzierte Aktin-Polymerisation vermittelt.

Der Signalweg CDC42-WASP-Arp2/3 induziert den Aktin-Kern-Komplex podosomal Adhäsionen (rote Punkte). Mikrotubuli (grüne Linien) sind über Linkermoleküle an der Bildung dieser Strukturen beteiligt.

Regulation von Filopodien (rote Linien außerhalb der Zelle) erfolgt durch CDC42-N-WASP-Arp2/3 Komplex, andere Strukturen werden ebenfalls diskutiert.

*Linke Seite* (Hinterende): Lösung der rückwärtigen Kontakte und Zellkontraktion durch Rho und seinen Effektor. Modifiziert nach und mit freundlicher Genehmigung von S. Linder (aus Habilitationsschrift S. Linder, 2002, Seite 67).

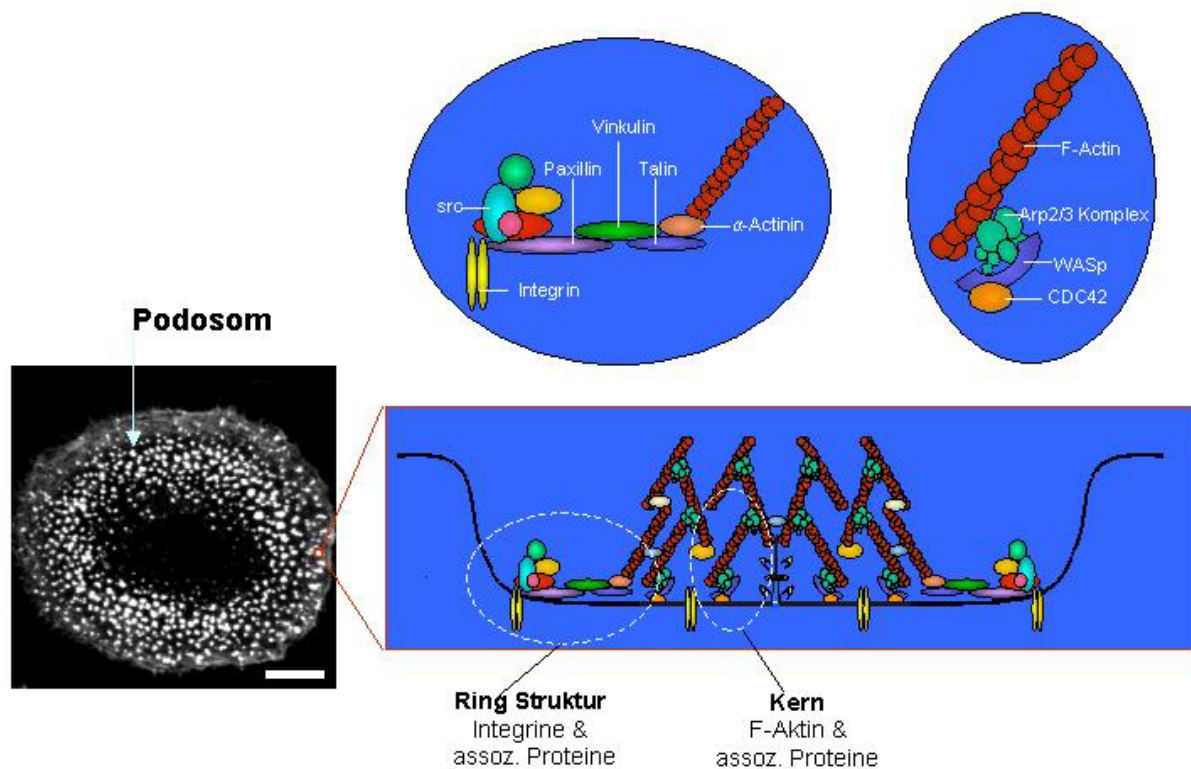
### 2.3 Struktur und Funktion von Podosomen

Die markantesten Strukturen des Aktinzytoskeletts von primären Humanmakrophagen sind die Podosomen, Ausstülpungen des Plasmalemmas mit einer Halbwertszeit von 2-12 min (siehe Abbildungen 3 und 4).

In virustransformierten Fibroblasten und malignen B-Zellen wurden diese aktinreichen Adhäsionsstrukturen erstmals Anfang der 80er Jahre entdeckt (Tarone *et al.*, 1985; Caligaris-Cappio *et al.*, 1986). Seitdem wurden sie in Zellen der Monozytenreihe wie Makrophagen, Osteoklasten und dendritischen Zellen (Marchisio *et al.*, 1984; Marchisio *et al.*, 1987; Zamboni-Zallone *et al.*, 1989) beschrieben. Auch in glatten Muskelzellen konnten sie erst kürzlich nachgewiesen werden (Gimona *et al.*, 2003).

Podosomen sind überwiegend in den flachen peripheren Bereichen der Zelle unter Aussparung des kuppelförmigen kernhaltigen Zentralteils lokalisiert. Sie zeichnen sich

charakteristischerweise durch folgende Merkmale aus: (a) sie bilden sich erst bei Zell-Substrat-Kontakt aus und befinden sich an der zum Substrat zugewandten Seite der Zelle (Linder *et al.*, 2003), (b) der Podosomenkern besteht aus kurzen Aktinfilamenten und aktinassozierten Proteinen, umgeben ist er von einem Proteinring aus Vinculin, Paxillin und Talin (Gavazzi *et al.*, 1989; Zambonin-Zallone *et al.*, 1989), (c) ein Podosom hat einen Durchmesser von ungefähr 0,5  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 3: Das Aktinzytoskelett eines primären humanen Makrophagen.**

*Linke Seite:* Die konfokalmikroskopische Aufnahme zeigt das mit Alexa 568 Phalloidin gefärbte Aktin-Zytoskelett eines primären humanen Makrophagen. Prominente Strukturen sind der subcortikale-Aktinring und zahlreiche punktartige Adhäsionen an der Ventralseite der Zelle, sogenannte Podosomen.

*Rechte Seite:* Schematischer Aufbau eines Podosoms. Man beachte die Aufteilung in eine aktinreiche Kernstruktur und einen umgebenden Ring aus Vinculin und Talin. Mit freundlicher Genehmigung von S. Linder (aus Linder *et al.*, 2003).

Diese Merkmale unterscheiden sie somit hinsichtlich des Aufbaus, der zellulären Verteilung und der Zusammensetzung klar von anderen Adhäsionsstrukturen, die beispielsweise im Fall von fokalen Adhäsionen keinen F-Aktinreichen Kern besitzen. Die Podosomen formieren sich aus bereits bestehenden Proteinen, eine *de novo* Synthese wie bei fokalen Adhäsionen ist

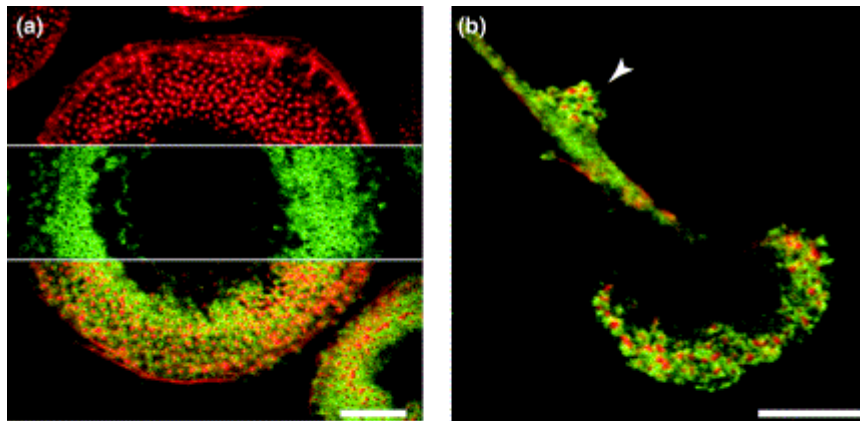
nicht erforderlich (Tarone *et al.*, 1985). Proteine, die die Aktinanlagerung kontrollieren, wie z.B. CDC42Hs, WASp und der Arp2/3 Komplex, sind zwar in Podosomen nachweisbar (Linder *et al.*, 1999; Linder *et al.*, 2000), aber nicht in fokalen Adhäsionen (Linder *et al.*, 2003). In Podosomen konnten Proteine nachgewiesen werden, die maßgeblich an der Aktinanlagerung beteiligt sind, zum Beispiel CDC42Hs, WASp und der Arp 2/3 Komplex (*Actin related protein complex 2/3*) (Linder *et al.*, 1999; Linder *et al.*, 2000). Des Weiteren sind zytoskelettale Komponenten und Regulatorproteine, Kinasen, Integrine und Rho GTPasen mit einer eindeutigen Zuordnung zum Kern oder zum Ring zu finden. *In vivo* Versuche mit Osteoklastenkulturen auf Dentinschichten sowie Monozyten- und natürliche Killerzellkulturen auf Endothelzellen sprechen dafür, daß die Podosomenbildung ein physiologischer Prozess ist (Linder *et al.*, 2003).

Drei Hauptfunktionen können Podosomen zugeschrieben werden: Invasion, Adhäsion und Migration von Zellen. Ihre Bedeutung für die Invasion von Zellen rührt aus der Beobachtung, daß sie Orte der Extravasation der Zytoplasmamembran (Tarone *et al.*, 1985) sind, an denen der Kontakt zum Substrat über Integrine erfolgt (Marchisio *et al.*, 1984; Gaidano *et al.*, 1990). Podosomen sind Bildungsstätten lokaler lytischer Aktivität und notwendig für die Degradation der extrazellulären Matrix. Dafür sprechen die Reduzierung der Podosomenbildung und verminderte EZM-Degradation bei Überexpression des Podosomenregulators N-WASP in transformierten Fibroblasten (Chen *et al.*, 1984), die Generierung zusätzlicher podosomenverwandter Aktinverdichtungen und eine erhöhte EZM-Degradation bei Überexpression von N-WASP sowie in Osteoklasten die Kolo-kalisation von EZM-degradierenden Matrixmetalloproteasen, denen Podosomen regulatorisch übergeordnet sind. Mehrere Podosomen können in transformierten Fibroblasten kranzartig aggregieren. Dabei sind sie entweder noch einzeln erkennbar und durch ein Aktinfasergeflecht zusammengehalten oder aber vollständig verschmolzen und bilden eine Aktin-Perlenschnur. Diese „Rosetten“ entsprechen in Osteoklasten der „*sealing zone*“, an der der erforderliche

Kontakt der Zellen zur Knochengrundsubstanz für die Knochenresorption gewährleistet ist. Sie umgibt die Resorptionslakune, in der lytische Enzyme und Radikale sezerniert werden, und ist unentbehrlich für den korrekten Knochenumbau.

Daß Podosomen in Integrinen angereichert sind und sich nach Substratkontakt auf der Ventralseite der Zellen bilden, unterstreicht die Rolle dieser hochdynamischen pseudopodienartigen Gebilde bei der Zelladhäsion. Übereinstimmend dazu zeigen podosomendefiziente Makrophagen von Patienten mit dem Wiskott Aldrich Syndrom einen Adhäsionsdefekt (Linder *et al.*, 1999). Die herausragende Funktion von Podosomen bei der Zellmigration spiegelt sich in ihrer inter- bzw. intrazellulären Lokalisation wider: während sie in ausgereiften dendritischen Zellen nicht vorkommen, findet man sie in wandernden dendritischen Zellen, innerhalb derer sie am Kopfteil vorzufinden sind (Linder *et al.*, 2003).

Konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen konnten zeigen, daß die kleine GTPase CDC42Hs und ihr Effektor Wiskott Aldrich Syndrom protein (WASp) spezifisch in Podosomen primärer Humanmakrophagen kolokalisieren (Linder *et al.*, 1999). Mikroinjektionsversuche mit konstitutiv aktivem Cdc42<sup>V12</sup> bzw. mit GST-Fusionen verschiedener Domänen des WAS Proteins wiesen darauf hin, daß Cdc42Hs und WASp Podosomen in humanen primären Makrophagen regulieren (Habilitationsschrift, S. Linder 2002). Des weiteren ist in Immunfluoreszenzversuchen nachgewiesen worden, daß im Kern von Podosomen zusammen mit F-Aktin und WASp auch der Aktin-nukleierende Arp 2/3 Komplex angereichert ist (Habilitationsschrift, S. Linder 2002). Mikrotubuli sind für die Ausbildung von Podosomen erforderlich, hingegen wirkt sich ein Podosomenzerfall nicht zwangsläufig nachteilig auf die Architektur des mikrotubulären Netzwerks aus (Linder *et al.*, 2000). WASp hat eine Sonderstellung im Hinblick auf die Podosomenanlagerung. Ohne WASp ist sie nicht möglich (Linder *et al.*, 2000).



**Abbildung 4: (a) Podosomestruktur in einem primären humanen Makrophagen.**

Konfokale lasermikroskopische Aufnahme eines ruhenden Makrophagen aus dem peripheren Blut, Ventralseite der Zelle, F-Aktin-Färbung (rot) mit Alexa-568 Phalloidin, Talin-Färbung (grün) mit entsprechenden Antikörpern, Overlay beider Signale (gelb). *Oberes Drittel*: nur F-Aktin-Färbung; *Mittleres Drittel*: nur Talin-Färbung; *Unteres Drittel*: Overlay beider Signale. Jeder podosomale F-Aktin-reiche Kern ist von einer Talin enthaltenden Ringstruktur umgeben (Foto von B. Schell und S. Linder). **(b) In wandernden Makrophagen werden Podosome an Membranprotrusionen rekrutiert.** Konfokale lasermikroskopische Aufnahme eines Peritonealmakrophagen, Ventralseite der Zelle, F-Aktin-Färbung (rot) mit Alexa-568 phalloidin, Vinculin-Färbung (grün) mit entsprechenden Antikörpern, Overlay beider Signale (gelb). Podosome werden an das Vorderende (unterer Teil) und an einer zellulären Ausstülpung (weißer Pfeilkopf) rekrutiert (Foto von A. Osiak und S. Linder). Weiße Balken entsprechen 10  $\mu\text{m}$ . Beide Fotos mit freundlicher Genehmigung von S. Linder (aus Linder *et al.*, 2003).

## 2.4 Rho GTPasen und ihr Einfluss auf das Zytoskelett

Rho Proteine bilden eine Subfamilie der Ras-Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine, die in nahezu jedem Aspekt der Aktinregulation involviert sind (Hall, 1998). Als Vermittler zwischen extrazellulären Signalen und der zellinneren Koordination des Aktinfilamentnetzwerks kommt ihnen eine zentrale Regulatorfunktion für die Aktin-abhängige Adhäsion, Migration und Phagozytose zu. Etwa 20 Mitglieder der Familie der Rho GTPasen konnten bisher beim Menschen identifiziert werden.

Rho GTPasen können Guanosinnukleotide binden und hydrolysieren und damit zwei Konformationzustände einnehmen. Diese sind ein aktiver GTP-gebundener und ein inaktiver GDP-gebundener Zustand. Ihre vertikale, d.h. übergeordnete Regulation erfolgt durch *Guanine Nucleotide Exchange Factors* (GEF), *GTPase aktivierende Proteine* (GAP) und *Guanin Nucleotide Dissociation Inhibitors* (GDI). (Van Aelst *et al.*, 1997).

Im Aktivierungsprozess wird GDP gegen GTP ausgetauscht, so daß die Rho GTPasen mit anderen Effektormolekülen interagieren, diese ebenfalls aktivieren und auf diese Weise die Aktinorganisation kontrollieren. Die Inaktivierung des Rho Proteins erfolgt durch hydrolytische Umwandlung von GTP zu GDP mittels einer intrinsischen GTPase, die durch die GAPs, um mehrere Zehnerpotenzen beschleunigt wird.

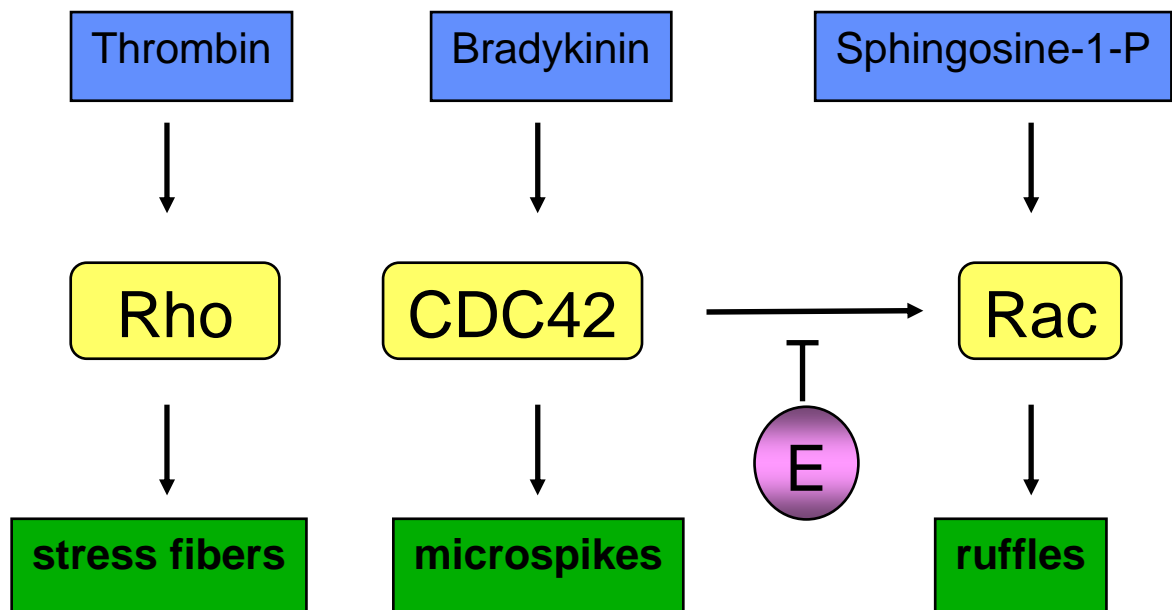
Rho Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Aktinzytoskeletts und sind auch an nukleären Signaltransduktionsprozessen, Gentranskription, Zellzyklusregulation wie Apoptose und Tumorprogression beteiligt (Aspenström *et al.*, 1999). Verschiedene Serin-/Threoninkinasen und die Rho-Kinase spielen als Effektoren beider Regulation des Aktinzytoskeletts eine bedeutende Rolle. Über die Rho-Kinase kommt es zu einer Myosin-Phosphorylierung und somit zu einer verstärkten Aktin-Myosin-Kontraktilität, die unter anderem für die Ausbildung von sogenannten Aktin-„Stressfasern“ essentiell ist. Über Phosphatidyl-inositol-bis-phosphat (PIP<sub>2</sub>) kommt es auch zu einer Interaktion von Aktin mit einer Reihe von aktinbindenden Proteinen, was vermuten läßt, daß über diesen Weg die Aktinpolymerisation kontrolliert werden könnte.

Die meisten Erkenntnisse liegen über RhoA/B, Rac1/2 und CDC42 vor. Dabei führt jedes Mitglied der Rho Familie Rho, Rac und Cdc42 zu einer einzigartigen Struktur aus Aktinfasern. Rho bildet Stressfasern aus, Rac Lamellipodien bzw. „*ruffles*“ und Cdc42 ist für die Bildung von Filopodien und „*microspikes*“ zuständig. Diese Rho GTPasen können zum einen unabhängig voneinander durch extrazelluläre Stimuli, die an Rezeptoren der Plasmamembran ankommen, aktiviert werden. Zum anderen sind sie Bausteine im verzweigten Gesamtnetzwerk der Aktinregulierung können sich gegenseitig aktivieren und inaktivieren.

Wie bereits oben erwähnt, konnte für die YopE homologe Domänen von SptP von *Salmonella typhimurium* und ExoS von *Pseudomonas aeruginosa* eine Rho GAP Aktivität nachgewiesen werden.



Für YopE konnte ebenfalls gezeigt werden, daß Rho, Rac und Cdc42 ein GAP darstellt. (Black and Bliska, 2000; Galan, 1999; Goehring *et al.*, 1999; Pawel-Rammingen *et al.*, 2000). Fu und Galan haben gezeigt, daß SptP, YopE und ExoS sogenannte Argininfingerstrukturen konserviert haben, die bei der GAP-Aktivität von Rho GTPasen von Bedeutung sind. Es wurde gezeigt, daß durch eine Mutation des Argininfingers im YopE die GAP-Aktivität *in vitro* komplett verloren geht und in Zellen und Mausinfektionsstudien weitere Funktionen des YopE beeinträchtigt (Pawel-Rammingen *et al.*, 2000; Black and Bliska, 2000; Andor *et al.*, 2001). In Zielzellen von *Yersinien* kann YopE Rho GTPase abhängige Signaltransduktionsprozesse mit einer hohen Spezifität beeinträchtigen (Andor *et al.*, 2001). *In vitro* Versuche legen den Schluß nahe, daß SptP als GAP für Rac und Cdc42 fungiert, während Rac, Cdc42 und Rho Zielproteine für ExoS und YopE sind. Es konnte gezeigt werden, daß YopE selektiv Rac-abhängige Aktinstrukturen in Endothelzellen moduliert (Andor *et al.*, 2001). Abbildung 5 veranschaulicht schematisch die Spezifität von zytoskelettalen Aktinstrukturen, ihre Induktion durch externe Stimuli und den Einfluss von YopE.



**Abbildung 5: Der Effekt von YopE auf extern stimulierte Rho GTPasen in humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC = Human umbilical yenous endothelial cells).**

*Obere Zeile* (blauer Hintergrund): Externer Stimulus, *Mittlere Zeile* (gelb): Effektor Rho GTPase, *Untere Reihe* (grün): Struktur des Aktinzytoskeletts. YopE (violette Kugel) inhibiert die indirekte Aktivierung von Rac durch CDC42, aber nicht die direkte Aktivierung von Rac, CDC42 oder Rho. Modifiziert nach und mit freundlicher Genehmigung von A. Andor (aus Andor *et al.*, 2001).

### 3. Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Bei einer Infektion mit pathogenen *Yersinia spp.* kommt es zum Kontakt der Bakterien mit Zellen des Immunsystems. Über das bakterielle Typ III Sekretionssystem werden Effektorproteine, sogenannte Yops, in die Zielzellen injiziert und beeinflussen dadurch spezifische Immunfunktionen.

Ziel der Arbeit war es, die Wirkung von *Yersinia*-Yops auf das Aktinzytoskelett humaner Makrophagen zu untersuchen. Besonderes Augenmerk galt dabei der Wirkung von YopE auf die aktinreichen Podosomen. Diese Strukturen sind für die Adhäsion und Migration der Makrophagen notwendig. Dazu mußten zuerst die geeigneten Infektionsbedingungen bzgl. Zeit, Bakterienzahl etc. gefunden werden. Für die anschließenden Infektionsreihen wurden ausgewählte Mutanten von *Yersinia enterocolitica* verwendet. Als Wirtszellen dienten aus Blutmonozyten differenzierte Makrophagen gesunder menschlicher Spender.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Zellgewinnung/Monozytenpräparation

Von gesunden Spendern wurde 50 ml heparinisiertes Blut entnommen. In zwei Reinigungsschritten wurden primäre humane Monozyten isoliert: 1) Abtrennung der mononukleären Zellen und 2) Anreicherung der Monozyten. Zunächst wurden in einem Ficoll-Gradienten (Ficoll Separating Solution, Biochrom KG) die zellulären Blutbestandteile ihrer Dichte nach getrennt. Dabei sammelten sich die mononukleären Zellen in einer mit dem Auge sichtbaren gelblich-weißen Phase an. Diese Schicht wurde entnommen und anschließend zur weiteren Aufreinigung mit Magnetkügelchen inkubiert, die mit dem monoklonalen humanen anti-CD14-Antikörper konjugiert waren (Miltenyi Biotech GmbH). Zellen, die CD14 auf ihrer Oberfläche exprimiert haben (CD14<sup>+</sup>), wie z.B. Monozyten, werden spezifisch auf diese Weise markiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine *MiniMacs*-Säule (Miltenyi Biotech GmbH) pipettiert, die in einem Magneten eingespannt war. Die mit den CD14-Magnetkügelchen markierten Monzyten wurden zurückgehalten, wohingegen nichtmarkierte Zellen durch die Säule fließen konnten. In drei Waschsritten wurden die gewonnenen Monozyten von den Magnetkügelchen getrennt, das Eluat in einer Neubauer Zählkammer gezählt und auf 144 mm<sup>2</sup> große Deckgläschen aus Glas ausgesät (200.000 Zellen pro Deckgläschen).

### 4.2 Zellkultur

Im Kulturmedium RPMI 1640 mit 20 %igem autologen Serum (PAA Laboratories) überleben Monozyten, wenn sie innerhalb von wenigen Tagen in Makrophagen differenzieren. Sie wurden in Inkubatoren bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit in RPMI-Medium mit 20 %igem autologen Serum gezüchtet. Im Lichtmikroskop wurde beobachtet, wie sie nach 5-7 Tagen die Morphologie von Makrophagen annehmen. Kurz nach dem Präparationsvorgang

sind die Zellen noch klein (5-10  $\mu\text{m}$ ) und unregelmäßig geformt. Podosomen, sichtbar z.B. nach Aktinfärbung, bilden sich etwa 4-6 Stunden nach dem Aussäen und sind zunächst gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt. Ausdifferenzierte Makrophagen haben eine Größe von ca. 30-50  $\mu\text{m}$  und ein radiärsymmetrisches Aussehen. Hier ist das Zentrum der Zelle von Podosomen ausgespart, während sich in der Peripherie reichlich Podosomen anlagern. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt. Die Ausgangspopulation der isolierten Monozyten ist sehr heterogen, was sich v.a. in den ersten Tagen an der unterschiedlichen Größe und dem uneinheitlichen Reifungsgrad individueller Zellen zeigt. Die in dieser Arbeit erwähnten Infektionsversuche wurden alle mit 5-7 Tage alten Makrophagen durchgeführt.

### 4.3 Bakterienstämme und Plasmide

Als Wildtyp *WAP* wurde *Y. enterocolitica* Serotyp 08 mit dem Virulenzplasmid pYV08 verwendet. Durch Entfernen des Plasmids wurde der *WA-C* Stamm gewonnen, der weder das plasmidkodierte *Yersinia* Adhäsın *YadA* noch das Sekretionsapparat oder Effektorproteine besitzt. *WA(pYLCR)* ist das Ergebnis eines Ko-Transfers von zwei Abschnitten des Virulenzplasmids pYV08, und zwar einem Abschnitt, der die für die Sekretion und Translokation erforderlichen Gene enthält (*yLCR*), und einem Abschnitt, der *YadA* im Vektor pSUP102 beinhaltet, in den plasmidfreien Stamm *WA-C*. Die Mutante *WA-C(pYLCR+E)* unterscheidet sich von *WA(pYLCR)* durch das zusätzliche Plasmid pLAF, das für YopE und sein Chaperon SycE kodiert. Dadurch erlaubt es eine isolierte Translokation und Betrachtung der Effekte von YopE auf das Aktinzytoskelett humaner Monozyten. Sämtliche dieser und andere vorliegenden Arbeiten benutzten Stämme können der nachstehenden Tabelle (Tabelle 1) entnommen werden.

**Tabelle1: Verwendete *Yersinia enterocolitica*- Stämme**

Stamm und Plasmid	Genotyp/Phänotyp	Antibiotikaresistenz	Referenz
<i>WA-314</i>	Serotyp 08; klinisches Isolat mit dem Virulenzplasmid pYV08	Nalidixinsäure	Heesemann <i>et al.</i> (1986)
<i>WA-C</i>	Plasmidbereinigtes Derivat von <i>WA-314</i>	Nalidixinsäure	Ruckdeschel <i>et al.</i> (1996)
<i>WA(pYLCR)</i>	Mutante mit der lcr-Region und YadA auf dem Vektor pSUP102, kann keine Yops produzieren	Nalidixinsäure, Chloramphenicol	Andor <i>et al.</i> (2001)
<i>WA(pYLCR+E)</i>	<i>WA(pYLCR)</i> mit pLAF-E ergänzt, das für YopE und SycE kodiert	Nalidixinsäure, Chloramphenicol, Tetrazyklin	Andor <i>et al.</i> (2001)
<i>WA(pYLCR+E<sub>R144A</sub>)</i>	<i>WA(pYLCR)</i> mit pLAF-E <sub>R144A</sub> ergänzt, das für YopE <sub>R144A</sub> und SycE kodiert	Chloramphenicol, Tetrazyklin	Andor <i>et al.</i> (2001)
<i>WA-C(pYV-515)</i>	Mutante, die keine Yops sezernieren kann; Tn5-Insertionsinaktivierung von lcrD	Nalidixinsäure, Kanamycin	Ruckdeschel <i>et al.</i> (1996)
<i>WA-C(pYV08ΔE)</i>	Mutante, die durch eine TnMax-Insertionsinaktivierung des YopE-Gens kein YopE produzieren kann	Nalidixinsäure, Chloramphenicol, Tetrazyklin	Zumbihl <i>et al.</i> (1999)

#### 4.4 Infektion

*Yersinien* wurden über Nacht in ein Luria-Bertani (LB) Medium bei 27°C unter Antibiotikaselektion angezüchtet. Diese Übernachtskultur wurde in einer 1:10 Verdünnung in LB-Medium für 60 min bei 37°C inkubiert, um die Yop-Produktion zu induzieren. Nach dem Zentrifugieren wurde zur Bestimmung der Bakteriendichte die Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm (OD<sub>600</sub>) gemessen und auf OD = 0,36 eingestellt. Erfahrungswerte haben ergeben, daß eine OD von 0,36 einer M.O.I. (*Multiplicity of infection* = Bakterienzahl pro eukaryoter Zelle) von 50 entspricht.

Eine Stunde vor der Infektion wurde das Medium durch ein vorgewärmtes RPMI-Medium ohne Serum- und Antibiotikazusatz ersetzt. Um die *Yersinien* gleichmäßig auf die Zellen zu geben, ohne dabei die Zellen zu stimulieren oder sie gar von den Deckgläschen zu lösen, wurden die *Yersinien* zunächst vorsichtig an den Rand der Wells, in denen sich die Deckgläschen befanden, pipettiert und mehrfach resuspendiert. Um die *Yersinien* homogen zu verteilen und ihre Adhärenz an die Zellen zu bewirken wurde ein Zentrifugationsschritt durchgeführt (3 min bei 800U/min und 4°C ohne Bremse). Mit dem Inkubieren der

Deckgläschen bei 37°C (Zeitpunkt 0 min) begann die Zeiterfassung in der Infektionsreihe. Zu den Zeitpunkten 30, 60, 90 und 120 min wurden die Infektionsreaktionen mit 3,7%igem Formaldehyd gestoppt und das zelluläre F-Aktin gefärbt.

#### **4.5 Aktinfärbung**

Die infizierten Makrophagen wurden etwa 10 min in 3,7 %igem Formaldehyd fixiert, anschließend zur Permeabilisierung 5 min in 1 % TRITON-X100 in PBS gegeben und luftgetrocknet. Die 20-minütige Färbung erfolgte mit Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin (bindet spezifisch an F-Aktin) in einer Verdünnung von 1:200 in PBS in einer feuchten Kammer. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Deckgläschen auf zuvor gereinigte Objektträger gelegt, auf die vorher 3 µl Mowiol getropft worden war. Das darin enthaltene p-Phenylendiamin verhinderte das schnelle Abblassen der Präparate bei wiederholter Konfokalmikroskopie durch energiereiches Licht. Die Ränder der Deckgläschen wurden mit handelsüblichem Nagellack versiegelt.

#### **4.6 Mikroskopie**

Die Infektionsversuche wurden mehrfach reproduziert. In jedem Präparat wurden nach einer Schnellsichtung eine zufällig ausgewählte Zahl von 160 Zellen ausgezählt und das Verhältnis der podosomenhaltigen zu den podosomenfreien Zellen bestimmt. So waren für jeden Zeitpunkt und jeden verwendeten Stamm Daten aus drei mal 160 ausgezählten Zellen zur statistischen Bearbeitung vorhanden. Die Präparate wurden in einem Leitz DM Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Neben der Anzahl der Podosomen wurde noch die Gesamtmorphologie der Zelle beurteilt. Bilder wurden digital mit einer angeschlossenen Spot Kamera (Visitron Systems) aufgezeichnet.

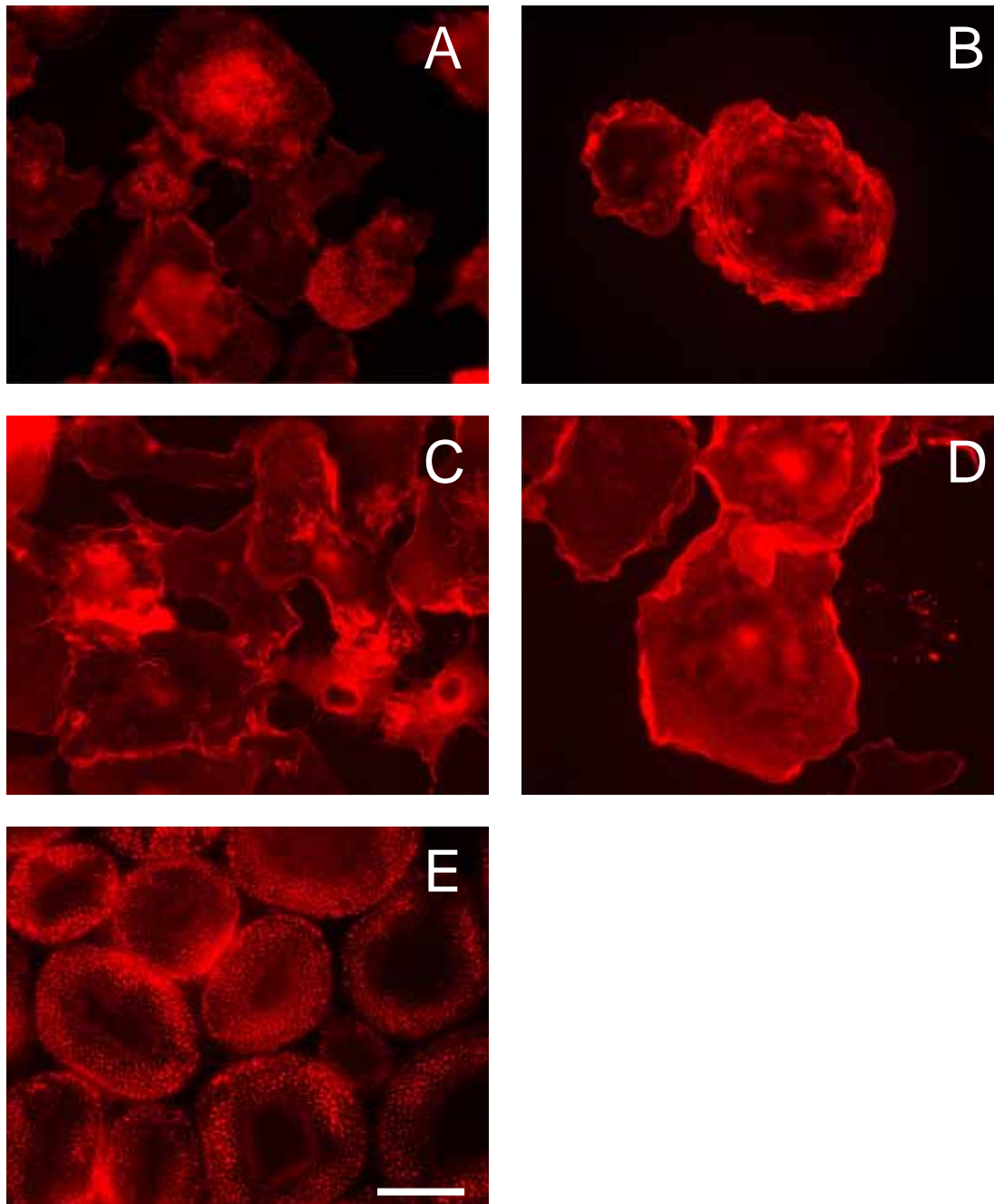
## 5. Ergebnisse

Bestimmte Zellen der menschlichen Monozyten-/Makrophagenreihe, J774-Mausmakrophagen, Mausperitonealmakrophagen und Osteoklasten bilden Podosomen aus. (Marchisio *et al.*, 1984; Marchisio *et al.*, 1987; Zambonin-Zallone *et al.*, 1989; Linder *et al.*, 2003). Diese hochdynamischen Adhäsionsstrukturen, sichtbar gemacht durch Färbung der Zellen z.B. für F-Aktin, bleiben über Wochen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. In menschlichen Makrophagen sind Podosomen 5-7 Tage nach dem Aussäen der Blutmonozyten am deutlichsten. In diesem Zeitfenster wurden auch sämtliche Infektionsversuche durchgeführt, um gleiche Ausgangsbedingungen und somit Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Unbehandelte Zellen (meist als Kontrollen verwendet) waren ebenfalls 5-7 Tage alte Makrophagen. Ein Infektionsansatz bestand aus unbehandelten Kontrollmakrophagen sowie einer Infektionsreihe mit einem bzw. zwei ausgewählten *Yersinien*-Mutanten (*WA-314*, *WA-C*, *WA(pYLCR)*, *WA(pYLCR+E)*, *WA(pYLCR+E<sub>R1444A</sub>)*, *WA-C(pYV-515)* und *WA-C(pYV08ΔE)*) zu verschiedenen Zeitpunkten (z.B. 30, 60, 90 und 120 min).

### 5.1 Infektion von Makrophagen mit *WA-314* und *WA-C*

Die Infektion von Makrophagen mit dem virulenten *Yersinia* Wildtyp *WA-314* (siehe Tabelle 1) zeigte eine drastische Reduktion der Podosomenzahl. Bereits nach 30 min waren die Podosomen von mehr als zwei Drittel der ausgezählten Makrophagen nicht mehr nachweisbar. Nach 60 min wiesen knapp 90 % der Zellen keine Podosomen mehr auf und nach 90 min waren 98,5 % ohne Podosomen, was sich nach 120 min nicht änderte. Abbildung 6 zeigt die Morphologie der unbehandelten und *Yersinia*-infizierten Zellen nach Aktinfärbung.

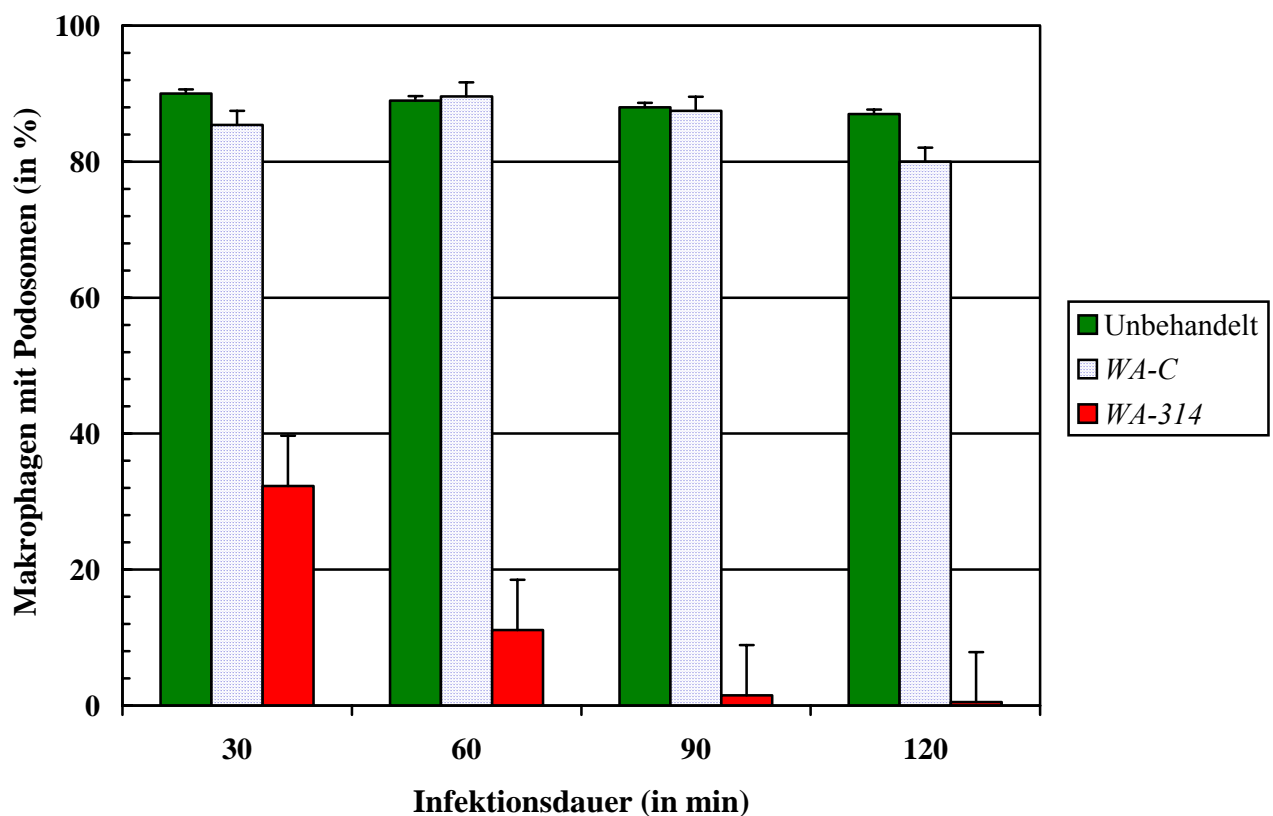




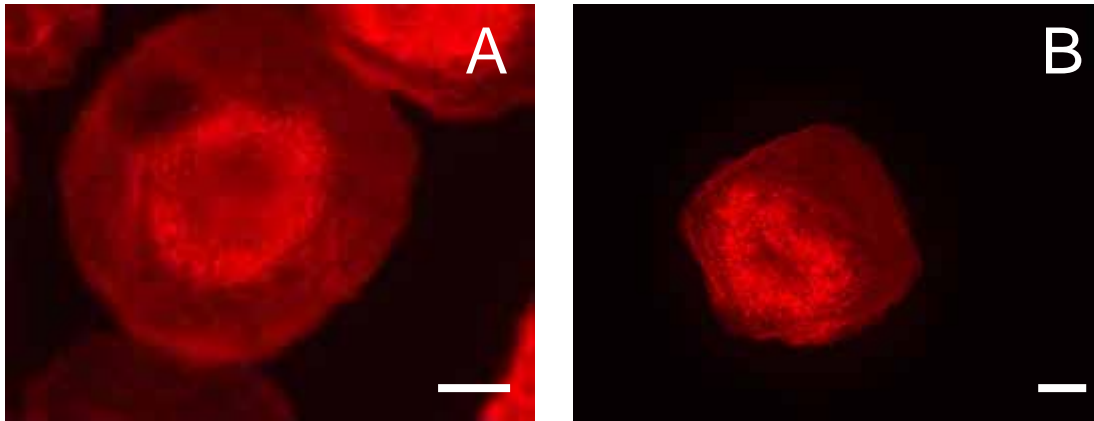
**Abbildung 6: Zeitreihe der Infektion von primären humanen Makrophagen mit *Yersinia WA-314*.**

Konfokalmikroskopische Aufnahmen (A – E) der Makrophagen-Podosomen, F-Aktin-Färbung (rot) mit Alexa Phalloidin. Bereits nach 30 min (A) deutlicher podosomenzerstörender Effekt, der nach 60 min (B) noch weiter zunahm. Nach 90 min (C) waren fast alle Zellen ohne Podosomen, was sich nach 120 min (D) minimal änderte. (E) In unbehandelten Kontrollzellen sind die Podosomen, punktierte Aktinakkumulationen, ringartig angeordnet. Balkenlänge entspricht 20 µm.

Als Kontrolle wurden Makrophagen mit dem plasmidfreien *WA-C* Stamm infiziert. Abbildung 7 dokumentiert die Ergebnisse der *WA-314*-infizierten und *WA-C*-infizierten Makrophagen zu den vier Zeitpunkten in einem Balkendiagramm. Im Gegensatz zur Infektion mit dem Wildtyp *WA-314* hatte eine Infektion mit dem plasmidfreien *WA-C*-Typ keinen Effekt auf die Podosomen. Die Zellen hielten ihre Podosomenanzahl zu allen untersuchten Zeitpunkten auf demselben Niveau, vergleichbar mit dem Podosomengehalt der unbehandelten Makrophagen (Abbildung 7 und 8). Damit wurde gezeigt, daß ein vollvirulenter *Yersinien*-Stamm mit Typ III-Sekretionsapparat und Effektorproteinen Podosomen zerstört.



**Abbildung 7: Effekt der Infektion von Makrophagen mit *WA-314* und *WA-C* zu unterschiedlichen Zeiten.** Deutlicher Podosomenverlust bei der Infektion mit dem Wildtyp bereits nach 30 min, der im Zeitverlauf weiter zunahm. Nahezu konstante Podosomenzahl bei der Infektion mit *WA-C* sowie den nicht infizierten Kontrollen. Für jeden einzelnen Wert wurden 160 Zellen aus drei unabhängigen Infektionsversuchen ausgezählt ( $n = 3$ ). Der Standardfehler (Standard Error of Mean = SEM) ist als Balken auf den Säulen dargestellt.

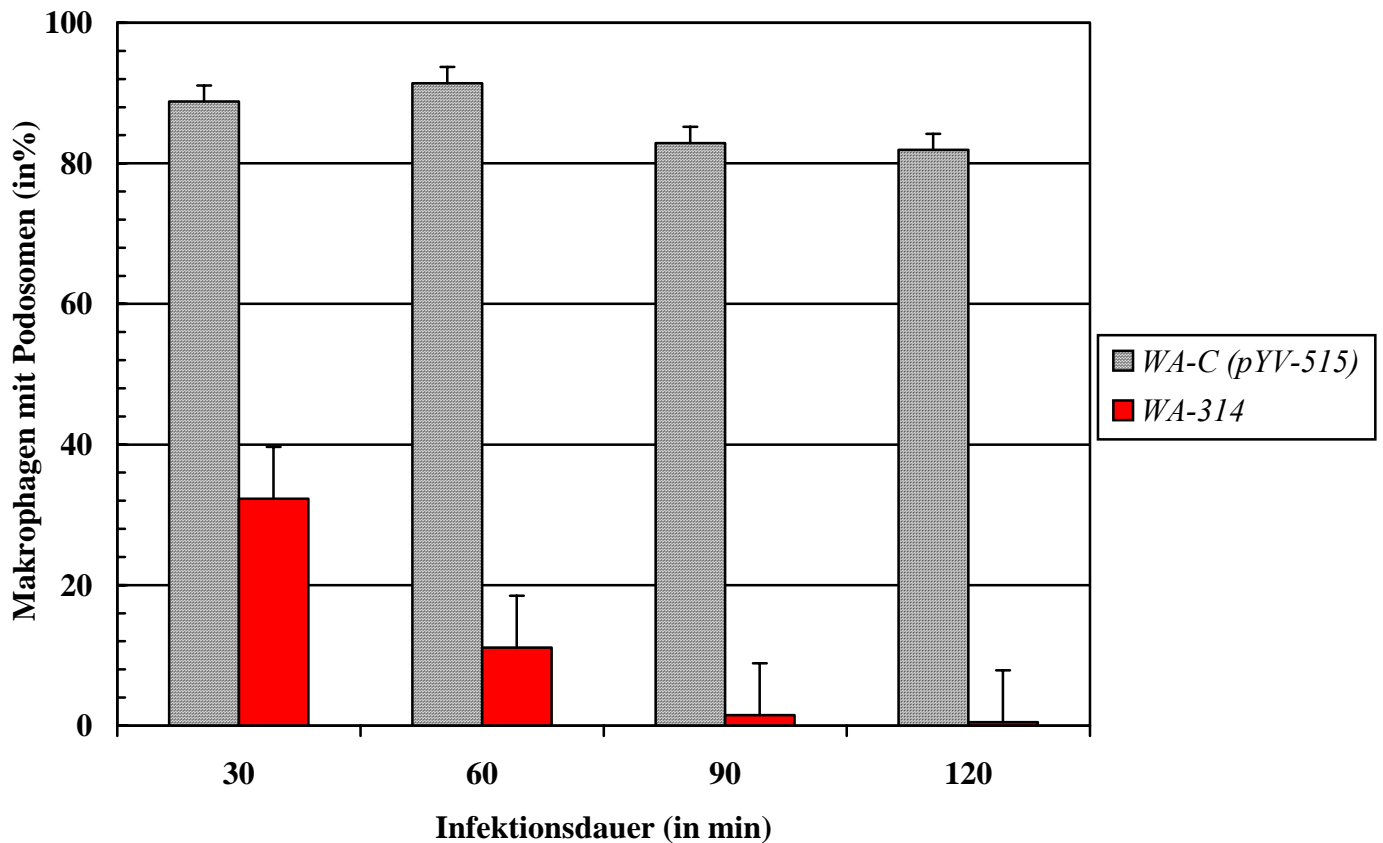


**Abbildung 8: *WA-C*-Infektion von primären humanen Makrophagen nach 90 min.**

Konfokalmikroskopische Aufnahme von Makrophagen, F-Aktin-Färbung (rot) mit Alexa Phalloidin. Kein Unterschied der *WA-C*-infizierten Makrophagen zu der unbehandelten Zelle zum selben Zeitpunkt. Auch zu allen anderen Zeiten (nicht gezeigt) behielten Makrophagen ihre Podosomen bei. Balkenlänge = 10 µm.

## 5.2 Infektion von Makrophagen mit *WA-C(pYV-515)*

Der Stamm *WA-C(pYV-515)* besitzt die Translokationsmaschinerie und alle Yops, unterscheidet sich aber vom Wildtyp *WA-314* durch eine Mutation in einem Regulatorgen, das für die Sekretion und Translokation essentiell ist. De facto ist der Typ III-Sekretionsapparat nicht funktionsfähig. Aus Abbildung 9 ist zu entnehmen, daß Makrophagen bei einer Infektion mit *WA-C(pYV-515)* ihre Podosomen zu den untersuchten Zeiten beibehalten. Es besteht kein signifikanter Unterschied zu den *WA-C*-infizierten Zellen. Diese Resultate legen den Schluß nahe, daß für die Destruktion der Makrophagenpodosomen der Typ III-Sekretionsapparat in Verbindung mit der Translokation der Yop-Effektoren notwendig ist. Andere, möglicherweise durch das Virulenzplasmid kodierte Faktoren (die auf *WA-C(pYV-515)* auch vorhanden wären) scheinen keine Rolle zu spielen.



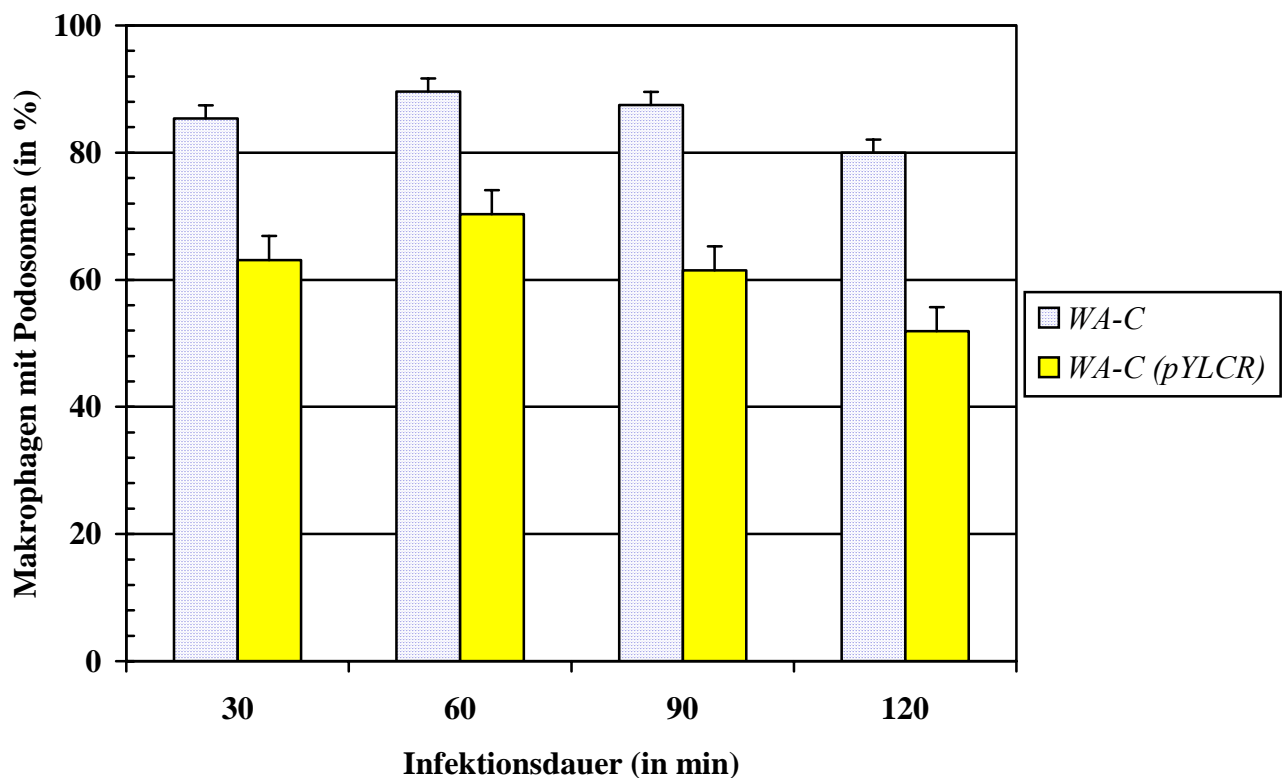
**Abbildung 9: Effekt der Infektion von Makrophagen mit *WA-C(pYV-515)*.**

Die Infektion der Makrophagen mit diesem Stamm, der durch eine Mutation einen defizienten Typ III-Sekretionsapparat aufweist, ließ die Anzahl der Podosomen unberührt, vergleichbar zur Infektion mit *WA-C*. Für jeden einzelnen Wert wurden 160 Zellen aus drei unabhängigen Infektionsversuchen ausgezählt ( $n = 3$ ). Der Standardfehler (Standard Error of Mean = SEM) ist als Balken auf den Säulen dargestellt.

### 5.3 Infektion von Makrophagen mit *WA(pYLCR)*

*WA(pYLCR)* besitzt neben *Yada* einen funktionsfähigen Sekretionsapparat, verfügt aber nicht über die Yop Effektorproteine, die in die Wirtszelle geschleust werden. Somit kann ein mit *pYLCR* transformierter *WA-C* Stamm zwar Yops produzieren, die zur Sekretionsmaschinerie gehören, wie YopB, YopD und YopN, jedoch keine Effektor-Yops, wie sie normalerweise durch *WA-314* freigesetzt werden. Um Effekte von *WA(pYLCR)* auf Aktinstrukturen monozytärer Zelllinien zu untersuchen, wurden Infektionsversuche durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 10 gezeigt werden. Der Prozentsatz der Zellen mit Podosomen hat bereits zum ersten untersuchten Zeitpunkt im Vergleich zu *WA-C*-infizierten Zellen um ca. 20% abgenommen und verringerte sich bis 120 min dann nur noch geringfügig. Die Resultate

in der Abbildung 10 repräsentieren einen maximal zu erwartenden Effekt des Sekretionsapparates auf die Podosomen von Makrophagen. Er könnte mit dem Einbau von Poren in die Wirtszellmembran erklärt werden, durch die es zum Beispiel infolge eines  $\text{Ca}^{++}$ -Einstroms zur Podosomendestruktion kommt. Im Falle von vollvirulenten *Yersinia*-Stämmen ist aber der Effekt der Porenbildung nicht so stark, wenn noch zusätzlich Effektor-Yops mit injiziert werden (Übersichtsarbeit von Cornelis, 1998).

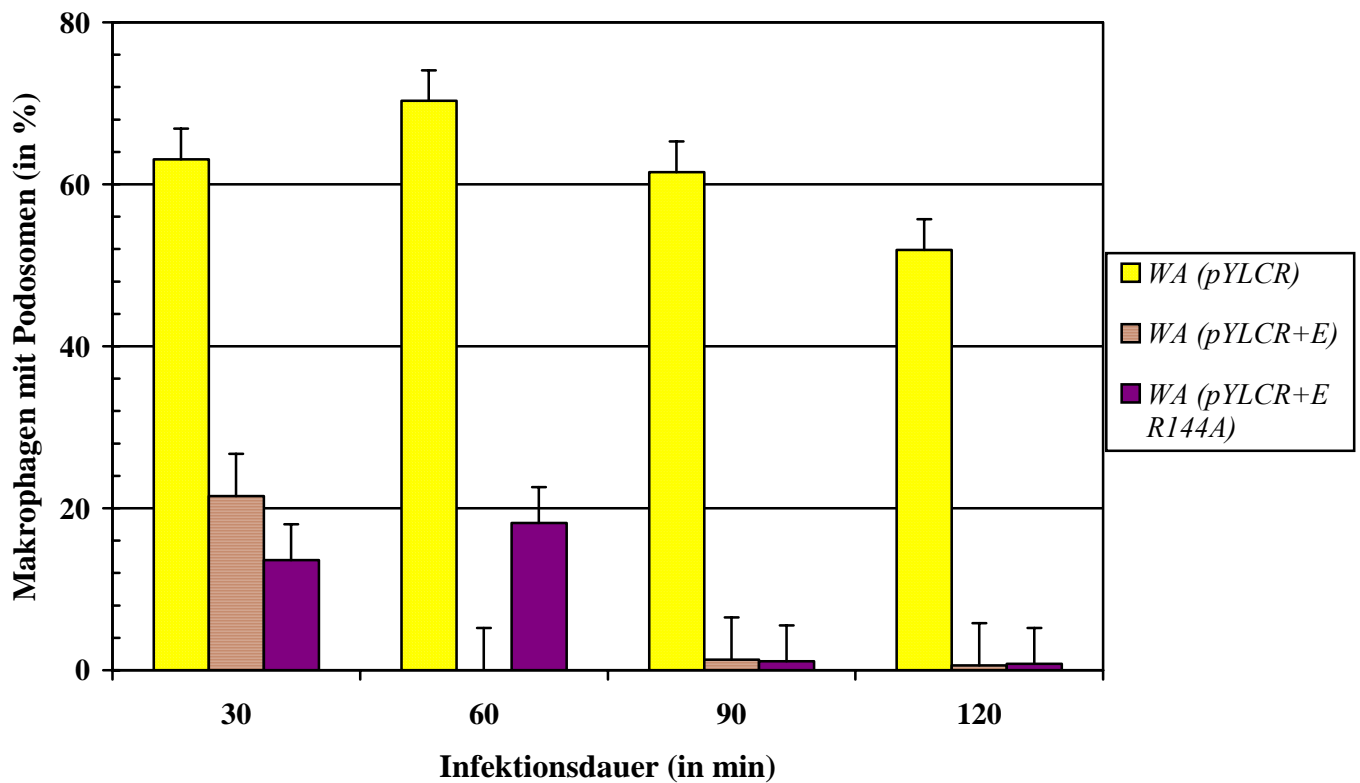


**Abbildung 10: Effekt der Makrophageninfektion mit *WA-C(pYLCR)*.**

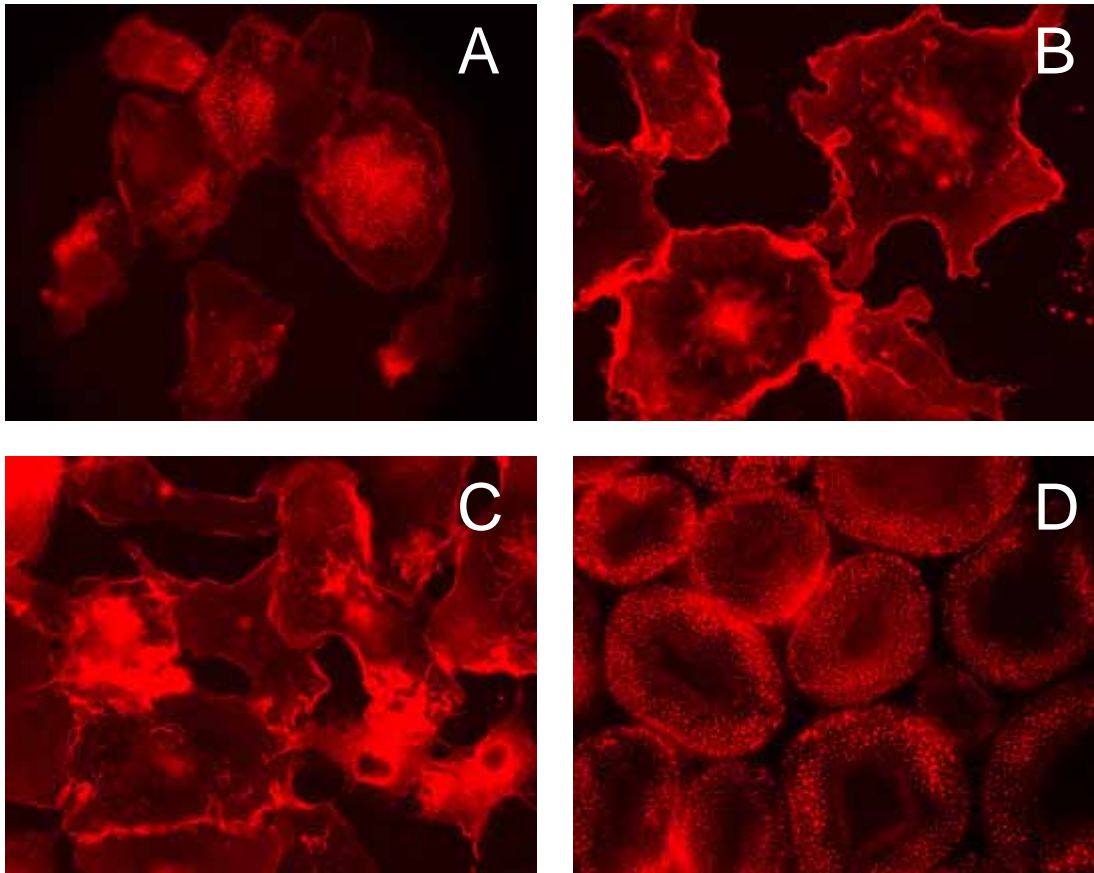
Bereits nach 30 min war im Vergleich zu den *WA-C*-infizierten Zellen ein Rückgang der Podosomen in den Makrophagen zu verzeichnen, der über die folgenden Zeitpunkte relativ konstant blieb. Für jeden einzelnen Wert wurden 160 Zellen aus drei unabhängigen Infektionsversuchen ausgezählt ( $n = 3$ ). Der Standardfehler (Standard Error of Mean = SEM) ist als Balken auf den Säulen dargestellt.

#### 5.4 Infektion von Makrophagen mit *WA-C(pYLCR+E)* und *WA-C(pYLCR+E<sub>R144A</sub>)*

Der *WA-C(pYLCR+E)*-Stamm unterscheidet sich vom *WA(pYLCR)*-Stamm durch ein zusätzlich eingebrachtes Plasmid, das für YopE und dessen Chaperon SycE kodiert. Er enthält damit einen intakten Sekretionsapparat mit nur einem einzigen Effektor-Yop, nämlich YopE. Die Hauptwirkung dieses *Yersinien*-Stamms auf Makrophagenpodosomen entfaltete sich bereits in den ersten 30 min nach Infektion, als schon mehr als drei Viertel aller ausgezählten Zellen ihre Podosomen verloren hatten. Nach weiteren 30 min waren keine Podosomen mehr nachweisbar und dies blieb bis zum Zeitpunkt 120 min so. Den erwarteten Effekt, daß YopE alleine ausreicht, um Podosomen zu zerstören, veranschaulichen das Säulendiagramm der Abbildung 11 und die Konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Abbildung 12. Von *WA-C(pYLCR+E)* unterscheidet sich das *WA(pYLCR+E<sub>R144A</sub>)*-Konstrukt durch eine Punktmutation im Gen von YopE (Aminosäure R an Position 144 wird zu Aminosäure A), das YopE inaktiviert. Zur Veranschaulichung kann man sich bei diesem Konstrukt vorstellen, daß bei einer Infektion mit *WA(pYLCR+E<sub>R144A</sub>)* über einen intakten Typ III-Sekretionsapparat ein einziges Effektor-Yop, und zwar das GAP inaktive YopE in die Wirtszelle transloziert wird. Überraschenderweise gelingt es auch mit diesem Stamm mit der GAP-negativen YopE-Mutante, podosomale Aktinstrukturen humaner Makrophagen zu zerstören. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß für die Podosomenzerstörung zwar YopE alleine ausreicht, aber wahrscheinlich andere Funktionen als die GAP-Aktivität von YopE daran beteiligt sind. Das Ergebnis nach Infektion mit den Stämmen *WA-C(pYLCR+E)* und *WA(pYLCR+E<sub>R144A</sub>)* zeigt Abbildung 11, in der zum Vergleich auch die Ergebnisse der Infektion mit *WA(pYLCR)* mit abgebildet wurden.



**Abbildung 11: Effekt der Infektion von Makrophagen mit  $WA-C(pYLCR+E)$ - und  $WA-C(pYLCR + E_{R144A})$ .** Bei der Infektion mit dem  $WA-C(pYLCR + E_{R144A})$ -Stamm fiel die Zahl podosomenhaltiger Zellen bereits nach 30 min auf unter 20 %, hielt sich nach weiteren 30 min etwa auf dem Niveau, um dann komplett abzufallen. Die Infektion mit dem  $WA-C(pYLCR+E)$ -Stamm führte zu einem deutlichen Abfall, schon nach 30 und 60 min waren keine Zellen mit Podosomen nachweisbar. Für jeden einzelnen Wert wurden 160 Zellen aus drei unabhängigen Infektionsversuchen ausgezählt ( $n = 3$ ). Der Standardfehler (Standard Error of Mean = SEM) ist als Balken auf den Säulen dargestellt.



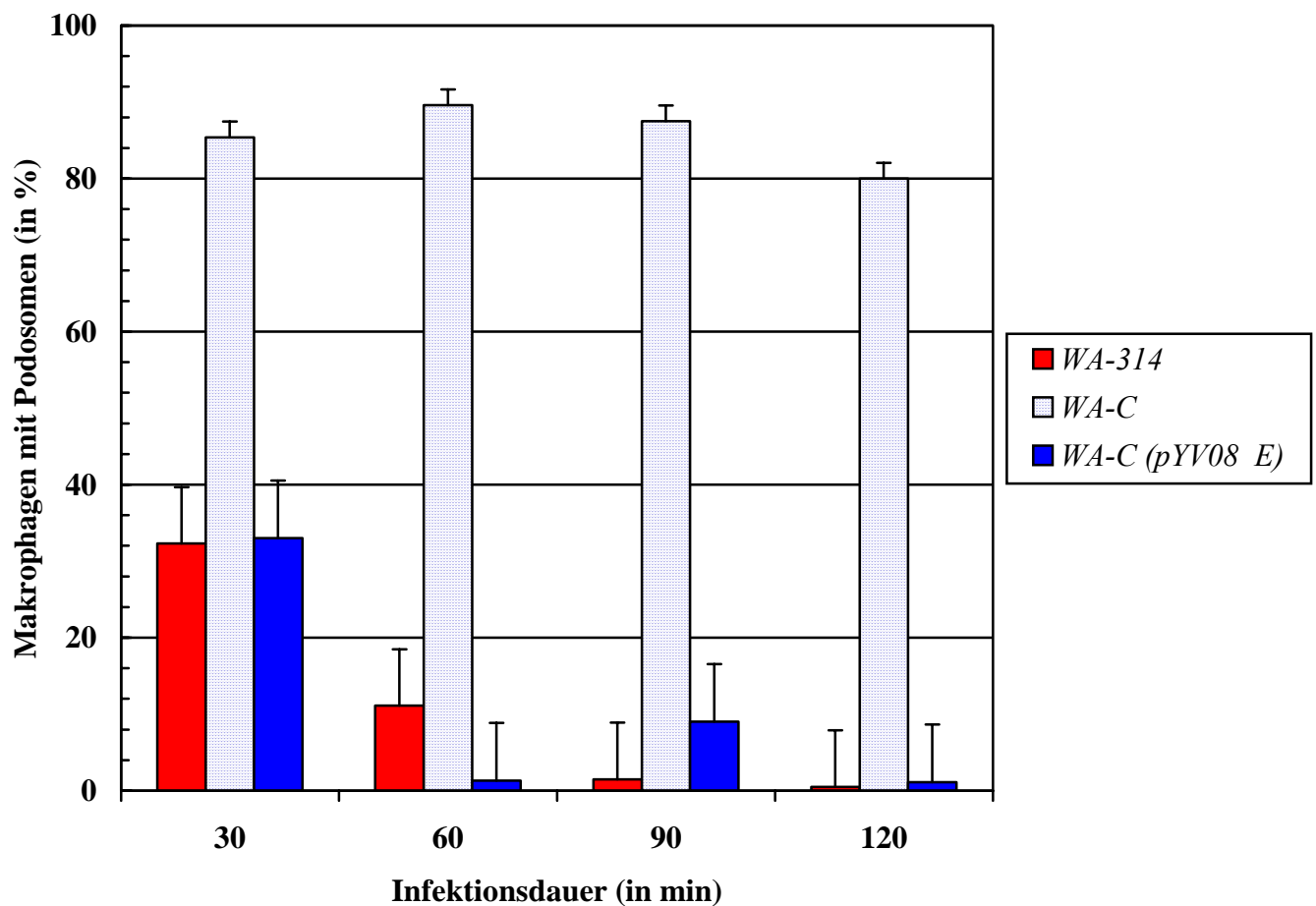
**Abbildung 12: Zeitreihe der *WA-C(pYLCR+E)*-Infektion primärer humaner Makrophagen.**

Konfokalmikroskopische Aufnahmen (A – D) infizierter Makrophagen 30, 60 und 90 min nach Infektion, F-Aktin-Färbung (rot) mit Alexa 568 Phalloidin. Drastischer Effekt auf die Podosomen bereits nach 30 min (A), nach weiteren 30 min (B) waren nahezu keine Podosomen mehr in den Makrophagen nachweisbar. Podosomen blieben in den weiteren Zeitpunkten 90 min (C) und 120 min (nicht gezeigt) weg. Unbehandelte Makrophagen (D). Weißer Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .



## 5.5 Infektion von Makrophagen mit *WA-C(pYV08ΔE)*

Nachdem bisher gezeigt werden konnte, daß YopE und sogar eine GAP-negative YopE-Mutante ausreichen, um Podosomen zu zerstören, wurde mit dem folgenden Versuch untersucht, ob YopE das einzige Effektor-Yop ist, das Podosomen zerstören kann. In diesem Infektionsversuch wurde die YopE-Minusmutante *WA-C(pYV08ΔE)* verwendet. Dieser Stamm unterscheidet sich vom Wildtyp *WA-314* durch ein in das Virulenzplasmid eingeführtes Transposon in dem Genabschnitt, der für YopE kodiert. Folglich werden bei einer Infektion mit diesem Stamm durch einen intakten Typ III Sekretionsapparat alle Effektorproteine bis auf YopE in die Wirtszelle geschleust. Aus Abbildung 13 ist zu entnehmen, daß auch dieser YopE-defiziente Stamm in der Lage ist, monozytäre Podosomen zu zerstören. Bereits nach 60 min sind die meisten der ausgezählten Zellen unter dem Konfokalmikroskop ohne Podosomen. Offensichtlich sind auch andere Effektor-Yops als YopE in der Lage, Podosomen von Makrophagen zu zerstören.



**Abbildung 13: Effekt der Infektion von Makrophagen mit *WA-C(pYV08ΔE)*.**

Die Infektion mit dem *WA-C(pYV08ΔE)*-Stamm hatte denselben podosomenzerstörerischen Effekt wie mit dem Wildtyp *WA-314* nach 30 min, im Zeitverlauf war die Zerstörung vergleichbar hoch. Zur Veranschaulichung sind die Ergebnisse der Infektionen mit dem virulenten *WA-314* in der rechten und dem plasmidfreien *WA-C* in der mittleren Säulenreihe abgebildet. Für jeden einzelnen Wert wurden 160 Zellen aus drei unabhängigen Infektionsversuchen ausgezählt ( $n = 3$ ). Der Standardfehler (Standard Error of Mean = SEM) ist als Balken auf den Säulen dargestellt.

## 6. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß YopE alleine ausreicht Makrophagenpodosomen zu zerstören. Dieser Effekt ist schon 30 min nach Infektion maximal. Für YopE ist eine GAP Aktivität nachgewiesen worden (von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000) und es ist auch bekannt, daß YopE in Zellen selektiv Rac-abhängige Signaltransduktionswege beeinträchtigt (Andor *et al.*, 2001). Podosomen werden durch die integrierte Aktivität unterschiedlicher Rho GTPasen kontrolliert. Rac vermittelt über die Kaskade IRSp53-WAVE-Arp2/3 die Aktinpolymerisation (Habilitationsschrift, S. Linder, 2002). Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, daß der Effekt der Podosomenzerstörung von YopE über Rac erfolgt. Möglich wäre ein Szenario, in dem YopE über die Kaskade Rac-IRSp53-WAVE-Arp2/3 die Aktinpolymerisation zum Erliegen bringt und damit den Podosomen-*turnover* unterbindet. Podosomen sind überaus labile Strukturen, da jede Änderung der Rho- und Rac-Aktivität ihre sofortige Dissoziation zur Folge hat (Ory *et al.*, 2000). Unter Änderung ist in diesem Zusammenhang sowohl eine Inhibierung als auch eine Aktivierung gemeint.

YopE wirkt auch auf die Rho GTPasen Cdc42Hs und Rho *in vitro* (von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000). Cdc42Hs führt zur Ausbildung von *microspikes*, während RhoA Stressfasern induziert. Es konnte gezeigt werden, daß die Mikroinjektion von konstitutiv aktivem bzw. inaktivem Cdc42Hs die Podosomenbildung stört bzw. die Podosomen zerstört (Linder *et al.*, 2000). Hypothetisch könnte YopE auch über eine Wirkung auf Cdc42Hs Einfluß auf die Podosomengestaltung ausüben. Allerdings ist dieser geschilderte Weg aufgrund der höheren Rac-Affinität von YopE als zweitrangig einzustufen. Möglicherweise hat YopE keinen Zugang zu Cdc42Hs und Rho, weil es durch Regulatoren, *Downstream* Effektoren sequestriert wird oder in ganz anderen subzellulären Kompartimenten lokalisiert ist.

Auch *Yersinien*-Stämme mit GAP-negativer YopE-Mutante, *WA(pYLCR+E<sub>R144A</sub>)*, und der Minusmutante *WA-C(pYV08ΔE)* zerstören podosomale Adhäsionsstrukturen. Das kann auf unterschiedliche Weisen ausgelegt werden. Zum einen bedeutet dies, daß YopE nicht alleine einen Effekt auf Podosomen hat. Interessant wäre zu untersuchen, ob und inwiefern YopE durch andere Effektor-Yops ersetzt werden kann, die zum Beispiel wie im Fall von YopT auf Rho GTPasen wirken. Zum zweiten ist offensichtlich nicht nur die GAP-Aktivität von YopE für den Effekt auf die Podosomen verantwortlich, sondern auch andere Funktionen von YopE, wie z.B. seine Rho GTPase bindende Wirkung, die auch ohne GAP-Aktivität zustande kommt.

Mikrotubuli sind ein wichtiger zytoskelettaler Baustein und als solcher für die Podosomenbildung essentiell (Habilitationsschrift S. Linder, 2002). Bisher wurde ein möglicher Effekt von Effektor-Yops, insbesondere YopE, auf Mikrotubuli nicht untersucht, könnte aber als Ansatz für weitere Experimente dienen.

Man könnte auch überlegen, ob nicht Bestandteile des Typ III Sekretionsapparats selbst, wie zum Beispiel YopB, auch als Effektor eine Rolle spielen und somit einen modulatorischen Einfluss auf die Wirtszelle ausüben. Die Infektion humaner Makrophagen mit *WA(pYLCR)* hat auch einen podosomenzerstörenden Effekt, der mit dem Einbau von nanometergroßen Poren in die Wirtszellmembran erklärt werden könnte, durch die es zum Beispiel infolge eines Ca<sup>++</sup>-Influxes zur Podosomenzerstörung kommt.

Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Infektionsversuche wurden in einem Zeitfenster von 120 min durchgeführt, um den schnellen Effekt der Yops auf die Podosomen konfokalmikroskopisch zu untersuchen. Auf Grund der selbstlimitierenden Natur einer durch *Yersinien spp.* ausgelösten Infektionserkrankung bietet es sich auch an, in längeren Infektionszeitreihen der Frage nachzugehen, ob und inwiefern sich Podosomen wieder regenerieren und zurückbilden können.

## 7. Zusammenfassung

Podosomen sind aktinreiche Strukturen des Zytoskeletts primärer humaner Makrophagen. Für Adhäsion, Polarisation und Chemotaxis sind diese Strukturen von essentieller Bedeutung. Ihr ständiger Umbau und ihre Regulation unterliegt einer fein abgestimmten Balance der Rho GTPasen Rho, Rac und Cdc42. Pathogene *Yersinien spp.* haben Aktinzytoskelett von Wirtszellen durch Modulation von Rho GTPasen als Angriffsobjekt gewählt. Mit ihrem plasmidkodierten Typ III Sekretions- und Translokationsapparat werden wichtige Immunfunktionen paralysiert.

In dieser Arbeit wurde in primären humanen Makrophagen der Einfluss von *Yersinien*-Effektoren auf Podosomen untersucht. Konkret interessierte die Frage, welchen Effekt YopE auf diese Strukturen hat. Hierzu wurden in einem standardisierten Verfahren gewonnene und gereinigte Makrophagen gesunder Spender mit unterschiedlichen Mutanten der Spezies *Yersinia enterocolitica* für verschiedene Zeiten infiziert. Nach Färbung der Zellen mit Rhodamin-Phalloidin wurde die Anzahl der verbliebenen Zellen mit Podosomen im konfokalen Mikroskop ermittelt und statistisch ausgewertet.

Es konnte **erstens** gezeigt werden, daß ein voll virulenter *Yersinien* Stamm in der Lage ist, nach einer Infektion von bereits 30 min die podosomalen Strukturen der Makrophagen vollkommen zu zerstören. **Zweitens** sind an diesem Effekt verschiedene *Yersinien*-Effektoren und zusätzlich der Typ III Sekretions- und Translokationsapparat beteiligt. **Drittens** reicht YopE für die Zerstörung von Podosomen alleine aus. **Viertens** ist die GAP-Aktivität von YopE für die Destruktion von Podosomen nicht notwendig und lässt auf GAP-unabhängige Mechanismen von YopE schließen.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, daß YopE ein wichtiger aber nicht der alleinige Effektor der *Yersinien* bei der Paralyse von menschlichen Makrophagen und insbesondere der Zerstörung podosomaler Adhäsionsstrukturen ist.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Adams J. C.** (2001) Cell-matrix contact structures. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 371-392.
2. **Aderem A., Underhill D. M.** (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**: 593-623.
3. **Aepfelbacher M., Heesemann J.** (2001). Modulation of Rho-GTPases and the actin cytoskeleton by *Yersinia* outer proteins (Yops). *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 1-8.
4. **Aepfelbacher M., Trasak C., Wilharm G., Wiedemann A., Trülsch K., Krauss K., Gierschik P., Heesemann J.** (2003). Characterization of YopT Effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected Cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 33217-33223.
5. **Aepfelbacher M., Zumbihl R., Ruckdeschel K., Heesemann J.** (1999). Pathogenicity of *Yersinia* or How to Find an Extracellular Niche. *Nova Acta Leopoldina* **312**: 181-192.
6. **Aepfelbacher M., Zumbihl R., Ruckdeschel K., Jacobi C., Barz C., Heesemann J.** (1999). The Tranquilizing Injection of *Yersinia* Proteins: A Pathogen's Strategy to Resist Host Defence. *Biol. Chem.* **380**: 1-8.
7. **Amato P. A., Unanue E. R., Lansing D. L.** (1983). Distribution of Actin in Spreading Macrophages: A Comparative Study on Living and Fixed Cells. *J. Cell Biol.* **96**: 750-761.
8. **Andor A., Trülsch K., Essler M., Roggenkamp A., Wiedemann A., Heesemann J., Aepfelbacher M.** (2001). YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho-GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell. Microbiol.* **3**: 301-310.
9. **Aspenstrom P.** (1999). Effectors for the Rho GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 95-102.
10. **Aspenström P.** (1999). The Rho GTPases Have Multiple Effects on the Actin Cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* **246**: 20-25.
11. **Aubin J. E.** (1992). Osteoclast Adhesion and Resorption: The Role of Podosomes. *J. Bone Min. Res.* **7**: 365-368.
12. **Autenrieth I. B., Firsching R.** (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.
13. **Bi E., Zigmond S. H.** (1999). Actin polymerisation: Where the WASP stings. *Curr. Biol.* **9**: R160-R163.

14. **Bishop A. L., Hall A.** (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* **348**: 241-255.
15. **Black D. S., Bliska J. B.** (2000). The Rho GAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol. Microbiol.* **37**: 515-27.
16. **Bliska J. B.** (2000). Yop effectors of *Yersinia spp.* and actin rearrangements. *Trends Microbiol.* **8**: 205-208.
17. **Burns S., Thrasher A. J., Blundell M. P., Machesky L., Jones E. J.** (2001). Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein and differentiation. *Blood* **98**: 1142-1149.
18. **Caligaris-Cappio F., Bergui F., Tesio L., Corbascio G., Tousco F., Marchisio P. C.** (1986). Cytoskeleton organization is aberrantly rearranged in the cells of B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia. *Blood* **67**: 233-239.
19. **Caron E., Hall A.** (1998). Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**: 1717-1721.
20. **Chellaiah M. A., Soga N., Swanson S., McAllister S., Alvarez U., Wang D., Dowdy S. F., Hruska K. A.** (2000). Rho-A Is Critical for Osteoclast Podosome Organization, Motility and Bone Resorption. *J. Biol. Chem.* **275**: 11993-12002.
21. **Chen W. T., Olden K., Bernard B. A., Chu F. F.** (1984). Expression of transformation associated protease(s) that degrade fibronectin at cell contact sites. *J. Cell Biol.* **98**: 1546-1555.
22. **Cornelis G. R., Boland A., Boid A. P., Geuijen C., Iriarte M., Neyt C., Sory M. P., Stanier I.** (1998). The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1315-1352.
23. **Cornelis G. R.** (1998). The *Yersinia* Deadly Kiss. *J. Bacteriol.* **180**: 5495-5504.
24. **Cornelis G. R.** (2000). Molecular and cell biology aspects of plague. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 8778-8783.
25. **Dong R., Cwynarski K., Entwistle A., Marelli-Berg F., Dazzi F., Simpson E., Goldman J. M., Melo J. V., Lechler R. I., Bellantuono I., Ridley A., Lombardi G.** (2003). Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. *Blood* **101**: 3560-3567.
26. **Dutartre H., Davoust J., Gorvel J-P., Chavrier P.** (1996). Cytokinesis and redistribution of actin-cytoskeleton regulatory components in cells expressing the Rho-GTPase CDC42Hs. *J. Cell Sci.* **109**: 367-377.

27. **Evans J. G., Correia I., Krasavina O., Watson N., Matsudaira P.** (2003). Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation. *J. Cell Biol.* **161**: 697-705.
28. **Fu Y., Galan J. E.** (1999). A *salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature.* **401**: 293-297.
29. **Gaidano G., Begui L., Schena M., Gaboli M., Cremona O., Marchisio P. C., Caligaris-Cappio F.** (1990). Integrin Distribution and Cytoskeleton Organization in Normal and Malignant Monocytes. *Leukemia* **4**: 682-687.
30. **Galán J. E.** (1998). Interaction of *Salmonella* with host cells: encounters of the closest kind. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 14006-8.
31. **Gavazzi I., Nermut M. V., Marchisio P. C.** (1989). Ultrastructure and gold-immunolabelling of cell-substratum adhesions (podosomes) in RSV-transformed BHK cells. *J. Cell Sci.* **94**: 85-99.
32. **Gimona M., Kaverina I., Resch G. P., Vignal E., Burgstaller G.** (2003). Calponin repeats regulate actin filament stability and formation of podosomes in smooth muscle cells. *Mol. Biol. Cell.* **14**: 2482-2491.
33. **Glomset J. A., Farnsworth C. C.** (1994). Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**: 181-205.
34. **Goehring U. M., Schmidt G., Pederson K. J., Aktories K., Barbieri J. T.** (1999). The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* **274**: 36369-36372.
35. **Hall A.** (1998). Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* **279**: 509-513.
36. **Heesemann J., Gross U., Schmidt N., Laufs R.** (1986). Immunchemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia spp.* grown in calcium-deficient media. *Infect. Immun.* **54**: 561-567.
37. **Higgs H. N., Pollard T. D.** (1999). Regulation of Actin Polymerization by Arp2/3 Complex and WASp/Scar Proteins. *J. Biol. Chem.* **274**: 32531-32534.
38. **Iriarte M., Cornelis G. R.** (1998). YopT, a new *Yersinia effector protein*, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol. Microbiol.* **29**: 915-929.
39. **Juris S. J., Rudolph A. E., Huddler D., Orth K., Dixon J. E.** (2000). A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation and cytoskeleton disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 9431-6.



40. **Juris S. J., Shao F., Dixon J. E.** (2002). *Yersinia* effectors target mammalian signalling pathways. *Cell. Microbiol.* **4**: 201-211.
41. **Lehto V. P., Hovi T., Vartio T., Badley R. A., Virtanen I.** (1982). Reorganization of Cytoskeletal and Contractile Elements during Transition of Human Monocytes into Adherent Macrophages. *Lab. Invest.* **47**: 391-399.
42. **Linder S.** (2002). Regulation des Aktin-Zytoskeletts primärer humaner Makrophagen: Bedeutung für Adhäsion, Migration und Phagozytose. *Habilitationsschrift an der LMU München.*
43. **Linder S., Aepfelbacher M.** (2000). Orientierungslose Makrophagen. Die Rolle des Arp 2/3-Komplexes bei der gestörten Migration von Immunzellen im Wiskott-Aldrich Syndrom. *Immun. Aktuell.* **1**: 52-53.
44. **Linder S., Aepfelbacher M.** (2003). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* **13**: 376-384.
45. **Linder S., Higgs H., Hübner K., Schwarz K., Pannicke U., Aepfelbacher M.** (2000). The polarization defect of Wiskott-Aldrich Syndrome macrophages is linked to dislocalisation of the Arp 2/3 Complex. *J. Immunol.* **165**: 221-225.
46. **Linder S., Hübner K., Wintergerst U., Aepfelbacher M.** (2000). Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J. Cell Sci.* **113**: 4165-4176.
47. **Linder S., Nelson D., Weiss M., Aepfelbacher M.** (1999). Wiskott-Aldrich Syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 9648-9653.
48. **Machesky L. M., Gould K.L.** (1999). The Arp2/3 complex: a multifocal actin organizer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 117-121.
49. **Machesky L. M., Hall A.** (1996). Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **6**: 304-310.
50. **Machesky L. M., Insall R.H.** (1998). Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein WASp regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* **8**: 1347-1356.
51. **Marchisio P. C., Bergui L., Corbascio G. C., Cremona O., D'Urso N., Schena M., Tesio L., Caligaris-Cappio F.** (1984). Vinculin, Talin and Integrins Are Localized at Specific Adhesion Sites of Malignant B Lymphocytes. *Blood* **72**: 830-833.

52. **Marchisio P. C., Cirillo D., Naldini L., Primavera M. V., Teti A., Zambonin-Zallone A.** (1984). Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *J. Cell Biol.* **99**: 1696-1705.
53. **Marchisio P. C., Cirillo D., Teti A., Zambonin-Zallone A., Tarone G.** (1987). Rous Sarcoma Virus-Transformed Fibroblasts and Cells of Monocytic Origin Display a Peculiar Dot-like Organization of Cytoskeletal Proteins Involved in Microfilament-Membrane Interactions. *Exp. Cell Res.* **169**: 202-214.
54. **Mullins R. D.** (2000). How WASP-family proteins and theArp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 91-96.
55. **Nakamura N., Tanaka J., Kenji S.** (1993). Rous sarcoma virus-transformed cells develop peculiar adhesive structures along the cell periphery. *J. Cell Sci.* **106**: 1057-1069.
56. **Nermut M. V., Eason P., Hirst E. M. A., Kellie S.** (1991). Cell/Substratum Adhesions in RSV-Transformed Rat Fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **193**: 382-397.
57. **Ory S., Munari-Silem Y., Fort P., Jurdic P.** (2000). Rho and Rac exert antagonistic functions on spreading of macrophage-derived multinucleated cells and are not required for actin fiber formation. *J. Cell Sci.* **113**: 1177-1188.
58. **Ridley A. J., Hall A.** (1992). The Small GTP-Binding Protein rho Regulates the Assembly of Focal Adhesions and Actin Stress Fibres in Response to Growth Factors. *Cell* **70**: 389-399.
59. **Ridley A.J., Paterson H.F., Johnston C.L., Diekmann D., Hall A.** (1992).The small GTP-Binding Protein rac Regulates Growth Factor-Induced Membrane Ruffling. *Cell* **70**: 401-410.
60. **Ridley J. A.** (2001). Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* **114**: 2713-2722.
61. **Ruckdeschel K., Richter K., Aepfelbacher M.** (2003). *Yersinia* outer proteins (Yops) - Modulators of Host Signalling During bacterial infection. *Biomedical Progress* **16**: 15-19.
62. **Ruckdeschel K., Roggenkamp A., Schubert S., Heesemann J.** (1996). Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect. Immun.* **64**: 724-733.
63. **Schell B., Linder S.** (2001). Magnetisierte Monozyten. Isolation, Mikroinjektion und Stimulation primärer humaner Monozyten und Makrophagen. *Immunol. Aktuell* **1**: 152-158.

64. **Shao F., Merritt P. M., Bao Z., Innes R.W., Dixon J. E.** (2002). A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* **109**: 575-588.
65. **Shao F., Vacratsis P. O., Bao Z., Bowers K. E., Fierke C. A., Dixon J. E.** (2003). Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 904-909.
66. **Tarone G., Cirillo D., Giancotti F. G., Comoglio P. M., Marchisio P. C.** (1985). Rous Sarcoma Virus-Transformed Fibroblasts Adhere Primarily at Discrete Protrusions of the Ventral Membrane Called Podosomes. *Exp. Cell Res.* **159**: 141-157.
67. **Van Aelst L., D'Souza-Schorey C.** (1997). Rho GTPases and signalling networks. *Genes Dev.* **11**: 2295-2322.
68. **von Pawel-Rammingen U., Telepnev M. V., Schmidt G., Aktories K., Wolf-Watz H., Rosqvist R.** (2000). GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol. Microbiol.* **36**: 737-748.
69. **Welch M. D.** (1999). The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex. *Trends Cell Biol.* **9**: 423-427.
70. **Winter D., Podtelejnikov A. V., Mann M., Li R.** (1997). The complex containing actin-related proteins Arp 2 and Arp 3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Curr. Biol.* **7**: 519-529.
71. **Zambonin-Zallone A., Teti A., Grano M., Rubinacci A., Abbadini A., Gaboli M., Marchisio P. C.** (1989). Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts: A  $\beta_3$  integrin is colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. *Exp. Cell Res.* **182**: 645-652.
72. **Zumbihl R., Aepfelbacher M., Andor A., Jacobi C., Ruckdeschel K., Rouot B., Heesemann J.** (1999). The Cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* Induces Modification and Cellular Redistribution of the Small GTP-binding Protein RhoA. *J. Biol. Chem.* **274**: 29289-29293.

## 9. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann für die freundliche Aufnahme in sein Institut.

Ich danke allen Mitarbeitern des Max von Pettenkofer-Instituts und des Instituts für Kreislaufprophylaxe für die sehr fruchtbare und geistreiche Kooperation und tatkräftige Unterstützung in allen technischen Fragen.

Ich danke der technischen Assistentin, Frau B. Böhlig, für die hervorragende Zusammenarbeit und die tolle Arbeitsatmosphäre.

Ich danke den Doktoranden A. Andor, H. Ilchmann, B. Schell, D. Walz und A. Wiedemann für ihre zahlreichen konstruktiven Vorschläge.

Für die sprachlichen Tipps danke ich ganz herzlich A. Schwetzler. —

Meiner Familie, meinen Eltern und meinen Geschwistern habe ich auch für ihre Großzügigkeit und ihre Geduld während der Erstellung dieser Arbeit zu danken. Ihnen bin ich sehr verbunden.

Ich danke ganz herzlich PD. Dr. Stefan Linder für seine ständige Ansprechbarkeit sowie seine nützlichen Tipps und Ratschläge.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Aepfelbacher. Ihm danke ich für seine ständige und engmaschige Betreuung meiner Arbeit, seine sachlichen und brillanten Vorschläge sowie seine Ansprechbarkeit und unerschöpfliche Geduld.

## 10. Lebenslauf

**Name:** Awa

**Vorname:** Abdul Aziz

**Geburtsdatum:** 03.03.1975

**Geburtsort:** Kabul

**Familienstand:** ledig

**Schule:**

1982-1986	Grundschule an der Bergmannstrasse, München
1986-1995	Dante Gymnasium, München
1995	Abitur

**Studium:**

1996-2003	Humanmedizin, LMU, München
2003	III. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung