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

UNTERSUCHUNGEN ZUR BETEILIGUNG PROAPOPTOTISCHER SIGNALWEGE AN DER YOPP - INDUZIERTEN APOPTOSE VON MAKROPHAGEN

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

vorgelegt von

Oliver Mannel
aus Buchholz in der Nordheide

Jahr
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. K. Ruckdeschel

Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Ostermann
	Priv. Doz. Dr. U. Wintergerst
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2006

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	INHALTSÜBERSICHT	1
2.	EINLEITUNG	2
2.1.	Die Gattung *Yersinia*	2
2.2.	Pathophysiologie und Klinik von Yersiniosen	2
2.3.	Pathogenese von *Yersinia enterocolitica* - Infektionen	3
2.4.	Der TypIII - Sekretionsapparat von Yersinien	5
2.5.	Die Effektorproteine von *Yersinia enterocolitica*	7
2.5.1.	Einfluss der Yops auf das Zytoskelett der Wirtszelle	7
2.5.2.	Einfluß der Yops auf die Produktion von Zytokinen und Chemokinen	8
2.5.3.	Die Funktion von YopM	9
2.6.	Apoptoseinduktion durch YopP / YopJ	9
2.7.	Zielsetzung	12
3.	MATERIAL UND METHODEN	13
3.1.	Material	13
3.1.1.	Geräte	13
3.1.2.	Chemikalien	13
3.1.3.	Reagenzien und Enzyme	14
3.1.4.	Bakterienstämm	16
3.2.	Zellkultur und Stimulationsbedingungen	17
3.3.	Konstruktion der Expressionsvektoren	18
3.3.1.	Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte	18
3.3.1.1.	Plasmidaufreinigung	18
3.3.1.2.	Restriktionsverdau des pcDNA - Vektors	20
3.3.1.3.	Isolation der Plasmid - DNS aus dem Agarosegel	20

3.3.1.4.	Konstruktion und Amplifikation der Insertions - DNS	21
3.3.1.4.1.	Prinzip der PCR	21
3.3.1.4.2.	Durchführung der PCR aus Bakterien	22
3.3.1.5.	Ligation des geschnittenen Vektors mit der Insertions - DNS	22
3.3.1.6.	Transformation des ligierten Vektors in Ca^{2+} - kompetente *E. coli* Bakterien	23
3.3.1.7.	Kontrolle des klonierten Gens	24
3.3.1.7.1.	Aufreinigung der Plasmid - DNS und Gelelektrophorese	24
3.3.1.7.2.	Restriktionsverdau und Gelelektrophorese	24
3.3.1.7.3.	PCR	25
3.3.1.8.	Sequenzierung	25
3.3.1.8.1.	Das Prinzip der DNS - Sequenzierung	25
3.3.1.8.2.	Arbeitsablauf der DNS - Sequenzierung	26
3.3.1.9.	Endotoxinfreie Plasmidaufreinigung	27
3.3.2.	ΔIRAK - M - Flag - Vektor	27
3.3.3.	YopP - myc - Vektor	30
3.4.	Transfektion	31
3.5.	Fluoreszenzmikroskopie	34
3.5.1.	Immunfluoreszenzfärbung	34
3.5.2.	TUNEL - Fluoreszenzfärbung	34
3.5.3.	Annexin – Färbung	35
4.	ERGEBNISSE	36
4.1.	YopP von *Y. enterocolitica* induziert Apoptose bei J774A.1 Makrophagen	36
4.1.1.	Allgemeiner Versuchsansatz	36
4.1.2.	Infektion von J774A.1 Makrophagen mit *Y. enterocolitica* - Stämmen	36
4.2.	NF-κB p65 und IKKβ schützen vor der durch Yersinien induzierten Apoptose	38
4.2.1.	Allgemeiner Versuchsansatz	38
4.2.2.	Infektion von transfizierten J774A.1 Makrophagen	38
4.2.3.	NF - κB p65 schützt nicht vor Apoptose durch *Salmonella typhimurium*	41

4.2.4.	Fazit	41
4.3.	LPS - Stimulation steigert die Fähigkeit von YopP, Apoptose bei J774A.1 Makrophagen zu induzieren.	42
4.3.1.	Allgemeiner Versuchsansatz	42
4.3.2.	Nachweis von intrazellulärem YopP bei transfizierten J774A.1 Makrophagen	42
4.3.3.	LPS - Stimulation transfizierter J774A.1 Makrophagen	43
4.3.4.	Nachweis von Apoptose durch TUNEL - Färbung	45
4.3.5.	Polymyxin B - Versuch	46
4.4.	Überexprimiertes NF - κB p65 transloziert in den Zellkern und schützt vor YopP und LPS induzierter Apoptose	48
4.4.1.	Allgemeiner Versuchsansatz	48
4.4.2.	NF - κB p65 - Überexpression im Transfektionsmodell	48
4.4.3.	Fluoreszenzfärbung von überexprimiertem NF - κB p65	49
4.4.4.	Fazit	51
4.5.	MyD88, nicht aber IRAK1 oder TRAF6, vermitteln Apoptose nach LPS - Stimulation einer MyD88 - IRAK - TRAF6 - abhängigen Signalkaskade	51
4.6.	IRAK2 induziert NF - κB - Aktivierung und apoptotischen Zelltod von Makrophagen	53
4.6.1.	Allgemeiner Versuchsansatz	53
4.6.2.	Analyse der Effekte von ΔIRAK1, ΔIRAK2 und ΔIRAK- M auf das zelluläre Überleben im Transfektionsmodell	53
4.6.3.	ΔIRAK1 und ΔIRAK2 im Infektionsversuch	54
4.6.4.	Analyse des Einflusses von ΔIRAK1 und ΔIRAK2 auf die nukleäre Translokation von NF - κB	55
4.6.5.	Fazit	57
4.7.	IRAK1 und TRAF6 sichern das Überleben von Makrophagen nach LPS -Exposition	57
4.8.	Der FADD / Caspase - 8 - Komplex ist an der *Y. enterocolitica* induzierten Apoptose beteiligt	59
4.8.1.	Einfluss von Caspaseinhibitoren auf die Yersinien – induzierte Apoptose	59

4.8.2. Einfluss von ΔFADD auf das zelluläre Überleben im Transfektionsmodell 60

5. DISKUSSION

5.1. YopP von *Y. enterocolitica* induziert bei Makrophagen Apoptose durch Inhibition der NF - κB Aktivierung 62

5.2. LPS - abhängige Signale verstärken die Induktion von Apoptose bei Inhibition der NF - κB - Aktivierung. 63

5.3. Die Auftrennung der Apoptose - verhindernden und induzierenden Signale nach LPS - Stimulation erfolgt auf Höhe der IRAKs. 64

5.4. Der FADD / Caspase - 8 - Komplex ist an der *Y. enterocolitica* - induzierten Apoptose beteiligt 67

5.5. Diskussion neuerer Erkenntnisse 68

6. ZUSAMMENFASSUNG 71

7. LITERATURVERZEICHNIS 72

1. INHALTSÜBERSICHT

Die Exposition von Makrophagen gegenüber Bakterien oder LPS führt über die Aktivierung zellulärer Signalkaskaden zu einer vermehrten Expression von Genen, deren Proteinprodukte zelluläres Überleben unter Infektionsbedingungen ermöglichen. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF - κB spielt dabei eine wichtige Rolle. Pathogene *Yersinia enterocolitica* - Stämme hemmen die Aktivierung von NF - κB und induzieren Apoptose bei Makrophagen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das *Yersinia* - Effektorprotein YopP maßgeblich an der Apoptoseinduktion beteiligt ist. Bei Infektionsversuchen konnten lediglich die Yersinienstämme bei Makrophagen Apoptose induzieren, die über einen funktionstüchtigen Typ III - Sekretionsapparat und ein dadurch transloziertes YopP verfügen. Eine transiente Überexpression der transkriptionell aktiven NF - κB - Untereinheit p65 schützt Makrophagen spezifisch vor durch Yersinien, nicht jedoch vor durch Salmonellen induzierter Apoptose. Das weist darauf hin, dass YopP durch die Blockierung des NF - κB aktivierenden Signalwegs Apoptose bei Makrophagen vermittelt. Die Transfektion von J774A.1 Makrophagen mit YopP induzierte bei 40 - 50% der transfizierten Zellen Apoptose. Durch die zusätzliche Stimulation mit LPS konnte die Apoptoserate auf 80 - 90% gesteigert werde. Dieser synergistische, proapoptotische Effekt ist direkt auf durch LPS induzierte Signaltransduktions - prozesse zurückzuführen. Aus Transfektionsversuchen mit dominant - negativen Signalmolekülen der TLR - Signalkaskade ergaben sich Hinweise auf eine Beteiligung der Transmitter MyD88 und IRAK2 an der Apoptoseeinleitung. IRAK1 und TRAF6 scheinen dagegen eher ein antagonistisches, NF - κB aktivierendes LPS - Signal zu bedienen, welches unter dem Einfluss von YopP unterdrückt wird. Dadurch überwiegt das durch LPS induzierte, proapoptotische Signal, welches den apoptotischen Zelltod einleitet. Die Aktivierung des Apoptoseprogramms selbst erfolgt über FADD und Caspase - 8.

2. EINLEITUNG

2.1. Die Gattung *Yersinia*

Die Gattung *Yersinia* gehört zur Familie der *Enterobactericeae.* Sie kann in elf Spezies unterteilt werden. Lediglich *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* sind als humanpathogen einzustufen und haben als Erreger der Pest bzw. als Erreger von gastrointestinalen Infekten medizinische Bedeutung (Cover et al. 89). Erst 1964 erhielt die Yersinie ihren heutigen Namen zu Ehren des schweizer Bakteriologen A. Yersin, der die Bakterien bereits 1894 als Erreger der Hong Kong - Pest identifizierte. Yersinien sind gramnegative Stäbchen, fakultativ anaerob und unbekapselt. Im Gegensatz zu *Y. pestis*, sind die enteropathogenen Yersinien bei 22 - 28°C peritrich begeißelt und mobil. Ihr Wachstumsoptimum erreichen sie bei 28°C, wobei Yersinien auch bei Temperaturen zwischen 43°C und 4°C in der Lage sind, sich zu vermehren (Bottone 97).

2.2. Pathophysiologie und Klinik von Yersiniosen

Y. pestis wird in der Regel durch Flohbisse auf den Menschen übertragen und gelangt so in lokale Lymphknoten, wo sich die Bakterien vermehren. Über die Blutbahn disseminieren sie anschließend in andere Organe, wie zum Beispiel in die Lunge, und verursachen systemische Erkrankungen, die bis zum Tode führen können.

Y. pseudotuberculosis und *Y. enterocolitica* treten als Erreger von gastrointestinalen Krankheitsbildern unterschiedlicher klinischer Ausprägung in Erscheinung. Beim Menschen stellt das Hausschwein, welches häufig mit *Y. enterocolitica* kolonisiert ist, das Haupterregerreservoir für den peroralen Infektionsweg dar. *Y. pseudotuberculosis* hat hauptsächlich Nagetiere zum Wirt (Bottone 97). Die gramnegativen Stäbchen gelangen über kontaminierte Lebensmittel in den Magendarmtrakt, wo sie schließlich über die sogenannten M - Zellen der Schleimhautmukosa per Transzytose aufgenommen werden. Die Yersinien erreichen so das lymphatische Gewebe des Darms, auch Peyer´sche Plaques genannt. Dort

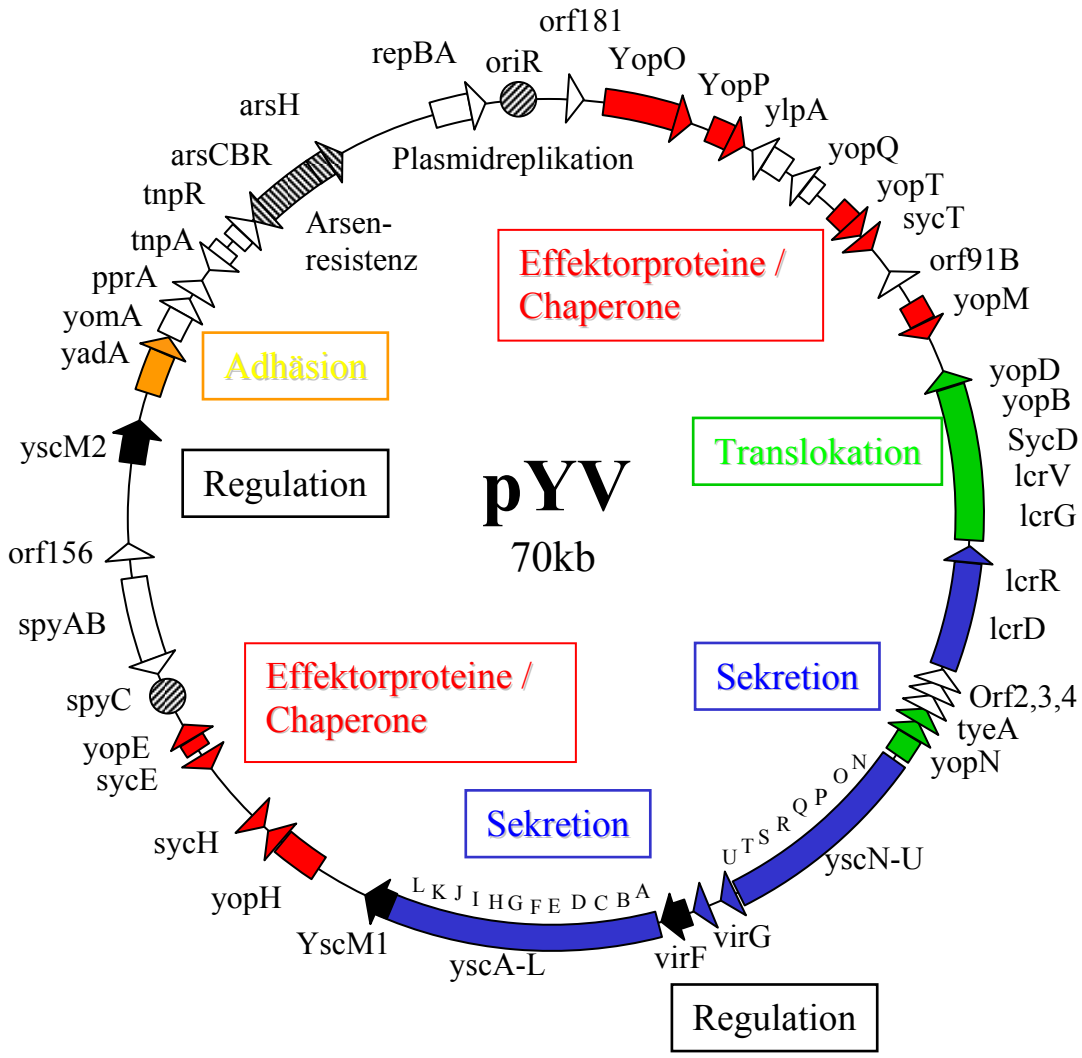
werden sie mit der unspezifischen Immunantwort des Wirtes konfrontiert und rufen eine Entzündungsreaktion hervor (Autenrieth et al. 96). Je nach Immunstatus des Wirtes bleibt die Infektion lokal begrenzt und heilt nach wenigen Tagen selbständig ab. Selten kommt es zu Bakteriämien mit septischen Verlaufsformen. Bei Kleinkindern beobachtet man nach einer Inkubationszeit von zwei bis drei Tagen häufig eine blutige Diarrhö, zum Teil begleitet von Fieber, Bauchschmerzen und Übelkeit. Bei immunkompetenten Erwachsenen äußert sich die Infektion infolge einer terminalen Iliitis oder Lymphadenitis oft als „Pseudoappendizitis“ mit unspezifischen abdominellen Beschwerden. Einige Wochen nach der Infektion kann es zu extraabdominellen Symptomen, wie reaktiver Monarthritis, Erythema nodosum, Reitersyndrom, Glomerulonephritis oder Neuropathien kommen (Bottone 97). In der Regel ist die Erkrankung selbstlimitierend und bedarf keiner antibiotischen Therapie. Nur bei systemischen Verläufen und Komplikationen ist eine Therapie mit Tetrazyklin, Cotrimoxazol, Gyrasehemmern oder Cephalosporinen der dritten Generation angezeigt (Hoogkamp - Korstanje et al. 92).

2.3. Pathogenese von *Yersinia enterocolitica* - Infektionen

Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis und *Y. pestis* besitzen eine Vielzahl gemeinsamer Virulenzfaktoren, deren Gene auf einem 70 Kb großen Plasmid (*pYV,* s. Abb.1) lokalisiert sind. Einige andere Virulenzfaktoren sind chromosomal kodiert. *Yersinia* - Virulenzfaktoren sind zum einen Adhäsions- und Invasionsproteine, wie z.B. YadA (plasmidkodiert) oder Invasin (chromosomal). Diese Proteine sind für die Anlagerung der Bakterien an Epithelzellen, bzw. die Vermittlung von Invasion über die Bindung an β_1 - Integrine verantwortlich. So gelingt es Yersinien, die Darmmukosa zu überwinden und sich im lymphatischen Gewebe anzusiedeln. Dort findet die Konfrontation mit der Immunabwehr des Wirtes statt. Das Virulenzplasmid pYV kodiert für ein so genanntes Typ III - Proteinsekretionssystem. Mit Hilfe des Typ III - Sekretionsapparats sezernieren Yersinien Effektorproteine, die so genannten Yops (***Y****ersinia* **o**uter **p**roteins), in das Zytosol von Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten (Cornelis et al. 98). Diese Yops beeinflussen die Funktion des eukaryontischen Zytoskeletts und verhindern dadurch die Phagozytose der Bakterien (Bliska et al. 95, Fallman et al. 95, Persson et al. 97, Rosqist et al. 90,

Visser et al. 95). Außerdem hemmen sie die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Adhesionsmolekülen (Schulte et al. 96, Palmer et al 98, Boland et al. 98, Denecker et al. 02). Diese Mechanismen ermöglichen Yersinien das extrazelluläre Überleben und die Vermehrung im lymphatischen Gewebe der Peyer´schen Plaques (Simonet et al. 90).

Abb. 1: pYV - Virulenzplasmid von *Yersinia enterocolitica*



Schematische Darstellung des 70 kb großen pYV - Plasmids. Die Pfeile zeigen die Richtung der Gentranskription. Rot dargestellt sind die sechs Effektor - Yops (***Yersinia* outer proteins**) mit den zugehörigen Syc - Chaperonen (Syc = **s**pezific ***Yersinia* c**haperones). Mit Blau sind alle Gene markiert, die für Strukturproteine des

Typ III - Sekretionsapparats kodieren (***Y****ersinia* **s**e**c**retion). Die grünen Pfeile zeigen die an der Translokation beteiligten Gene. YopN, tyeA (**t**ranslocation ***Y****ersinia* **e**ffector) und LcrG (**l**ow **c**alcium **r**esponse) verschließen bei fehlendem Zellkontakt den Sekretionsapparat und hemmen die Yop - Expression. Bei einer Temperatur von 37°C, wie sie im Wirtsorganismus vorherrscht, induziert der Transkriptionsaktivator virF (**vir**ulence) die Synthese der Effektorproteine. Der Suppressor YscM unterdrückt die Yop - Synthese bei geschlossenem Sekretionskanal. Ars (**a**rsenite **r**e**s**istence), oriR (**ori**gin of **r**eplication), spy (**s**tabilisation **p**lasmid ***Y****ersinia*).

2.4. Der Typ III - Sekretionsapparat von Yersinien

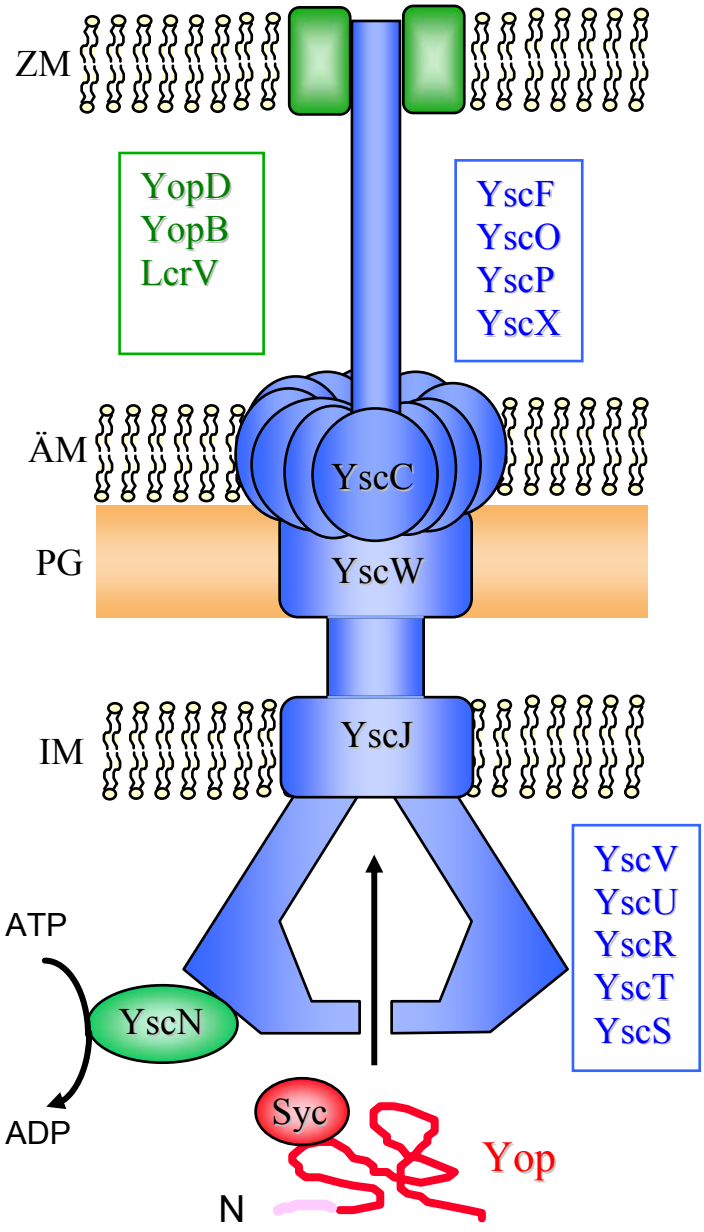
Wie viele andere gramnegative Bakterien (z.B. Salmonellen, Shigellen, Pseudomonaden) besitzen Yersinien einen Typ III - Sekretionsapparat, der es ihnen ermöglicht, durch Injektion von Effektorproteinen die Abwehrfunktion von Wirtszellen zu beeinflussen (Cornelis et al. 98).

Der Sekretionsapparat (Ysc) besteht aus einem Basalkörper, welcher in den Bakterienmembranen und in der Peptidoglykanschicht verankert ist, sowie einer außerhalb des Bakteriums befindlichen, nadelähnlichen Struktur (Kulbori et al. 98, Blocker et al. 01, Kimbrough et al. 97, Kubori et al. 00, Hoiczyk et al. 01). Am proximalen Ende des Basalkörpers befindet sich eine Proteinpumpe, an deren Antrieb maßgeblich eine als YscN bezeichnete ATPase beteiligt ist (Woestyn et al. 94). Ein Polymer des Proteins YscC bildet am äußersten Ende des Basalkörpers eine ringartige Struktur mit einer zentralen Pore von 50 Å (Koster et al. 97). Die Nadel selbst besteht aus Polymeren des Proteins YscF und hat einen Innendurchmesser von 20 Å (Hoiczyk et al. 01). Der gesamte Sekretionsapparat kann zwar Proteine aus der Bakterienzelle in die Umgebung sezernieren, für die Translokation ins Zytosol einer eukaryontischen Zelle bedarf es jedoch zusätzlich der Translokationsproteine YopB, YopD und LcrV. Diese hydrophoben Proteine bilden eine Pore in der Wirtszellmembran, durch welche die Effektor - Yops in die Wirtszelle eingeschleust werden. Ihre genaue Funktionsweise und wie sie mit dem Sekretionsapparat selbst interagieren ist bis dato noch nicht bekannt.

In vitro ist der Sekretionsmechanismus durch Ca^{2+} - Entzug bei 37°C artifiziell induzierbar. In vivo findet die Freisetzung der Yops erst nach Kontakt des Bakteriums

mit der Zielzelle statt (Petterson et al. 96). Durch den Zellkontakt, oder möglicherweise auch rezeptorvermittelt, wird das Lumen des Sekretionsapparats für die Effektorproteine passierbar gemacht. An diesem Prozess sind ursächlich drei Proteine beteiligt, nämlich YopN, TyeA und LcrG (Rosqvist et al. 94, Forsberg 91, Skryzpek 93). Für den Transport durch den Austrittskanal benötigen einige der Yops zusätzlich die Hilfe spezieller Chaperone (Syc), deren Gene ebenfalls pYV - Plasmid kodiert sind, sowie eine N - terminale Erkennungssequenz.

Abb. 2: Schematische Darstellung des Typ III - Sekretionsapparats



Der Basalkörper des Sekretionsapparats wird über die Lipoproteine YscC, YscW und YscJ in der Peptidoglykanschicht (PG), sowie der äußeren und inneren Plasmamembran (ÄM,IM) verankert. Der proximale Teil wird durch die Proteine YscV, YscU, YscT und YscS gebildet. YscN dient als ATPase der Proteinpumpe. Die Nadel besteht neben YscO, YscP und YscX hauptsächlich aus polymerisiertem YscF. Die hydrophoben Proteine YopB, YopD und LcrV wirken als Translokationsproteine. Die Yop - Effektorproteine werden, zum Teil intrabakteriell zunächst noch chaperongebunden stabilisiert, mit der N - terminalen Erkennungssequenz voran sezerniert.

2.5. Die Effektorproteine von *Yersinia enterocolitica*

Außer den bereits erwähnten Struktur- und Regulatorproteinen des Typ III - Sekretionsapparats, dem YadA - Adhäsin und den Translokationsproteinen, sind sechs Effektorproteine virulenzplasmidkodiert: YopE, YopT, YopO (YpkA bei *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*), YopH, YopM, YopP (YopJ bei *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*). Diese Yops werden sezerniert und in die Zielzelle transloziert, um dort direkt zellinterne Funktionen und Abläufe zu beeinflussen.

2.5.1. Einfluß der Yops auf das Zytoskelett der Wirtszelle

YopH, YopE, YopT und YopO / YpkA blockieren gemeinsam die Phagozytose von Makrophagen und PMN´s. Die vier Yops interagieren auf unterschiedlichen Ebenen mit Signaltransduktionsprozessen, welche die Dynamik des Aktinzytoskeletts regulieren. Dadurch ergänzen sie sich synergistisch in ihren Funktionen.
YopH wirkt als Phosphotyrosinphosphatase (PTPase) (Zhang et al. 92). YopH dephosphoryliert das Adhäsionsprotein $p130_{cas}$ und die fokale Adhäsionskinase FAK, wodurch die, an der Phagozytose beteiligten, fokalen Zellbindungen zerstört werden (Hamid et al 99). Darüberhinaus dephosphoryliert YopH bei Makrophagen das Fyn bindende Protein (Fyb) und das Strukturprotein SKAP - HOM (Black et al. 00). Über diese Mechanismen gelingt es Yersinien, die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen zu beeinträchtigen. Eine Deletion der Aminosäuren 223 - 226 im katalytischen Zentrum von YopH zerstört dessen antiphagozytäre Eigenschaft (Persson et al. 99).
YopE, YopT und YopO / YpkA inhibieren die Phagozytose durch Interaktion mit den sogenannten Rho - GTPasen. Diese nur in eukaryontischen Zellen vorkommenden GTPasen fungieren als molekulare Schalter in wichtigen Zellabläufen und sind in Abhängigkeit von GTP - oder GDP - Bindung ein-, bzw. ausgeschaltet. Der Austausch der Nukleotide erfolgt durch spezifische Regulatoren, die GTPase aktivierenden Proteine (GAPs) und die „Guanine nucleotide exchange“ - Faktoren (GEFs). Für die Rho - GTPasen sind zytoskelettassoziierte Funktionen bekannt. YopE besitzt, ähnlich wie eukaryontische GAP Proteine, einen so genannten

Argininfinger und hat die Fähigkeit, die Rho - GTPasen Rho, Rac und Cdc42 durch GAP - Aktivität auszuschalten. Dadurch verhindert YopE Phagozytose (Black et al. 00, Von Pawel - Rammingen et al. 00, Andor et al. 01).
YopT ist eine Cysteinprotease, welche die Rho - GTPasen am Carboxylende prozessiert (Shao et al 02). Dadurch verlieren die GTPasen die Fähigkeit zur Bindung an die Zytoplasmamembran, welche für deren Funktion essentiell ist. Durch seine enzymatische Aktivität verursacht YopT eine Depolymerisation des Aktinzytoskeletts (Iriatre et al 98).
YopO / YpkA ist eine autophosphorylierende Serin / Threonin - Kinase, die durch Aktin oder andere eukaryontische Faktoren aktiviert wird (Galyov et al 93). Sie interagiert mit RhoA und Rac1 und wirkt modulierend auf Abläufe des Zytoskeletts ein (Barz et al 00, Dukuzumuremyi et al 00). Offensichtlich spielt YopO / YpkA eine Rolle in der Phagozytoseinhibition, die genauen Zusammenhänge sind bis dato jedoch noch nicht geklärt.

2.5.2. Einfluß der Yops auf die Produktion von Zytokinen und Chemokinen

YopP / YopJ und YopH hemmen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen.
YopP bzw. das, dazu homologe YopJ von *Y. pseudotuberculosis und Y. pestis,* blockiert die Aktivierung der mitogen - aktivierten Proteinkinasen (MAPKinasen) JNK, p38, ERK1, ERK2 und des Transkriptionsfaktors NF - κB (Orth et al. 99, Ruckdeschel et al. 98). Die Inhibition dieser Signalwege der angeborenen Immunantwort führt zur verminderten Ausschüttung von TNFα und Interleukin - 8 (Ruckdeschel et al. 97a, Palmer et al. 98, Boland et al. 98, Schesser et al. 98) und zudem zum Zelltod von Makrophagen durch Apoptose (Monack et al. 97, Ruckdeschel et al. 97b, Mills et al. 97). Vermutlich besitzt YopP / YopJ eine Proteaseaktivität, da es Sequenzhomologien zu der “ubiquitin - like“ Protease (Ulp1) von Hefen aufweist. In transfizierten Zellen reduziert YopP / YopJ die intrazelluläre Konzentration des ubiquitinähnlichen Moleküls SUMO1 (Orth et al 00). Ein definiertes zelluläres Substrat für die postulierte proteolytische Aktivität von YopP / YopJ konnte bisher jedoch noch nicht identifiziert werden.

Die immunsupprimierende Eigenschaft von YopH beruht auf der Hemmung der Synthese des „Monocyte chemoattractant“ Protein 1 (MCP1) bei infizierten Makrophagen (Sauvonnet et al. 02). Dadurch unterbleibt die durch MCP1 vermittelte Rekrutierung von Makrophagen in infizierten Lymphknoten. Ferner interferiert YopH mit T - und B - Zellrezeptor - induzierten Signaltransduktionsprozessen von Lymphozyten. Dadurch wird bei Antigenexposition die zu erwartende Zytokinproduktion unterdrückt (Yao et al. 99).
Auch das bereits oben beschriebene, als Translokationsprotein wirkende LcrV hat eine immunsupprimierende Aktivität. LcrV induziert die Sekretion von Interleukin 10 bei Makrophagen. Interleukin 10 wiederum hat einen hemmenden Effekt auf die Produktion von TNFα (Nakajima et al. 95, Sing et al. 02).

2.5.3. Die Funktion von YopM

YopM ist ein saures Protein mit multiplen, leucinreichen Sequenzen. Multimere dieses Moleküls bilden einen Hohlzylinder mit einem Innendurchmesser von 35 Å (Evdokimov et al. 01). Die genaue Funktion von YopM konnte bisher noch nicht geklärt werden. Mausinfektionsversuche konnten aber zeigen, dass YopM ein wichtiger Pathogenitätsfaktor ist (Leung et al. 90, Mulder et al. 89). YopM wird ins Zytosol transloziert und gelangt von dort in den Zellkern, wo es die Transkription von Genen inhibiert, die den Zellzyklus, das Zellwachstum und die Zellproliferation steuern (Skrzypek et al. 98, Boland et al. 96).

2.6. Apoptoseinduktion durch YopP / YopJ

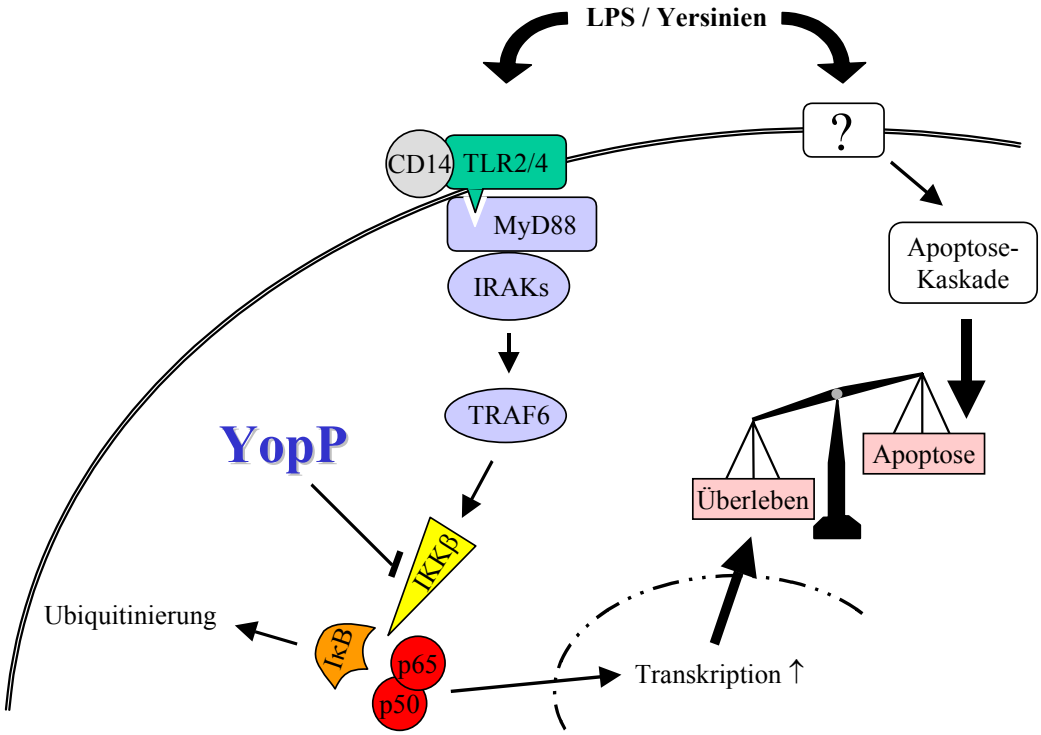
Apoptose ist ein physiologischer, genetisch determinierter, aktiver Selbstzerstörungsprozess von Zellen, der in der Ontogenese und Homeostase von mehrzelligen Organismen eine wichtige Rolle spielt. Bei der Apoptoseinduktion durch unterschiedliche extra - oder intrazelluläre Stimuli werden komplexe Signalkaskaden aktiviert, die zur Aktivierung der so genannten Caspasen führen. Caspasen sind Cysteinproteasen, welche für den Vollzug des Apoptoseprogramms verantwortlich sind (Hengartner, M. O. 00).

Andererseits existieren auch apoptosegegenregulierende Signaltransduktionswege. Eine entscheidende Rolle spielt dabei der Transkriptionfaktor NF - κB (Hatada et al. 00, Baichwald et al. 97). Im Zytosol liegt NF - κB im inaktiven Zustand im Komplex gebunden an IκB - α oder IκB -β vor. Wird die Zelle beispielsweise durch LPS, TNF - α, Interleukin 1, virale Infektion, UV - Strahlung oder andere Stimuli aktiviert, werden die IκB - Inhibitoren durch den so genannten IκB - Kinase - Komplex (IKK - Komplex) phosphoryliert und über den Ubiquitin - Proteasom - Weg abgebaut (Baichwal et al. 97, Wang et al. 96, Liu et al. 96, Natoli et al. 98). Das hierdurch freigesetzte Heterodimer NF - κB, bestehend aus den Untereinheiten p50 und p65, kann nun in den Zellkern wandern und dort die Transkription von Genen einer Vielzahl von Entzündungsmediatoren (z.B. TNF - α, IL - 1, IL - 6, IL - 8, GM - CSF), sowie von antiapoptotischen Proteinen (z.B. IAPs, TRAFs, Moleküle der Bcl - 2 - Familie) hochregulieren (Chu et al. 97, Wang et al. 98, Chen et al. 00, Perkins et al. 00). Die antiapoptotischen Proteine wirken einer Aktivierung des Apoptoseprogramms durch gleichzeitig induzierte proapoptische Signale entgegen. Auf diese Weise vermittelt NF - κB zelluläres Überleben.
Bei der bakteriellen Infektion von Makrophagen erfolgt die Aktivierung von NF - κB nach Bindung von LPS an den Transmembranrezeptor TLR4 (“Toll - like – Receptor“). Daraufhin interagiert das Adapterprotein MyD88 (“myeloid differentiation factor 88“) mit der zytoplasmatischen Rezeptordomäne und rekrutiert Proteine, die zur Familie der IL - 1R assoziierten Kinasen (IRAK) gehören (IRAK1, IRAK2, IRAK-M, IRAK4). Die IRAKs aktivieren über den TNFR assoziierten Faktor 6 (TRAF6) und die TGF - β aktivierte Kinase 1 den IKK - Komplex und schließlich NF - κB (Aderem et al 00, Anderson et al. 00, Brightbill et al. 00, Medzhitov et al. 00, Zhang et al. 01).

Verschiede Bakterien können das Gleichgewicht von Apoptose und Antiapoptose stören und den Zelltod der Wirtszelle hervorrufen. Yersinien induzieren Apoptose primär bei Makrophagen, nicht aber bei epithelialen Zellen. An der Apoptoseinduktion durch Yersinien ist das Effektorprotein YopP / YopJ essentiell beteiligt (Monack et al. 97). YopP / YopJ blockiert selektiv die IκB - Kinase IKKβ und inhibiert somit die Aktivierung von NF - κB (Ruckdeschel et al. 01). Dadurch gelingt es den Yersinien die proinflammatorischen und die antiapoptotischen Funktionen von NF - κB zu inhibieren. Die antiapoptotische Funktion von NF - κ B scheint für das Überleben von

Makrophagen bei der bakteriellen Infektion essentiell zu sein. So konnte gezeigt werden, dass Makrophagen, die in ihrer NF - κB - Aktivierung beeinträchtigt sind, nach Konfrontation mit Bakterien oder Stimulation mit LPS apoptotisch werden (Kitamura et al. 99, Navarre et al. 00, Ruckdeschel et al. 98 und 01). Das spricht dafür, dass LPS bei Makrophagen Apoptose induzierende Signalwege aktiviert, welche bei einer gleichzeitigen Hemmung der NF - κB - Aktivierung Zelltod herbeiführen. Da YopP / YopJ die NF - κB - Aktivierung durch Interaktion mit IKKβ blockiert, erfolgt die Aktivierung des proapoptotischen Weges offenbar oberhalb des IKK - Komplexes oder abseits der TLR - NF-κB - Signalkaskade.

Abb. 3: Yersinien - induzierte Apoptose



Die Konfrontation mit Yersinien induziert bei Makrophagen sowohl proapoptotische Signale, als auch den antiapoptotischen NF - κB - Signalweg. YopP / YopJ blockiert die Aktivierung von NF - κB. Dadurch überwiegt das zytotoxische Signal, welches Apoptose herbeiführt.

2.7. Zielsetzung

Zunächst sollte durch Infektionsversuche mit Yersinienstämmen, die sich in der Fähigkeit, YopP zu exprimieren und zu translozieren, unterscheiden, die Rolle von YopP bei der Apoptoseinduktion durch *Yersinia enterocolitica* verifiziert werden. (*Induziert YopP Apoptosen?*)

Durch Transfektionsexperimente mit NF - κB - Expressionsvektoren sollte auf Einzelzellebene untersucht werde, ob die durch YopP verursachte Blockade der NF - κB Aktivierung und die Induktion von Apoptose in einem kausalen Zusammenhang stehen. *(Induziert YopP Apoptose durch NF - κB - Inhibition?)*

Des Weiteren sollte das Gen für YopP in einen eukaryontischen Expressionsvektor gebracht werden, um damit Mausmakrophagen zu transfizieren. Hierdurch sollte untersucht werden, ob YopP alleine programmierten Zelltod einleiten kann oder ob weitere Yersinien - Faktoren, wie beispielsweise LPS, dazu benötigt werden. *(Genügt YopP alleine, um Apoptose zu induzieren, oder werden dazu Kofaktoren benötigt?)*

Schließlich sollte der proapoptotische Signalweg, der durch Yersinien aktiviert wird, charakterisiert werden. *(Wie signalisieren Yersinien Apoptose?)*

Die aus diesen Untersuchungen gewonnen Ergebnisse sollten zu einem besseren Verständnis der durch Yersinien induzierten Apoptose beitragen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Photometer:	Ultraspec 300 von Pharmacia Biotech
Zentrifugen:	5417R von Eppendorf; 3K18 von Sigma; Megafuge 3.0R von Kendro (Platenzentrifuge); RC5C Kendro (Ultrazentrifuge)
Mikroskope:	Axiovert 25 von Zeiss (Phasenkontrast) TCSNT von LEICA (Confocal-Laser)
Reagenzglasschüttler:	Certomat von B. Braun Biotech International
Heizschüttler:	Thermomixer compact von Eppendorf
UV - Licht - Kamera:	E.A.S.Y. RH und UVT 20 M / W von Herolab
Zellkultur:	Nunclon Surface von Brand (24 - Kammerplatten und Zellkulturflaschen); Bluemax 50 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen) conical tube
Thermocycler:	GeneAmp PCR-System 2400 von Perkin elmer
Gleichstromgerät:	Powerpac 200 von Bio Rad
Elektrophoresekammer:	Mini Agagel Biometra
Brutschrank:	Heraeus BBD6220 von Kendro
Pipetten:	Pipetman von Gilson
Pipettierhilfe:	accu – jet von Brand
Waage:	BL1500S von Satorius
Vortex - Mischer:	Vortex Genie 2 von Scientific Industries

3.1.2. Chemikalien

Hefeextrakt , Bacto - Agar: BD Biosciences, Heidelberg.

X - Gal (5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyt - β - D - Galaktose): AppliChem GmbH, Darmstadt.

BSA (Rinderserumalbumin), FBS (fetales Rinderserum), FCS (fetales Kälberserum), EDTA: BIOMOL, Hamburg.

Bactro - Trypton, Essigsäure, Ethanol, Formaldehyd, Glutaraldehyd, Glycerin: Carl Roth GmbH, Karlsruhe.

D - Glaktose, Ethidiumbromid, Agarose, Bromphenolblau, Penicillin, Streptomycin, TritonX - 100, Trisbase, HEPES, $MgCl_2$ (Magnesiumchlorid), NaCl (Natriumchlorid): Sigma, Steinheim.

dTTP, dGTP, dATP, dCTP, SDS: PeQlab Biotechnologie GmbH, Erlangen.

NP - 40 (Ethylphenylpolyethylenglycol): ICN Biomedicals, Niederlande.

RPMI 1640 Medium, PBS (Phosphate buffered saline), L - Glutamin,: Gibco, Eggenstein.

Natriumacetat, NaH_2PO_4, Na_2HPO_4, H_3PO_4, Natronlauge, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Calciumchlorid, DABCO (Triethylendiamin), TRIS - HCl: Merck, Darmstadt.

Mowiol: Calbiochem, Schwalbach/Taunus.

3.1.3. Reagenzien und Enzyme

Ethidiumbromidfärbung:	1 mg Ethidiumbromid in 500 ml Aqua demin.
Luria - Bertani - Bouillon:	10 g Trypton + 5 g Hefeextrakt + 5 g NaCl in 1 Liter dd H_2O (pH 7,4 - 7,6); für Agarplatten zusätzlich 15 g Bacto-Agar pro Liter
Zellkulturmedium:	RPMI 1640 (Invitrogen) + 50 ml FCS + 5 ml Glutamin + 5 ml Penicillin (100 µg/ml) / Streptomycin (20 µg/ml).
Elektrophoresepuffer TAE:	282 g Trisbase, 57,1 ml 96% Essigsäure, 200 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) in 50 Liter dd H_2O
Agarosegel:	7 - 15 g Agarose pro Liter TAE
X - Gal - Fixierlösung:	5,4 ml 37% Formaldehyd, 1 ml 25% Glutaraldehyd, 200 µl 1 M $MgCl_2$, 200 µl 10% TritonX - 100, PBS auf 100 ml
X - Gal - Färbung:	800 µl 1 M Na_2HPO_4, 200 µl 1 M NaH_2PO_4, 13 µl 1M $MgCl_2$, 1ml 750 mM D-Galaktose (in Aqua dest.), 600 µl 100 mM Redoxpuffer, 500 µl 2% X - Gal (in DMF), 20 µl 10% TritonX - 100 (in DMF), dd H_2O auf 10 ml
Mowiol - Lösung:	2,4 g Mowiol, 5 ml Glycerin, 6 ml dd H_2O, 12 ml 0,2 M TRIS (pH 8,5), 1g DABCO

Annexin - Puffer:	100 mM HEPES pH 7,5, 140 mM NaCl, 2,5 mM $CaCl_2$ (Sigma)
Annexin - Cy3 :	1 µg / ml Annexin - Puffer (Sigma)
Taq - Mix:	dNTP - Mix: je 20 µl 100 mM dTTP, dGTP, dATP, dCTP, dd H_2O auf 1000 µl
Stop - Mix:	50 ml Glycerin, 0,2 ml 0,5M EDTA, 250 mg Bromphenolblau, ad 100 ml dd H_20
DNS - Marker:	200 µl (= 100 µg) Lambda DNS - HindIII - Marker (Amersham pharmacia biotech), 600 µl Auqua dest., 200 µl Stop - Mix
S1 - Puffer:	50 mM Tris / HCl, 10 mM EDTA, 100 µg RNAse A / ml, pH 8,0
S2 - Puffer:	200 mM NaOH, 1 % SDS
S3 - Puffer:	2,8 M KAc, pH 5,1
N2 - Puffer:	100 mM Tris / H_3PO_4, 15 % Ethanol, 900 mM KCl, pH 6,3, 0,15 % TritonX - 100
N3 - Puffer:	100 mM Tris / H_3PO_4, 1150 mM KCl, pH 6,3
N5 - Puffer:	100 mM Tris / H_3PO_4, 1000 mM KCl, pH 8,5
Gel - Extraktion:	QIAquick Gel - Extraction - Kit (Qiagen GmbH);
TUNEL - Enzymlösung:	terminale Desoxynucleotidtransferase, 200 mM Kakodylsäure, 200 mM KCl, 1 mM EDTA, 4 mM β-Merkaptoethanol, 50 % Glycerin, pH 6,5 (Roche)
TUNEL - Färbelösung:	Fluoreszein - dUTP, dNTP, 200 mM Kaliumkakodylat, 25 mM Tris - HCl, 1 mM $CoCl_2$, 0,25 mg / ml Rinderserum-albumin (Roche)
Taq - Polymerase:	Taq - Pfu - DNS - Polymerase, New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Restriktionsenzyme:	XhoI, SalI, XbaI, EcoRI, Gibco
Ligase:	T4 - DNS - Ligase, Gibco

3.1.4. Bakterienstämme

Alle für die Infektionsversuche benutzten *Yersinia enterocolitica* Stämme (Tab. 1) wurden routinemäßig in 0,5 ml Luria - Bertani Bouillon (LB) bei 26°C über Nacht angezüchtet. Um ein unspezifisches Wachstum von Fremdkeimen durch Verunreinigung zu verhindern, wurde dem LB - Medium das jeweilige Antibiotikum, für das der anzuzüchtende Stamm ein Resistenzgen besitzt, zugegeben. Am nächsten Tag wurden die Übernachtkulturen noch einmal im Verhältnis 1 : 20 mit frischem LB - Medium verdünnt und für weitere 2 Stunden bei 37°C bebrütet, um so die Yop - Expression zu induzieren. Um die Bakterien in diesem aktivierten Zustand zu konservieren, wurde bei allen jetzt folgenden Schritten bis hin zur Infektion bei 4°C oder auf Eis gearbeitet. Nachdem die Bakterien 3 Minuten bei 15.000 U / min. abzentrifugiert worden waren, wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde mit PBS resuspendiert. Durch Verdünnung und Messung der optischen Dichte im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm wurde eine, für alle Infektionsversuche identische, Konzentration von 10^9 Bakterien / ml eingestellt. Zur Kontrolle der bestimmten Bakterienkonzentration wurden die Proben verdünnt und auf LB - Agarplatten ausplattiert und bei 26 °C für 20 Stunden bebrütet. Anschließend wurden die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) ausgezählt.

Tabelle 1: Verwendete *Yersinia enterocolitica* - Stämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz
WA-314	Wildtypstamm; Serotyp O8; klinisches Isolat mit dem Virulenzplasmid pYVO8	Heesemann et al. 87
WA-C	plasmidloses Derivat von WA-314	Heesemann et al. 87
WA314Δ*yopP*	YopP - negative Mutante; insertionsinaktiviertes *yopP* - Gen	Ruckdeschel et al. 01
WA314Δ*yopP/P*$^+$	mit *yopP* komplementierter WA314Δ*yopP*-Stamm; sezerniert YopP	Ruckdeschel et al. 00
WA-C-pLCR	besitzt das Plasmid pLCR, das nur für den Sekretion- und Translokationsapparat von *Y. enterocolitica* und das Adhesin YadA kodiert	Ruckdeschel et al. 00
WA-C-pLCR*yopP*	WA-C-pLCR mit einem zusätzlichem, für *yopP* kodierende Plasmid; sezerniert YopP	Ruckdeschel et al. 00

Die verwendeten *Salmonella typhimurium* Stämme wurden bei 37°C über Nacht in 5 ml LB angezüchtet. Dann wurden 50 µl dieser Übernachtkultur in 5 ml frischem LB verdünnt und bis zum Erreichen einer frühen stationären Wachstumsphase, bei regelmäßiger Messung der optischen Dichte im Photometer, bebrütet. In dieser Wachstumsphase, die ab einer optischen Dichte von 1, nach etwa 4 - 5 Stunden erreicht wurde, ist die Fähigkeit der Salmonellen, Apoptose zu vermitteln, am größten (Lundberg et al. 99). Im Folgenden wurden die Bakterien, wie bereits oben beschrieben, bei 4°C gewaschen und bis zur gewünschten Konzentration mit PBS verdünnt. Es wurden zwei Wildtypstämme, nämlich ATCC14028 und SL1344, respektive ihrer Mutanten, bezüglich ihrer Apoptose induzierenden Eigenschaften analysiert. Der von der Salmonellen - Pathogenitätsinsel 1 (SPI - 1) kodierte TypIII - Sekretionsapparat ist für die Apoptoseinduktion verantwortlich. Dieser Sekretionsapparat ist bei den untersuchten Mutanten durch Transposonmutagenese des *prgk* - Gens inaktiviert (Deiwick et al. 98, Bajaj et al. 95).

3.2. Zellkultur und Stimulationsbedingungen

Für die Zellkulturen wurden Mausmakrophagen der Zelllinie J774A.1 gewählt. Die Makrophagen wurden in Zellkulturflaschen mit dem Wachstumsmedium RPMI 1640 im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 und 90% Luftfeuchtigkeit angezüchtet. Alle 3 Tage wurden die, zu diesem Zeitpunkt konfluenten Zellen, mit frischem, vorgewärmten RPMI 1640 Medium gewaschen, mit einem Zellschaber resuspendiert und zur Subkultivierung 1:20 verdünnt. Für die Versuche wurden die Makrophagen auf 24 - Kammerplatten mit einer Konzentration von 500.000 Zellen / ml ausgesät, wobei jede Kammer mit 0,5 ml der Zellsuspension (~250.000 Zellen) beschichtet wurde. Die Zellkonzentration wurde durch Auszählen unter einem Lichtmikroskop mittels einer genormten Zellzählkammer errechnet. Nach einer weiteren Bebrütungszeit von 24 Stunden erreichten die Makrophagen eine für die Transfektions- und Infektionsversuche optimale subkonfluente Wachstumsphase mit einer Zellkonzentration von etwa 500.000 Zellen / Kammer. Für die Infektionsversuche mit Yersinien bzw. Salmonellen wurden die mit Antibiotika - freiem RPMI 1640 Medium dreimalig gewaschenen Zellen mit einer Bakterienkonzentration von 50 Bakterien / Zelle infiziert. Um die Infektion zu synchronisieren wurden die Bakterien bei 1500 U /

Minute für 3 Minuten in einer Plattenzentrifuge auf die Makrophagen sedimentiert. Bei Inkubationszeiten von mehr als 90 Minuten wurden die Bakterien durch Zugabe von Gentamycin (100 μg / ml) abgetötet. Für die LPS - Versuche wurden die Zellen einmalig mit Penicillin- und Streptomycin - haltigem Wachstumsmedium gewaschen und mit LPS von *Escherichia coli* O55 :B5 (Sigma) oder Polymyxin B Sulfat (Life Technologies) in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt.

3.3. Konstruktion der Expressionsvektoren

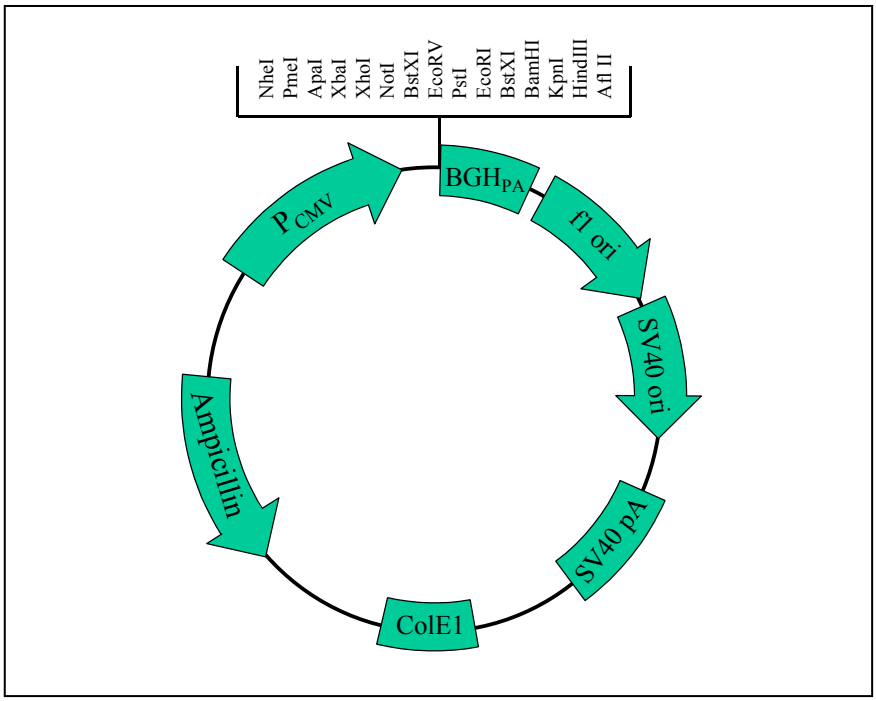
3.3.1. Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte

Bakterien besitzen extrachromosomale DNS (Plasmide), die mittels Konjugation, Transformation oder Transduktion zwischen Bakterien ausgetauscht werden kann. Somit ist die Übertragung von genetischen Eigenschaften möglich. In der Biotechnologie werden speziell konstruierte Plasmide als Vektoren benutzt, um gezielt Gene auch in eukaryontische Zellen zu transferieren. Dieser Vorgang wird als Transfektion bezeichnet. Im Folgenden wird die Konstruktion von eukaryontischen Expressionsvektoren beschrieben.

3.3.1.1. Plasmidaufreinigung

Zunächst wurde eine Kultur des plasmidtragenden Bakterienstammes angesetzt. Für alle Klonierungen wurde hierfür *Escherichia coli* DH5αE mit dem Klonierungsvektor pcDNA 3.1 (-) (Invitrogen) verwendet. Dieser Vektor besitzt ein Ampicillinresistenzgen, einen Cytomegalievirus - Promoter (P_{cmv}) und eine multiple Klonierungsregion, die eine Reihe von Restriktionsschnittstellen beinhaltet.

Abb. 4: Klonierungsvektor pcDNA 3.1 (-), Invitrogen, Groningen



Die Übernachtkultur wurde zentrifugiert und in 4 ml des RNAse - haltigen Puffers S1 resuspendiert, um die Bakterien zu lysieren. Danach erfolgte jeweils eine Inkubation über 5 Minuten, zunächst nach Zugabe von 4 ml des Puffers S2 bei Raumtemperatur und später auf Eis nach Zugabe von 4 ml des Puffers S3. Durch den alkalischen pH - Wert der ersten beiden Lösungen wird die chromosomale DNS denaturiert. Der saure Puffer S3 neutralisiert das Gemisch, wodurch die hochmolekulare DNS ein unlösliches Netzwerk bildet. Die RNS und die Zellreste werden durch das SDS ebenfalls zu einem Komplex gebunden. Somit kann jetzt die gelöste Plasmid - DNS mittels Zentrifugation bei 15.000 g und 4°C über 45 Minuten von den restlichen Bestandteilen der Lösung getrennt werden.

Die Isolierung der Plasmide wurde mittels NucleoBond PC 100 Säulen (Macherey - Nagel) durchgeführt. Diese Säulen sind mit einem speziellen Anionen - Austauscherharz beschichtet, an welches die negativ geladenen Phosphatreste der Plasmid DNS binden. Dazu wurden zunächst die Säulen mit 2,5 ml des Puffers N2 kalibriert. Anschließend wurde der DNS - haltige Überstand der zentrifugierten Lösung vorsichtig auf die Säule pipettiert. Nachdem die Lösung vollständig abfiltriert war, wurde die Säule mit 10 ml des Puffers N3 zweimal gewaschen. Anschließend

wurde die gebundene DNS mit 5 ml des Puffers N5 in ein sauberes Gefäß eluiert. Im nächsten Schritt wurde die DNS mit 70 %.-igem Isopropanol gefällt und bei 15.000 g und 4°C über 35 Minuten zentrifugiert. Die abzentrifugierte DNS wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in sterilem Wasser gelöst. Die Reinheit des so aufgereinigten Plasmids wurde mittels Gelelektrophorese und photometrischer DNS -Konzentrationsmessung überprüft

3.3.1.2. Restriktionsverdau des pcDNA-Vektors

Um das gewünschte Gen in den Vektor einfügen zu können, muss das aufgereinigte Plasmid an den passenden Restriktionsschnittstellen geöffnet werden. Die dazu verwendeten Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die rotationssymmetrische DNS - Sequenzen (Palindromsequenzen) erkennen und durch Hydrolyse spalten.
Pro Restriktionsverdau wurden 6 µl der Plasmid - DNS - Lösung, jeweils 1,5 µl der Restriktionsenzyme, sowie 5 µl des entsprechenden Verdauungspuffers mit 26 µl sterilem Wasser in ein Eppendorfgefäß pipettiert und bei 37°C inkubiert. Nach etwa zwei Stunden wurde der Restriktionsverdau durch Zugabe von 4 µl Stopp - Mix beendet und in einem 1%-igen Agarosegel bei 80 mA Gleichstrom aufgetrennt.
Nach etwa 5 - minütiger Färbung im Ethidiumbromidbad konnten unter UV - Licht die jetzt fluoreszierenden DNS - Banden im Gel sichtbar gemacht werden. Parallel zu dem Produkt des Restriktionsverdaus wurde ein λ - DNS - Markers aufgetragen, der aus DNS - Fragmente definierter Größe besteht. Somit konnten die Banden des Restriktionsverdaus anhand ihrer Größe identifiziert und mit einem Skalpell aus dem Gelblock geschnitten werden.

3.3.1.3. Isolation der Plasmid - DNS aus dem Agarosegel

Zur Isolierung der geschnittenen Plasmid - DNS aus dem Agarosegel wurde ein Silikongel basiertes Verfahren angewandt (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen GmbH). Zunächst wurde das Gelstück gewogen und zusammen mit der dreifachen Menge des Lösungspuffer QG in ein Eppendorfgefäß gegeben. Bei 50°C wurde es 10 Minuten inkubiert bis das Gel sich vollständig aufgelöst hatte. Jetzt wurde der

gesamte Inhalt in das Röhrchen mit dem Silikongelfilter pipettiert und bei 15.000 g zentrifugiert. Der hohe Salzgehalt des Puffers QG sorgt dabei für eine effiziente Bindung der DNS - Moleküle an das Silikongel. Um Verunreinigungen zu entfernen wurde der Filter mit 0,75 ml PE - Puffer gewaschen und schließlich die gereinigte DNS mit 50 µl sterilisiertem Wasser eluiert.
1 µl der Plasmidlösung wurde schließlich noch mittels Gelelektrophorese auf seinen Inhalt hin überprüft. Die DNS - Konzentration und Reinheit wurde photometrisch bestimmt.

3.3.1.4. Konstruktion und Amplifikation der Insertions - DNA

3.3.1.4.1. Prinzip der PCR

Die DNS - Sequenz, die das zu exprimierende Gen enthält, musste nun mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältig werden. Bei der PCR werden doppelsträngige DNS - Sequenzen durch eine thermostabile Taq - Polymerase (*Thermophilus aquaticus*) millionenfach vervielfältigt. Als Substrat dienen dem Enzym die vier Nukleotide dTTP, dGTP, dATP und dCTP. Da die Polymerase nur bestehende DNS - Einzelstränge verlängern kann, benötigt sie schon bestehende Anfangssequenzen. Diese, auch Primer genannt, werden dem Reaktionsansatz ebenfalls hinzugegeben und so konstruiert, dass an beiden Enden die gewünschten Restriktionsschnittstellen entstehen.
Jeder Vervielfältigungszyklus besteht jeweils aus drei Schritten. Zunächst wird die DNS durch Erhitzen in ihre Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Nach Absenken der Temperatur können sich die Primer an die 3`-Enden der zu vervielfältigenden DNS - Sequenzen anlagern (Annealing). Im dritten Schritt komplementiert die Polymerase, an den Primern beginnend, den DNS -Einzelstrang mit den Nukleotiden wieder zu einem vollständigen Doppelstrang (Elongation). Dazu muss die Temperatur erneut angehoben werden. Der so entstandene Doppelstrang dient im nächsten Zyklus der Polymerase als erneute Vorlage. Dieser Zyklus kann theoretisch solange wiederholt werden, bis alle Nukleotide und Primer aufgebraucht sind.

3.3.1.4.2. Durchführung der PCR aus Bakterien

Eine Kolonie des gewünschten Bakterienstamms wurde mit einer ausgeglühten Impföse von der Agarplatte genommen und in 500 µl destilliertes Wasser eingerieben. Anschließend wurde die Suspension bei 95°C für 10 Minuten aufgekocht, um die Bakterienzellen aufzubrechen, und bei 14.000 U/min. für zwei Minuten zentrifugiert. Zu 20 µl des DNS - haltigen Überstandes wurden 16 µl PCR - Puffer, 10 µl Taq - Mix, jeweils 1 µl der beiden Primer, 0,4 µl Taq - Polymerase sowie 52 µl destilliertes Wasser hinzugegeben. Die PCR erfolgte bei 36 Zyklen, einer Denaturierungstemperatur von 94°C für 60 Sekunden, einer Anlagerungstemperatur von 55°C für 30 Sekunden und einer Elongationstemperatur von 68°C für 90 Sekunden. Das PCR - Produkt wurde mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt Die amplifizierte DNS - Sequenz wurde aus dem Gel geschnitten und anschließend, wie bereits oben beschrieben, mit sterilem Wasser eluiert,

3.3.1.5. Ligation des geschnittenen Vektors mit der Insertions - DNS

Zur Ligation des geschnittenen Vektors mit dem konstruierten Geninterponat wurden 2 µl des Ligase-Enzyms (Gibco), 4 µl des Ligationspuffers (Gibco), die Vektor - DNS und das Insert zu einem Gesamtansatz von 20 µl zusammenpipettiert. Dabei sollte das Verhältnis beider Liganden etwa 1:1 sein, um die Wahrscheinlichkeit von Oligomerisierung und Religation möglichst gering zu halten. Der Ansatz wurde für 12 Stunden bei 14°C inkubiert. Zur Überprüfung einer möglichen Religation zwischen den beiden Enden des geschnittenen Vektors wurde in einem Kontrollligationsansatz das Insert durch ein gleiches Volumen destilliertes Wasser ersetzt.

3.3.1.6. Transformation des ligierten Vektors in Ca^{2+} - kompetente *E. coli* Bakterien

Die korrekt ligierten Plasmide müssen jetzt zur Selektionierung und Vervielfältigung wieder in *E. coli* Bakterien gebracht werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Transformation. Da das Plasmidkonstrukt ein Ampicillinresistenzgen trägt, werden nur erfolgreich mit dem Plasmid transformierte Bakterien auf Ampicillin - haltigen Agarplatten wachsen.

Für die Transformation wurden so genannte Ca^{2+} - kompetente *E. coli* Bakterien verwendet, die freie DNS leichter aufnehmen können. Zu deren Herstellung wurden 2 ml einer Übernachtkultur in 100 ml LB gegeben und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,8, gemessen bei 600 nm Wellenlänge, bei 37°C und unter starken Schütteln weiterbebrütet. In diesem Stadium befinden sich die Bakterien in einer frühen logarithmischen Wachstumsphase. Anschließend wurden die Bakterien in zwei 50 ml Röhrchen für 15 Minuten auf Eis gelagert und danach bei 4.000 U/min. und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das daraus resultierende Sediment wurde in einer eiskalten Lösung aus 50 mM $CaCL_2$ und 15%-igen Glycerol resuspendiert, 15 Minuten auf Eis gelagert und erneut abzentrifugiert. Es folgte wiederum die Resuspension in diesmal 2 ml der $CaCl_2$ - Glycerollösung, um letztendlich, nach 30 Minuten Lagerung auf Eis, die Bakterien in 400 µl großen Aliquots bei - 80°C einzulagern.

Jeweils 200 µl der Ca^{2+}-kompetenten *E. coli* - Suspension wurden mit den Ligationsprodukten vermengt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem zweiminütigen Hitzeimpuls von 42°C und kurzem Abkühlen auf Eis wurde jedem Ansatz 1 ml LB zugefügt. Die Suspension wurde für etwa 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Jeder Ansatz wurde auf einer Ampicillin - haltigen Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C im Brutschrank über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag konnten die selektiv gewachsenen Bakterienkolonien mittels einer ausgeglühten Impföse auf Ampicillinagarplatten überimpft werden. Da der Vektor pcDNA 3.1 (-) ein Ampicillinresistenzgen enthält, sollten die gewachsenen Klone ausschließlich das erfolgreich ligierte Plasmid enthalten. Auf der Kontrollplatte waren als Hinweis dafür, dass der Vektor nicht mit sich selbst religierte, keine Kolonien gewachsen.

3.3.1.7. Kontrolle des klonierten Gens

Dem Beweis der korrekten Klonierung des Gens in den Expressionsvektor mittels Sequenzierung gingen noch drei weniger aufwendige Kontrollverfahren voraus.

3.3.1.7.1. Aufreinigung der Plasmid - DNS und Gelelektrophorese

Für dieses Screeningverfahren genügte zur Aufreinigung der Plasmide eine so genannte Minipräparation. Dazu wurden von 20 ausgewählten Klonen mit einer sterilen Pipettenspitze soviel Bakterien wie möglich gewonnen, in 200 µl des Puffers S1 resuspendiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurden zuerst 200 µl des Puffers S2 hinzugegeben und durch leichtes Schwenken des Reagenzgefäßes vermengt. Dasselbe wurde dann mit 200 µl des Puffers S3 durchgeführt. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wurden die aggregierten Bestandteile des Lysats mit 14.000 U/min und 4°C für 10 Minuten in einer Zentrifuge sedimentiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und mit 400 µl Isopropanol vermengt. Um die nun ausgefällte Plasmid - DNS zu sedimentieren, wurde erneut mit 14.000 U/min bei 4°C für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde dann mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 20 µl sterilem Wasser gelöst.
Jeweils 10 µl der so gewonnen DNS - Lösungen sowie eine vergleichbare Menge des leeren Ausgangsvektors pcDNA 3.1 (-) wurden nebeneinander auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei 90 mA Gleichstrom aufgetrennt. Nach Färbung mit Ethidiumbromid und Betrachtung der DNS - Banden unter UV - Licht zeigte sich, dass die Plasmide, die korrekt mit dem Insert ligiert wurden, langsamer liefen als der leere Kontrollvektor.

3.3.1.7.2. Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

Die Plasmide der Klone, die in der ersten Kontrolle als positiv selektioniert worden waren, wurden zur genaueren Analyse in einem Restriktionverdau entsprechend der gewählten Schnittstellen, wie bereits oben beschrieben, geschnitten. Danach erfolgte

erneut die gelelektrophoretische Auftrennung und Betrachtung der mit Ethidiumbromid gefärbten DNS - Banden unter UV - Beleuchtung. Da die identischen Restriktionsschnittstellen des Vektors auch bei der Klonierung benutzt wurden, sollten die positiven Klone nach dem Verdau ein größeres, dem leeren Vektor entsprechendes Fragment, und ein kleineres Fragment, nämlich das Insert, enthalten. Durch den Vergleich der Fragmente mit dem gleichzeitig aufgetragenen λ-DNS - Marker konnten diese aufgrund ihrer Größe exakt zugeordnet werden.

3.3.1.7.3. PCR

Des Weiteren wurden die Klone durch eine PCR mit den Primern, die schon bei der Klonierung zum Einsatz kamen, charakterisiert. Die Prozedur erfolgte wie bereits oben beschrieben, jedoch in jeweils 20 µl Ansätzen. Dazu wurden 4 µl der DNS - Lösung zu 16 µl des PCR - Ansatzes gegeben. Die resultierenden PCR - Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt und nach Ethidiumbromidfärbung unter UV - Licht analysiert. Alle jetzt als positiv zu wertenden Klone sollten die korrekt klonierte Gensequenz enthalten.

3.3.1.8. Sequenzierung

Um bei der PCR eventuell entstandene Mutationen im klonierten Gen oder auch eine falsche Insertion herauszufinden, wurden mehrere positiver Klone ausgewählt und deren Basensequenzen mittels Sequenzierung ermittelt. Die erhaltenen Sequenzen wurden dann mit einer DNS - Sequenz - Datenbank verglichen.

3.3.1.8.1. Das Prinzip der DNS - Sequenzierung

Die hier angewandte enzymatische DNS - Sequenzanalyse beruht auf dem Prinzip nach Sanger - Coulson. Es erfolgt eine Polymerasekettenreaktion, die als Matrix die zu analysierende Gensequenz nutzt. Dabei werden zuzüglich zu den üblicherweise verwendeten Desoxynukleoditen 1 - 4% fluorszenzmarkierte Didesoxynukleotide

hinzugegeben. Jeder der vier Basen ist ein unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoff zugeordnet. Durch den zufälligen Einbau der Didesoxynukleotide und den dadurch verursachten Kettenabbruch entstehen unterschiedlich lange DNS - Einzelstränge. Jeder davon ist, in Abhängigkeit des Didesoxynukleotids, das den Abbruch verursachte, mit einem bestimmten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Würde man nun die DNS - Einzelstränge der Länge nach ordnen, könnte anhand der Reihenfolge der vier Fluoreszenzfarbstoffe die Basensequenz ermittelt werden. Die Auswertung der DNS - Stränge nach Länge und Fluoreszenz erfolgte automatisiert mittels Kapillar-elektrophorese und Fluoreszenzdetektion.

3.3.1.8.2. Arbeitsablauf der DNS - Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte in 20 µl Ansätzen mit unterschiedlichen Primern, um die gesamte DNS - Sequenz erfassen zu können. Dazu wurden 1 µg der, wie oben beschrieben, aufgereinigten DNA, 3 - 10 pmol des Primers und 8 µl Sequenzierungs - Mix mit sterilem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und in ein PCR - Gefäß pipettiert. Die PCR erfolgte bei einer Denaturierungstemperatur von 90°C für 10 Sekunden, einer Annealingtemperatur von 55°C für 5 Sekunden und einer Elongationstemperatur von 60°C für 4 Minuten. Nach 25 Zyklen und der Abkühlung auf 4°C, musste die DNS gefällt werden. Dazu wurden zu den PCR - Produkten 50 µl von 95 %-igem Ethanol, sowie 2 µl NAc (3 M, pH 5,2) pipettiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde die gefällte DNS 30 Minuten bei 14.000 U/min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Schließlich wurde die DNS noch mit 250 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet.
Durch den Vergleich der ermittelten DNS - Sequenzen mit einer Referenzsequenz konnte die Korrektheit des Inserts und der Restriktionsschnittstellen im untersuchten Plasmid verifiziert werden.

3.3.1.9. Endotoxinfreie Plasmidaufreinigung

Zur weiteren Verwendung für die Transfektionsversuche mit eukaryontischen Zellen wurde das Plasmid mittels eines speziellen Aufreinigungskits (Endofree Plasmid Kit, Qiagen GmbH), das für eine hochgradige Endotoxinfreiheit garantiert, aufgereinigt. Endotoxine sind als Lipopolysaccharide (LPS) Zellmembranbestandteile gramnegativer Bakterien. Bei der Gewinnung von Bakterienplasmiden werden durch die Lyse der Bakterienmembran Endotoxine freigesetzt. Diese interagieren zum einen mit dem Transfektionsreagenz, zum anderen rufen sie bei Makrophagen eine unspezifische Immunantwort hervor. Das kann sowohl die Transfektionseffizienz, als auch die Interpretation des Transfektionsergebnisses beeinflussen.

Das Prinzip der Aufreinigung entspricht dem, der unter 2.4.1. beschrieben Säulen - Plasmid - Präparation. Nach der alkalischen Lyse wurde jedoch der Suspension ein Puffer hinzugegeben, der das freigewordene Endotoxin bindet. Dadurch kann es leichter aus dem Anionenaustauscherharz herausgewaschen werden. Das so aufgereinigte Plasmid wurde schließlich noch zweimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in Endotoxin - freiem Wasser gelöst. Nach erneuter Kontrolle in der Gelelektrophorese und photometrischer Quantifizierung erfolgte die Aliquotierung und Lagerung bei -18°C.

3.3.2. ΔIRAK - M - Flag - Vektor

Um für den Vergleich der zellulären Effekte der dominant - negativen ΔIRAK - Konstrukte gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen, musste ΔIRAK - M in den pcDNA 3.1. - Vektor umkloniert werden.
Im ersten Schritt wurde das ΔIRAK - M - Flag - Gen, welches sowohl für ein Antikörpererkennungsepitop (Flag - Tag) als auch für die ersten 161 Aminosäuren des Proteins IRAK - M kodiert, mittels einer Polymerasenkettenreaktion vom Ausgangsplasmid pRK amplifiziert. Um für die spätere Ligation mit dem Expressionsvektor die richtigen Restriktionsschnittstellen zu erhalten, wurden die Primer so gewählt, dass am 3`-Ende eine XhoI und am 5´-Ende eine EcoRI Erkennungssequenz entstand (Tab. 3).

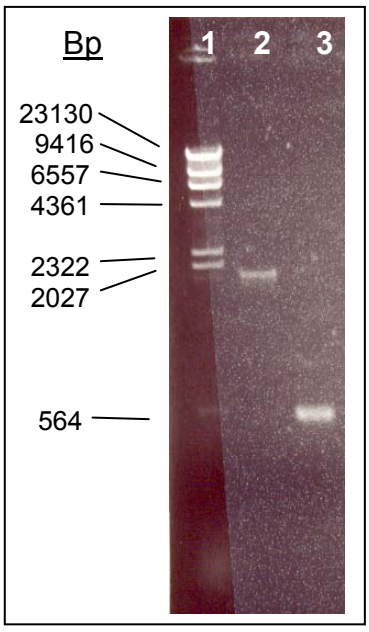
Tab. 2: Verwendete Primer für die PCR und Sequenzierung von ΔIRAK - M - Flag (Metabion GmbH, Deutschland)

	Name	Sequenz
	IRAKM-Flag-XhoIF	5´-ATC GAT CTC GAG ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT -3´
	IRAKM-161DN-Stop-Eco-rev	5´-ATC GAT GAA TTC TTA TCC TTC TAT GAT ATT TTG AAA GCT-3´

= Restriktionsschnittstellen, = IRAK - M - kodierende Sequenz, = Stopkodon

Das PCR - Produkt wurde in der Gelelektrophorese aufgetrennt, das amplifizierte Gen aus dem Gel isoliert und aufgereinigt (siehe Abb. 5)

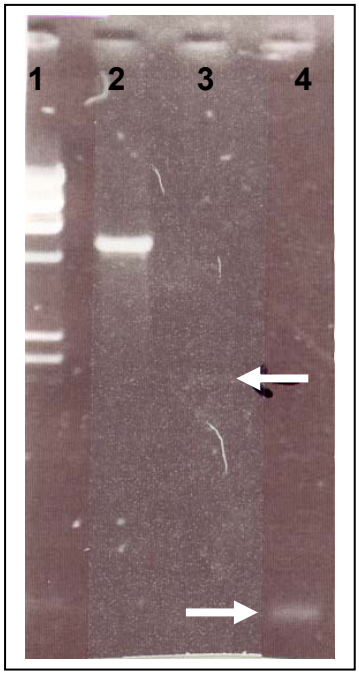
Abb. 5: Gelelektrophorese nach PCR von ΔIRAK - M - Flag



Auf Spur 1 ist ein EcoRI - HindIII geschnittener λ - DNS - Marker aufgetragen, der sich in sieben Fragmente mit bekannter DNS - Länge auftrennt (Bp = Basenpaare). Auf der Bahn 2 erkennt man das vollständige IRAK - M - Gen. Wie zu erwarten läuft das dominat - negative IRAK - M deutlich schneller, da es um etwa 2/3 gegenüber dem Wildtyp verkürzt ist (Spur 3).

Sowohl der Expressionsvektor pcDNA 3.1. als auch die amplifizierte cDNS von IRAK - M wurden nun mit den Restriktionsenzymen XhoI und EcoRI verdaut. Die Produkte wurden wiederum im Agarosegel aufgetrennt, die geschnittenen Fragmente identifiziert, separiert und aus dem Gel eluiert.

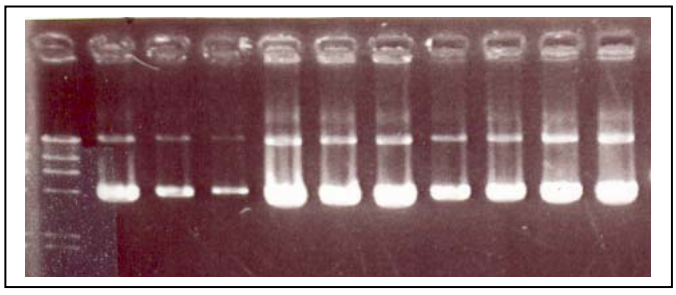
Abb. 6: Gelelektrophorese nach Restriktionsverdau



Auf Spur 2 ist der geschnittene pcDNA 3.1 - Vektor aufgetragen. Mit einer Größe von 5,5 Kb läuft er im Gel zwischen der 3. (6557 Bp) und der 4. Bande (4361 Bp) des λ - DNS - Markers. Das Wildtyp IRAK - M (Spur 3) und die dominant - negative Variante (Spur 4) färben sich an der gleichen Stelle wie vor dem Restriktionsverdau. Anhand der Fluoreszenz-intensität ist anzunehmen, dass die Vektor - DNS höher konzentriert ist als die Insert - DNS.

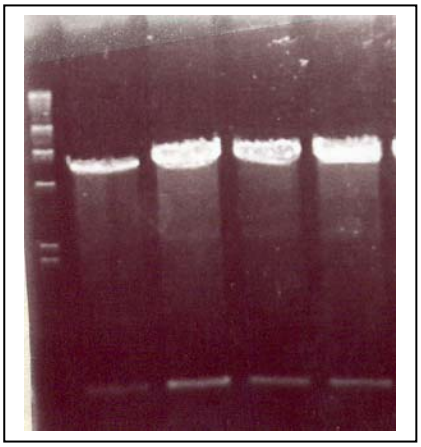
Die beiden geschnittenen DNS - Fragmente wurden in einem 10 µl Ansatz, bestehend aus 1 µl pcDNA3.1., 6 µl ΔIRAK - M, 1 µl Ligaseenzym und 2 µl Ligasepuffer, bei 14°C über Nacht legiert. Das Ligationsprodukt wurde in 200 µl Ca^{2+}-kompetente *E. coli* Bakterien transformiert, auf Ampicillinagarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.
Aus zehn gewachsenen Bakterienkolonien wurden die Plasmide isoliert und auf ein Elektrophoresegel aufgetragen. Alle zehn Klone enthalten ein transformiertes Plasmid gleicher Größe.

Abb. 7: Gelelektrophorese der transformierten Plasmide



Von vier Klonen wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt.

Abb. 8: Gelelektrophorese der Klone 4 - 7 nach Restriktionsverdau mit XhoI und EcoRI



Bei allen getesteten Klonen sieht man jetzt zwei DNS - Banden, die der Größe nach dem Expressionsvektor und dem ΔIRAK - M - Flag - Gen entsprechen.

Durch vollständige Sequenzierung und Vergleich mit einer Referenzsequenz konnte die Korrektheit des klonierten ΔIRAK - M - Flag - Gens bestätigt werden.
Zur weiteren Verwendung bei den Transfektionsexperimenten wurde das Plasmid mittels Endofreeprep endotoxinfrei aufgereinigt und nach photometrischer Quantifizierung in destilliertem Wasser verdünnt.

3.3.3. YopP - myc - Vektor

Auch zur Konstruktion des YopP - myc - Vektors wurde der eukaryontische Expressionsvektor pcDNA 3.1 (-) verwendet. Diesmal wurden die Restriktionsschnittstellen XhoI und XbaI gewählt. Das Insert sollte für YopP mit dem Antikörpererkennungsepitop myc (myc - Tag) kodieren. Hierfür wurde ein Plasmid, mit dem *yopP* - Gen von *Yersinia enterocolitica* Serotyp O8 aus einem *E.coli* -Stamm isoliert. Bei der anschließend durchgeführten PCR wurden die Primer (siehe Tab. 3) so gewählt, dass am 3´ - Ende des *yopP* - Gens die myc - Antikörper - Erkennungssequenz und eine SalI - Schnittstelle, am 5´-Ende eine XbaI - Schnittstelle entstehen.

Tab. 3: verwendetet Primer für a) die PCR b) die Sequenzierung von *yopP-myc* (Metabion GmbH, Deutschland)

	Name	Sequenz
a)	YopP8-XbaI-F	5´-ACT CTC TAG AAT GAT TGG ACC AAT ATC ACA-3´
	YopP-cmyc-SalI-R	5´-ATA CTC GAC TTA CAG GTC CTC CTC GGA GAT CAG CTT CTG CTC CAT TAC TTT GAG AAG TGT TTT ATA-3´
b)	YopP8-300R	5´-TAT GAA GCG GGA AGA TCC AA-3´
	YopP8-700R	5´-AAG TTA CCG GGA GAT ACG GA-3´
	YopP8-200F	5´-GGC GAA CAA AAT ATA TCC TG-3´
	YopP8-500F	5´-GCG AAG CTC ATC TGA ATG TG-3´
	YopP8-650 F	5´-ATC CGT ATC TCC CGG TAA CT- 3´

= Restriktionsschnittstelle, = YopP kodierende Sequenz, = Stopkodon, = myc-tag

Das resultierende PCR - Produkt und der Vektor wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und ligiert. Dem Ligationsansatz wurden dabei 1 µl der Vektor - DNS und 13 µl des *yopP* - *myc* - Inserts hinzugefügt. Die nach der Transformation gewachsenen Klone wurden mittels Restriktionsverdau, erneuter PCR und Sequenzanalyse auf ihre Korrektheit überprüft.

3.4. Transfektion

Für die Transfektionsexperimente wurden die in 24-Kammer-Platten gewachsenen J774A.1 Makrophagen mittels des Transfektionsreagenz Exgen 500 und einer konstant gehaltenen DNS - Menge von 1 µg pro 500.000 Zellen bzw. pro Kammer transfiziert. Exgen 500 ist ein nichtliposomales Gentransferreagenz, das aus linearen Polyethyleniminmolekülen mit einer hohen kathionischen Ladungsdichte besteht. Die Gentransfereigenschaft beruht auf der Trägereigenschaft für kondensierte DNS und der Interaktion mit den anionischen Proteoglykanen der Zellmembran, sodass es als

Komplex mit der DNS durch Endozytose aufgenommen werden kann und nicht dem lysosomalen Abbau unterliegt. Exgen 500 wurde vor allem für diese Versuche ausgewählt, da es bei J774A.1 Makrophagen nur geringe zytotoxische Effekte auslöst. Die Transfektionseffizienz variierte in diesen Experimenten zwischen 1 bis 10 %, sodass etwa zwischen 500 und 5000 Zellen pro Ansatz transfiziert wurden.

Es wurden die jeweiligen Plasmide in 50 µl endotoxinfreier 0,9 %-iger physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und 4 µl des Transfektionsreagenzes in ebenfalls 50µl 0,9 %-iger Kochsalzlösung hinzugefügt. Nachdem das Gemisch mit Hilfe eines Vortex - Mischers gut vermengt worden war, wurde es bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert, damit sich die Polyethyleniminmoleküle an die DNS anlagern können. Anschließend wurde das Gemisch auf die J774A.1 Zellen pipettiert, nachdem diese mit frischem RPMI - Medium gewaschen worden waren. Danach wurden die Zellkulturplatten bei Raumtemperatur und 1500 U/min für 5 Minuten zentrifugiert, um die DNS auf die Makrophagen zu sedimentieren. Um eine toxische Wirkung auf die J774A.1-Zellen zu vermeiden, wurde die Transfektion nach 2,5 bis 3 Stunden, je nach morphologischem Erscheinungsbild, durch einen einfachen Mediumwechsel beendet und die Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank bis zum nächsten Tag bebrütet.

Alle Transfektionsversuche wurden als Kotransfektionen durchgeführt, wobei immer 0,33 µg des pSV - β - Galaktosidase - Expressionsvektors mit 0,66 µg eines zu untersuchenden Plasmids bzw. 0.2 µg pSV - β - Galaktosidease - Vektor und jeweils 0,4 µg zweier Versuchsplasmide kombiniert wurden. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass aufgrund des Mengenverhältnisses β-Galaktosidase - exprimierende Zellen ebenfalls das durch das kotransfizierte Versuchsplasmid kodierte Protein synthetisieren. Untersucht wurden hierbei Expressionsplasmide für die Proteine p50, p65 (H. W. L. Ziegler-Heitbrock, Institut für Immunologie, München, Deutschland), IKKα, IKKβ (H. Nakano, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan), YopP, dominant-negatives ΔTRAF6 WT - TRAF6 (J. Inoue, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan), dominant-negatives ΔMyD88, ΔIRAK1, ΔIRAK2 (M. Muzio, Deparment of Immunology and Cell Biology, Mario Negri Institute, Mailand, Italien), ΔIRAKM (Z. Cao und H. Wesche, Tularik, South San Francisco, Californien, USA) und ΔFADD (C. Vincenze, Department for Pathology, University of Michigan Medical School, Michigan, USA). Um einen möglichen

Einfluss der Transfektion auf das Versuchsergebnis zu kontrollieren, wurde bei jedem Experiment als Negativkontrolle mit dem leeren Expressionsvektor pcDNA 3.1. transfiziert. 18 Stunden nach der Transfektion wurde erneut das Zellkulturmedium gewechselt. Für die Infektionsversuche wurden die Zellen mit Antibiotika - freiem Medium dreimalig gewaschen, um sie anschließend mit den unterschiedlichen Bakterienstämmen zu infizieren.

Am Ende der Inkubationszeit wurden die transfizierten Zellen fixiert und mittels 5 - bromo - 4 - chloro -3 - indolyt - β - D - Galaktose (X-Gal) gefärbt, um sie für die spätere Auswertung unter dem Lichtmikroskop identifizierbar zu machen. Nur transfizierten Makrophagen, die somit in der Lage waren ß - Galaktosidase zu produzieren, konnten das zugesetzte X - Gal in einen blauen Farbstoff umwandeln. Für die Färbung wurde das Zellkulturmedium von den Zellen vorsichtig abpipettiert. Die Zellen wurden dann mit einer Fixierlösung aus 2 %-igem Formaldehyd, 0,2 %-igem Glutaraldehyd, 2 mM $MgCl_2$ und 0,02 %-igem TritonX - 100 überschichtet und für 5 Minuten zurück in den Brutschrank gestellt. Zwischenzeitig wurde die Färbelösung bestehend aus 80 mM Na_2HPO_4, 20 mM NaH_2PO_4, 1,3 mM $MgCl_2$, 75 mM D-Galaktose, 6 mM Redoxpuffer, 0,1 % X - Gal in DMF und 0,02 % TritonX - 100 angesetzt und anstelle der Fixierlösung auf die Zellen pipettiert. Nach 12 - 24 Stunden konnten die jetzt blau gefärbten, transfizierten Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgewertet werden. Bei der Beurteilung der Apoptoseinduktion wurden die Makrophagen bezüglich ihre Morphologie beurteilt. Pro Versuchsansatz wurden mindestens acht Gesichtsfelder ausgezählt. Die Apoptoserate der transfizierten Zellen nach Infektion mit den unterschiedlichen Bakterienstämmen berechnet sich aus dem prozentualen Anteil toter blauer Zellen gegenüber der Anzahl nicht - infizierter Zellen. Um die Apoptose zu quantifizieren, die allein durch die Expression der transfizierten Plasmide induziert wurde, wurde die Zahl der toten blauen Zellen in Relation zur Gesamtzahl aller transfizierten Zellen gesetzt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert in Prozent plus / minus der Standartabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten ausgewertet.

3.5. Fluoreszenzmikroskopie

3.5.1. Immunfluoreszenzfärbung

Für die Fluoreszenzfärbungen wurden die J774A.1 Makrophagen auf durchsichtigen Glasdeckplättchen angezüchtet, transfiziert und je nach Indikation stimuliert. Nach zweimaligem Waschen mit vorgewärmten PBS wurden die Zellen mit 3,7 %-igem Formaldehyd bei Raumtemperatur für 15 Minuten fixiert und mit 0,02 %-igem NP-40 für eine Minute permeabilisiert, damit die später hinzugegebenen Antikörper die Zellmembran passieren können. Um unspezifische Bindungen der primären Antikörper zu verhindern, wurden die Zellen mit 100 %-igem Rinderserumalbumin (BSA) für 2 Stunden bei 4°C geblockt und anschließend mit PBS dreimalig gewaschen. Für die Inkubation mit den primären Antikörpern wurden 25 µl eines Gemisches aus Antikörper, 1 % BSA und 0,25 % TritonX - 100, wobei die Antikörper je nach Affinität zwischen 1:50 bis 1:200 mit PBS verdünnt wurden, auf Parafilm getropft. Anschließend wurde das Deckglas mit der Zellschicht nach unten darauf gelegt. Die Bindung der Antikörper an die zu markierenden Proteine erfolgte bei Raumtemperatur für 1 - 2 Stunden. Als Primärantikörper wurden polyklonale Ziegen- und Kaninchen - anti - p65 -Antikörper (Santa Cruz Biotechnology), polyklonale anti - β - Galaktosidase - Antikörper von Kaninchen, monoklonale Anti - myc - Antikörper (Clontech) von Mäusen, sowie monoklonale Maus anti - AU1 - Antikörper benutzt (Clontech). Die Sekundärantikörper, die spezifisch an die primären Antikörper binden und entweder mit Rhodamin- oder Fluoreszeinfarbstoff konjugiert sind, wurden auf gleiche Weise, nach dreimaligem Waschen mit PBS, mit den Zellen inkubiert. Schließlich wurden 6 µl Mowiol auf einen Projektträger getropft, das Deckgläschen mit den Zellen nach unten aufgelegt und mit Nagellack ringsum versiegelt.

3.5.2. TUNEL - Fluoreszenzfärbung

Die TUNEL - Fluoreszenzfärbung markiert spezifisch das 3`-OH-Ende von Oligonukleosomen, wie sie bei der apoptotischen DNS - Fragmentierung entstehen. Dabei wird an freie 3`- OH - Enden mittels terminaler Desoxynukleotidtransferase ein

Polymer aus fluoreszeinmarkierten dUTPs angehängt. Somit können apoptotische Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop von nekrotischen Zellen unterschieden werden.

Hierzu wurden die Zellen auf Deckgläsern angezüchtet, mit angewärmten PBS zweimal gewaschen und über Nacht in 3,7 %-igem Formalin bei Raumtemperatur fixiert. Am nächsten Tag wurden die Makrophagen nach erneutem Waschen bei Raumtemperatur 5 Minuten in 50 mM Glycin inkubiert und anschließend mit einer Lösung aus 0,25 % Triton X - 100 und 1 % BSA in PBS eine Stunde permeabilisiert und geblockt. Zur Markierung der transfizierten Zellen wurden diese, wie bereits beschrieben, mit einem 1:100 in PBS verdünnten anti - β - Galaktosidase - Antikörper eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit einem sekundären anti - Rabbit - TRITC - Antikörper bei einer Verdünnung von ebenfalls 1:100 über eine Stunde gefärbt. Danach wurden die Deckgläser nach zweimaligem Waschen mit einem Tropfen aus 2,5 µl der TUNEL - Enzymlösung und 22,5 µl der TUNEL - Färbelösung bei 37°C für eine Stunde gefärbt.

3.5.3. Annexin - Färbung

Um apoptotische J774A.1 Makrophagen zu quantifizieren, wurden die Zellen mit Cy3 - konjugiertem Annexin V markiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Phosphatidylserin (PS) ist ein Zellmembranbestandteil, der in lebenden Zellen durch aktiven Transport von der extrazellulären in die intrazelluläre Membranschicht transloziert wird. Während des Apoptoseprozesses gelangt das PS jedoch auch in die äußere Membranschicht, wo es Annexin V in Anwesenheit von Ca^{2+} - Ionen binden kann.

Für die Färbung wurden die J774A.1 Makrophagen mit Annexin - Puffer gewaschen und mit Färbelösung überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut mehrmals mit Puffer vorsichtig gewaschen und anschließend mikroskopiert.

4. ERGEBNISSE

4.1. YopP von *Y. enterocolitica* induziert Apoptose bei J774A.1 Makrophagen

4.1.1. Allgemeiner Versuchsansatz

Das Virulenzplasmid pYV tragende Yersinienstämme sind in der Lage Apoptose bei Makrophagen zu induzieren. Dem Virulenzprotein YopP wird dabei eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Die YopP exprimierenden und sezernierenden Yersinienstämme sind in der Lage, die Aktivierung des nukleären Transkriptions - faktors NF - κB zu verhindern, die Freisetzung von TNFα zu hemmen und Apoptose zu verursachen (Boland et al. 98, Mills et al. 97). Es war bislang aber nicht geklärt, ob außer YopP noch weitere Effektorproteine an der Apoptoseinduktion beteiligt sind. Um unter anderem dieser Frage nachzugehen, wurden Infektionsversuche mit *Y. enterocolitica* - Stämmen, die sich in ihrer Fähigkeit, YopP zu synthetisieren und zu translozieren unterscheiden, durchgeführt. Sechs Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit Cy3 - konjugiertem Annexin V gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Dabei wurden in jedem Versuchsansatz mindestens 100 Zellen gezählt und die Apoptoserate von drei unabhängigen Experimenten in Prozent angegeben.

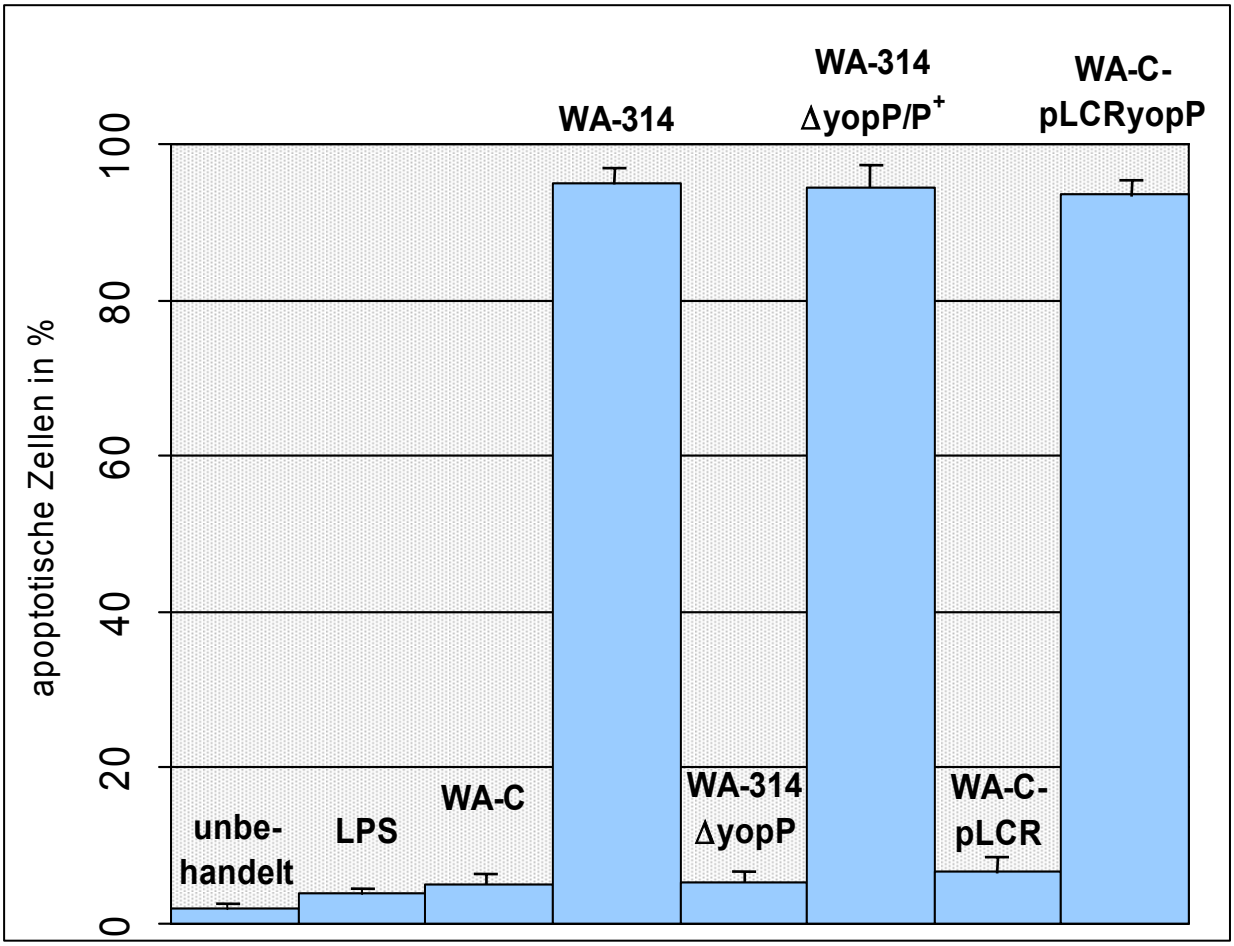
4.1.2. Infektion von J774A.1 Makrophagen mit *Y. enterocolitica* - Stämmen

Wie zu erwarten, induzierte die Infektion mit dem Wildtypstamm WA - 314 bei J774A.1 Makrophagen nach sechs Stunden eine deutliche Apoptoserate (>90%). Unter dem plasmidlosen Derivat WA - C hingegen konnten, wie bei alleiniger Stimulation mit LPS, nur sehr wenige Zellen mit Annexin V angefärbt werden.

Als nächstes wurden die YopP - negative Mutante WA - 314Δ*yopP*, die ein durch Insertion inaktiviertes *YopP* - Gen enthält, und die mit *YopP* komplementierte Mutante WA - 314Δ*yopP*/P$^+$ miteinander verglichen. WA - 314Δ*YopP*/P$^+$ synthetisiert ein Fusionsprotein, das aus YopP und den ersten 138 Aminosäuren von YopE

besteht und unter der Kontrolle des *YopE* Promoters produziert wird (Ruckdeschel et al. 01). Im Gegensatz zu WA - 314Δ*yopP* induzierte dieser Stamm, ähnlich wie WA - 314, deutlich Apoptose. Hieraus lässt sich schließen, dass YopP für die Apoptoseinduktion offensichtlich notwendig ist. Da dadurch jedoch eine Beteiligung anderer Effektor - Yops nicht ausgeschlossen werden kann, wurden Infektionsversuche mit den *Y. enterocolitica* - Stämmen WA - C - pLCR und WA - C - pLCR*yopP* durchgeführt. WA - C - pLCR besitzt ein Plasmid, das nur für die Proteine des Typ III - Sekretionsapparats und das Adhesin YadA kodiert, nicht jedoch für ein translozierbares Effektor - Yop. Der Stamm WA - C - pLCR*yopP* besitzt zusätzlich ein für YopP kodierendes Plasmid und produziert YopP als einziges Effektorprotein (Ruckdeschel et al. 01). Dieser Stamm löste im Gegensatz zu WA - C - pLCR im Infektionsversuch eine annähernd so hohe Apoptoserate wie der Wildtypstamm aus. Folglich kann YopP auch in Abwesenheit anderer Effektorproteine im Infektonsversuch Apoptose bei J774A.1 Makrophagen induzieren.

Abb.9: Nur YopP - produzierende Yersinien induzieren Apoptose bei J774A.1 Makrophagen.



4.2. NF-κB p65 und IKKβ schützen vor der durch Yersinien induzierten Apoptose

4.2.1. Allgemeiner Versuchsansatz

Das Heterodimer NF - κB besteht aus den Untereinheiten p50 und p65, wobei lediglich p65 eine Transaktivierungsdomäne besitzt (Hatada et al. 00). Um die Rolle der Inhibition von NF - κB durch YopP bei der Yersinien - induzierten Apoptose zu untersuchen, wurden Infektionsversuche bei gleichzeitiger Überexpression einzelner NF - κB Untereinheiten durchgeführt.
Dazu wurden J774A.1 Makrophagen mit Expressionsvektoren, die jeweils für eine der Untereinheiten kodieren, oder dem leeren CMV - Kontrollvektor transient transfiziert. Um die transfizierten Zellen identifizieren zu können, wurden die Versuche als Kotransfektionen mit dem β - Galaktosidase - Reporterplasmid durchgeführt, die Zellen 8 Stunden nach Infektion fixiert und mit X - Gal gefärbt. Die Galaktosidase - positiven, blau gefärbten Zellen wurden ausgezählt und nach ihrer Morphologie beurteilt. Apoptotischer Zelltod ist zum einen durch das typische kondensierte und unscharf begrenzte Erscheinungsbild der transfizierten Zellen, zum anderen durch die Reduktion der vitalen blauen Zellen charakterisiert. Um die Apoptoserate bei den transfizierten Makrophagen zu quantifizieren, wurden die blau gefärbten Zellen eines jeden Versuchsansatzes ausgezählt und in Relation zu der nicht infizierten Kontrolle gesetzt.

4.2.2. Infektion von transfizierten J774A.1 Makrophagen

Die Abbildung 10 zeigt Aufnahmen von repräsentativen Gesichtsfeldern, wie sie sich unter einem Lichtmikroskop bei den jeweiligen Transfektions- und Infektionsansätzen darstellten. Nicht infizierte J774A.1 Makrophagen, die mit dem leeren Kontrollvektor pcDNA3.1. transfiziert wurden, erschienen unter dem Lichtmikroskop homogen blau und in ihrer Morphologie gegenüber den nicht gefärbten Zellen unverändert (10a). Die schonende Transfektionsmethode mittels Exgen 500 wies in allen Transfektionen bei J774A.1 Makrophagen eine nur sehr geringe toxische Wirkung auf. Bei Infektion

der, mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen mit dem Wildtypstamm WA - 314 zeigten sowohl die blauen transfizierten, als auch die nicht transfizierten Zellen die typischen morphologischen Charakteristika des apoptotischen Zelltods. Auch nahm die Zahl der gefärbten Zellen deutlich ab (10b).

Abb. 10: Überexpression von p65 in J774A.1 Makrophagen schützt vor YopP - induzierte Apoptose
a) pcDNA 3.1 ohne Bakterien, b) pcDNA 3.1 mit WA - 314,
c) p65 mit WA - 314, d) p65 mit WA - 314Δy*opP*

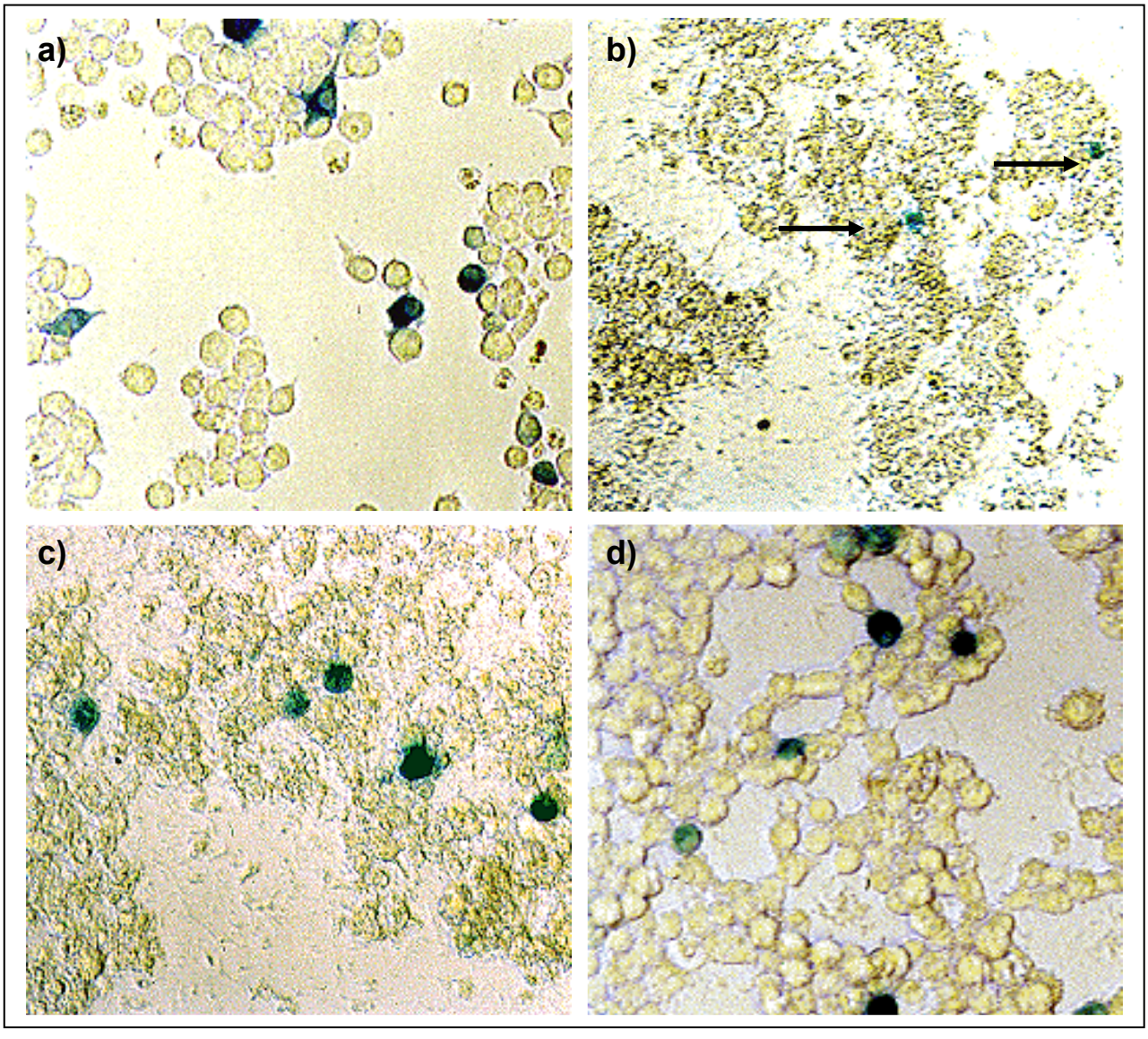
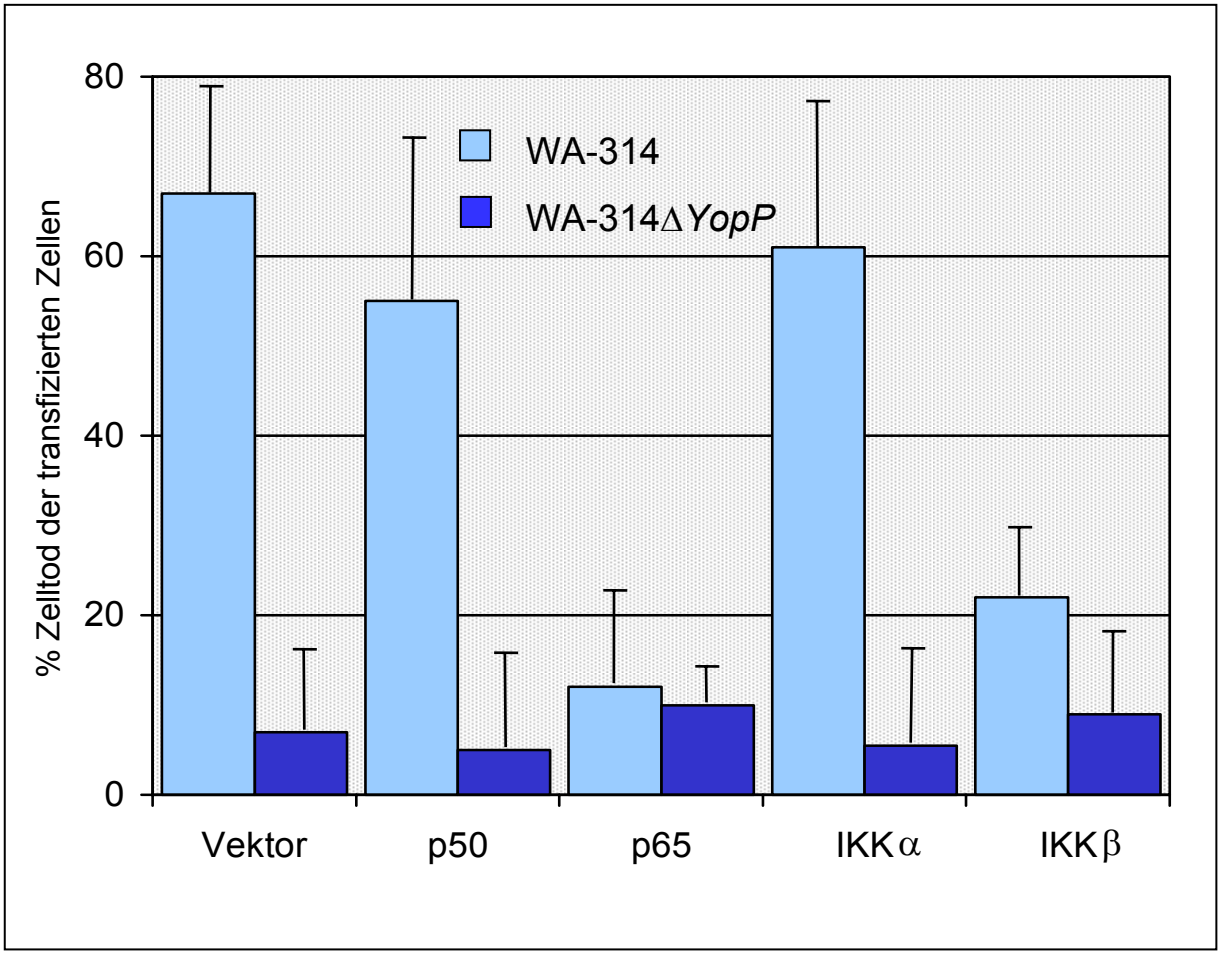


Abbildung 10c zeigt, dass die mit p65 transfizierten Zellen auch nach Infektion mit WA - 314 ihre normale Zellform beibehielten und offenbar überlebten, während die umliegenden nicht transfizierten Zellen apoptotisch wurden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Überexpression von p65 einen schützenden Effekt auf die Yersinien - induzierte Apoptose hat, wohingegen die Transfektion mit dem Leervektor oder dem für das transkriptionell inaktive p50 kodierende Plasmid keinen signifikanten Überlebensschutz vermittelt. Ähnliche Ergebnisse wie für p65 wurden für IKKβ erzielt: Zellen, die das NF - κB aktivierende IKKβ überexprimierten, zeigten eine wesentlich geringere Empfindlichkeit gegenüber Apoptose ausgelöst durch Infektionen mit dem Wildtypstamm. Anders als IKKα ist IKKβ hauptverantwortlich für die Aktivierung von NF - κB bei der bakteriellen Infektion (Delhase et al. 99). Die Transfektion mit einem für IKKα kodierenden Plasmid vermittelte im Gegensatz zu IKKβ keinen nennenswert schützenden Effekt.

Abb.11: Überexpression von p65 und IKKβ schützt J774A.1 Makrophagen vor Yersinien - induzierter Apoptose



4.2.3. NF - κB p65 schützt nicht vor Apoptose durch *Salmonella typhimurium*

Um herauszufinden, ob der protektive Effekt von NF - κB p65 Yersinien - spezifisch ist oder ob p65 generell vor Apoptose schützt, wurden J774A.1 Makrophagen wiederum mit für p65 und IKKβ kodierenden Plasmiden transfiziert und anschließend mit *Salmonella typhimurium* - Stämmen infiziert.
Salmonellen vermitteln über die Aktivierung von Caspase - 1 Apoptose. Wie auch Yersinien translozieren Salmonellen Proteine mit Hilfe eines Typ III - Sekretionsapparats, der durch die Pathogentitätsinsel 1 (SPI - 1) kodiert ist, in die Wirtszelle. Für die Apoptoseinduktion ist ein über diesen Apparat translozierbares Protein namens SipB verantwortlich (Hersh et al. 99). Daher konnten die zwei *S. typhimurium* Mutanten, SL1344 - EE659 und ATCC14028 - MvP215, die in ihrer Fähigkeit, durch SPI - 1 kodierte Proteine zu sezernieren, beeinträchtigt sind, erwartungsgemäß keine Apoptose induzieren. Die Wildtypstämme verursachten jedoch deutliche Apoptose, unabhängig davon, ob die Zellen vorher mit dem leeren Expressionsvektor (12 - 25% überlebende Zellen), oder mit IKKβ- (15 - 25 % überlebende Zellen) oder p65 - Expressionsplasmid (15 – 20 % überlebende Zellen) transfiziert wurden.

4.2.4. Fazit

Sowohl die Überexpression der NF - κB - Untereinheit p65, als auch von IKKβ hat einen schützenden Einfluss auf die durch YopP induzierte Apoptose. Dieser Effekt deutet darauf hin, dass YopP durch die Inhibition der NF - κB - Aktivierung Apoptose induziert. Die Schutzwirkung von NF- κB scheint yersinienspezifisch zu erfolgen, andere YopP - Effektormechanismen sind für die Entstehung von Apoptose offenbar von geringerer Bedeutung.

4.3. LPS - Stimulation steigert die Fähigkeit von YopP, Apoptose bei J774A.1 Makrophagen zu induzieren.

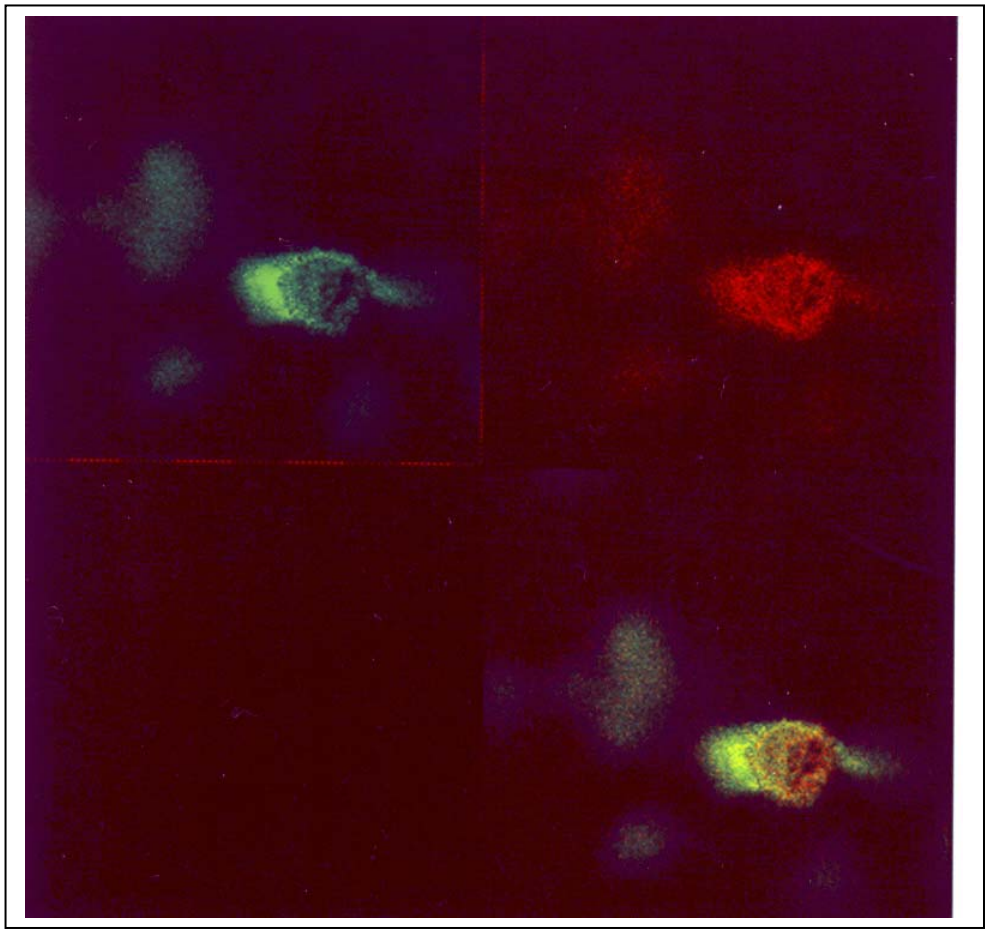
4.3.1. Allgemeiner Versuchsansatz

Bei den Infektionsversuchen konnte eine wesentliche Beteiligung anderer Effektorproteine neben YopP an der Apoptoseentstehung ausgeschlossen werden. Um herauszufinden, ob YopP auch ohne bakterielle Infektion Apoptose von Makrophagen auslösen kann, wurde das *yopP* - Gen in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert. Das Plasmid exprimiert YopP konstitutiv unter Kontrolle eines CMV Promoters. Mit diesem Konstrukt und dem β - Galaktosidase - Reporter wurden J774A.1 Makrophagen transfiziert. Nach X - Gal - Färbung wurde die Morphologie der blaugefärbten transfizierten Zellen unter einem Lichtmikroskop auf Einzelzellebene untersucht.

4.3.2. Nachweis von intrazellulärem YopP bei transfizierten J774A.1 Makrophagen

Da das von den transfizierten Makrophagen synthetisierte YopP ein myc - Erkennungsepitop besitzt, sollte durch Fluoreszenzmarkierung die Expression des YopP - myc - Gens nachgewiesen werden. Dazu wurden die kotransfizierten Zellen mit einem Kaninchen anti - β - Galaktosidase - Antikörper und das YopP - Protein mit einem Maus anti - myc - Antikörper markiert. Nach Färbung mit geeigneten Sekundärantikörpern zeigten transfizierte Zellen sowohl Grün - (YopP), als auch Rot - Fluoreszenz (β - Galaktosidase). Da die β - Galaktosidase - Produktion jedoch stabiler erschien als die YopP - Produktion, wurde zur Identifizierung der kotransfizierten Zellen bei allen weitern Immunfluoreszenzversuchen der β - Galaktosidase - Antikörper verwendet.

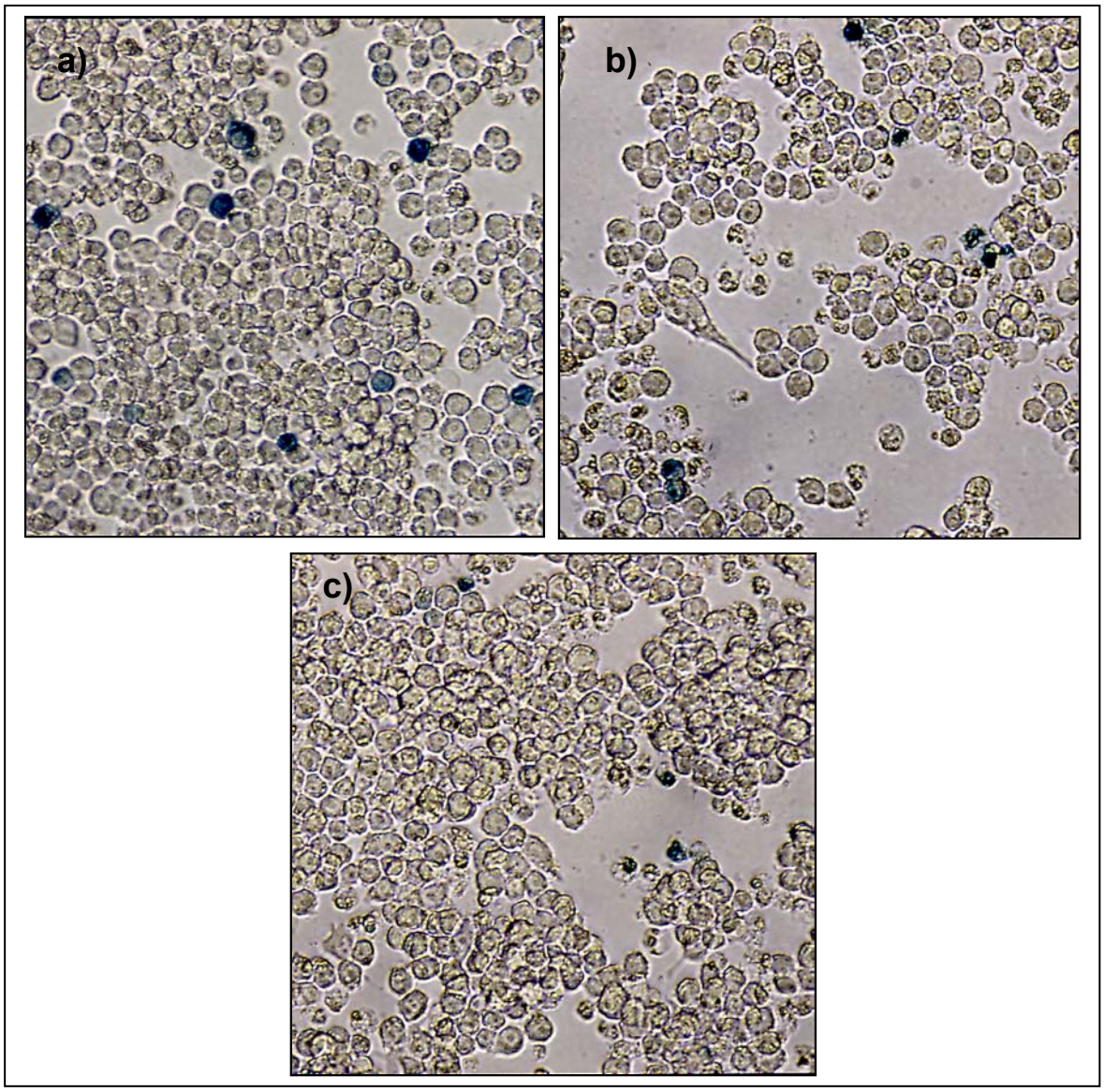
Abb. 12: Koexpression von YopP (grün) und β - Galaktosidase (rot) von kotransfizierten J774A.1 Makrophagen



4.3.3. LPS - Stimulation transfizierter J774A.1 Makrophagen

Nach Kotransfektion mit dem Kontrollplasmid pcDNA 3.1 (-) und dem Reporterplasmid unterschieden sich die transfizierten X - Gal - gefärbten Zellen morphologisch nicht von den übrigen Zellen (Abb. 13a). Wurde jedoch statt mit dem Kontrollplasmid mit dem YopP - Plasmid transfizierten, wiesen 40 bis 50 % der transfizierten Makrophagen Charakteristika von Apoptose auf. Die übrigen Zellen waren morphologisch unverändert (Abb. 13b). Nach zusätzlicher LPS - Exposition (10 μg/ml) stieg der Anteil der kompromittierten Zellen auf 80 - 90% (Abb. 13c). Auf nichttransfizierte oder mit dem Kontrollvektor transfizierte Zelle hatte die LPS - Stimulation keinen sichtbaren Effekt.

Abb. 13: Kotransfizierte J774A.1 Makrophagen vor und nach LPS - Stimulation:
a) pcDNA 3.1 (-) mit LPS, b) YopP ohne LPS, c) YopP mit LPS



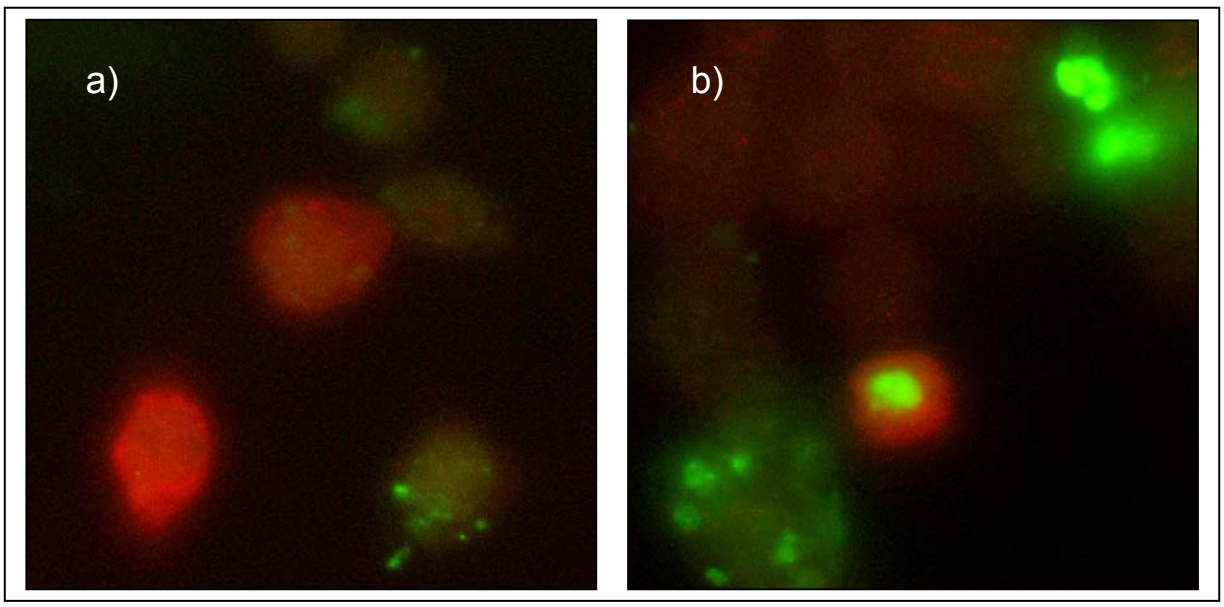
Diese Ergebnisse zeigen, dass das von Makrophagen synthetisierte YopP, offensichtlich alleine Apoptose induzieren kann. Die zusätzliche Stimulation mit LPS induziert einen Signalweg, der zu einer Steigerung der Apoptoserate führt. Offenbar ist für diesen synergistischen LPS - Effekt die gleichzeitige Anwesenheit von YopP notwendig.

4.3.4 Nachweis von Apoptose durch TUNEL - Färbung

Viele morphologische Aspekte der transfizierten und mit LPS behandelten Zellen erinnerten an Apoptose. Der Beweis für das Vorliegen von Apoptose sollte mittels der so genannten TUNEL - Färbung (**T**dT mediated d**U**TP **N**ick **E**nd **L**abeling) auf Einzelzellebene erbracht werden. Bei der TUNEL - Färbung wird Apoptose durch spezifische Markierung fragmentierter DNS mit einem FITC - markierten Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen. Die kotransfizierten Zellen wurden zur Identifizierung mit einem Anti - β - Galaktosidase - Antikörper markiert und mit einem TRITC - konjugierten Sekundärantikörper fluoreszenzgefärbt. Somit konnten unter Verwendung eines Mischfilters im Fluoreszenzmikroskop die rot fluoreszierenden, transfizierten Zellen auf apoptotische DNS - Fragmentierung (grüne Fluoreszenz) untersucht werden.

20 - 30 % der mit dem Kontrollvektor kotransfizierten Makrophagen waren nach sechsstündiger LPS - Stimulation (10 μg/ml) TUNEL - positiv. Das Auftreten von Apoptose in diesem Ausmaß ist in Abwesenheit von YopP auf die Transfektion an sich zurückzuführen. Die YopP transfizierten und mit LPS stimulierten Zellen hingegen wiesen in 80 - 90 % eine positive TUNEL - Färbung auf (siehe Abb. 14). Diese Ergebnisse zeigen, dass die morphologischen Veränderungen, die durch YopP und LPS induziert werden, auf Apoptose zurückzuführen sind.

Abb. 14: YopP und β - Galaktosidase (rot) exprimierende J774A.1 Makrophagen zeigen nach LPS - Stimulation (b) apoptotische DNS - Fragmentierung (grün), in Abwesenheit von LPS nicht (a).



4.3.5. Polymyxin B - Versuch

Um zu untersuchen, ob LPS direkt oder indirekt über die Freisetzung sekundärer Aktivatoren, wie z. B. TNFα, die YopP - induzierte Apoptose steigert, wurde ein in Abbildung 15 schematisch dargestellter Versuchansatz mit Polymyxin B durchgeführt. Polymyxin B bindet freies LPS und inhibiert dadurch seine Wirkung. Nach erfolgreicher Apoptoseinduktion durch YopP - Transfektion und LPS - Stimulation wurde der Zellkulturüberstand abgenommen. Jeweils die Hälfte des Überstandes wurde wiederum auf YopP - transfizierte Zellen pipettiert. Einem der beiden Medien wurde jedoch zuvor Polymyxin B zugegeben, um das enthaltenen LPS zu inaktivieren. Dabei zeigte sich, dass nach Zugabe von Polymyxin B die Apoptosesteigerung ausbleibt. Die Apoptoseverstärkung scheint also in der Tat direkt auf LPS, und auf keinen nach LPS - Stimulation ins Medium freigesetzten Mediator zurückzuführen zu sein.

Abb. 15: Polymyxin - B - Versuch

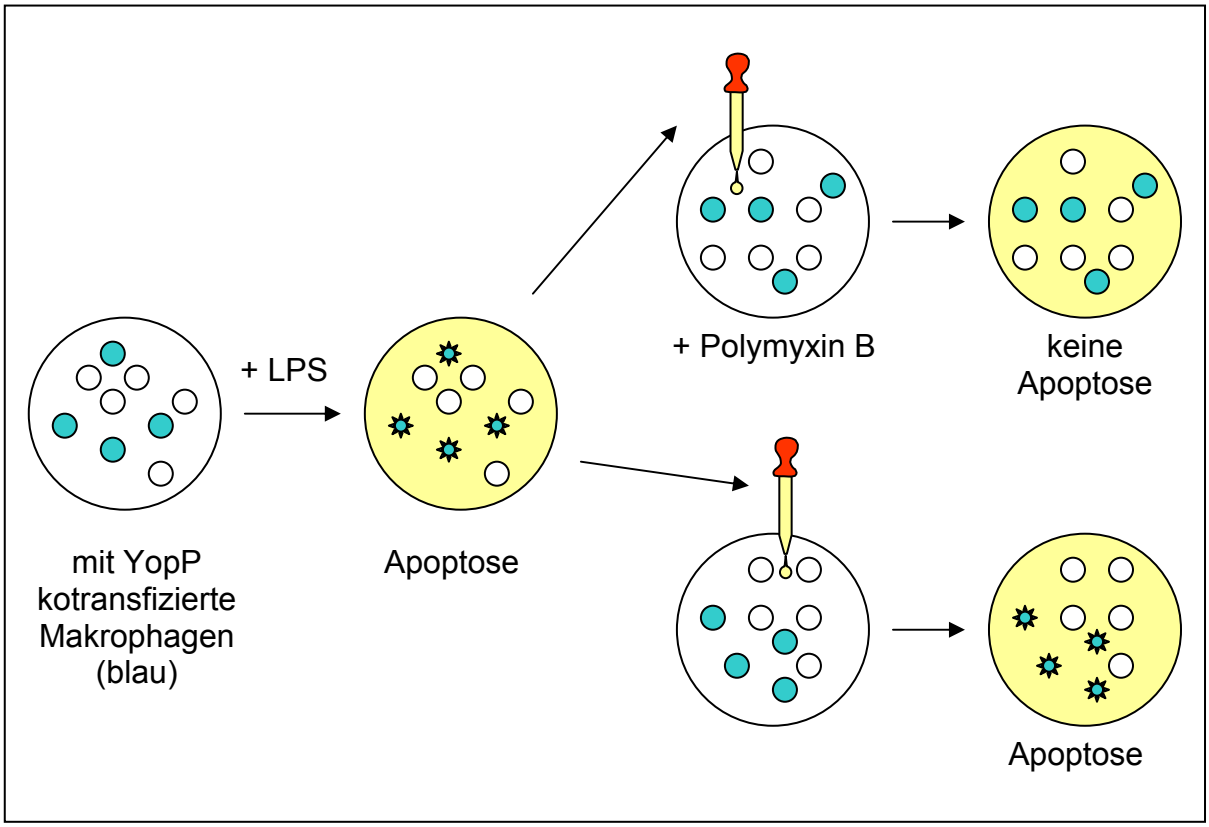
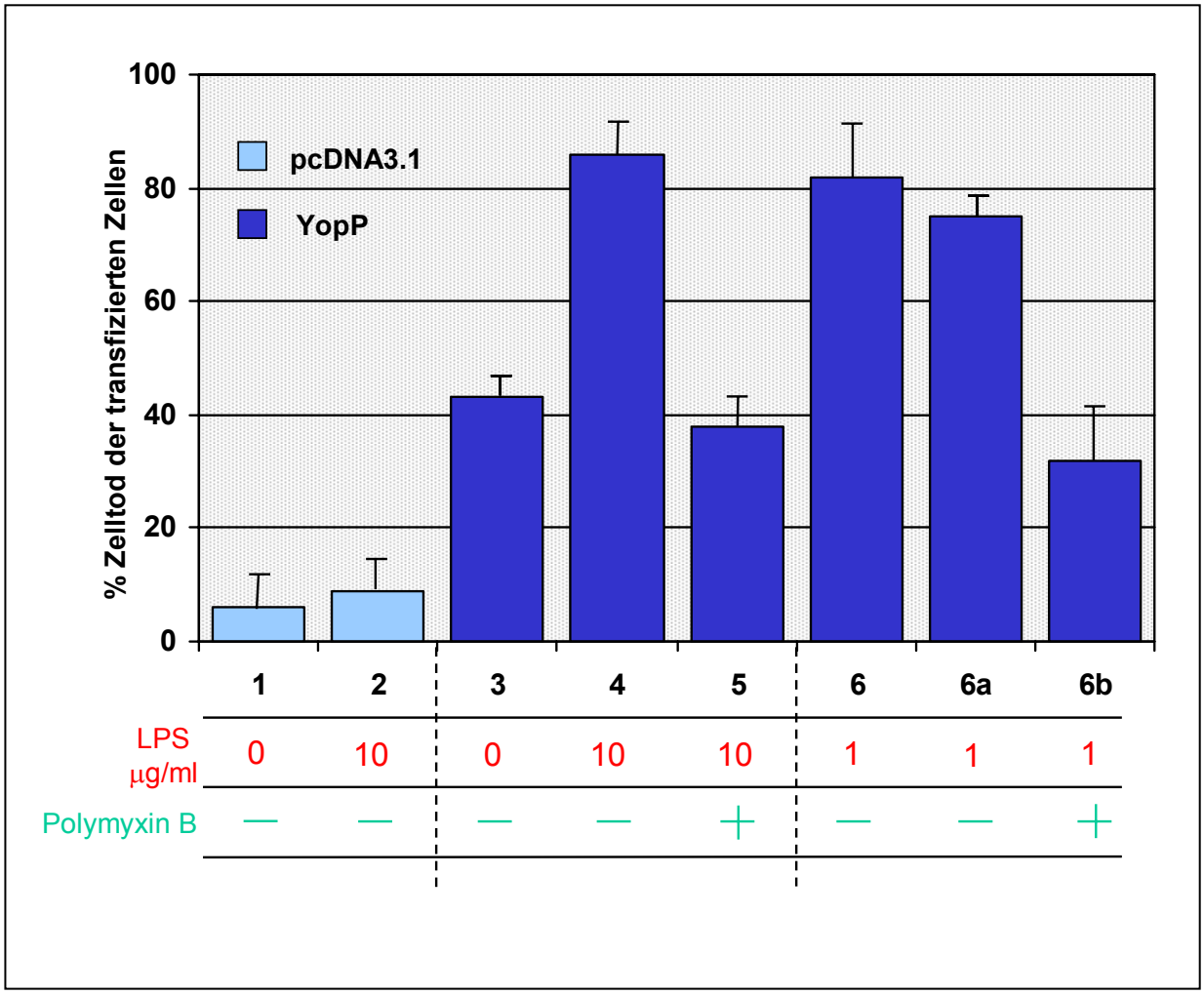


Abb. 16: LPS steigert die durch YopP induzierte Apoptose. Der nach erfolgreich induzierter Apoptose (6) entnommene Zellkulturüberstand (6a, 6b) verliert nach Polymyxinbehandlung seine apoptosesteigernde Wirkung (6b).



4.4. Überexprimiertes NF - κB p65 transloziert in den Zellkern und schützt vor YopP und LPS induzierter Apoptose

4.4.1. Allgemeiner Versuchsansatz

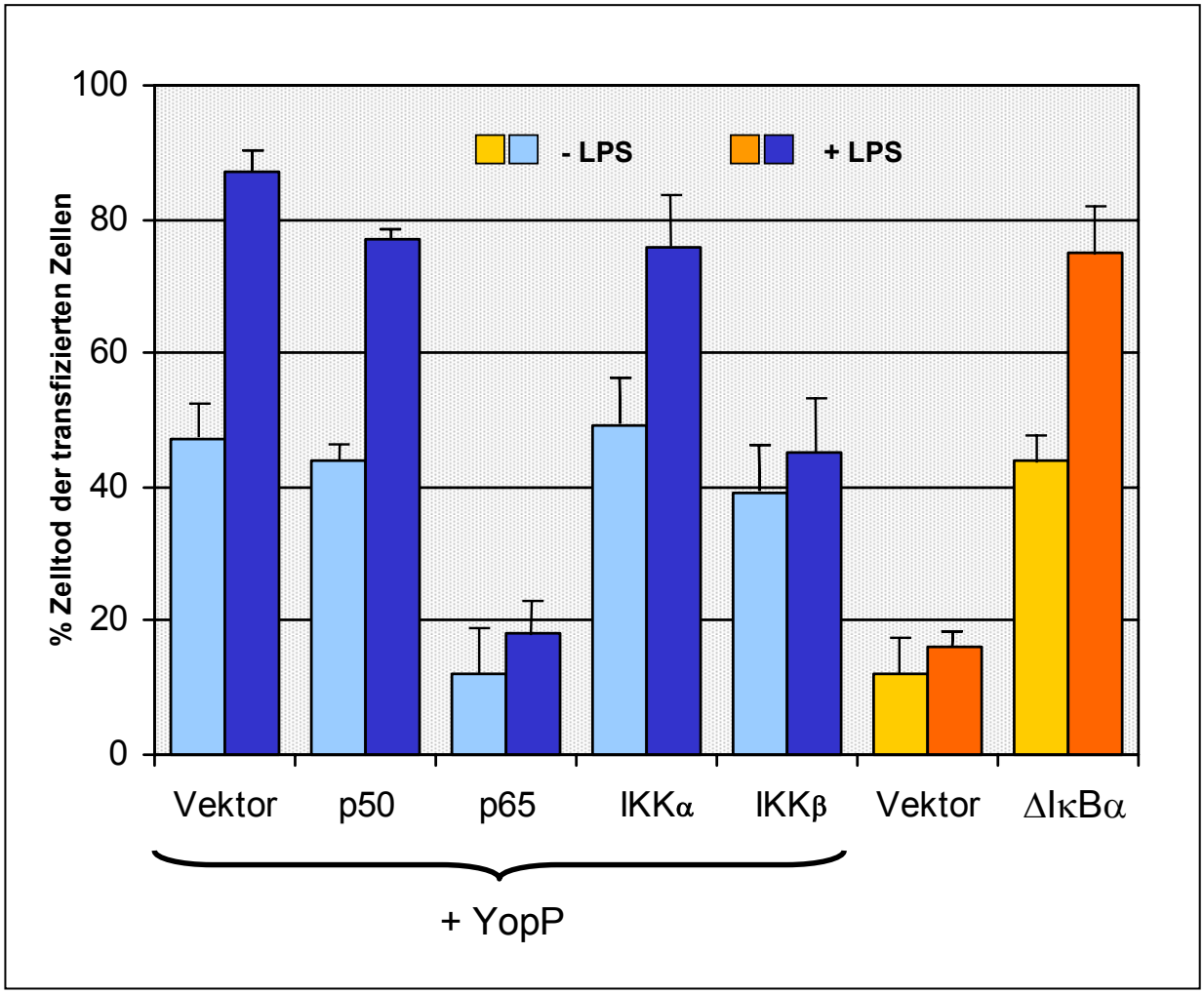
Wie bei den Infektionsversuchen mit *Y. enterocolitica* gezeigt werden konnte, verhindert überexprimiertes NF - κB p65 die Induktion von Apoptose bei J774A.1 Makrophagen. Es sollte ermittelt werden, ob NF - κB p65 einen ähnlich protektiven Effekt auf die YopP- und LPS - vermittelte Apoptose ausübt. Ferner sollte durch Immunfluoreszenzfärbung auf Einzelzellebene untersucht werden, ob überexprimiertes NF - κB p65 tatsächlich in den Zellkern wandert und somit die Zelle vor Apoptose schützt.

4.4.2. NF - κB p65 - Überexpression im Transfektionsmodell

Ähnlich wie in den Infektionsexperimenten wurden die Makrophagen mit Plasmiden transfiziert, die für p50, p65, IKKβ und IKKα kodieren. Statt der Infektion wurden die Zellen mit dem YopP - Plasmid bzw. dem Kontrollvektor kotransfiziert und mit LPS stimuliert. In Korrelation zu den Infektionsversuchen konnte der Apoptose induzierende Effekt von YopP nach Stimulation mit LPS durch Überexpression von p65 inhibiert werden, wohingegen p50 und IKKα die Zellen nicht schützen konnten (siehe Abb. 17). Die Überexpression von IKKβ konnte nur zu einem sehr geringen Grad Zellen vor dem programmierten Zelltod bewahren. Möglicherweise ist die Menge des transfizierten YopP größer, als die YopP - Menge, die durch Yersinien transloziert wird, so dass überexprimiertes IKKβ durch YopP - Transfektion noch zu einem Großteil inhibiert werden kann.
Die Überexpression einer phosphorylierungsinaktiven ΔIκBα Mutante ergab vergleichbare Ergebnisse wie die Transfektion mit YopP. Die Mutante kann nicht durch den IKK - Komplex phosphoryliert werden, was eine NF - κB Freisetzung verhindert. Dadurch zeigt ΔIκBα eine ähnliche Aktivität wie YopP. Die zusätzliche

LPS - Exposition konnte deshalb bei ΔIκBα - transfizierten Zellen in ähnlicher Weise wie bei YopP - transfizierten Zellen die Apoptoserate deutlich steigern (Abb. 17).

Abb. 17: Die durch Überexpression von YopP und LPS - Exposition induzierte Apoptose wird von p65 inhibiert. ΔIκBα imitiert den YopP - Effekt.

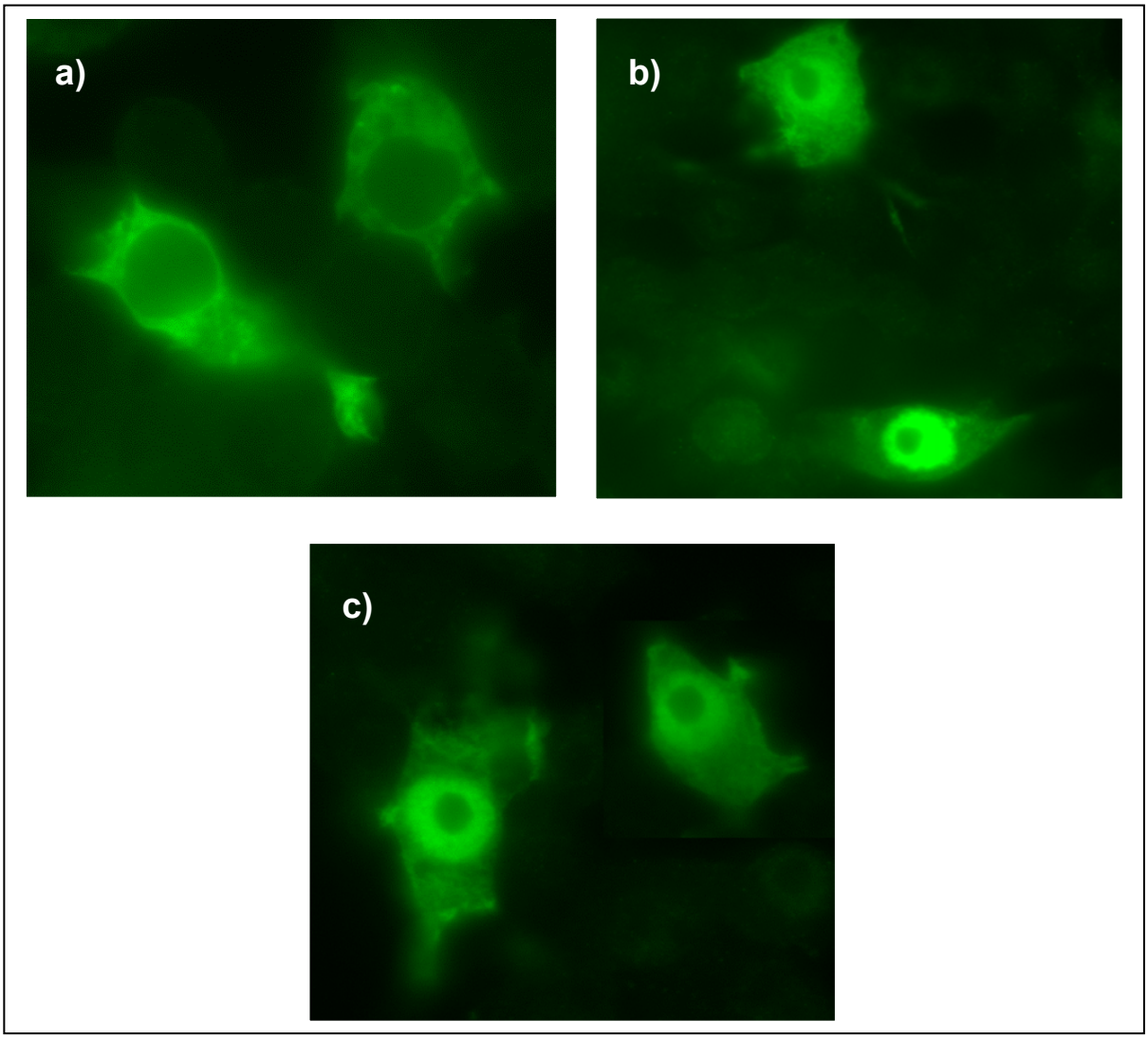


4.4.3. Fluoreszenzfärbung von überexprimiertem NF - κB p65

In J774A.1 Makrophagen wurde NF - κB p65 überexprimiert und mit einem anti - p65 - Antikörper fluoreszenzgefärbt. Dabei wurde entweder mit dem Kontrollplasmid pcDNA 3.1 (-) oder mit dem YopP - Plasmid kotransfiziert. Die zelluläre Lokalisation von NF - κB wurde analysiert. Da das im Zytoplasma an seinen Inhibitorkomplex

gebundene NF - κB erst nach Aktivierung in den Zellkern transloziert, stellte sich überexprimiertes NF - κB p65 im nicht stimulierten Zustand hauptsächlich im Zytoplasma der transfizierten Zellen dar (siehe Abb. 18a). Nach Stimulation mit LPS konnte eine Translokation von NF - κB auch in Anwesenheit von YopP in den Zellkern beobachtet werden. Die Zellen behielten dabei ihre vitale Morphologie (siehe Abb. 18b und 18c). Diese Ergebnisse zeigen, dass das die Translokation des überexprimierten NF - κB p65 die Zelle vor der durch YopP induzierten Apoptose schützt.

Abb. 18: Überexprimiertes NF - κB p65 wird auch in Anwesenheit von YopP nach LPS - Stimulation in den Zellkern von J774A.1 Makrophagen transloziert. Immunfluoreszenzfärbung mit anti - p65 - Antikörpern.
a) pcDNA 3.1 b) pcDNA 3.1 mit LPS c) YopP mit LPS.



4.4.4. Fazit

Der Schutz vor Apoptose durch überexprimiertes p65 deutet darauf hin, dass die Unterbrechung des NF - κB - Signalwegs durch YopP den Hauptmechanismus der YopP induzierten Apoptose darstellt. Des Weiteren demonstrieren die Ergebnisse die bedeutende Rolle von NF - κB bei der Sicherstellung zellulären Überlebens von LPS - stimulierten Makrophagen.

4.5. MyD88, nicht aber IRAK1 oder TRAF6, vermitteln Apoptose nach LPS - Stimulation einer MyD88 - IRAK - TRAF6 - abhängigen Signalkaskade

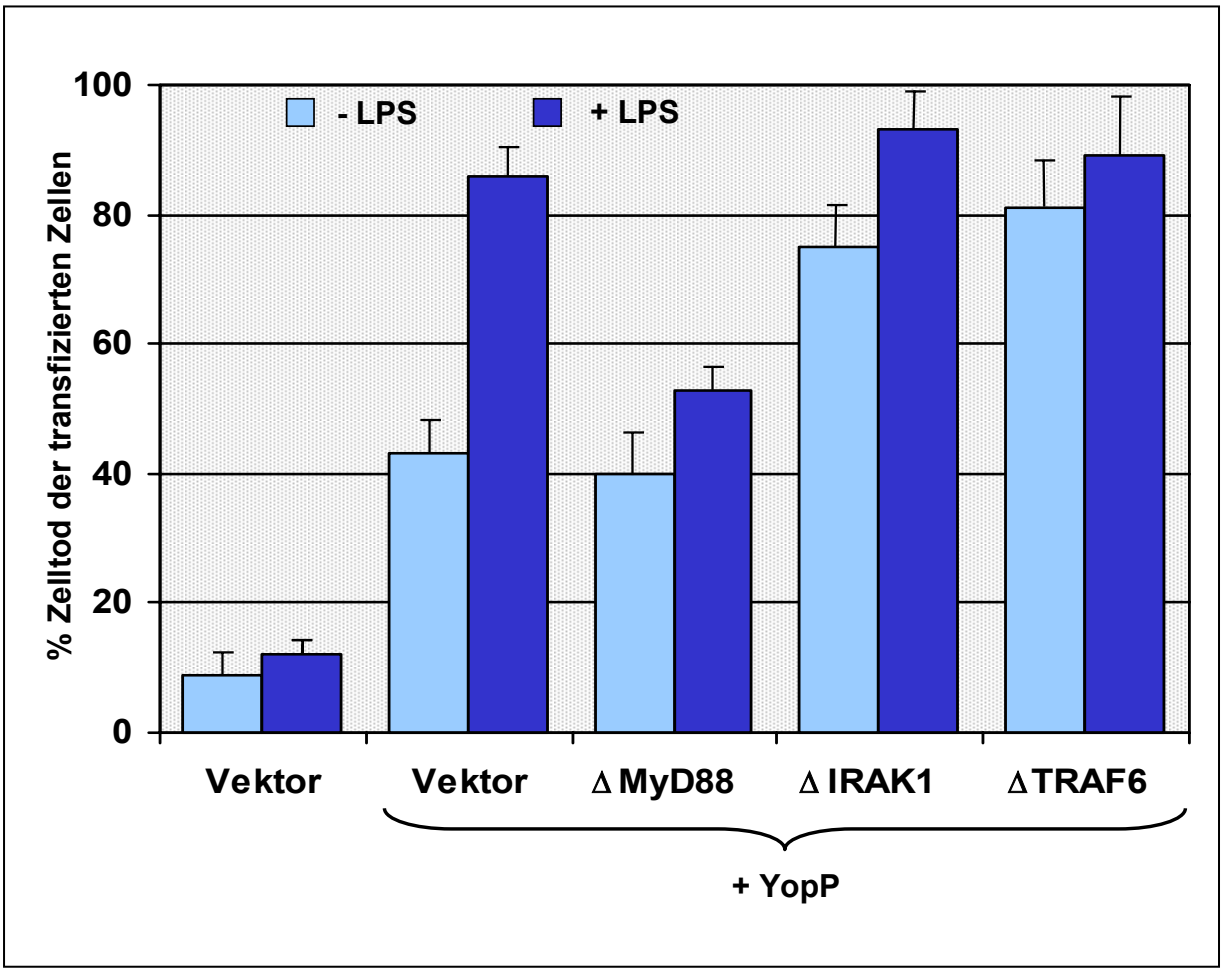
Es war bekannt, dass LPS über den TLR4 - Rezeptor und eine MyD88 - IRAK - TRAF6 - abhängige Signalkaskade NF - κB aktiviert (Zhang et al. 99, Yang et al. 99). Um zu untersuchen, ob diese Transmitter auch an der YopP- und LPS - vermittelten Apoptose in Makrophagen beteiligt sind, wurden dominant - negative Konstrukte gemeinsam mit YopP in J774A.1 Makrophagen koexprimiert. Das Prinzip dominant – negativer Inhibitorstudien beruht auf der kompetitiven Verdrängung endogener Signalmoleküle von intermolekularen Bindungsstellen durch die Überexpression funktionsuntüchtiger Konstrukte. Dadurch werden die betroffenen Signalwege blockiert. Die Apoptoserate wurde als die Anzahl der apoptotischen, transfizierten Zellen in Relation zu der Gesamtzahl aller blau gefärbten Zellen definiert.

Zunächst wurde die dominant - negative Mutante des Adapterproteins MyD88 zusammen mit YopP in J774A.1 Makrophagen koexprimiert. Nach Zugabe von LPS konnte hierbei nur eine geringe Steigerung der Apoptoserate beobachtet werde. Die alleine durch YopP vermittelte Apoptose hingegen blieb unbeeinflusst. Da ΔMyD88 LPS - abhängiger Apoptose entgegenwirkt scheint MyD88 an der Induktion des proapoptotischen Signalweges durch LPS beteiligt zu sein.

Im Gegensatz zu ΔMyD88 hatte weder dominant - negatives ΔIRAK1, noch ΔTRAF6 einen schützenden Effekt auf die mit YopP transfizierten und LPS - stimulierten Zellen (ΔIRAK1: 96 ± 3%; ΔTRAF6: 92 ± 6%). Beide dominant - negativen Transmitter steigerten sogar die durch YopP verursachte Apoptose in Abwesenheit von LPS.

IRAK1 und TRAF6 haben also offenbar keine proapoptotische, aber möglicherweise eine antiapoptotische Funktion.

Abb. 19: Dominant - negatives ΔMyD88 inhibiert im Gegensatz zu ΔIRAK1 und ΔTRAF6 die LPS vermittelte Apoptosesteigerung nach Transfektion mit YopP.



4.6. IRAK2 induziert NF - κB - Aktivierung und apoptotischen Zelltod von Makrophagen

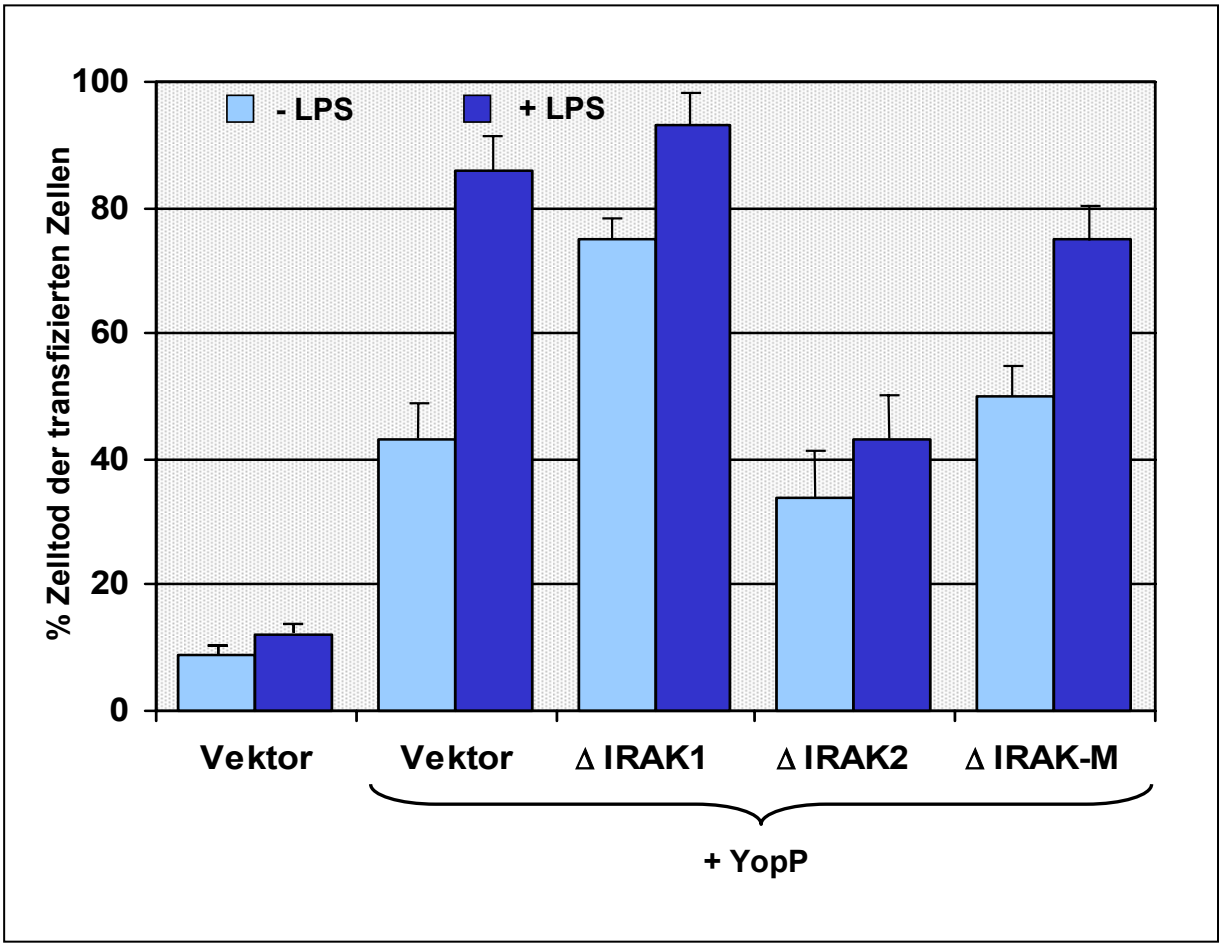
4.6.1. Allgemeiner Versuchsansatz

Da unterhalb von MyD88 neben IRAK1 auch IRAK2, IRAK4 und IRAK - M eine Aktivierung von NF - κB vermitteln, wurde untersucht ob diese IRAK - Moleküle möglicherweise auch eine zusätzliche proapoptotische Funktion wahrnehmen können. Es wurde der Effekt von dominant - negativen ΔIRAK2- und ΔIRAK - M - Konstrukten im Vergleich zu ΔIRAK1 charakterisiert.

4.6.2. Analyse der Effekte von ΔIRAK1, ΔIRAK2 und ΔIRAK- M auf das zelluläre Überleben im Transfektionsmodell

J774A.1 Makrophagen wurden mit den dominant - negativen ΔIRAK - Mutanten, mit dem YopP - Plasmid und dem β - Galaktosidase - Reporterplasmid kotransfiziert. ΔIRAK2 zeigte dabei einen zu ΔIRAK1 unterschiedlichen Effekt. Im Vergleich zu mit Leervektor und YopP transfizierten Zellen (82 ± 7 % apoptotische Zellen) wurden die Zellen, die ΔIRAK2 und YopP exprimierten, nur zu einem geringern Anteil apoptotisch (44 ± 6 % apoptotische Zellen). Damit besitzt ΔIRAK2, nicht aber ΔIRAK1, eine schützende Funktion gegenüber der Apoptose steigernden Wirkung von LPS. ΔIRAK - M wies einen intermediären Effekt auf und konnte den Anstieg der Apoptoserate nach Zugabe von LPS nur geringfügig reduzieren. IRAK2 scheint also neben MyD88 an der Induktion eines apoptotischen Signals nach LPS - Stimulation beteiligt zu sein.

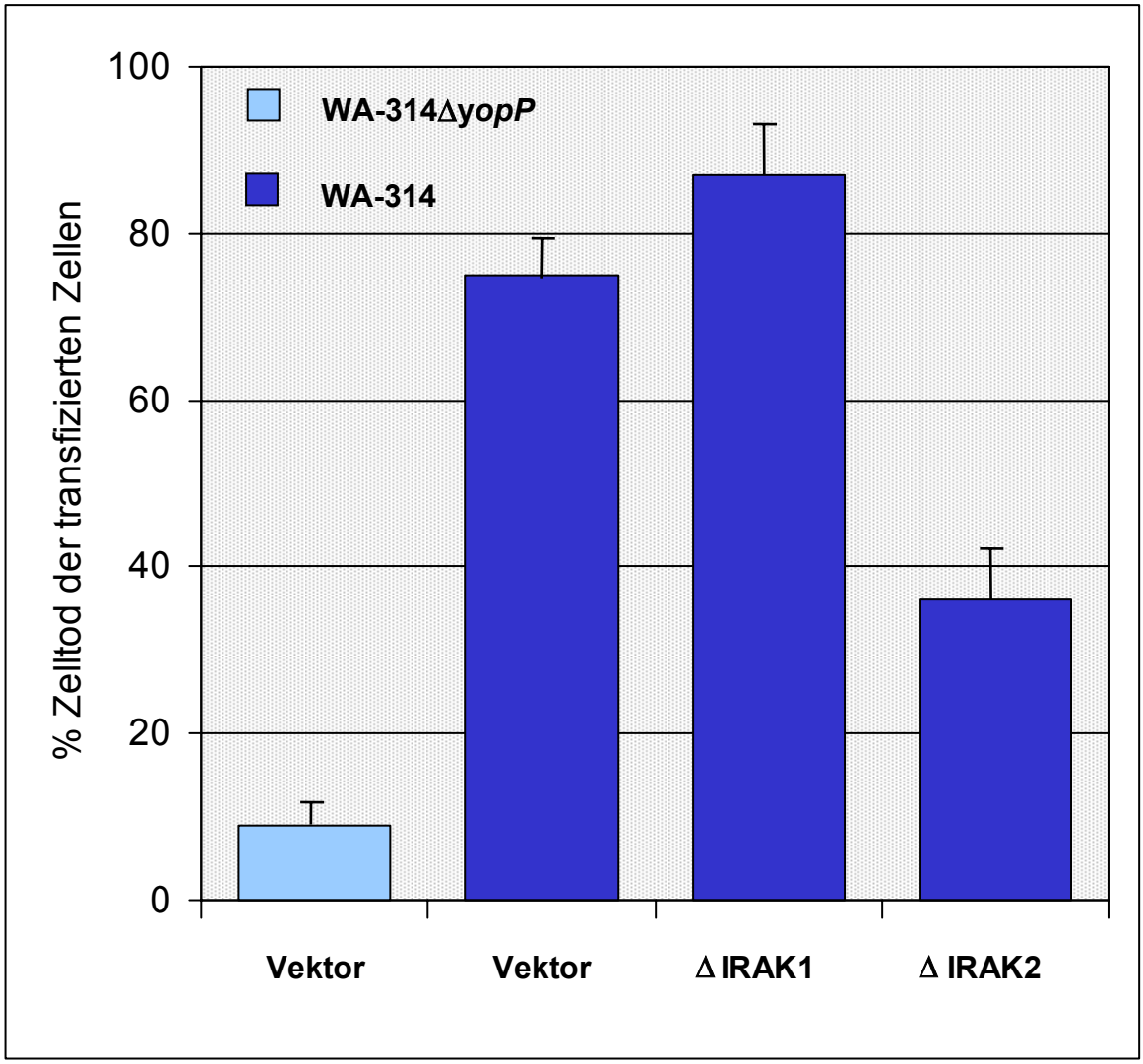
Abb. 20: ΔIRAK2 besitzt im Gegensatz zu ΔIRAK1 eine antiapoptotische Aktivität.



4.6.3. ΔIRAK1 und ΔIRAK2 im Infektionsversuch

Wurden die J774A.1 Makrophagen mit ΔIRAK1 oder ΔIRAK2 transfiziert und anschließend mit dem *Y. enterocolitica* Wildtypstamm WA - 314 oder der YopP negativen Mutante WA - 314Δ*yopP* infiziert, zeigte sich ein ähnlich divergenter Effekt, wie in den Transfektionsversuchen. Die Zellen, die ΔIRAK2 exprimierten, waren nach Wildtypinfektion deutlich vor Apoptose geschützt (Abb. 21), wohingegen die mit ΔIRAK1 transfizierten Zellen sogar noch stärker Apoptose zeigten als die Kontrollgruppe, die keines der beiden dominant - negativen Konstrukten synthetisierten. Somit konnte die antiapoptotische Wirkung von ΔIRAK2 im Infektionsversuch bestätigt werden.

Abb. 21: ΔIRAK2 schützt vor Yersinien induzierter Apoptose.



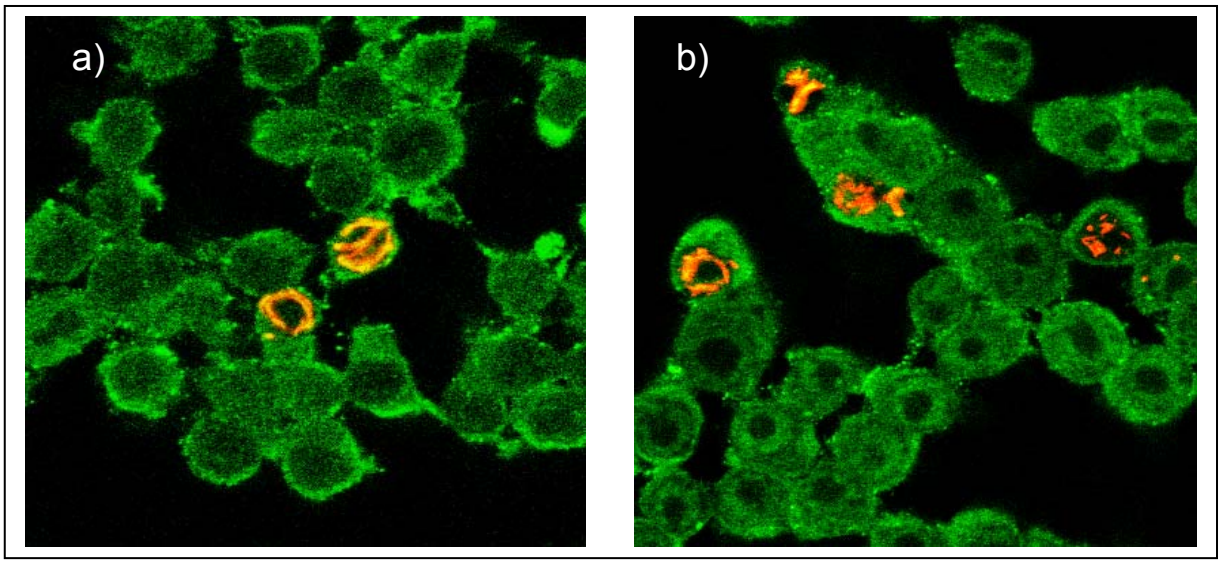
4.6.4. Analyse des Einflusses von ΔIRAK1 und ΔIRAK2 auf die nukleäre Translokation von NF - κB

Sowohl IRAK1 als auch IRAK2 sind an der LPS induzierten NF - κB Aktivierung beteiligt. Die unterschiedlichen Effekte von ΔIRAK1 und ΔIRAK2 auf das zelluläre Überleben könnten somit auch auf eine unterschiedliche Beeinflussung der NF - κB - Aktivierung zurückzuführen sein. Daher sollte mittels Immunfluoreszenzfärbung die Induktion bzw. die Inhibition der nukleären Translokation von endogenem NF - κB p65 in Anwesenheit von dominant - negativem IRAK1 und IRAK2 untersucht werden.

Die transfizierten Zellen konnten durch Fluoreszenzmarkierung der jeweiligen Antikörpererkennungsepitope von ΔIRAK1 (c - myc) und ΔIRAK2 (AU - 1) identifiziert werden. Die Spezifität der beiden polyklonalen Antikörper wurde zunächst durch Kotransfektion mit dem β - Galaktosidase - Reporterplasmid verifiziert. Für die weiteren Versuche wurden dann lediglich die Anti - c-myc - und Anti - AU-1 - Antikörper verwendet.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Arbeiten konnten die ΔIRAK´s im Zellkern und der perinukleären Region lokalisiert werden (Bol et al 00). Bei nicht stimulierten Zellen befand sich der größte Teil des grün fluoreszierenden p65 im Zytoplasma. Nach Stimulation der Makrophagen mit LPS über 6 Stunden konnte aktiviertes NF - κB in den Zellkernen der nicht transfizierten Zellen lokalisiert werden. Die mit ΔIRAK1 oder ΔIRAK2 transfizierten Zellen hingegen zeigten auch nach LPS - Exposition keine nukleäre Translokation von NF - κB (siehe Abb. 22). Beide dominant - negativen Proteine konnten somit die Aktivierung von NF - κB verhindern.

Abb. 22: ΔIRAK2 inhibiert bei J774A.1 Makrophagen die nukleäre Translokation von NF - κB p65 nach LPS - Stimulation. Immunfluoreszenzfärbung mit anti - p65 - Antikörpern (grün) und anti - AU1 - Antikörpern (rot).
a) ΔIRAK2 ohne LPS - Stimulation b) ΔIRAK2 mit LPS - Stimulation



4.6.5. Fazit

Sowohl ΔIRAK1 als auch ΔIRAK2 blockieren die LPS induzierte NF - κB Aktivierung. Da aber offenbar nur ΔIRAK2 das LPS - abhängige, proapoptotische Signal hemmen kann, scheint die Auftrennung der pro- und antiapoptotischen Signaltransduktionswege auf Höhe der IRAK - Moleküle zu erfolgen.

4.7. IRAK1 und TRAF6 sichern das Überleben von Makrophagen nach LPS - Stimulation

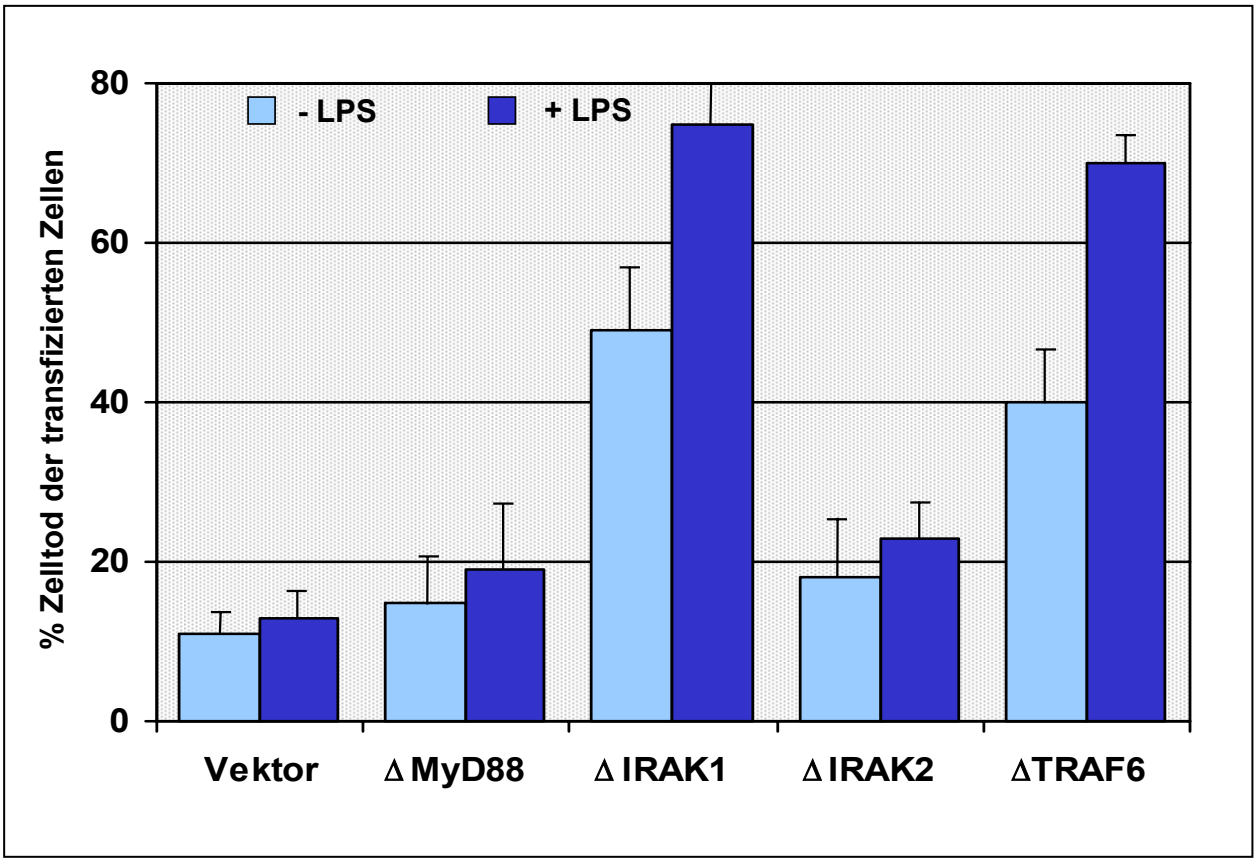
Die bisher gewonnenen Ergebnisse lassen vermuten, dass durch LPS parallel sowohl ein pro- als auch ein antiapoptotisches Signal ausgelöst wird. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob LPS nach Transfektion mit den dominant - negativen Signaltransmittern auch in Abwesenheit von YopP Apoptose bei Makrophagen induzieren kann. J774A.1 Makrophagen wurden dazu mit dem β - Galaktosidase - Reporterplasmid und mit den jeweiligen dominant - negativen Konstrukten kotransfiziert. Die Apoptoserate der Zellen wurde nach Exposition mit LPS untersucht.

Die Überexpression von ΔMyD88 und ΔIRAK2 konnte die Überlebensfähigkeit LPS - stimulierter Zellen nicht signifikant beeinflussen (Abb. 23). Im Gegensatz dazu konnte ΔIRAK1 eine deutliche Induktion von Apoptose bei LPS - stimulierten Makrophagen verursachen (76 ± 6% Apoptoserate). Ein dominant - negatives Konstrukt des in der NF - κB - Signalkaskade unterhalb von IRAK1 geschalteten TRAF6 erzielte ein sehr ähnliches Ergebnis (71 ± 4 % Apoptoserate). Der proapoptotische Effekt beider Proteine konnte durch Zugabe des Breitspektrum - Caspaseinhibitors z-VAD - fmk reduziert werden (28 ± 3 % bzw. 29 ± 4% Apoptoserate).

Die Beobachtung, dass ΔIRAK1 und ΔTRAF6, ähnlich wie YopP, bei LPS - Stimulation Apoptose vermitteln, lässt vermuten, dass die Inhibition der NF - κB - Aktivierung durch diese Konstrukte für die Apoptoseauslösung verantwortlich ist. IRAK1 und TRAF6 scheinen also eine essentielle Rolle bei der Induktion des antiapoptotischen NF - κB - Signalswegs zu spielen. Da im Gegensatz dazu IRAK2

und MyD88 sowohl den antiapoptotischen, als auch den proapoptotischen NF - κB - Signalweg bedienen können, hat die Überexpression dominant - negativer ΔIRAK2- und ΔMyD88 - Konstrukte keinen nennenswerten Einfluss auf das zelluläre Überleben.

Abb. 23: Effekte der dominantnegativen Signaltransmitter auf das Überleben von LPS behandelten J774A.1 Makrophagen.

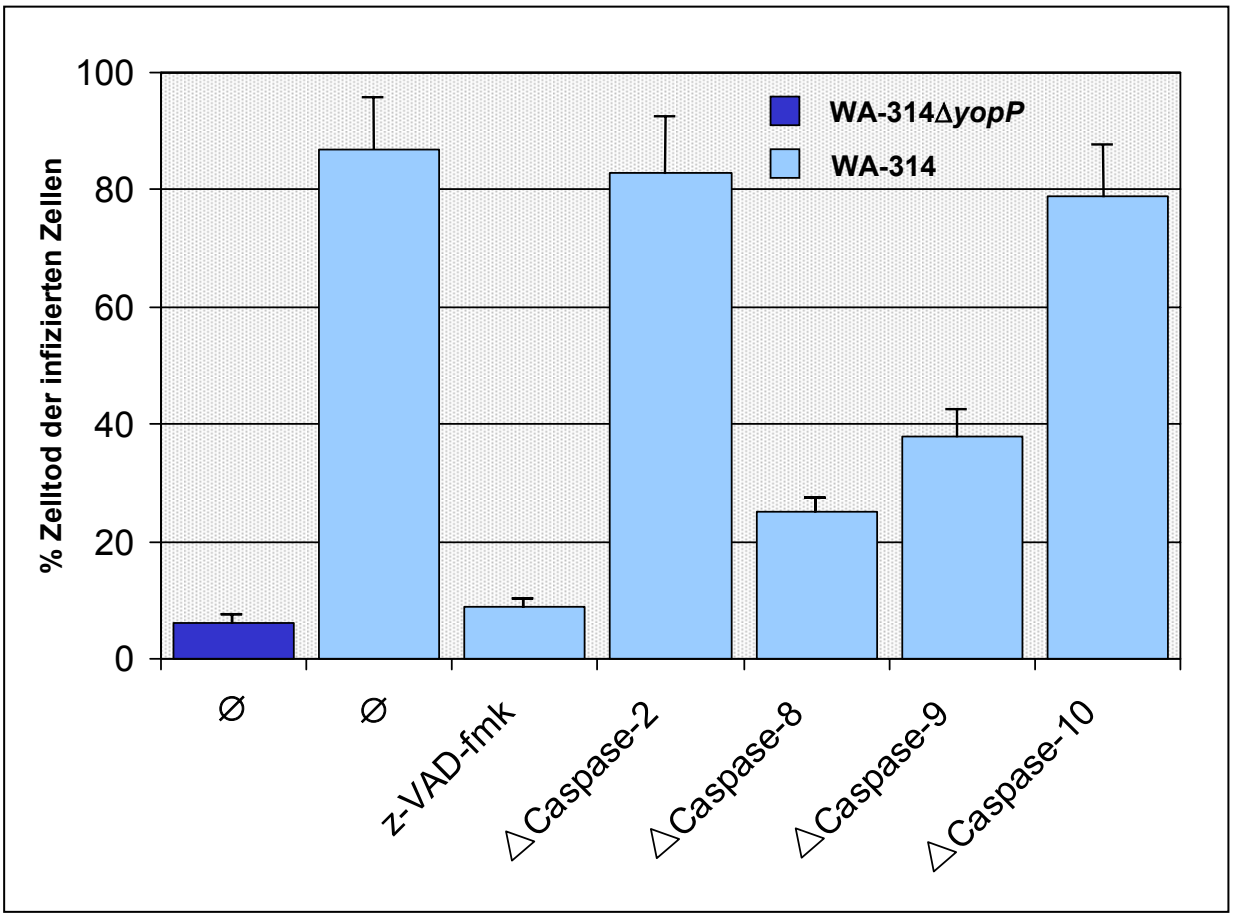


4.8. Der FADD / Caspase - 8 - Komplex ist an der *Y. enterocolitica* induzierten Apoptose beteiligt

4.8.1. Einfluss von Caspaseinhibitoren auf die Yersinien - induzierte Apoptose

Apoptose in eukaryontischen Zellen ist von der Aktivierung so genannter Caspasen abhängig. Caspasen gehören zur Familie der Cysteinproteasen. Sie setzen im Rahmen einer proteolytischen Kaskade den apoptotischen Zellabbau um. Die Rolle einiger wichtiger Caspasen bei *Y. enterocolitica* und YopP vermittelten Apoptose wurde durch Verwendung von spezifischen Caspaseinhibitoren analysiert.
Der Breitspektrum - Caspaseinhibitor z - VAD - fmk war in der Lage, die durch WA - 314 induzierte Apoptose fast vollständig zu hemmen. Spezifische Inhibitoren der Caspasen 8 und 9 vermittelten einen partiellen Schutz vor Apoptose im Infektionsversuch (Caspase - 8: 27 $\pm$ 3% Apoptose; Caspase - 9: 39 $\pm$ 5% Apoptose; unbehandelt: 86 $\pm$ 9% Apoptose). Inhibitoren der Caspase 2 und 10 hingegen zeigten keinen schützenden Effekt. Somit scheinen die Caspasen 8 und 9, nicht aber die Caspasen 2 und 10, an der Apoptoseinduktion durch Yersinien beteiligt zu sein.

Abb. 24: Effekte der Caspaseinhibitoren auf die durch Yersinien induzierte Apoptose bei J774A.1 Makrophagen



4.8.2. Einfluss von ΔFADD auf das zelluläre Überleben im Transfektionsmodell

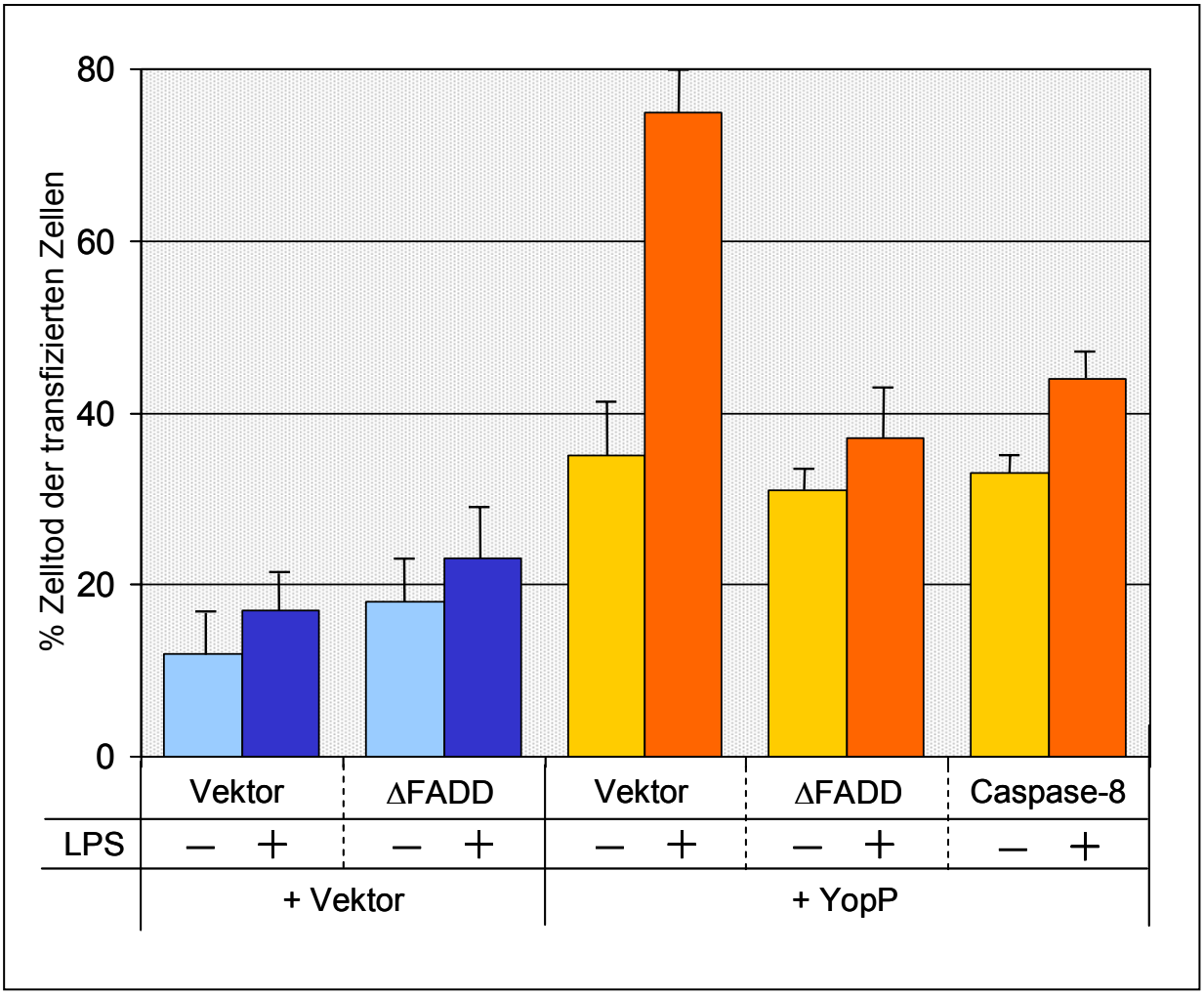
Des Weiteren wurde die Beteiligung des Adapterproteins FADD an der durch YopP und LPS vermittelten Apoptose untersucht. FADD bindet an die intrazelluläre Todesdomäne von Rezeptoren der TNF - Rezeptorfamilie und aktiviert die Initiatorcaspase - 8.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass auch die durch überexprimiertes YopP und LPS - Stimulation hervorgerufene Apoptose durch den Breitspektrum - Caspaseinhibitor z-VAD-fmk nahezu vollständig inhibiert wird (26 $\pm$ 4 % Apoptose). Im Vergleich dazu induzierte sowohl die Transfektion mit dominantnegativem FADD als auch die Behandlung mit dem Caspase - 8 - Inhibitor eine etwas schwächere

aber dennoch deutliche Apoptosereduktion (ΔFADD: 37 ±.6% Apoptose; Caspase-8-Inhibitor: 44 ± 3 % Apoptose, Abb. 25).

Diese Daten zeigen, dass die durch YopP und LPS induzierten Apoptose über den Caspase-8 / FADD - Komplexes in Makrophagen vermittelt wird. Somit erscheint ein Rezeptorvermittelter Apoptoseweg wahrscheinlich.

Abb. 25: Effekt von ΔFADD auf die durch YopP und LPS induzierte Apoptose bei J774A.1 Makrophagen.



5. DISKUSSION

5.1. YopP von *Y. enterocolitica* induziert bei Makrophagen Apoptose durch Inhibition der NF - κB Aktivierung

Die Interaktion von *Yersinia enterocolitica* mit Makrophagen, welche wichtige Effektorzellen der primären zellulären Immunantwort darstellen, ist für den Verlauf der Yersiniose von entscheidender Bedeutung. In vivo Mausinfektionsversuche von Monack et al. (1998) konnten aufzeigen, dass die durch Yersinien induzierte Apoptose von Makrophagen die Ausbreitung der Bakterien vom Interstitium in tiefer liegendes lymphatisches Gewebe begünstigt und somit zu einer systemischen Infektion führt. Ruckdeschel et al. (1997) konnten zeigen, dass es sich beim Yersinien - induzierten Zelltod von Makrophagen um einen apoptotischen, vom zytotoxischen YopE - Effekt abzugrenzenden Prozess handelt. Dieser ausschließlich bei Makrophagen beschriebene Effekt scheint jedoch nicht, wie bei Salmonellen oder Shigellen, über eine unmittelbare Aktivierung der Apoptosekaskade (Hersh et al. 99), sondern über eine Verschiebung des Gleichgewichts pro- und antiapoptotischer Signale zustande zu kommen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Monack et al. 1997, Mills et al. 1997) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Fähigkeit Apoptose bei Makrophagen zu induzieren, einen funktionstüchtigen Typ III - Sekretionsapparat, sowie ein translozierbares YopP voraussetzt.

Mit Hilfe von Adhäsinen binden Yersinien an Makrophagen und injizieren über ihr Typ III - Sekretionssystem Yop - Effektorproteine ins Zellinnere. Die translozierten Yops interagieren mit intrazellulären Signaltransmittern und greifen so in zellinterne Regulationsmechanismen ein, um Abwehrfunktionen der Zelle außer Kraft zu setzen (Cornelis et al. 98). YopP unterdrückt dabei die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und induziert Apoptose von Makrophagen. In Infektionsexperimenten konnte mittels Immunpräzipitation eine spezifische Interaktion zwischen YopP und dem NF - κB aktivierenden IKKβ nachgewiesen werden (Ruckdeschel et al. 01). IKKβ ist bei Monozyten und Makrophagen hauptverantwortlich für die NF - κB Aktivierung nach extrazellulärer LPS - Stimulation (O´Connell et al. 98, Hawiger et al. 99). Immunpräzipitiertes IKKβ war nach Infektion mit Wildtypyersinien in seiner Kinaseaktivität deutlich beeinträchtigt (Ruckdeschel et

al. 01). YopP bindet und inhibiert also IKKβ, um dadurch die Aktivierung von NF - κB zu verhindern. Unter physiologischen Bedingungen vermittelt der Transkriptionsfaktor NF - κB Schutz der Zelle vor Apoptose und sichert das Überleben der Zelle im Falle einer Infektion mit Bakterien (Kitamura et al. 99). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der NF - κB - Inhibition durch YopP und der Induktion von Apoptose besteht. Um diese These zu bestätigen, wurde der Einfluß der Überexpression von IKK - bzw. NF - κB Untereinheiten auf die YopP - vermittelte Apoptose analysiert. Die erhobenen Daten zeigten, dass die Überexpression sowohl der NF - κB Untereinheit p65 als auch von IKKβ einen Schutz gegenüber der Yersinien - induzierten Apoptose bei Makrophagen ausübt. Diese Schutzfunktion ist spezifisch für Yersinieninfektionen, da weder p65 noch IKKβ in der Lage waren, Makrophagen vor dem programmierten Zelltod nach Salmonelleninfektion zu bewahren. Außerdem verhinderte die Überexpression von p65 die durch Transfektion mit einem für YopP kodierenden Expressionsvektor induzierte Apoptose von Makrophagen. Diese Beobachtungen zeigen, dass YopP durch Unterbrechung des NF - κB - Signaltransduktionwegs Apoptose von Makrophagen auslöst. Gleichzeitig scheint der Einfluss von YopP auf den MAPK - Signaltransduktionsweg von untergeordneter Relevanz für die Apoptoseentstehung zu sein, da gezeigt werden konnte, dass eine spezifische Hemmung der p38 und ERK MAPK - Signaltransduktionswege keinen wesentlichen Einfluß auf den Zelltod oder das Überleben von Makrophagen nach Infektion mit Yersinien hat (Ruckdeschel et al 98).

5.2. LPS - abhängige Signale verstärken die Induktion von Apoptose bei Inhibition der NF - κB - Aktivierung.

Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob die Inhibition der NF - κB - Aktivierung durch YopP alleine genügt, um Apoptose von Makrophagen auszulösen, oder ob es hierzu eines zweiten, proapoptotischen Signals bedarf, welches das Apoptoseprogramm induziert, wenn gleichzeitig die NF - κB - Aktivierung verhindert ist.

Durch Verwendung eines eukaryontischen Expressionsvektors, welcher für YopP kodiert, war es möglich den Mechanismus der YopP - induzierten Apoptose von

Makrophagen detaillierter zu untersuchen. Die Transfektion von J774A.1 Makrophagen mit diesem Vektor induzierte einen geringen, aber doch deutlichen Grad an Apoptose (40 - 50 % der transfizierten Zellen). Bei zusätzlicher Stimulation mit LPS wurden zwischen 80 und 90 % der mit YopP transfizierten Zellen apoptotisch. Weder mit Polymyxin B vorbehandeltes LPS, noch ein nach erfolgreicher Apoptoseinduktion mit Polymyxin B von LPS befreiter Zellkulturüberstand induzierte vergleichbare Effekte. Wie aus diesen Zellkultur-transferexperimenten hervorgeht, scheint außer LPS auch keine andere, durch LPS Stimulation freigesetzte Substanz als Kofaktor für die YopP - induzierte Apoptose in Frage zu kommen. Folglich ist die beschriebene Apoptosesteigerung ein direkter Effekt LPS - abhängiger Signaltransduktionsprozesse. Yersinien scheinen also zum einen den antiapoptotischen NF - κB - Signalweg mittels YopP abzuschalten, zum anderen aber auch ein LPS - induziertes, proapoptotisches Signal auszunutzen, um Apoptose von Makrophagen auszulösen.

5.3. Die Auftrennung der Apoptose - verhindernden und induzierenden Signale nach LPS - Stimulation erfolgt auf Höhe der IRAKs.

Wie für TNF - α existieren für LPS bei Makrophagen offenbar zwei gleichzeitig induzierte Signalwege, wobei einer für das Überleben der Zelle sorgt und der andere Apoptose einleitet. Wird nun der antiapoptotische NF - κB - Signalweg unterbrochen, wie bei der Yersinieninfektion durch YopP, überwiegt das zytotoxische Signal und die Zelle wird apoptotisch (Ruckdeschel et al. 98 und 01, Kitamura et al. 99). Da YopP die Signalkaskade auf Höhe von IKKβ blockiert, der apoptotische Signalweg aber offenbar aktiv bleibt, muss davon ausgegangen werden, dass das proapoptotische Signal seinen Ursprung oberhalb von IKKβ hat. Das angeborene Immunsystem hat eine Reihe von Transmembranrezeptoren, die so genannten TLRs (**T**oll-**l**ike **r**eceptors), hervorgebracht. Die TLRs erkennen konservierte mikrobielle Strukturen, wie LPS, Peptidoglykane, bakterielle Lipoproteine oder Flagelline, um so auf einen eindringenden Krankheitserreger reagieren zu können. Mit Ausnahme von TLR3 ist allen TLRs gemeinsam, dass sie zur Signaltransduktion das Adapter Protein MyD88 benötigen, um die NF - κB - Signalkaskade zu aktivieren (Aderem et al. 00, Anderson et al. 00, Brightbill et al. 00, Medzhitov et al. 00, Zhang et al. 01). MyD88 rekrutiert

seinerseits im Zytoplasma Proteine der **I**L - 1 **R**ezeptor **a**ssoziierten **K**inasen (IRAK). Insgesamt sind vier unterschiedliche IRAKs bekannt, nämlich IRAK1, IRAK2, IRAK4 und IRAK-M (Croston eta l 95, Cao et al 96, Muzio et al 97, Wesche et al 99). IRAK1, IRAK2 und IRAK4 sind in der Lage durch Aktivierung des **T**NF - **R**ezeptor **a**ssoziierten **F**aktors **6** (TRAF 6) und von TAK1 (**t**ransforming growth factor-β-**a**ctivated **k**inase **1**) den IKK - Komplex und NF - κB zu aktivieren.

In dieser Arbeit wurde YopP als Hilfsmittel benutzt, um den LPS - abhängigen, proapoptotischen Signalweg bei Makrophagen näher zu charakterisieren. Dazu wurden dominant - negative Konstrukte der TLR - Signalkaskade zusammen mit YopP in J774A.1 Makrophagen koexprimiert. Anschließend wurde das Auftreten von Apoptose in den transfizierten Zellen nach LPS - Stimulation ausgewertet und quantifiziert. Im Falle einer Unterbrechung des proapoptotischen Signalwegs durch ein dominant - negatives Konstrukt müsste die LPS induzierte Steigerung der Apoptoserate verhindert werden.

Die Überexpression des dominant - negativen Adapterproteins MyD88 bewirkte einen partiellen Schutz vor Apoptose nach LPS - Stimulation. Daher lässt sich eine Beteiligung von MyD88 an der proapoptotischen Signalkaskade vermuten. Die im Signaltransduktionsweg unterhalb von MyD88 angeordneten, dominant - negativen Proteine ΔIRAK1 und ΔTRAF6 hingegen zeigten keinen nennenswerten schützenden Effekt gegenüber der LPS - verstärkten Apoptose. Sie verursachten im Gegenteil sogar in Abwesenheit von YopP und nach Stimulation mit LPS einen ähnlich starken zytotoxischen Effekt wie YopP selbst. Offensichtlich ersetzt die Unterbrechung der NF - κB Signalkaskade durch diese dominant - negativen Transmitter den YopP - Effekt und bahnt somit das LPS - abhängige Apoptosesignal. Im Umkehrschluß sind IRAK1 und TRAF6 also für den das Überleben sichernden, NF - κB - aktivierenden Signalweg essentiell. Für den proapoptotischen Zweig der LPS - Kaskade scheinen sie hingegen keine Bedeutung zu haben. Im Gegensatz dazu verhinderte die Überexpression von ΔIRAK2 sowohl die LPS - abhängige Apoptose nach Transfektion mit dem YopP - Vektor, als auch die Yersinien - induzierte Apoptose im Infektionsversuch. Des Weiteren führte eine LPS - Exposition bei ΔIRAK2 - und ΔMyD88 - überexprimierenden Zellen in Abwesenheit von YopP nur bei wenigen Zellen zum Zelltod. Diese Ergebnisse weisen auf die Beteiligung von IRAK2, neben MyD88, an der proapoptotischen Signaltransduktion nach LPS - Stimulation hin. Da beide dominant - negativen IRAK - Konstrukte bezüglich NF - κB - Inhibition nach

LPS Stimulation vergleichbare Ergebnisse erzielten, scheint es sich hier um eine spezifische, proapoptotische Funktion von IRAK2 zu handeln. ΔIRAK - M zeigte in den Transfektionsexperimenten im Vergleich zu ΔIRAK1 und ΔIRAK2 einen intermediären Effekt auf das Überleben der Zellen.

Ein funktioneller und struktureller Vergleich von IRAK1 und IRAK2 zeigt, dass sie sich trotz vorhandener Ähnlichkeiten deutlich voneinander unterscheiden. So stimmen die einzelnen IRAKs in nur 31 - 38 % ihrer Aminosäuresequenz miteinander überein (Wesche et al. 99). Lediglich IRAK1 besitzt eine Kinaseaktivität mit starker autophosphorylierender Eigenschaft. (Cao et al. 96, Wesche et al. 99). IRAK2 hingegen ist katalytisch inaktiv, da wichtige Sequenzen der konservierten Proteinkinaseuntereinheit fehlen (Muzio et al. 97, Wesche et al. 99, Maschera et al. 99, Vig et al. 99). Eine nur sehr schwache Kinaseaktivität wurde bei IRAK - M beobachtet (Wesche et al. 99). Diese unterschiedlich ausgeprägten, enzymatischen Fähigkeiten geben Hinweise darauf, dass sich die IRAKs möglicherweise auch in ihren funktionellen Eigenschaften als Signaltransmitter voneinander unterscheiden. So spielt IRAK1 eine besondere Rolle bei der Kontrolle der p38 MAPK - Aktivierung und der Induktion von morphologischen Zellveränderungen nach der Stimulation von Makrophagen mit LPS (Schmidt et al. 01). Die Kinaseaktivität von IRAK1 ist für diese Funktionen notwendig, wohingegen die Aktivierung von NF - κB auch in Abwesenheit dieser enzymatischen Eigenschaft möglich ist (Vig et al. 99, Maschera et al. 99, Knop et al. 99, Wesche et al. 99). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass IRAK1 die Phosphorylierung von Tollip (**Toll**-**i**nteracting **p**rotein) vermittelt (Zhang et al. 02). In ruhenden Zellen verhindert die Komplexbildung mit Tollip eine Aktivierung von NF - κB. Wird die Zelle durch einen extrazellulären Stimulus aktiviert, kommt es nach Phosphorylierung von IRAK1 und Tollip zu deren Freisetzung (Zhang et al. 02, Burns et al. 00, Bulut et al. 01), was die Induktion nachgeschalteter Signale ermöglicht. Auch IRAK2 kommt eine weitere spezifische Funktion bei der zellulären Signaltransduktion zu. Das MyD88 - abhängige Adapterprotein Mal / TIRAP aktiviert NF - κB selektiv über IRAK2, nicht aber über IRAK1 (Fitzgerald et al. 01, Horng et al. 01a). Auch die in dieser Arbeit erhobenen Daten weisen auf eine Beteiligung von IRAK1 und IRAK2 an jeweils gegenläufigen Signaltransduktionswegen hin. Danach scheint sich das nach Kontakt von Makrophagen mit bakteriellem LPS induzierte Signal intrazellulär in ein IRAK1 - vermitteltes antiapoptotisches und ein IRAK2 - abhängiges proapoptotisches Signal aufzuspalten. Ob Mal / TIRAP oder Tollip die

Überlebensfähigkeit von Makrophagen bei bakteriellen Infektionen beeinflussen, ist bisher noch nicht untersucht worden.

5.4. Der FADD / Caspase - 8 - Komplex ist an der *Y. enterocolitica* - induzierten Apoptose beteiligt

ΔMyD88, das von den untersuchten Molekülen in der TLR - Signalkaskade als erstes aktiviert wird, zeigte einen deutlich geringeren Apoptose verhindernden Effekt als ΔIRAK2. Diese Beobachtung stützt die Annahme, dass das Adapterprotein MyD88 sowohl mit IRAK1, als auch mit IRAK2 interagiert und beide gegensätzliche Signaltransduktionswege aktivieren kann (Muzio et al. 97, Wesche et al. 98). Aliprantis et al. weisen in einer Arbeit auf die Beteiligung von MyD88 an einem proapoptotischen Signalweg hin, welcher in Monozyten nach Stimulation mit bakteriellen Lipoproteinen aktiviert wird (Aliprantis et al. 00). Sie konnten zeigen, dass MyD88 an das Adapterprotein des Zelltodrezeptors FADD bindet und dadurch das Apoptoseprogramm auslöst. Ein entsprechender Signaltransduktionsweg wurde vor kurzem auch in Drosophila entdeckt (Horng et al. 01b). FADD vermittelt die Auslösung von Apoptose durch die Aktivierung von Caspase - 8 (Krammer et al. 00, Hengartner et al. 00). Eine weitere Studie fand Hinweise darauf, dass bakterielles LPS auch in endothelialen Zellen ein FADD - abhängiges Apoptosesignal auslösen kann (Choi et al. 98). Um die Rolle dieser proapoptotischen Moleküle bei der Yersinien - induzierten Apoptose zu eruieren, wurde der Effekt von spezifischen Caspase - Inhibitoren in Infektionsversuchen analysiert. J774A.1 Makrophagen konnten dabei effizient durch Zugabe von Inhibitoren für Caspase - 8 - und Caspase - 9 vor der durch *Y. enterocolitica* - induzierten Apoptose geschützt werden. Ebenfalls verhinderte ein dominantnegatives Konstrukt des Caspase - 8 - Aktivators FADD die durch YopP und LPS - Exposition verursachte Apoptose. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass sowohl FADD, als auch Caspase - 8 und Caspase - 9 an der durch Yersinien bzw. YopP und LPS vermittelten Apoptose beteiligt sind.

MyD88 bindet an FADD über eine sogenannte Todesdomäne. Da die IRAKs ebenfalls über solch eine Domäne verfügen, liegt der Schluss nahe, dass eine ähnliche Interaktion zwischen IRAK2 und FADD stattfindet. Es konnte ferner gezeigt werden, dass *Yersinia enterocolitica* eine Spaltung des proapoptotischen, der Bcl - 2

Familie zugehörigen Proteins Bid vermittelt (Denecker et al. 01). Dessen Prozessierung und Aktivierung induziert den mitochondrialen Apoptoseweg, was schließlich zur Freisetzung von Cytochrom C und zur Aktivierung von Caspase - 9 führt. Da zur Aktivierung von Bid auch Caspase - 8 notwendig ist (Krammer et al. 00, Hengartner et al. 00), sind diese Resultate konform mit der Vorstellung, dass sowohl Caspase - 8, als auch Caspase - 9 an der Yersinien - vermittelten Apoptose beteiligt sind.

5.5. Diskussion neuerer Erkenntnisse

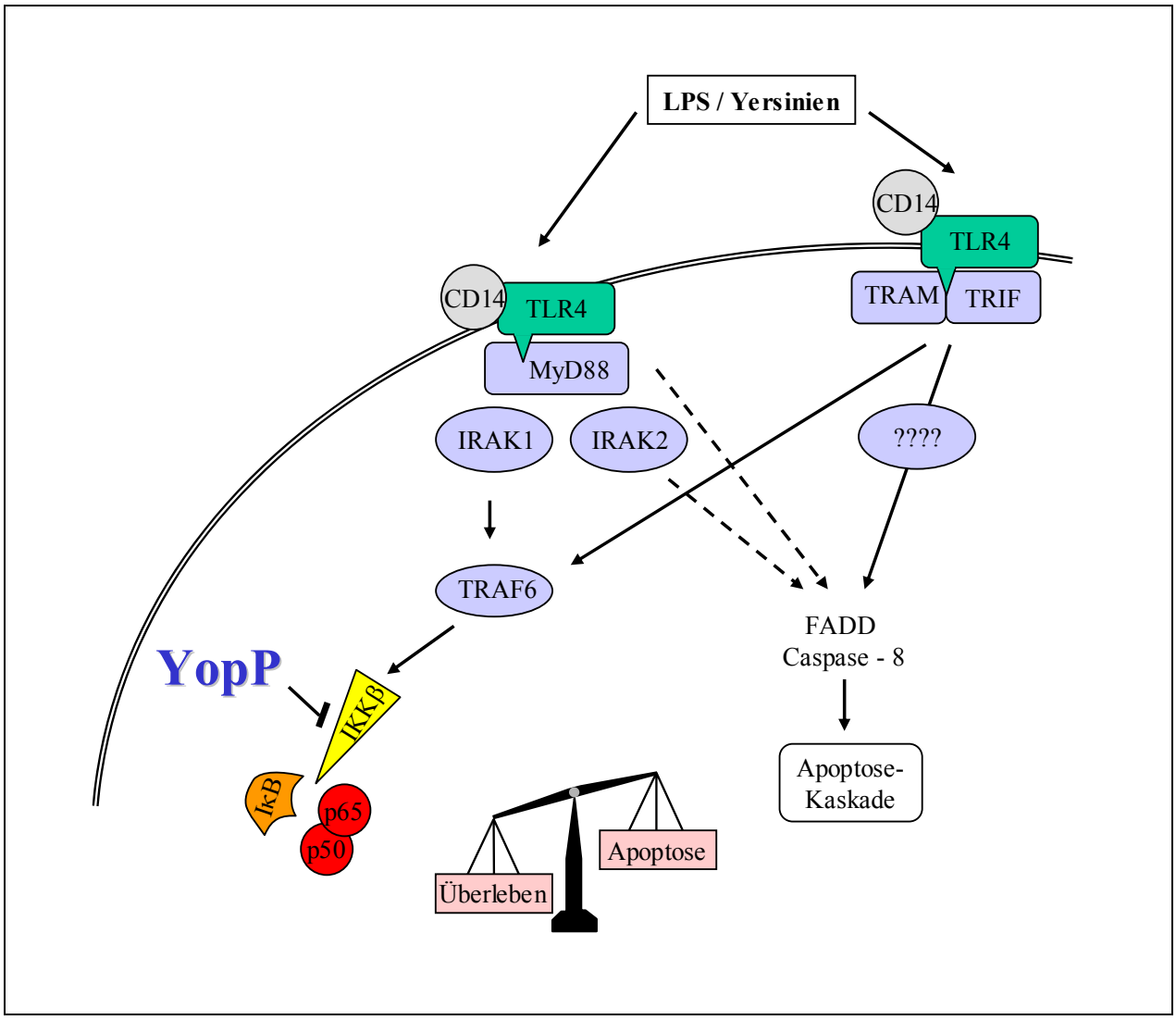
Sowohl TLR2, als auch TLR4 sind in der Lage apoptotische Signalwege zu aktivieren (Aliprantis et al. 00, Zhang et al. 03). Beide Rezeptoren werden durch Yersinieninfektionen aktiviert, lediglich TLR4 vermag jedoch die Induktion von Apoptose bei Yersinieninfektion zu vermitteln (Haase et al. 03). LPS - abhängige Signale werden über TLR4 initiiert, wohingegen Peptidoglykane und LTA TLR2 aktivieren. Diese Erkenntnisse unterstützen die These, dass Lipopolysaccharide von Yersinien über TLR4 bei Mausmakrophagen ein apoptotisches Signal auslösen.
Im scheinbaren Widerspruch zu den hier erhobenen Daten, konnte im Jahr 2004 in einer Arbeit von Ruckdeschel et al. gezeigt werden, dass durch eine Yersinieninfektion auch bei Mausmakrophagen ohne funktionstüchtigem MyD88 Apoptose in unvermindertem Ausmaß hervorgerufen werden kann. Im Jahr 2003 konnten verschiedene Arbeitsgruppen einen weiteren Signaltransduktionsweg beschreiben der MyD88 - unabhängig, nach Stimulation von TLR3 und TLR4 zur Aktivierung von NF - κB und zur Freisetzung von Interferon - β führt (O´Neill et al. 03, Jiang et al. 03, Yamamoto et al. 03, Oshiumi et al. 03, Hoebe et al. 03). Als Adaptermolekül dient dabei TRIF (TIR domain-containing adapter inducing IFN-β). Das Apoptosesignal, dass nach Kontakt mit bakteriellem LPS durch TLR4 initiiert wird, wird bei Mausmakrophagen ebenfalls über den TRIF - abhängigen Signalweg aktiviert (Ruckdeschel et al. 04). Doch selbst bei Makrophagen mit inaktivem TRIF - Molekül kann nach Blockierung der NF - κB Aktivierung ein geringes Maß an Apoptose durch LPS - Exposition induziert werden. Dies lässt vermuten, dass der hier beschriebene, MyD88 - abhängige Apoptosesignalweg koexistent ist, aber offensichtlich bei Mausmakrophagen nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die doch

sehr eindeutigen Effekte, die in dieser Arbeit beschrieben wurden, konnten möglicherweise durch die massive Überexpression der dominantnegativen Transmitter induziert werden.

Es scheint auch ein spezies- oder zellspezifischer Unterschied der TLR - vermittelten Apoptose zu existieren. Während TLR4 und MyD88 vor allem bei humanen Zellen Apoptose auslösen können (Lopez et al. 03, Into et al. 02, Oliveira et al. 03, Aliprantis et al. 00), scheint TRIF in erster Linie bei Mauszellen Apoptose zu bewirken (Ruckdeschel et al. 04, Hoebe et al. 03).

Auch an dem TRIF - abhängigen proapoptotischen Signalweg sind sowohl Caspase - 8, als auch FADD beteiligt. Eine direkte Interaktion von TRIF und FADD ist bisher jedoch nicht nachweisbar (Ruckdeschel et al. 04). Dem TRIF - Molekül fehlt die so genannte Todesdomäne, über die andere Aktivatoren mit FADD in Kontakt treten können. Somit bleiben die weiteren Schritte der Aktivierung des Apoptoseprogramms unterhalb von TRIF noch weitestgehend unverstanden.

Abb. 26: LPS - abhängige Apoptose wird bei Makrophagen durch TLR4 vermittelt. Die Adaptermoleküle MyD88 bzw. TRIF / TRAM leiten das Apoptosesignal weiter und induzieren gleichzeitig einen antiapoptotischen Signalweg, der zur Aktivierung von NF - κB führt. Durch YopP von *Yersinia enterocolitica* wird diese Aktivierung verhindert, sodass das Gleichgewicht zu Gunsten des proapoptotischen Signals verschoben und Apoptose ausgelöst wird.



6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Pathomechanismus der durch *Yersinia enterocolitica* bei Mausmakrophagen induzierten Apoptose analysiert. Mausmakrophagen der Zelllinie J774A.1 wurden mit unterschiedlichen *Y. enterocolitica* - Mutanten infiziert und die Apoptoseraten wurden quantifiziert, um somit Hinweise auf den verantwortlichen bakteriellen Virulenzfaktor zu erhalten. Lediglich die Yersinienstämme, die das Virulenzprotein YopP synthetisieren und translozieren können, waren in der Lage, bei Makrophagen Apoptose zu induzieren. YopP stellt daher das Haupteffektorprotein für die Yersinien - induzierte Apoptose dar.

Um die Wirkungsweise von YopP näher zu charakterisieren, wurden die Zellen mit einem für YopP kodierenden eukaryontischen Expressionsvektor transfiziert. Es zeigte sich, dass YopP durch Inhibition der NF - κB - Aktivierung Apoptose auslöst. Die gleichzeitige Stimulation mit LPS bewirkte eine zusätzliche deutliche Steigerung der Apoptoserate. Dieser synergistische, proapoptotische Effekt wird direkt durch LPS - induzierte Signaltransduktionsprozesse vermittelt. Aus Transfektionsversuchen mit dominant - negativen Signalmolekülen der TLR - Signalkaskade ergaben sich Hinweise auf eine Beteiligung der Transmitter MyD88 und IRAK2 an der Apoptoseeinleitung. IRAK1 und TRAF6 vermitteln ein antagonistisches, NF - κB aktivierendes LPS - Signal, welches unter dem Einfluss von YopP unterdrückt wird. Dadurch überwiegt das LPS - induzierte, proapoptotische Signal, so dass der apoptotische Zelltod eingeleitet wird. Die Aktivierung des Apoptoseprogramms selbst erfolgt über FADD und Caspase - 8. Diese Daten zeigen, dass Yersinien zum einen durch YopP die Aktivierung des antiapoptotischen NF - κB - Signalwegs blockieren, und zum anderen durch die gleichzeitige Induktion LPS - abhängiger, proapoptotischer Signale Apoptose von Makrophagen auslösen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Weiss, D. S., Godowski, P. & Zychlinsky, A. 2000.
The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2.
EMBO J. **19**: 3325ff.

Anderem, A. & Ulevitch, R. J. 2000.
Toll-like receptor in the induction of the innate immune response*. Nature* **406**: 782ff.

Anderson, K. V. 2000.
Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin. Immunol* **12**: 13ff.

Andor, A. et al. 2001.
YopE of Yersinia*,* a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol*. **3**: 301 – 310

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.

Baichwal, V.R. & Baeuerle, P. A. 1997.
Apoptosis: activate NF-κB or die? *Curr. Biol*. **7**: R94.

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

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

Black, D. S., Marie-Cardine, A., Schraven, B. & Bliska, J. B. 2000.
The Yersinia tyrosin phospatase YopH targets a novel adhesion-regulated signalling complex in macrophages*. Cell. Microbiol*. **2**: 401 - 414.

Bliska, J.B. & Black, D. S. 1995.
Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidatve burst in macrophages by the *yersinia pseudotuberculosis* tyrosin phosphatase*. Infect. Immun*. **63**: 681 – 685.

Blocker, A. et al. 2001.
Structure and composition of the *shigella flexneri* “needle complex”, a part of it´s type III secretion. *Mol. Microbiol*. **39**: 652 - 663.

Bol, G., Kreuzer, O. J. and Brigelius-Flohe, R. 2000
Translocation of the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 (IRAK-1) into the nucleus*. FEBS Lett*. **477**: 73ff.

Boland, A. & Cornelis, G. R. 1998.
Role of YopP in suppression of TNF-α release by macrophages during Yersinia Infection. *Infec. Immun*. **66**: 1878 - 1884.

Boland, A. et al. 1996.
Status of YopM and YopN in the Yersinia Yop virulon : YopM of *Y. enterocolitica* is interalized insede the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *EMBO J*. **15**: 5191 - 5201.

Bottone, E. J. 1997.
Yersinia enterocolitica: The charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev*. **10**: 257-276.

Brightbill, H. D. & Modlin, R. L. 2000.
Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response. *Immunology* **101**: 1ff.

Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Equils, O. & Arditi, M. 2001.
Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein : role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling in Toll-like receptor 2 signaling. *J. Immunol*. **167**: 987ff.

Burns, K., Clatworthy, J., Martin, L., Martinon, F., Plumpton, C., Maschera, B., Lewis, A., Ray, K.,Tschopp, J. & Volpe, F. 2000.
Tollip a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat. Cell Biol*. **2**: 346.

Cao, Z. , Henzel, W. J. & Gao G. 1996.
IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Sience* **271**: 1128ff.

Chen, C., Edelstein, L. C. & Gelinas, C. 2000.
The Rel/NF-kB family direktly activates expression of the apatosis inhibitor Bcl-x_L. *Mol. Cell. Biol*. **20**: 2687ff.

Choi, K. B., Wong, F., Harlan, J. M., Chaudhary, P. M., Hood, L. & Karsan, A. 1998.
Lipopolysaccharide mediates endothelian apoptosis by a FADD-dependent pathway. *J. Biol. Chem*. **276**: 19706ff.

Chu, Z. L., McKinsey, T. A., Liu, L., Gentry, J.J., Malim, M. H. & Ballard, D. W. 1997
Suppression of TNF-induced cell death by inhibitor of apoptotis c-IAP2 is under NF-κB control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 10057ff.

Cornelis, G. R., Boland, A., Boyd, A. P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M. P. & Stainier, I. 1998.
The virulence plasmid of Yersinia, an antihost genome. Microbiol. *Mol. Biol. Rev*. **62**: 1315ff.

Cover, T. L., and R. C. Aber. 1989.
Yersinia enterocolitica. *N. Engl. J. Med*. **321**: 16-24.

Croston, G. E., Cao, Z. & Goeddel, D. V. 1995.
NF - kappa B activation by interleukin-1 requires an IL-1 receptor-associated protein kinase activity. *J. Biol. Chem.* **270**: 16514ff.

Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., & Karin, M. 1999
Positive and Negative Regulation of IκB Kinase Activity Through IKKβ Subunit Phosphorylation. *Science* **284**, 309-313

Denecker, G., Declercq, W., Geuijen, C. A., Benabdillah, R., van Gurp, M., Sory, M. P., Vandenabeele, P. & Cornelis G. R. 2000.
Yersinia enterocolitica YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of Bid. *J. Biol. Chem*. **276**: 19706ff.

Denecker, G. et al. 2002.
Effect of low- and high-virulence *Yersinia enterocolitica* strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells. *Infect. Immun*. **70**, 3510 - 3520.

Dukuzumuremyi, J. M. et al. 2000.
The Yersinia protein kinase A ist a host factor inducible Rho/Rac-binding virulence factor. *J. Biol. Chem*. **275**: 35281 - 35290.

Evdokimov, A. G., Anderson, D. E., Routzahn, K. M. & Waugh, D. S. 2001.
Unusual molecular architecture of the yersinia pestis cytotoxin YopM: a leucine-rich repeating unit. *J. Mol. Biol.* **312**: 807 - 821.

Fallmann, M. et al. 1995.
Yersinia pseudotuberculosis inhibits Fc recepror-mediated phagocytosis in J774 cells*. Infect. Immun.* **63**: 3117 – 3124.

Fitzgerald, K. A., Palsson-McDermatt, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mensell, A. S., Brady, G., Dunne, A., Gray, P., Harte, M. T. et al. 2001.
Mal (MyD88-adapter-like) is required for toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**: 78ff.

Forsberg, A., Viitanen, A. M., Skurnik, M. & Wolf-Watz, H. 1991.
The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis. Mol. Microbiol*. **5**: 977 - 986.

Galyov, E. E., Hakanson, S., Forsberg, A. & Wolf-Watz, H. 1993.
A secretet protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinante. *Nature* **361**: 730 - 732.

Haase, R., Kirschning C. J., Sing, A., Schrottner, P., Fukase, K., Kusumoto, S., Wagner, H., Heesemann, J. & Ruckdeschel, K. 2003
A dominant role of Toll-like receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteria-faced macrophages. *J. Immunol*. **171(8)**: 4294-303.

Hamid, N. et al. 1999.
YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages, *Microb. Pathog.* **27**: 231 – 242.

Hatada, E. N., Krappmann, D. & Scheidereit, C. 2000.
NF-kB and innate immune response*. Curr. Opin. Immunol*. **12**, 52ff.

Hawiger, J., Veach, R. A., Liu, X. Y., Timmons, S. & Ballard. D. W. 1999.
IKK complex is an intracellular target for endotoxic lipopolysaccharide in human monocytic cells. *Blood* **94**: 17711ff.

Hengartner, M. O. 2000.
The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770ff.

Heesemann, J., 1987
Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic *Yersinia* species. *FEMS Microbiol. Lett*. **48**:229-233.

Hersh, D., Monack, D. M., Smith, M. R., Ghori, N., Falkow, S. & Zychlinsky, A. 1999.
The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Poc. Natl. Acad. Sci*. USA **96**: 2396ff.

Hoiczyk, E. & Bobel, G. 2001.
Polymerization of a sigle protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needle punctures eucaryotic cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**: 4669 - 4674.

Hoogkamp-Korstanje, J. A.A., de Koning, J., Heesemann, J., Festen, J. J. M., Houtman, P. M. & van Oyen, P. L. M. 1992.
Influence of antibiotics on IgA and IgG response and persistence of *Yersinia enterocolitica* in patients with Yersinia-associated spondylarthropathy.
Infection **20**: 53ff.

Horng, T., Barton, G. M. & Medzhitov, R. 2001 a.
TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol*. **2**: 835ff.

Horng, T., Barton, G. M. & Medzhitov, R. 2001 b.
Drosophila MyD88 is an adapter in Toll signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 12654ff.

Iriarte, M. & Cornelis, G. R. 1998.
YopT, a new Yersinia Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol. Microbiol.* **29**: 915 - 929.

Kimbrough, T. G. & Miller, S. I. & Galan, J. E. 2000.
Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**: 11008 - 11013.

Kitamura, M. 1999.
NF-kB-mediated self defense of macrophages faced with bacteria. *Eur. J. Immunol*. **29**: 1647ff.

Koster, M. et al. 1997.
The outer membran component, YscC, of the Yop secretion machinery *of Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol. Microbiol*. **26**: 789 - 797.

Knop, J. And Martin, M. U. 1999.
Effects of IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) expression on IL-1 signaling are independent of its kinase activity. *FEBS Lett.* **448**: 81ff.

Krammer, P. H. 2000.
CD95`s deadly mission in the immune system. *Nature* **407:** 789ff.

Kubori, T. et al. 1998.
Supremolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280:** 602 - 605.

Kubori, T. Sukhan, A., Aizawa, S. I. & Galan, J. E. 2000
Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Samonella typhimurium* type III scretion system. *Proc Natl Acad. Sci. USA* **97**: 10225 - 10230.

Leung, K. Y., Reisner, B. S. & Straley, S. C. 1990.
YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect. Immun*. **58**: 3262 - 3271.

Liu, Z. G., Hsu, H., Goeddel, D. V. & Karin, M. 1996.
Dissektion of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linkted to apoptosis while NF-kB activation prevents cell death. *Cell* **87**: 565ff.

Maschera, B., Ray, K., Burns, K. & Volpe, F. 1999.
Overexpression of an enzymically inactive interleukin-1-receptor-associated kinase activates nuclear factor–κB. *Biochem. J.* **339**: 227ff.

Medzhitov, H. D. & Janeway, C. 2000.
The toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol*. **8**: 452ff.

Mills, S. D., Boland, A., Sory, M. P., van-der-Smissen, P., Kerbourch, C., Finlay, B. B. & Cornelis, G. R. 1997.
Yersinia enterocolitica induces apoptosis by a process requiring functional typ III scretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc Natl Acad. Sci. USA* **94**: 12638ff.

Monack, D. M., Mecsas, J., Ghori, N. & Falkow, S. 1997.
Yersinia signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad. Sci. USA* **94**: 10385ff.

Monack, D. M., Mecsas, J., Bouley, D. & Falkow, S. 1998.
Yersinia-induced apoptosis in vivo aids in the esablishment of a systemic infection of mice. *J. Exp. Med*. **188**: 2127ff.

Mulder, B., Michiels, T., Simonet, M., Sory, M. P. & Cornelis, G. 1989.
Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Infect. Immun*. **57**: 2534 – 2541.

Muzio, M., Ni, J., Feng, P. & Dixit, V. M. 1997.
IRAK (Pelle) family me,ber IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* **278**: 1612ff.

Nakajima, R., Motin, V.L., & Brubaker, R.R. 1995
Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. *Infect. Immun*. **63**, 3021 – 3029

Natoli, G., Costanzo, A., Guido, F., Moretti, F. & Levrero, M. 1998.
Apoptotic, non-apoptotic, and anti-apoptotic pathways of TNF signalling. *Biochem. Pharmacol*. **56**: 915ff.

Navarre, W. W. & Zychlinsky, A. 2000.
Pathogen-indued apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. *Cell. Mikrobiol*. **2**: 265ff.

O´Connel, M. A., Bennette, B. L., Mercurio, F., Manning, A. M. & Mackmann. 1998.
Role of IKK1 and IKK2 in lipopolysaccharide signaling in human monocytic cells. *J. Biol. Chem*. **273**: 30410ff.

Orth, K., Palmer, L. E., Bao, Z. Q., Stewart, S., Rudolph, A. E., Bliska, J. B. & Dixon, J. E. 1999.
Inhibition of the mitogen-activated Protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector. *Science* **285**: 1920ff.

Orth, K. et al. 2000.
Disruption of signaling by Yersinia effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* **290**: 15940 - 1597.

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

Perkins, N. D. 2000.
The Rel/NF-kB family: friends and foe. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 434ff.

Person, C., Carballeira, N., Wolf-Watz, H. & Fallman, M. 1997.
The PTPase YopH inhibits uptake of Yersinia, tyrosin phosphorylation of $p130^{cas}$ and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J.* **16**: 2307 – 2318.

Pettersson, J. et al. 1996.
Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contract. *Sience* **273**: 1231-1233.

Rosqvist, R., Forsberg, A., Rimpilainen, M., Berman, T. & Wolf-Watz, H. 1990.
The cytotoxic protein YopE of Yersinia obstructs the primary host defence. *Mol Microbiol*. **4**: 657 – 667.

Rosqvist, R., Magnusson, K. E. & Wolf-Watz, H. 1994.
Target cell contact triggers expression and polarized transfer of Yersinia YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J*. **13**: 964-972.

Ruckdeschel, K., Machold, J., Roggenkamp, A., Schubert, S., Pierre, J., Zumbihl, R.,Liautard, J. P., Heesemann, J. & Rouot, B. 1997 a.
Yersinia enterocolitica promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase. Correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor-α production. *J. Biol. Chem*. **272**: 15920-15927.

Ruckdeschel, K., Roggenkamp, A., Lafont, V., Mangeat, P., Heeseman, J. & Rouot, B. 1997 b.
Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. *Infect. Immun*. **65**: 4813ff.

Ruckdeschel, K., Harb, S., Roggenkamp, A., Hornef, M., Zumbihl, R., Köhler, S., Heesemann, J. & Rouot, B. 1998.
Yersinia enterocolitica impairs activation of transcription factor NF-κB: Involvment in the induction of programed cell death and in the suppression of the macrophage TNFa production. *J. Exp. Med*. **187**: 1069ff.

Ruckdeschel, K., Mannel, O., Richter, K., Jacobi, C. A., Trülzsch, K., Rouot, B. & Heesemann, J. 2001.
Yersinia outer Protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-κB Pathway and exploits Lipopolysacchardide signaling to trigger apotosis in macrophages. *J. Immunol*. **168**: 1823-1831.

Ruckdeschel K, Mannel O, Schrottner P. 2002
Divergence of apoptosis-inducing and preventing signals in bacteria-faced macrophages through myeloid differentiation factor 88 and IL-1 receptor-associated kinase members. *J Immunol*.**168(9)**: 4601-11.

Ruckdeschel, K., Pfaffinger, G., Haase, R., Sing, A., Weighardt, H., Hacker, G., Holzmann, B. & Heesemann, J. 2004.
Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages. *J Immunol*. **173(5)**: 3320-8.

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

Schulte, R., Wattiau, P., Hartland, E. L., Robins-Brown, R. M. & Cornelis, G. R. 1996.
Differential secretion of interleukin-8 by human epithelial cell lines upon entry of virulent or nonvirulent *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun*. **64**: 2196-2113.

Schesser, K., A. K. Spiik, J. M. Dukuzumuremyi, M. F. Neurath, S. Pettersson & H. Wolf-Watz. 1998.
The YopJ locus is required for Yersinia-mediated inhibition of NF-kB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol Microbiol*. **28**: 1076ff.

Schmidt, A., Caron, E. & Hall, A. 2001.
Lipopolysaccharide-induces activation of beta2-integrin function in macrophages requires Irak kinase activity, p38 mitogen-avtivated protein kinase, and the Rap1 GTPase. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 438ff.

Shao, F., Merritt, P. M., Bao, Z., Innes, R. W. & Dixon, J. E. 2002.
Yersinia effector and a Pseudomonas avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* **109**, 575-588.

Simonet, M., Richard, S. & Berche, P. 1990.
Electron microscopic evidence for in vitro extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. *Infect. Immun*. **58**, 841-845.

Sing, A., Roggenkamp, A., Geiger, A. M. & Heesemann, J. 2002
Yersinia enterocolitica evasion of the host innate immune response by V Antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10 deficient mice.
J Immunol. ***168,*** 1315-1321

Skrzypek, E. & Straley, S. C. 1993.
LcrG, a secreted protein involved in negative regulation of the low-calcium response in *Yersinia pestis. J. Bacteriol*. **175**: 3520-3538.

Skrzypek, E., Cowan, C. & Straley, S. C. 1998.
Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol. Microbiol*. **28**: 1067-1079.

Vig. E., Green, M., Liu, Y., Donner, D. B., Mukaida, N., Goebl, M. G. & Harrington, M. A. 1999.
Modulation of tumor necrosis factor and interleukin-1-dependent NF-kappaB activity by mPLK/IRAK. *J. Biol. Chem*. **274**: 13077ff.

Visser, L.G., Annema, A & van Furth, R. 1995.
Role of Yops in inhibition of phagocytosis and killing of opsoniced *Yersinia enterocolitica* by human granulocytes. *Infect. Immun*. **63**: 2570 – 2575.

Von Pawel-Rammingen, U. et al. 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.

Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S. and Cao, Z. 1998.
MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex.
Immunity **7**: 837ff.

Wesche, H., Gao, X., Li, X., Kirschning, C. J., Stark, G. R & Cao, Z. 1999.
IRAK-M is novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J. Biol. Chem*. **274**: 19403ff.

Wang, C. Y., Mayo, M. W. & Baldwin, A. S. 1996.
TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kB. *Science* **274**: 784ff.
Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. C., Goeddle , D. V. & Baldwin, A. S. 1998.
NF-κB antiapoptosis: induction of TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**: 1680ff.

Woestyn, S., Alaoui, A., Wattiau, P. & Cornelis, G. R. 1994.
YscN, the putative energizer oft the Yersinia Yop secretion machinery.
J. Bacteriol. **176**: 1561-1569.

Yang, R. B., Mark, M. R., Gurney, A. L. & Godowski P. J. Signaling events inducted by lipopolysaccharide – activated toll-like receptor 2. *J. Immunol*. **163**: 639ff.

Yao, T., Mecsas, J., Healy, J. I., Falkow, S. & Chien, Y. 1999.
Suppression of T and B lyphocyte activation by a Yersinia pseudotuberculosis virulence factor, YopH. *J. Exp. Med*. **190**: 1343-1350.

Zhang, F. X., Kirschning, C. J., Mancinelli, R., Xu, X. P., Jin, Y., Faure, E., Mantovani, A., Rothe, M., Muzio, M., Arditi, M. 1999.
Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor – kappaB through interleukin – 1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J. Biol. Chem.* **274**: 7611 ff.

Zhang, G. & Ghosh, S. 2001.
Toll – like receptor – mediated NF – kappaB activation: A phylogenetcally conserved paradigm in innate immunity. *J. clin. Inves*. **107**: 13ff.

Zhang, G. & Ghosh, S. 2002.
Negative regulation of toll – like receptor- mediated signaling by tollip*. J. Biol. Chem.* **277**: 7059ff.

Zhang, Y. and Bliska, J. B. 2003
Roll of Toll-like receptor signalling in the apoptotic response of macrophages to Yersinia infection. *Infect. Immun*. **71**: 1513ff.

Zhang, Z. Y. et al. 1992.
Expression, purification, and physiochemical characterization of a recombinant Yersinia protein tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem*. **267**: 23759-23766.

Diese Arbeit entstand am Max von Pettenkofer - Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Ludwig - Maximilians - Universität München. Mit der Durchführung der Experimente wurde im Jahr 1999 begonnen. Teile der Arbeit wurden im Journal of Immunologie publiziert (Ruckdeschel et al. 01, Ruckdeschel et al. 02).

Besonders danken möchte ich Herrn PD Dr. K. Ruckdeschel für die Überlassung des Themas und die engagierte Betreuung.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann, in der Funktion als Sprecher des „Graduierten Kollegs“, für die Bewilligung des Stipendiums danken.

Ich danke allen Mitarbeitern des Max von Pettenkofer - Instituts für Hygiene und medizinische Mikrobiologie, die mir bei der Durchführung der Arbeit auf irgendeine Art und Weise behilflich waren.

Lebenslauf

23.10.1974:	geboren in Buchholz / Nordheide
1981 - 1983:	Besuch der Grundschule in Maschen / Seevetal
1983 - 1985:	Besuch der Fröbel - Grundschule in Augsburg
1985 - 1994:	Besuch des Holbein - Gymnasiums in Augsburg
Juni 1994:	Abitur
08.1994 - 08.1995:	Grundwehrdienst in Klosterlechfeld
WS 1995 - SS 2002:	Studium der Humanmedizin an der LMU-München
03.1998:	Physikum
03.1999:	1.Staatsexamen
08.2001:	2. Staatsexamen
12.2002:	3. Staatsexamen
01.2003 - 06.2004:	Arzt im Praktikum an der LMU – München, Klinikum Großhadern, I. Medizinische Klinik
seit 07.2004:	Assistenzarzt am Klinikum Augsburg, I. Medizinische Klinik