

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Expressionsregulation des Transkriptionsfaktors KLF2 durch bakterielle Toxine



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Kristina Dach
geboren in Frankenthal

München
im Februar 2008

Expressionsregulation des Transkriptionsfaktors KLF2 durch bakterielle Toxine

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Kristina Dach

Dekan:	Prof. Dr. Jürgen Soll
Erstgutachter:	Prof. Dr. Jörg Overmann
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Michael Schleicher
Sondergutachter:	Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Eingereicht am: 12.02.2008
Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2008

Eidesstattliche Erklärung:

Ich versichere, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde und noch keiner Hochschule zu Prüfungszwecken vorgelegt wurde. Ich habe noch nicht versucht eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den 11.02.2008

Kristina Dach

Meinen Eltern

per aspera ad astra

Publikationen

Dach K., Zovko J., Hogardt M., Koch I., van Erp K., Heesemann J., Hoffmann R. Bacterial toxins induce sustained mRNA expression of the silencing transcription factor KLF2 via inactivation of RhoA and RhoGDI-1. Eingereichtes Manuskript (JBC)

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

Koch I., Dach K., Heesemann J., Hoffmann R. A bacterial pathogen targets and inactivates NK cells. Eingereichtes Manuskript (Cell Host & Microbe)

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
bidest.	Bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-di-Amin-tetra-Essigsäure
<i>et al.</i>	und andere
FBS	Fötale Bovines Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein
GDP	Guanidin-Diphosphat
GTP	Guanidin-Triphosphat
H ₂ O	Wasser
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin der Klasse G
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	molar

mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
nm	Nanometer
MOPS	3-Morpholio-propansulfonsäure
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
sec	Sekunden
Syc	<i>specific Yop chaperone</i>
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	N,N,N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTSS	Typ III Sekretions- und Translokationsapparat
U	Enzymeinheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen/ Volumen
Vol.	Volumen
Yop	<i>Yersinia outer protein</i>
Ysc	<i>Yersinia secretion system</i>
α	Anti
Ω	Ohm
%	Prozent
μ F	Mikrofarad
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	12
1.1	Bakterien der Gattung <i>Yersinia</i>	12
1.2	Pathogenitätsfaktoren von <i>Yersinia enterocolitica</i>	13
1.2.1	Typ III Sekretionssystem	14
1.2.2	Effektorproteine (<i>Yersinia Outer Proteins</i>)	14
1.3	GTP-bindende Proteine	17
1.3.1	Die Ras-Superfamilie	17
1.3.2	Rho-GTPasen	18
1.3.2.1	Regulation der GTPasen	19
1.3.2.2	Rho-Effektorproteine	20
1.3.2.3	Modifikation von Rho-GTPasen durch bakterielle Virulenzfaktoren	21
1.4	Sp1/Krüppel-ähnliche Transkriptionsfaktoren	22
1.4.1	Allgemeine Eigenschaften und Einteilung	22
1.4.2	Der Transkriptionsfaktor KLF2	23
1.5	Ziele dieser Arbeit	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Material	26
2.1.1	Geräte	26
2.1.2	Chemikalien und Enzyme	26
2.2	Bakterienstämme, Plasmide und Primer	27
2.2.1	Bakterienstämme	27
2.2.2	Plasmide	28
2.2.3	Primer	28
2.2.3.1	Oligonukleotide für PCR und Sequenzierungen	28
2.2.3.2	Oligonukleotide für die cDNA Synthese	31
2.3	Nährmedien und Antibiotika	31
2.3.1	Nährmedien	31
2.3.2	Antibiotika	32
2.4	Molekularbiologische Methoden	33
2.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA	33
2.4.2	Agarosegelelektrophorese von DNA	33
2.4.2.1	Analytische Gelelektrophorese	34
2.4.2.2	Präparative Gelelektrophorese	34
2.4.3	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	34
2.4.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
2.4.4.1	Allgemeine PCR	34
2.4.4.2	Real-Time PCR	35
2.4.4.2.1	Taqman	35
2.4.4.2.2	Lightcycler	37
2.4.5	Aufreinigung von PCR-Produkten	38
2.4.6	Restriktionsverdau	38
2.4.7	Dephosphorylierung von DNA	38
2.4.8	Ligation von DNA-Fragmenten	38
2.4.9	Phenol/Chloroform-Extraktion	39
2.4.10	Fällung von DNA	39
2.4.11	Transformation von DNA mittels Elektroporation	39

INHALTSVERZEICHNIS

2.4.12	Transformation von DNA mittels Hitzetransformation	40
2.4.13	Sequenzspezifische Mutagenese	40
2.4.14	RNA-Isolierung	40
2.4.15	Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung	41
2.4.16	Agarosegelelektrophorese von RNA	41
2.4.17	Erststrang cDNA Synthese für RT-PCR	42
2.4.18	Zweitstrang cDNA Synthese, <i>in vitro</i> Transkription und Markierung der cRNA für die Analyse auf MOE430A Mikroarrays	42
2.5	Mikrobiologische Methoden	43
2.5.1	Anzucht und Stammhaltung von Bakterien	43
2.5.2	Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen	43
2.5.3	Herstellung elektrokompenter Zellen	44
2.5.4	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	44
2.6	Zellbiologische Methoden	45
2.6.1	Verwendete Zelllinien und Kulturbedingungen	45
2.6.2	Bestimmung der Zellzahl	46
2.6.3	Transfektion von Zellen	46
2.6.3.1	Transfektion mit FuGene (Roche)	46
2.6.3.2	Calcium Phosphat Transfektion	46
2.6.3.3	Transfektion mit ExGen 500 (Fermentas)	47
2.6.4	Herstellung von GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor)-haltigem Zellkulturüberstand	47
2.6.5	Ausdifferenzierung von murinem Knochenmark zu dendritischen Zellen (DCs)	47
2.6.6	Herstellung von M-CSF-haltigem Zellkulturüberstand	48
2.6.7	Ausdifferenzierung von murinem Knochenmark zu Makrophagen	48
2.6.8	Infektion von Zellen	48
2.6.9	Färbung des Aktinzytoskeletts	49
2.7	RNA Interferenz (RNAi)	49
2.7.1	Herstellung eines lentiviralen shRNA Expressionsvektors	49
2.7.2	Hybridisierung der Oligonukleotide und Klonierung in pENTR/U6	50
2.7.3	Klonierung der shRNA Expressionskassette in den lentiviralen Vektor	52
2.7.4	Produktion des lentiviralen Überstandes	53
2.7.5	Transduktion der lentiviralen Vektoren in Zielzellen	53
2.8	Tierexperimentelle Methoden	54
2.8.1	Verwendete Mausstämme	54
2.8.2	Isolierung von Knochenmark	54
2.8.3	Präparation der Milz und Gewinnung von Zellsuspensionen	54
2.8.4	Intravenöse (<i>i.v.</i>) Infektion	55
2.9	Proteinbiochemische Methoden	55
2.9.1	Isolierung sekretierter YOPs aus dem Kulturüberstand	55
2.9.2	Herstellung von Zelllysaten für SDS-Polyacrylamidgele	56
2.9.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	56
2.9.4	Western Blot	58
2.9.5	Antikörper	58
2.9.5.1	Primäre Antikörper	58
2.9.5.2	Sekundäre Reagenzien	59
2.9.6	Ponceaufärbung	59
2.10	Immunologische Methoden	59
2.10.1	Oberflächenfärbung von dendritischen Zellen	59
2.10.2	Apoptosemessung	59
2.10.3	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	60
2.10.4	Sortierung dendritischer Zellen am High-Speed-Cell-Sorter MoFlo	60

INHALTSVERZEICHNIS

2.10.5	Präparation und Färbung von Gewebeschnitten	61
2.11	Analyse von Mikroarrays	61
2.11.1	Beschreibung der Mikroarrays MOE430A	61
2.11.2	Hybridisierung, Waschen und Färben der Mikroarrays	62
2.11.3	Auswertung der Mikroarraydaten	63
2.11.3.1	Normalisierung der Mikroarraydaten	63
2.11.3.2	Analyse einzelner Arrays	63
2.11.3.3	Identifikation differentiell exprimierter Gene und Cluster-Analyse	63
2.11.3.4	Einteilung differentiell exprimierter Gene in funktionelle Gruppen	64
3	Ergebnisse	65
3.1	Transkriptionsantwort muriner dendritischer Zellen auf Infektion mit <i>Yersinia enterocolitica</i>	65
3.1.1	Optimierung der Infektionsbedingungen	65
3.1.2	Sortieren dendritischer Zellen	67
3.1.3	Mikroarrayanalyse nach Infektion von dendritischen Zellen mit <i>Yersinia enterocolitica</i>	67
3.1.4	Qualitätskontrolle der Mikroarraydatensätze	68
3.1.5	Detektion differentiell exprimierter Gene	69
3.1.6	Transkriptionsprofil muriner dendritischer Zellen	71
3.1.7	Identifizierung des für die <i>klf2</i> -Induktion verantwortlichen Yops	72
3.2	Mechanismus der <i>klf2</i>-Induktion	73
3.2.1	Einfluss von Cycloheximid auf die Expression von <i>klf2</i>	74
3.2.2	Untersuchungen zur Funktion von Rho-GTPasen bei der Induktion des Transkriptionsfaktors <i>klf2</i>	75
3.2.3	Einfluss des Serum response factors (SRF) in der <i>klf2</i> Regulation	76
3.2.4	Untersuchungen zum Einfluss von Aktin auf die Expression von <i>klf2</i>	78
3.2.5	Die Rolle von Rho bei der Induktion von <i>klf2</i>	80
3.2.5.1	Gezieltes Ausschalten von <i>rhoA</i> , <i>rhoB</i> und <i>rhoC</i> mit Hilfe von shRNAs	81
3.2.5.1.1	Konstruktion der Expressionsvektoren und Herstellung des lentiviralen Überstandes	81
3.2.5.1.2	Infektion der Zielzellen	81
3.2.5.2	Inaktivierungseffizienz der transduzierten shRNA Konstrukte	82
3.2.5.3	Effekt auf die Induktion von <i>klf2</i>	84
3.2.6	Identifizierung von Rho-Effektoren, welche die anhaltende Induktion von <i>klf2</i> vermitteln	85
4	Diskussion	90
4.1	Genexpressionsprofil dendritischer Zellen nach Infektion mit <i>Yersinia enterocolitica</i>	90
4.2	Mechanismus der <i>Yersinia</i>-induzierten <i>klf2</i>-Induktion	94
4.2.1	Eigenschaften des Transkriptionsfaktors KLF2	94
4.2.2	Die Rolle von Rho-GTPasen in der <i>klf2</i> -Induktion	97
4.2.3	Einfluss der Aktindynamik auf die <i>klf2</i> Expression	98
4.2.4	Rho-vermittelte Transkriptionsregulation von <i>klf2</i>	99
4.2.5	Die Rolle der RhoA-Effektorproteine in der Regulation der <i>klf2</i> Expression	100
4.2.6	Modell der <i>klf2</i> Expressionsregulation	104
5	Zusammenfassung	105
6	Anhang	106
7	Literaturverzeichnis	109
	Danksagung	126
	Lebenslauf	127

1 Einleitung

1.1 Bakterien der Gattung *Yersinia*

Yersinien sind gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien der Familie *Enterobacteriaceae*. Die Gattung *Yersinia* umfasst elf verschiedene Spezies, wobei *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis* zu den humanpathogenen Arten zählen (Aleksic und Bockemuhl, 1990). *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* sind im Gegensatz zu *Y. pestis* bei 25 °C beweglich, synthetisieren jedoch bei 37 °C keine Flagellen mehr. Yersinien können sich in einem Temperaturbereich von 4-43 °C vermehren, die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 28-30 °C (Brubaker, 1972; Cover und Aber, 1989).

Y. pestis, der Erreger der Pest wird bei der klassischen Infektion durch den Biss des Rattenfloh (*Xenopsylla cheopis*) übertragen. Dabei kommt es zunächst zur Invasion der Lymphknoten und zur Ausbildung so genannter Bubonen (Beulenpest). Von den Lymphknoten aus können die Erreger in die Blutbahn gelangen und eine Sepsis hervorrufen. Eine Abwanderung der Erreger in die Lunge führt zur Lungenpest und ermöglicht eine Übertragung durch Tröpfcheninfektion (Heesemann, 1994; Perry und Fetherston, 1997).

Die enteropathogenen Arten *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* sind nach Salmonellen- und Campylobacter-Spezies die häufigsten Erreger von bakteriellen Enteritiden. Das natürliche Reservoir von Yersinien sind Schweine, Nager und Hühner. Die Übertragung der Erreger auf den Menschen verläuft über den Genuss von kontaminiertem Fleisch und Milchprodukten (Shayegani *et al.*, 1981). Nach oraler Aufnahme durchwandern die Yersinien die in der Submukosa des Dünndarms gelegenen Peyerschen Plaques und injizieren mithilfe des so genannten Typ III Sekretionsapparates Effektorproteine (*Yersinia outer proteins*, Yops) in ihre Zielzellen (Grutzkau *et al.*, 1990; Autenrieth und Firsching, 1996). In den Peyerschen Plaques vermehren sich Yersinien extrazellulär und bilden Abszesse, die sich einerseits in das Darmlumen entleeren und andererseits die Dissemination der Yersinien in mesenteriale Lymphknoten, Milz, Leber und Blutbahn verursachen können (Bottone, 1997). Die von enteropathogenen Yersinien hervorgerufenen Krankheitsbilder reichen von Enteritis, Enterokolitis und selbstlimitierender Diarrhöe (v.a.

Yersinia enterocolitica), bis hin zur mesenterialen Lymphadenitis, terminaler Ileitis und Pseudoappendizitis (v.a. *Yersinia pseudotuberculosis*) (Black *et al.*, 1978; Braunstein *et al.*, 1971; Putzker *et al.*, 2001). Neben diesen selbstlimitierenden Formen der Yersiniose kann es jedoch - vor allem bei immunsupprimierten Patienten, Dialyse-Patienten, Patienten mit Diabetes mellitus, hämolytischer Anämie oder Leberzirrhose - zu einer septischen Verlaufsform kommen (Lenz *et al.*, 1984; Butzler *et al.*, 1978; Lenz *et al.*, 1984).

1.2 Pathogenitätsfaktoren von *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica besitzt verschiedene Pathogenitätsfaktoren, die entweder plasmid- oder chromosomal kodiert sind. Alle pathogenen Yersinien besitzen ein ~70 kb großes Virulenzplasmid pYV (Abb. 1-1) (Portnoy und Falkow, 1981). pYV-kodierte Pathogenitätsfaktoren werden temperaturabhängig bei 37 °C exprimiert. Das plasmidkodierte *Yersinia* Adhäsins A (YadA), sowie die chromosomal kodierten Proteine Invasin (Inv) und AIL (*attachment invasion locus*) sind für die Adhärenz an die Zielzelle von Bedeutung. Nach dem Anheften der Bakterien werden mit Hilfe eines Typ III Sekretionssystems Effektorproteine in die Wirtszelle transloziert (Iriarte und Cornelis, 1996).

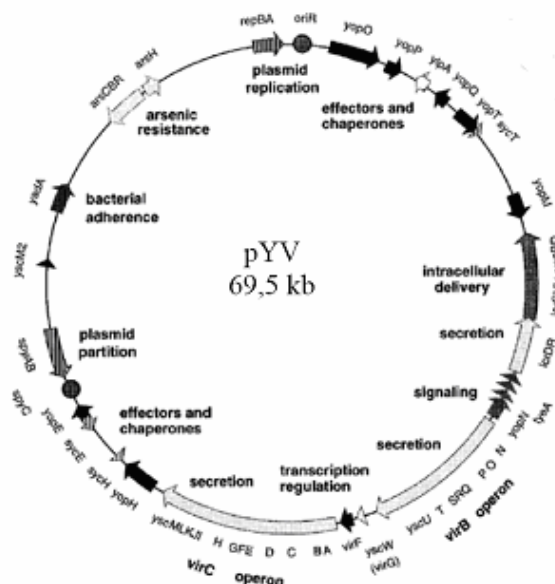


Abb. 1-1: Das Virulenzplasmid pYV von *Yersinia enterocolitica* (Iriarte und Cornelis, 1998)

1.2.1 Typ III Sekretionssystem

Typ III Sekretionssysteme (TTSS) wurden in einer Vielzahl von gram-negativen human- und tierpathogenen Bakterien wie *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., *Bordetella* spp., *Shigella* spp., *Chlamydia* spp. und *E. coli* identifiziert. Ähnliche TTSS finden sich darüber hinaus auch in pflanzenpathogenen Bakterien, wie *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum* oder *Xanthomonas campestris* (Hueck, 1998). Es erlaubt den Bakterien den Transport von Virulenzproteinen in die eukaryontische Wirtszelle. Bei Yersinien werden alle zu sekretierenden Yops und die Proteine, welche für den Aufbau des Sekretionsapparates benötigt werden, auf dem pYV-Plasmid kodiert. Das so genannte Ysc- (Yop secretion) Injektisom der Yersinien wird aus 27 verschiedenen Proteinen aufgebaut und durchspannt die Peptidoglykanschicht und die zwei Bakterienmembranen (Cornelis, 2002). Am Basalkörper befindet sich eine Proteinpumpe, an deren Antrieb eine als YscN bezeichnete ATPase beteiligt ist (Woestyn *et al.*, 1994). Das Injektisom ragt an der Oberfläche nadelartig hervor. Mit Hilfe dieser 60-80 nm langen Nadel wird eine direkte Verbindung zur Wirtszelle hergestellt. Der Aufbau des Sekretionsapparates beginnt temperaturabhängig bei 37 °C, die Sekretion und Translokation der Effektorproteine erfolgt jedoch erst durch den Kontakt mit der Wirtszelle (Cornelis, 2002). Von Bedeutung für diesen Schritt ist YopN, welches die Öffnung des Kanals reguliert (Forsberg *et al.*, 1991). Nach der Öffnung des Sekretionskanals bilden YopB, YopD und LcrV eine Pore durch die Wirtszellmembran, wodurch die Effektorproteine in das Zytosol der Wirtszelle transloziert werden können (Neyt und Cornelis, 1999; Holmstrom *et al.*, 2001). Für den Transport benötigen einige Yops zusätzlich die Komplexion mit ihren speziellen Chaperonen (Syc), deren Gene ebenfalls auf dem pYV-Plasmid lokalisiert sind (Cornelis *et al.*, 1998).

1.2.2 Effektorproteine (*Yersinia Outer Proteins*)

Zusätzlich zu den Genen, die für die Ausbildung des TTSS nötig sind, sind auf dem pYV-Plasmid Gene für die Effektorproteine die so genannten Yops (*Yersinia Outer Proteins*) lokalisiert. Nach dem Zellkontakt und der Ausbildung des TTSS kommt es zur deren Translokation in die Wirtszelle. Im Folgenden sind die einzelnen Yops näher charakterisiert.

YopH ist eine 51 kDa große hochaktive Tyrosinphosphatase, welche sich durch eine hohe Sequenzhomologie zu eukaryontischen Proteinphosphatasen auszeichnet (Guan und Dixon, 1990). YopH greift in eine Reihe verschiedener Signaltransduktionswege ein, welche für die angeborene und die erworbene Immunität wichtig sind. Unter anderem dephosphoryliert YopH die Adhäsionsregulatorproteine FAK, Cas und Paxillin, wodurch es zur Auflösung des fokalen Adhäsionskomplexes kommt und folglich die Inhibierung der integrinvermittelten Phagozytose gehemmt wird (Persson *et al.*, 1997; Black *et al.*, 1998). Zusätzlich inhibiert YopH die Antigenrezeptor assoziierten Signaltransduktionskaskaden von B- und T-Lymphozyten (Yao *et al.*, 1999) und hemmt die Synthese des Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in Makrophagen (Sauvonnet *et al.*, 2002a). Des Weiteren dephosphoryliert es die Lck Kinase, ein Protein, das an der Signaltransduktion des T-Zell-Antigenrezeptors beteiligt ist (Alonso *et al.*, 2004).

YopM ist ein 42 kDa großes Effektorprotein, welches eine variable Anzahl an Leucin-reichen Sequenzen besitzt. Es ist das einzige der sechs Effektorproteine, von dem keine enzymatische Funktion bekannt ist. YopM gelangt nach Translokation in die Wirtszelle über einen Vesikel-assoziierten Transportweg in den Zellkern (Skrzypek *et al.*, 1998). Darüber hinaus ist bekannt, dass YopM mit den zellulären Kinasen PKN2 (Proteinkinase N2) und RSK1 (*p90 ribosomal S6 protein kinase 1*) interagiert, welche unter anderem an der Regulation von Zellproliferation, Translation und Zellwachstum beteiligt sind (McDonald *et al.*, 2003). Über die genaue Funktion und Wirkungsweise von YopM ist wenig bekannt, für die Ausbildung einer systemischen Infektion in Mäusen ist es jedoch essentiell (Leung *et al.*, 1990; Trülzsch *et al.*, 2004).

Die 32,5 kDa große Cysteinprotease (Orth, 2002) **YopP** (*Y. enterocolitica*) und das homologe YopJ (*Y. pseudotuberculosis*) hemmen die Freisetzung der Zytokine IL-8 und TNF- α (Boland und Cornelis, 1998) und sind für die Induktion der Apoptose in Makrophagen verantwortlich (Ruckdeschel *et al.*, 1997b). Diese Effekte werden durch die direkte Inhibition von Mitgliedern der MAPK-Kinase-Familie hervorgerufen. Wie diese Inhibierung erfolgt blieb lange Zeit umstritten. Ursprünglich wurde vermutet, dass die Cysteinproteaseaktivität von YopP/YopJ nötig ist um Ubiquitin oder das ubiquitinähnliche Molekül SUMO-1 von zellulären Proteinen, wie TRAF2, TRAF6 und I κ B α abzuspalten (Orth *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2005). Der NF- κ B spezifische Inhibitor I κ B α , hält dadurch inaktives NF- κ B im Zytoplasma zurück (Zhou *et al.*, 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass YopP/YopJ NF- κ B hemmt, indem es die Ubiquitinierung der Kinase IKK β hemmt und die NF- κ B Translokation in den Zellkern verhindert (Carter *et al.*, 2003).

Neueste Veröffentlichungen zeigen dass YopP/YopJ Serin- und Threonin-Reste der MAPK-Kinase 6 acetyliert und dadurch deren Phosphorylierung und Aktivierung durch Kinasen verhindert (Mukherjee *et al.*, 2006).

Das Effektorprotein **YopE** (23 kDa) inaktiviert als GAP (*GTPase activating protein*) die GTPasen RhoA, Cdc42 und besonders Rac-1 (Pawel-Rammingen *et al.*, 2000; Andor *et al.*, 2001) Diese GTPasen spielen bei der Regulation der Zytoskelettorganisation eine entscheidende Rolle. Eine Infektion von Epithelzellen mit YopE-translozierenden Yersinien führt zur Depolymerisation von Aktinfilamenten. Dadurch kommt es zum Abrunden und Ablösen der Zellen von der extrazellulären Matrix (Rosqvist *et al.*, 1991). Neben diesen zytotoxischen Effekten vermittelt YopE die Resistenz gegenüber der Phagozytose durch Neutrophile und Makrophagen (Grosdent *et al.*, 2002). Darüber hinaus inhibiert YopE die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (Viboud *et al.*, 2003). Durch die Deaktivierung von Rac-1 wird die autoproteolytische Aktivierung von Caspase-1 inhibiert, wodurch die Reifung von proIL-1 β gehemmt wird. ProIL-1 β spielt für die Regulation der Immunantwort eine entscheidende Rolle (Schotte *et al.*, 2004).

Bei **YopO** (*Y. enterocolitica*) bzw. YpkA (*Y. pseudotuberculosis*) handelt es sich um ein 81 kDa großes Effektorprotein mit verschiedenen funktionellen Domänen. YopO besitzt eine Serin/Threonin-Kinase Domäne (Galyov *et al.*, 1993), für deren Autophosphorylierung und Aktivierung Aktin nötig ist (Juris *et al.*, 2000). Zudem besitzt YopO eine Domäne, über die es RhoA und Rac-1 bindet (Galyov *et al.*, 1993; Dukuzumuremyi *et al.*, 2000). YopO führt zur Depolymerisation des Aktinzytoskeletts. Dieser Effekt ist vermutlich auf die Interaktion mit RhoA und Rac-1 zurückzuführen (Barz *et al.*, 2000; Dukuzumuremyi *et al.*, 2000; Juris *et al.*, 2000). Infektionsversuche mit *Yersinia*-Mutanten haben gezeigt, dass YopO keine große Bedeutung für die Virulenz der Yersinien hat, $\Delta yopO$ Mutanten sind immer noch in der Lage, Milz und Leber zu kolonisieren und eine systemische Infektion hervorzurufen (Trülzsch *et al.*, 2004).

Bei **YopT** handelt es sich um ein 35 kDa großes Effektorprotein, welches in allen *Y. enterocolitica* und *Y. pestis* Stämmen, nicht jedoch in *Y. pseudotuberculosis* Stämmen der Serogruppe O:3 exprimiert wird. YopT hat ähnlich wie YopE eine zytotoxische Wirkung, was sich in der Inhibierung der Stressfaserbildung und dem Abrunden der Wirtszellen äußert. Diese Effekte lassen sich auf die Cysteinproteaseaktivität von YopT zurückführen. YopT schneidet posttranslational Lipid-modifizierte und dadurch membrangebundene Rho-GTPasen nahe ihrem

Carboxyl-Ende. Dadurch lösen sich diese Rho-GTPasen von der Membran ab und sind nicht mehr in der Lage, mit ihren Effektorproteinen zu interagieren. *in vitro* modifiziert YopT sowohl die Rho-GTPase RhoA, als auch Rac-1 und Cdc42. *in vivo* konnte gezeigt werden, dass YopT bevorzugt RhoA inhibiert (Aepfelbacher *et al.*, 2003).

1.3 GTP-bindende Proteine

Regulatorische GTP-bindende Proteine besetzen eine Schlüsselposition in der Regulation der Signaltransduktion in eukaryontischen Zellen. Sie sind an der Regulation der ribosomalen Proteinsynthese, des intrazellulären Transports von Proteinen und der Kontrolle von Zellwachstum und Differenzierung beteiligt. GTP-bindende Proteine lassen sich in fünf Superfamilien einteilen: die α -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine, die Translationsfaktoren der Proteinbiosynthese (IF-2, EF-Tu, EF-G, RF-3), das Signalerkennungspartikel SRP und dessen Rezeptor SR, die großen GTP-bindenden Proteine (GBP, Dynamamin), sowie die Ras-Superfamilie (kleine GTP-bindende Proteine) (Pandit und Srinivasan, 2003).

1.3.1 Die Ras-Superfamilie

Proteine der Ras-Superfamilie sind monomere Proteine mit einem Molekulargewicht von 20-25 kDa. Sie kommen in allen Eukaryonten vor und umfassen in menschlichen Zellen mehr als 150 Mitglieder, die sich anhand von Struktur und Funktion in mehrere Subfamilien unterteilen lassen (Matozaki *et al.*, 2000; Wennerberg *et al.*, 2005). Wie in Abb. 1-2 zu sehen, erfolgt die Unterteilung der Ras-Superfamilie in fünf Hauptgruppen (Wennerberg *et al.*, 2005). Die Signaltransduktion über **Ras** (Rat sarcoma) Proteine führt zu zellulären Antworten wie Differenzierung, Proliferation oder Apoptose (Vojtek und Der, 1998). **Rab** (Ras-like proteins in brain) Proteine spielen eine Rolle beim intrazellulären Vesikeltransport und der Exozytose (Zerial und McBride, 2001). Die Gruppe der **Arf** (ADP-ribosylation factor) Proteine steuert die Bildung von Vesikeln und deren Transport zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat (Jackson und Casanova, 2000; Nie *et al.*, 2003). **Ran** (Ras-like nuclear) Proteine spielen eine regulatorische Rolle beim Kerntransport (Moore, 1998) und die Untergruppe der **Rho** (Ras homologous) Proteine sind an

der Regulation des Zytoskeletts, des Zellwachstums und der Genexpression beteiligt (Etienne-Manneville und Hall, 2002). Die Klassifizierung von einigen weniger bekannten Proteinen ist aufgrund der stark vernetzten Signalwege schwierig (Matozaki *et al.*, 2000).

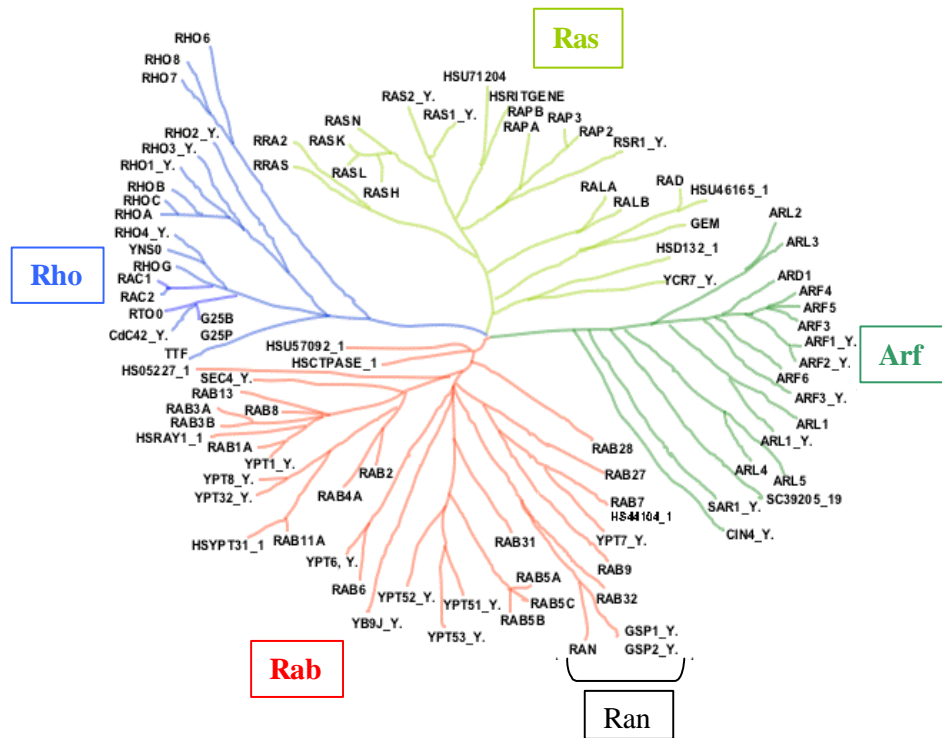


Abb. 1-2: Die Unterteilung der Ras-Superfamilie in ihre Hauptgruppen (Takai *et al.*, 2001)

1.3.2 Rho-GTPasen

Die Subfamilie der Rho-GTPasen umfasst in menschlichen Zellen mindestens 22 verschiedene Proteine, die anhand aminoterminalen Sequenzhomologien in neun Untergruppen unterteilt werden können: **Rho** (RhoA-C), **Rac** (Rac1-3, RhoG), **Cdc42** (Cdc42, TC10, TCL, Wrch1-2), **Rnd** (Rnd1-3), **RhoBTB** (RhoBTB1-2), **Miro** (Miro1-2), **RhoD**, **RhoF** und **RhoH** (Brembu *et al.*, 2006). Rho-GTPasen regulieren eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie die Organisation und den Umbau des Aktinzytoskeletts, Zellmigration oder Adhäsion. Sie spielen aber auch eine Rolle in Signaltransduktionswegen, welche Genexpression, Zellwachstum und Zellzyklus regulieren (Ridley, 2001). Von diesen Proteinen gehören Rho, Rac und Cdc42 zu den am besten untersuchten Proteinen der Rho-Familie. Die Aktivierung der Rho-GTPasen durch externe

Signale führt zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts (Hall, 1998). Rho kontrolliert sowohl die Ausbildung von Stressfasern, welche zur Zellkontraktion benötigt werden, als auch die Entstehung von fokalen Adhäsionen, einer Struktur zur Bindung der Zelle an die Matrix (Ridley und Hall, 1992). Eine Aktivierung von Cdc42 führt zur Ausbildung von Filopodien und Mikrospiques. Rac ist für die Bildung von netzartigen Ausstülpungen, so genannten Lamellipodien, verantwortlich (Nobes und Hall, 1995).

1.3.2.1 Regulation der GTPasen

GTPasen besitzen eine hohe GTP/GDP Affinität und dienen in der Zelle als molekulare Schalter bei verschiedenen Signaltransduktionsprozessen (Bourne *et al.*, 1990). Sie dienen der Übermittlung von externen Signalen an stromabwärtsgelegene Effektoren. Rho-GTPasen existieren in einer inaktiven zytosolischen GDP-gebundenen und einer aktiven Membranassoziierten GTP-gebundenen Form. Der Übergang zwischen diesen zwei Formen wird durch drei Klassen von Proteinen reguliert (Abb. 1-3).

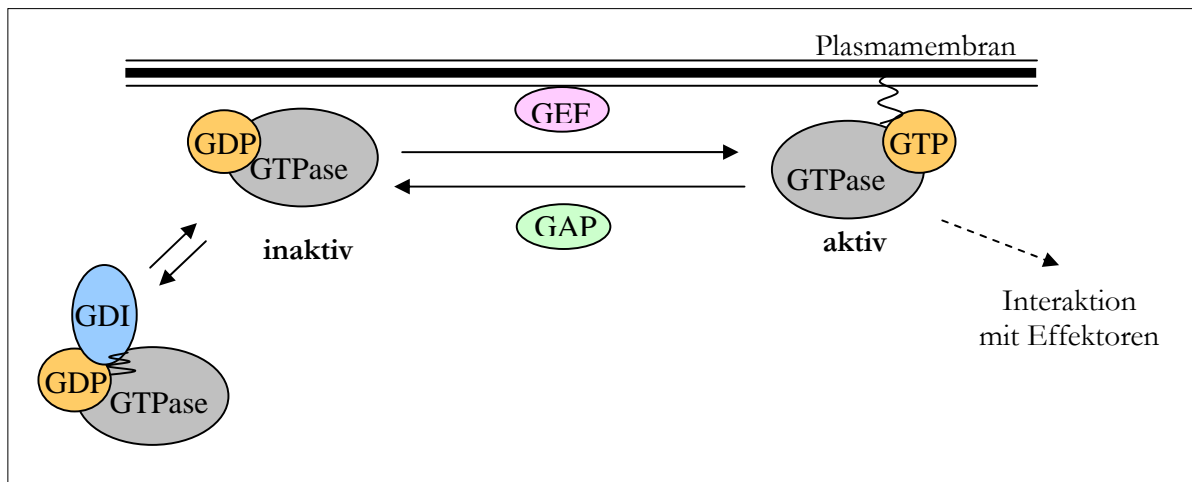


Abb. 1-3: Schematische Übersicht über die Regulation von GTPasen

GTPase aktivierende Proteine (*GTPase activating proteins*, GAPs) beschleunigen die irreversible langsame intrinsische GTP-Hydrolyse der Rho Proteine und begünstigen somit die Entstehung der inaktiven Form. Durch die Bindung von Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (*Guanine nucleotide dissociation inhibitors*, GDIs) wird der GDP-gebundene Zustand von Rho stabilisiert, was einer Aktivierung der Rho-GTPasen entgegenwirkt. Guaninnukleotidaustauschfaktoren (*Guanine*

nucleotide exchange factors, GEFs) überführen die GTPasen von der inaktiven in die aktive GTP-gebundene Form, indem sie die Dissoziation von GDP katalysieren (Boguski und McCormick, 1993; Narumiya, 1996; Bernards und Settleman, 2004; Siderovski und Willard, 2005).

Die Funktion von GTPasen ist abhängig von deren Lokalisation in der Zelle. Die Bindung von GDIs an GTPasen bewirkt das Ablösen der Proteine von der Membran und deren Translokation ins Zytoplasma (Michaelson *et al.*, 2001). Neben der Interaktion mit GDI ist die posttranslationale Modifikation der C-terminalen CAAX-Box (C: Cystein, A: aliphatische Aminosäure, X: Serin, Methionin oder Glutamin [Leucin bei Rho-GTPasen]) entscheidend für deren Assoziation mit der Zellmembran. Das Cystein wird zunächst durch die Anheftung eines Geranylgeranyl (bei Rho-GTPasen)-, Farnesyl-, Myristyl- oder Palmitylrestes prenyliert, darauf folgt die proteolytische Abspaltung des AAX-Restes und als letzte Modifikation die Carboxylmethylierung. Der Prenylrest dient den Rho-GTPasen als Anker in der Membran. GDIs maskieren diesen Rest und entfernen damit das Protein von der Zytoplasmamembran (Michaelson *et al.*, 2005).

1.3.2.2 Rho-Effektorproteine

Aktiviert Rho-GTPasen interagieren mit ihren stromabwärts gelegenen Effektorproteinen, von denen bis heute etwa 30 identifiziert werden konnten. Die Bindung von GTP an Rho induziert eine Konformationsänderung in zwei Domänen der GTPase (Switch I und Switch II), wodurch ihre Bindung an Effektorproteine ermöglicht wird. Diese besitzen eine Vielzahl an funktionellen Domänen, wobei die Interaktion mit GTPasen über die Rho-Bindedomäne (RBD) erfolgt. Man unterscheidet zwischen Effektoren, die für Rho, Rac und Cdc42 spezifisch sind oder mit allen Rho-GTPasen in Wechselwirkung treten können (Bishop und Hall, 2000). Bei den bisher bekannten Effektoren handelt es sich meist um Kinasen. Die Rho-Effektoren Citron Kinase, Kinectin, Rhoophilin, Rhotekin, PKN1 (Proteinkinase N1), mDia (Diaphanous) und die am besten untersuchten Rho-Kinasen (ROK1 und ROK2) kontrollieren verschiedene aktinmyosinvermittelte Prozesse in der Zelle. Die Aktivierung dieser Effektoren erfolgt meist über die Aufhebung autoinhibitorischer Interaktionen durch die Bindung von Rho-GTP. Der genaue Mechanismus der Effektoraktivierung ist für die meisten Proteine jedoch noch unklar (Bishop und Hall, 2000; Dvorsky und Ahmadian, 2004).

1.3.2.3 Modifikation von Rho-GTPasen durch bakterielle Virulenzfaktoren

GTPasen sind wegen ihrer Schlüsselfunktion in vielen Signaltransduktionskaskaden häufig Angriffsziel für bakterielle Toxine, welche GTPasen durch Desaminierung, Glykolyisierung oder ADP-Ribosylierung modifizieren können. Neben diesen kovalenten Modifikationen können einige bakterielle Proteine als GAP oder GEF wirken und somit die GTPasen inaktivieren oder aktivieren (Aktories *et al.*, 2000; Barbieri *et al.*, 2002). Intrazelluläre Bakterien wie beispielsweise Salmonellen bewirken durch die Injektion von SopE, welches als GEF wirkt und damit die GTPasen aktiviert, ihre Internalisierung (Hardt *et al.*, 1998). Das als GAP wirkende SptP inaktiviert anschließend die GTPasen (Fu und Galan, 1999). Extrazelluläre Erreger wie *Yersinia enterocolitica* induzieren dagegen die Deaktivierung von GTPasen, um der Phagozytose zu entgehen. YopE, ein GAP, fördert die GTP-Hydrolyse, zusätzlich bewirkt die Cysteinprotease YopT das Ablösen der GTPase von ihrem Membrananker (Aepfelbacher und Heesemann, 2001). In Tab. 1-1 sind die bisher bekannten Rho-GTPase modifizierenden bakteriellen Virulenzfaktoren zusammengefasst.

Tab. 1-1: Bakterielle Toxine, die mit Rho-GTPasen interagieren (Lerm *et al.*, 2000; Barbieri *et al.*, 2002)

Toxin	Aktivität	Wirkung
Proteasen		
YopT (<i>Y. enterocolitica</i>)	Cysteinprotease	inaktivierend
ADP-Ribosylierende Toxine		
C3bot (<i>C. botulinum</i>), C3lim (<i>C. limosum</i>), C3cer (<i>B. cereus</i>), C3stau (<i>S. aureus</i>)	ADP-Ribosyltransferase	inaktivierend
Glykosylierende Toxine		
Toxin A und B (<i>C. difficile</i>), Lethal Toxin (<i>C. sordellii</i>), Toxin B 1470 (<i>C. difficile</i> Stamm 1470)	UDP-Glykosyltransferase	inaktivierend
α Toxin (<i>C. novyi</i>)	UDP-N-Acetyl-Glucosamintransferase	inaktivierend
Deamidierende/Transglutaminierende Toxine		
CNF1, CNF2 (<i>E. coli</i>), CNFY (<i>Y. pseudotuberculosis</i>)	Glutamindeamidase	aktivierend
DNT (<i>Bordetella</i> spp.)	Transglutaminase	aktivierend
Transiente Modifikation durch Toxine		
YopE (<i>Yersinia</i> spp.)	GAP	inaktivierend
ExoS, ExoT (<i>P. aeruginosa</i>)	GAP	inaktivierend
SptP (<i>Salmonella</i>)	GAP	inaktivierend
SopE, SopE2 (<i>Salmonella</i>)	GEF	aktivierend

Das Exoenzym C3 aus *Staphylococcus aureus* ist einer der bekanntesten Vertreter der Rho-GTPase spezifischen ADP-Ribosyltransferasen. Dieses Toxin führt zur Depolymerisierung des Aktinzytoskeletts und anschließend zur Abrundung der Zelle (Aktories und Barbieri, 2005). Ähnlich wie das C3 Toxin, wirken ExoS und ExoT aus *Pseudomonas aeruginosa* als GAP und inaktivieren somit die Rho-GTPase (Sun und Barbieri, 2004). Zu den Rho-GTPase aktivierenden Toxinen zählen die zytotoxisch nekrotisierenden Faktoren CNF1 und CNF2 aus *Escherichia coli* und das dermonekrotische Toxin DNT aus *Bordetella*. CNF1 katalysiert eine Deamidierung von Rho an Glutamin, wodurch die intrinsische GTPase Aktivität herabgesetzt wird und die GAP-stimulierte GTPase Aktivität blockiert wird (Hoffmann und Schmidt, 2004).

1.4 Sp1/Krüppel-ähnliche Transkriptionsfaktoren

1.4.1 Allgemeine Eigenschaften und Einteilung

Alle Mitglieder der Familie der Sp1/Krüppel-ähnlichen Transkriptionsfaktoren binden über drei tandemartige Cys₂His₂ Zinkfinger Motive im hochkonservierten C-Terminus an die DNA (Kaczynski *et al.*, 2003; Lomberk und Urrutia, 2005). Diese Domäne ist dem Transkriptionsfaktor „Krüppel“ ähnlich, welcher während der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* exprimiert wird und an der Segmentierung beteiligt ist. „Krüppel“-defiziente Fliegen haben ein „verkrüppeltes“ Erscheinungsbild, welches namensgebend für diesen Transkriptionsfaktor ist (Philipsen und Suske, 1999). Sp1/Krüppel-ähnliche Transkriptionsfaktoren können eine Vielzahl an GC-reichen DNA-Elementen binden und deren Transkription regulieren. Sie sind an der Regulation von Zellwachstum, Phagozytose, Morphogenese und Proliferation von Zellen beteiligt. Inzwischen umfasst die Familie über 20 Mitglieder (Tab. 1-2), welche basierend auf Sequenzvarianten im N-Terminus in weitere Subgruppen unterteilt werden (Kaczynski *et al.*, 2003). Neben der variablen N-terminalen transkriptionsregulierenden Domäne, welche aktivierende und/oder inaktivierende Funktion hat, und der hochkonservierten C-terminalen Bindedomäne, besitzen diese Transkriptionsfaktoren eine weitere variable Domäne mit einem nukleären Lokalisationssignal (NLS: *nuclear localisation signal*) (Lomberk und Urrutia, 2005).

EINLEITUNG

Tab. 1-2: Übersicht der Sp1/KLF-ähnlichen Transkriptionsfaktoren (Kaczynski *et al.*, 2003). + steht für Aktivator; - steht für einen Repressor.

Abkürzung	Transkriptionsfaktor	Aktivität	Expressionsort	KLF Nr.
EKLF	Erythroid krüppel-like factor	+	Erythrozyten, Mastzellen	KLF1
LKLF	Lung krüppel-like factor	+	Lunge, Blutgefäße, Lymphozyten, Endothelzellen	KLF2
BKLF	Basic krüppel-like factor	+ / -	Erythrozyten, Gehirn	KLF3
GKLF	Gut krüppel-like factor	+ / -	Darm, Gefäßmuskulatur	KLF4
IKLF	Intestinal krüppel-like factor	+	Epithel, Gehirn	KLF5
CPBP		+	Ubiquitär	KLF6
UKLF	Ubiquitous krüppel-like factor	+	Ubiquitär	KLF7
BKLF3	Basic krüppel-like factor 3	-	Ubiquitär	KLF8
BTEB1	Basic transcription element binding protein 1	+ / -	Ubiquitär	KLF9
TIEG1	TGFβ-inducible early gene 1	-	Ubiquitär	KLF10
TIEG2	TGFβ-inducible early gene 2	+ / -	Ubiquitär	KLF11
AP2rep	AP2-Repressor	-	Gehirn, Leber, Niere, Lunge	KLF12
BTEB3	Basic transcription element binding protein 3	+ / -	Ubiquitär	KLF13
Sp6	Specifity protein 6	-	Ubiquitär	KLF14
KKLF	Kidney krüppel-like factor	-	Ubiquitär	KLF15
BTEB4	Basic transcription element binding protein 4	-	Ubiquitär	KLF16
BTEB5	Basic transcription element binding protein 5	?	Unbekannt	-
Sp1	Specifity protein 1	+	Ubiquitär	-
Sp2	Specifity protein 2	?	Unbekannt	-
Sp3	Specifity protein 3	+ / -	Ubiquitär	-
Sp4	Specifity protein 4	+	Gehirn	-
mSp5	Mouse Specifity protein 5	?	Ubiquitär	-

1.4.2 Der Transkriptionsfaktor KLF2

Krüppel-like factor 2 (KLF2 oder LKLF) wurde erstmals 1995 als ein naher Verwandter des Transkriptionsfaktors EKLF beschrieben (Anderson *et al.*, 1995). Bei KLF2 handelt es sich um ein C2/H2 Zinkfinger Protein mit DNA-bindender Funktion und einer Molekülgröße von rund 38 kDa. Das *klf2* Gen ist zwischen Mensch und Maus stark konserviert und wird dort in ähnlichen Geweben exprimiert: in Lunge, Milz, Herz Skelettmuskel, Pankreas und Plazenta

(Anderson *et al.*, 1995; Huddleson *et al.*, 2006). Während der Embryogenese wird *klf2* reguliert exprimiert, wobei es zu einer maximalen Expression an Tagen 7 und 15 der Gestation kommt (Anderson *et al.*, 1995). Im adulten Tier wird *klf2* vorwiegend in Lunge und Milz exprimiert. *klf2* knock out Mäuse sterben in der Embryonalphase zwischen Tag 11,5 und 13,5 aufgrund von Aneurysmenbildung und daraus resultierenden Hämorrhagien (Kuo *et al.*, 1997a). Eine hohe Expression von *klf2* konnte in reifen einzelpositiven (CD4+ bzw. CD8+) T-Lymphozyten und reifen B-Lymphozyten nachgewiesen werden, T-Zell-Aktivierung resultiert in einer Suppression von *klf2*. *klf2*^{-/-} T-Zellen haben einen aktivierten Phänotyp. Die Expression von *klf2* ist essentiell für das Überleben von ruhenden, naiven T-Zellen. Eine Überexpression von *klf2* bewirkt die Induktion eines ruhenden Zustandes von T-Lymphozyten, charakterisiert durch fehlende Proliferation, verminderte Zellgröße und Proteinsynthese und die reduzierte Expression von Aktivierungsmarkern (Kuo *et al.*, 1997b; Buckley *et al.*, 2001). Die Analyse von B-Zell-Subpopulationen ergab eine KLF2-Induktion in anergen B-Zellen (Glynne *et al.*, 2000). Dieser Transkriptionsfaktor hat also stark inhibitorische Funktion in T- und wahrscheinlich auch in B-Zellen. Obgleich verschiedene funktionelle Regionen von KLF2 charakterisiert wurden, konnten physiologische Zielgene bislang nicht mit Sicherheit identifiziert werden. Auch die Mechanismen der KLF2-Induktion sind bislang nicht bekannt.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Dendritische Zellen (DC) spielen eine entscheidende Rolle in der Erkennung und Präsentation von Antigenen und sind wichtige Regulatoren der Immunabwehr. Es ist bekannt, dass eine Infektion dendritischer Zellen mit *Y. enterocolitica* zu einer Suppression der immunstimulatorischen Fähigkeiten von DCs führt. Um mehr über die molekularen Prozesse zu erfahren, die in DCs durch den Kontakt mit Yersinien hervorgerufen werden, sollte in dieser Arbeit mit Hilfe der Mikroarray-Technologie das Transkriptionsprofil muriner dendritischer Zellen nach einer Infektion mit *Y. enterocolitica* umfassend untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor *klf2* in dendritischen Zellen nach Infektion mit virulenten Yersinien induziert wird. Daher wurde im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht, welche Mechanismen der *Yersinia*-induzierten Induktion von KLF2 zugrunde liegen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 2-1: In dieser Arbeit verwendeten Geräte

Gerät	Modell	Firma
Hybridisierungssofen	GeneChip® Hybridisation Oven 640	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Waschstation	GeneChip® Fluidics Station 400	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Gene-Array-Scanner	Agilent Gene Array Scanner	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Real-Time PCR Cycler	ABI Prism 7000 sequence detection	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Lightcycler	LightCycler 2.0	Roche (Mannheim, D)
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX61	Olympus (Hamburg, D)
Cell Sorter	MoFlo	Cytomation Inc. (Fort Collins, USA)
Durchflusszytometer	FACSCanto	BD Biosciences (Heidelberg, D)

Neben den in Tab. 2-1 aufgelisteten Geräten, wurden Laborstandardgeräte eingesetzt.

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien und Enzyme von den Firmen Boehringer (Mannheim, D), Merck (Darmstadt, D), Sigma (Deisenhofen, D), Serva (Heidelberg, D), Invitrogen (Karlsruhe, D), Applied Biosystems (Darmstadt, D), Promega (Mannheim, D) und Roche (Mannheim, D) bezogen. Die verwendeten Restriktionsenzyme stammen von New England Biolabs (Frankfurt am Main, D) und Fermentas (St. Leon-Rot, D).

2.2 Bakterienstämme, Plasmide und Primer

2.2.1 Bakterienstämme

Tab. 2-2: *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5 α	F ⁻ , Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>rk⁻</i> , <i>mk⁺</i>), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , λ -, <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	(Hanahan, 1983)
DH10B	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>lacZ</i> Δ X74, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , Δ (<i>ara,leu</i>)7697, <i>araD139</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>nupG</i> , <i>rpsL</i> , λ -, T1R	(Grant <i>et al.</i> , 1990)
Stbl3	F ⁻ , <i>mcrB</i> , <i>mrr</i> , <i>hsdS20</i> , (<i>rB</i> -, <i>mB</i> +), <i>recA13</i> , <i>supE44</i> , <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rpsL20</i> , (Str ^r), <i>xyl-5</i> Δ <i>leu</i> , <i>mtl-1</i> ; HB101 Derivat	Invitrogen (Karlsruhe, D)

Tab. 2-3: *Yersinia enterocolitica* Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
WA-314	Wildtyp WA-314 Serotyp O8, besitzt Virulenzplasmid pYVO8	(Heesemann und Laufs, 1983)
WA-C	plasmidloses Derivat von WA-314	(Heesemann und Laufs, 1983)
WA(pTTS)	WA-C Derivat; enthält Plasmid (pLCR) mit 25 kb Fragment des pYV-Plasmids, welches für das TTSS kodiert	(Trürlsch <i>et al.</i> , 2003)
WA(pTTS ^r SpYopT)	WA(pTTS) mit zweitem Plasmid, welches die <i>yopT</i> / <i>sycT</i> Gene enthält	(Trürlsch <i>et al.</i> , 2003)
WA(pTTS ^r SpP60)	WA(pTTS) mit zweitem Plasmid mit <i>YopE₁₃₈p60</i> (<i>Listeria monocytogenes</i>) Fusionsgen	(Russmann <i>et al.</i> , 2001)
WA(pYV Δ YopT)	WA(pYV) Mutante, Deletion von <i>yopT</i>	(Trürlsch <i>et al.</i> , 2004)
WA(pTTS ^r SpYopTC139S)	WA(pTTS ^r SpYopT) mit C/S Mutation bei AS 139 in <i>YopT</i>	(Shao und Dixon, 2003)

Tab. 2-4: *Salmonella typhimurium* Stamm

Stamm	Beschreibung	Referenz
SL1344	<i>rpsL</i> , <i>hisG</i> , <i>xyl</i> , Str ^R invasiver Referenzstamm	(Hoiseh und Stocker, 1981)

2.2.2 Plasmide

Tab. 2-5: Plasmide und Expressionsvektoren

Plasmid/Expressionsvektor	Eigenschaften	Herkunft
pEGFP-C1	Klonierungsvektor mit pUC-ori; exprimiert eine in den roten Bereich verschobene Variante des GFP; Kana ^R	Clontech (Heidelberg, D)
pEGFP-1	Klonierungsvektor mit pUC-ori; exprimiert eine in den roten Bereich verschobene Variante des GFP; Kana ^R	Clontech (Heidelberg, D)
pDsRedExpress	Exprimiert DsRedExpress, eine Variante des RFP aus <i>Discosoma</i> sp., Kana ^R	Clontech (Heidelberg, D)
pGL3-Basic	Expressionsvektor ohne eukaryontischen Promotor, kodiert für modifizierte <i>firefly</i> Luziferase; Amp ^R	Promega (Mannheim, D)
pMACS4.1	Exprimiert CD4 unter SV40 Promotor; Amp ^R	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)
pENTR/U6	Entryvektor, Insertion der shRNA Konstrukte; Kana ^R	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pLENTI6/BLOCK-iT-DEST	Lentiviraler Destinationsvektor; Amp ^R	Invitrogen (Karlsruhe, D)

2.2.3 Primer

2.2.3.1 Oligonukleotide für PCR und Sequenzierungen

Tab. 2-6: Oligonukleotide und deren Verwendung

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Zahl der Nt.	Verwendungszweck
Humanklf2pGL3_+40_Bgl	CTA AGA TCT GGC GAA AGT GGA GAA GGA C	28	Amplifikation der humanen klf2 Promotorsequenz
Humanklf2pGL3_-2123_NheI	TGC TAG CGG CAA CTG CAG AAA GCA AGT	27	Amplifikation der humanen klf2 Promotorsequenz
Humanklf2pDsRE-1_+40_EcoRI	TGA ATT CGG CGA AAG TGG AGA AGG AC	26	Amplifikation der humanen klf2 Promotorsequenz
Humanklf2pDsRE-1_-2123_Bgl	CTA AGA TCT GGC AAC TGC AGA AAG CAA GT	29	Amplifikation der humanen klf2 Promotorsequenz
Humanklf2pGL3_-5_Bgl	CTA AGA TCT GAC CCG GGG AGA AAG GAC	27	Amplifikation der humanen klf2 Promotorsequenz
Humanklf2pDsRE-1_-5_EcoRI	TGA ATT CGA CCC GGG GAG AAA GGA C	25	Amplifikation der humanen klf2 Promotorsequenz
Murinklf2pGL3_-2_Xho	CCG CTC GAG CAG GGA CTG TGT GTG CTG TG	29	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz
Murinklf2pDsRE1_-2_Pst	AAC TGC AGC AGG GAC TGT GTG TGC TGT G	28	Amplifikation klf2 Promotorsequenz (murin)
LKLFprom+25_XhoI	CCG CTC GAG GGC AAG ATA GGC TCG CTG A	28	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz

MATERIAL UND METHODEN

LKLFprom-1937_NheI	CTA GCT AGC GCA GGT GTG GCC TGT TAT AC	29	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz
LKLFprom-1359_NheI	CTA GCT AGC TCA GGT CAC AGG TTC AAT GC	29	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz
LKLFprom-955_NheI	CTA GCT AGC GGA ACT GAG CTC CTT GGA TG	29	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz
LKLFprom-401_NheI	CTA GCT AGC CAT GCA TCG GTC CAG GTT	27	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz
Klf2Promo+25_pGL3	CTA GCC CGG GCT CGA GGC AAG ATA GGC TCG CTG AGC GCC ATG GC	44	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz (BD In-Fusion Kit)
Klf2Promo-1937_pGL3	GAT CGC AGA TCT CGA GCA GGT GTG GCC TGT TAT ACC AGC ACT TTG	45	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz (BD In-Fusion Kit)
Klf2Promo- 1937_pDsResExp1	CTC AAG CTT CGA ATT GCA GGT GTG GCC TGT TAT AC	35	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz mit 15 bp Homologie zu pDsRedExpress
Klf2Promo+25_pDsRedEx p1	GTC GAC TGC AGA ATT GGC AAG ATA GGC TCG CTG A	34	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz mit 15 bp Homologie zu pDsRedExpress
Klf2Promo- 1359_pDsResExp1	CTC AAG CTT CGA ATT TCA GGT CAC AGG TTC AAT GC	35	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz mit 15 bp Homologie zu pDsRedExpress
Klf2Promo- 955_pDsResExp1	CTC AAG CTT CGA ATT GGA ACT GAG CTC CTT GGA TG	35	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz mit 15 bp Homologie zu pDsRedExpress
Klf2Promo- 401_pDsResExp1	CTC AAG CTT CGA ATT CAT GCA TCG GTC CAG GTT	33	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz mit 15 bp Homologie zu pDsRedExpress
Klf2Promo+25_PstI	AAC TGC AGG GCA AGA TAG GCT CGC TGA	27	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz
Klf2Promo-1937_Xho	CCG CTC GAG GCA GGT GTG GCC TGT TAT AC	29	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz
Klf2Promo-1359_Xho	CCG CTC GAG TCA GGT CAC AGG TTC AAT GC	29	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz
Klf2Promo-955_Xho	CCG CTC GAG GGA ACT GAG CTC CTT GGA TG	29	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz
Klf2Promo-401_Xho	CCG CTC GAG CAT GCA TCG GTC CAG GTT	27	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz
Klf2Promo25_PstI	AAC TGC AGG GCA AGA TAG GCT CGC TGA	27	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz
Klf2Promo-1937_Xho	CCG CTC GAG GCA GGT GTG GCC TGT TAT AC	29	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz
Klf2Promo-1359_Xho	CCG CTC GAG TCA GGT CAC AGG TTC AAT GC	29	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz
Klf2Promo-955_Xho	CCG CTC GAG GGA ACT GAG CTC CTT GGA TG	29	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz
Klf2Promo-401_Xho	CCG CTC GAG CAT GCA TCG GTC CAG GTT	27	Amplifikation der murinen klf2 Promotorsequenz
DsRE-left	GCG TGA TGA ACT TCG AGG A	19	Amplifikation des DsRed-Gens
DsRE-right	GAT GAA GGA GCC GTC CTG	18	Amplifikation des DsRed-Gens
YopT-left-XhoI	ACT CGA GGA TGG ACA GTA TTC ACG GAC ACT A	31	Amplifikation von YopT, 973 bp
YopT-right-XbaI	GTC TAG AGC ATT AAA CCT CCT TGG AGT CA	29	Amplifikation von YopT, 973 bp
RhoA-left-XhoI	ACT CGA GCA CCT TTA TAA GTG ATG GCT GC	29	Amplifikation von RhoA, 603 bp
RhoA-right-XbaI	ATC TAG ACA AGG CTT CAC AAG ATG AGG	27	Amplifikation von RhoA, 603 bp
RhoB-left-NotI	ATA TTG CGG CCG CAG CTC ATG GCG GCC ATC C	31	Amplifikation von RhoB, 599 bp
RhoB-right-XbaI	GTC TAG ACC CTC ATA GCA CCT TGC AGC AG	29	Amplifikation von RhoB, 599 bp

MATERIAL UND METHODEN

Cdc42-left-XhoI	ACT CGA GTT CCG AAA TGC AGA CAA TTA AGT	30	Amplifikation von Cdc42, 591 bp
Cdc42-right-XbaI	ATC TAG AAG ATG CGT TCA TAG CAG CAC A	28	Amplifikation von Cdc42, 591 bp
Klf2 S	GCC TTA TCA TTG CAA CTG GG	20	Amplifikation von murinem klf2 (Taqman)
Klf2 A	CAC ACT TGT CCG GCT CTG T	19	Amplifikation von murinem klf2 (Taqman)
MU HPRT 3'	CAC AGG ACT AGA ACA CTT GC	20	Amplifikation von murinem hpert (Taqman)
MU HPRT 5'	GCT GGT GAA AAG GAC CTC T	19	Amplifikation von murinem hpert (Taqman)
RhoB-N19-forward	GGC GCG TGC GGC AAG AAC TGC CTG CTG	27	Site-directed mutagenesis von RhoB, T gegen N
RhoB-N1-reverse	CAG CAG GCA GTT CTT GCC GCA CGC GCC	27	Site-directed mutagenesis von RhoB, T gegen N
RhoA-Taqman-l	GGG TCC TTT TGA CAC TGC TC	20	Amplifikation von humanem RhoA (Taqman)
RhoA-Taqman-r	GAA TTA GCG CCT GGT GTG TC	20	Amplifikation von humanem RhoA (Taqman)
RhoB-Taqman-l	GAA CCC TCC ACC AGC TAC C	19	Amplifikation von humanem RhoB (Taqman)
RhoB-Taqman-r	CGC TTA TGG CAA AAA CAA CC	20	Amplifikation von humanem RhoB (Taqman)
RhoC-Taqman-l	CTA TGC CCT GCC CTT CCT	18	Amplifikation von humanem RhoB (Taqman)
RhoC-Taqman-r	AAG TGC TGG TGT GTG ACC AT	20	Amplifikation von humanem RhoB (Taqman)
PIP5K-Taqman-l	AGT TCA TGA GCA ACA CGG TCT	21	Amplifikation von humanem PIP5K (Taqman)
PIP5K-Taqman-r	TCT TGG AGG GCG AGG ACT	18	Amplifikation von humanem PIP5K (Taqman)
RTKN-Taqman-l	CAC ATG ACC TCA CCC TTG C	19	Amplifikation von humanem Rhotekin (Taqman)
RTKN-Taqman-r	GGC AAC ACA CGC TAC CAT AA	20	Amplifikation von humanem Rhotekin (Taqman)
RHPN1-Taqman-l	CCA CCC GTC CAC GAC TAC	18	Amplifikation von humanem Rhopilin-1 (Taqman)
RHPN1-Taqman-r	GTA CTC GGC CTT GAC ATG C	19	Amplifikation von humanem Rhopilin-1 (Taqman)
RHPN1-Taqman-14-l	CCC CCA CCT CCT CTA AGC	18	Amplifikation von humanem Rhopilin-1 (Taqman)
RHPN1-Taqman-14-r	GCT TCA GGT GTG CCT TGC	18	Amplifikation von humanem Rhopilin-1 (Taqman)
RHPN2-Taqman-l	ATC TCG GTG GGC GTC TAT C	19	Amplifikation von humanem Rhopilin-2 (Taqman)
RHPN2-Taqman-r	AAG AAG AAT CAG GGG AAT CG	20	Amplifikation von humanem Rhopilin-2 (Taqman)
KTN1-Taqman-l	TTT CAG CAA GTT CGT GAG CA	20	Amplifikation von humanem Kinectin-1 (Taqman)
KTN1-Taqman-r	ACC ATT TTC CTG CTT CAA GTG	21	Amplifikation von humanem Kinectin-1 (Taqman)
PKN1-Taqman-l	GAC CGG ACC AGC ACA TTC	18	Amplifikation von humanem PKN1 (Taqman)
PKN1-Taqman-r	GTG TCC GTC AGC ACC TCA G	19	Amplifikation von humanem PKN1 (Taqman)
VEZF1-Taqman-l	AAG ACC CTT CAA ATG CCA AA	20	Amplifikation von humanem VEZF1 (Taqman)
VEZF1-Taqman-r	TGT GTC CGC AGT CTG TCT TT	20	Amplifikation von humanem VEZF1 (Taqman)
PLD1-Taqman-l	AAT ACC AGG CTT GAA TTG CTG	21	Amplifikation von humanem PLD1 (Taqman)

MATERIAL UND METHODEN

PLD1-Taqman-r	CAT CTT TTT GAC CAT CTG TAG CA	23	Amplifikation von humanem PLD1 (Taqman)
ROK2-Taqman-l	TGA AGA AAA GAC CAA ACT TGG TAA A	25	Amplifikation von humanem ROK2 (Taqman)
ROK2-Taqman-r	AAA GAG TCC CGT TCA TCC TG	20	Amplifikation von humanem ROK2 (Taqman)
CIT-Taqman-l	TCA CCT TTA TCT GGT CAT GGA A	22	Amplifikation von humanem Citron (Taqman)
CIT-Taqman-r	CTA TTC AAA AGT GAC AGC AAG TCC	24	Amplifikation von humanem Citron (Taqman)
Klf2TM	TCT GAC GAG CTT ACC CGC CAC T	22	Murines Klf2 Fluoreszenzsonde
HPRTM	TTG GAT ACA GGC CAG ACT TTG TTG G	25	Murines hprt Fluoreszenzsonde

Primer und Sonden wurden mit Hilfe der Programme „Universal Probe Library Assay Design Center“ (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp>), „Primer Express“ (Applied Biosystems, Darmstadt, D) und „Primer3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/>) entwickelt. Fluoreszenzsonden wurden mit einem fluoreszierenden Marker (6-carboxy-fluorescein, FAM, 5') und einem Quencher-Farbstoff (6-carboxy-tetra-methylrhodamine, TAMRA, 3') markiert.

2.2.3.2 Oligonukleotide für die cDNA Synthese

Für die Synthese von cDNA wurde der Random-Hexamer Primer pd(N)₆ (Roche, Mannheim, D) verwendet.

2.3 Nährmedien und Antibiotika

2.3.1 Nährmedien

Nährmedien wurden mit H₂O_{bidest} angesetzt und anschließend bei 1 bar und 121 °C für 15 min autoklaviert.

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	Bacto-Trypton	10 g/L
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	5 g/L

LB-Agar

LB-Medium
mit 15 g/L Bacto-Agar

Brain-Heart-Infusion Medium 37 g/L
(BHI Medium)

Einfriermedium LB-Medium mit 15 % Glycerol

SOC Medium

Bacto-Trypton	20 g/L
Bacto-Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	0,5 g/L
KCl	250 mM
Glucose	20 mM

YT-Medium

Bacto-Trypton	16 g/L
Bacto-Hefeextrakt	10 g/L
NaCl	5 g/L

2.3.2 Antibiotika

Bakterienstämme wurden mit Hilfe verschiedener Antibiotika selektiert. Dazu wurden den Medien kurz vor Verwendung sterilfiltrierte (0,22 µm Sterilfilter) Antibiotikallösungen zugegeben. Die verwendeten Antibiotika und Endkonzentrationen können Tab. 2-7 entnommen werden.

Tab. 2-7: Konzentrationen und Lösungen verwendeter Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration [µg/ml]	Lösungsmittel
Ampicillin (Amp)	100	H ₂ O _{bidest}
Kanamycin (Kana)	50	H ₂ O _{bidest}
Spectinomycin (Sp)	50	H ₂ O _{bidest}
Chloramphenicol (Cm)	20	70 % Ethanol
Streptomycin (Sm)	100	H ₂ O _{bidest}

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte je nach benötigter Menge des Plasmids mit Hilfe unterschiedlicher Kits („QIAprep Spin Miniprep Kit“, „QIAfilter Plasmid Midi Kit“ oder „QIAGEN Plasmid Mega Kit“; Qiagen, Hilden, D) nach Herstellerangaben.

Die Plasmid-Präparation wurde nach dem jeweiligen Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.4.2 Agarosegelelektrophorese von DNA

Diese Methode zur Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten macht sich die negative Ladung der DNA zu Nutze, welche im Agarosegel unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes zur positiv geladenen Elektrode der Elektrophoresekammer wandert. Hierbei benötigen größere DNA-Moleküle eine längere Zeit als die kleineren, wodurch ein spezifisches Bandenmuster entsteht. Die Größenbestimmung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe eines internen Standards. Dazu wurden eine 1 kb DNA Leiter sowie eine 100 bp DNA Leiter der Firma Invitrogen (Karlsruhe, D) verwendet.

Elektrophoresepuffer (1 x TAE)	Tris/HCl	40 mM (pH 8,2)
	Eisessig	20 mM
	EDTA	2 mM
10 x Auftragspuffer	Glycerin	30 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (m/v)
	Xylencyanol FF	0,25 % (v/v)
Agarosegel	Agarose	0,8 % - 1,2 % (m/v) in 1 x TAE
Ethidiumbromid-Färbebad	1 µg Ethidiumbromid pro ml H ₂ O _{bidest}	

2.4.2.1 Analytische Gelelektrophorese

Für die DNA-Gelelektrophorese wurden je nach Größe der DNA-Fragmente Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,5 % - 1,5 % gegossen. Als Gel- und Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1 x DNA Auftragspuffer versetzt. Nach der Auftrennung bei 100 V wurde das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt und die DNA unter dem UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht und fotografiert.

2.4.2.2 Präparative Gelelektrophorese

Die präparative Gelelektrophorese erfolgte wie die analytische Gelelektrophorese (Kapitel 2.4.2.1). Die Gele wurden nur kurz im Ethidiumbromidbad gefärbt. Das gewünschte DNA Fragment wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Fragmentisolierung wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden, D) durchgeführt.

2.4.3 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgt mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierbei gilt, dass eine optische Dichte von 1 der Menge von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht (Marmur *et al.*, 1961). Um den Grad der Verunreinigung durch Proteine zu ermitteln, wurde die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Der Quotient A_{260}/A_{280} verringert sich mit zunehmender Proteinverunreinigung und sollte über 1,6 liegen.

2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.4.4.1 Allgemeine PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, um definierte DNA-Fragmente mit exponentieller Kinetik zu amplifizieren. Als Template für die Polymerase-Kettenreaktion wurde

entweder ein Bakterienzellysate oder aufgereinigte DNA verwendet. Zur Gewinnung eines Bakterienzellysates wurde eine Kolonie in 50 µl TTE Puffer (1 % TritonX-100, 20 mM Tris-HCl pH 8,5, 2 mM EDTA pH 8,0 in H₂O_{bidest}) für 10 min bei 99 °C inkubiert und anschließend abzentrifugiert. 2 µl des Überstandes wurden als Template für die PCR verwendet. Für die Amplifikationen von DNA-Fragmenten bis 2 kb wurde eine Taq-Polymerase (AmpliTaq, Roche, Mannheim, D) verwendet. Zur Amplifikation größerer Fragmente, die später kloniert wurden, wurde die Pfx-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, D) mit 3'-5' Korrekturfunktion verwendet.

Reaktionsansatz	DNA	~100 ng		
	5' Primer (20 µM)	1 µl		
	3' Primer (20 µM)	1 µl		
	dNTP-Mix (2,5 mM)	2 µl		
	10 x Reaktionspuffer	2 µl		
	Polymerase	0,5 µl		
	H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl		
Reaktionsprogramm	Anfangsdenaturierung	94 °C	5 min	
	Denaturierung	94 °C	30 sec	
	Annealing	x °C	30 sec	30 x
	Elongation	72 °C	1 min/kb	
	Finale Elongation	72 °C	7 min	

Die Annealing-Temperatur lag 2 - 4 °C unter dem Schmelzpunkt der Primerpaare.

2.4.4.2 Real-Time PCR

2.4.4.2.1 Taqman

Die quantitative Real- Time PCR (RT-PCR) wird eingesetzt, um die relativen Expressionshöhen der RNA in einer Probe zu bestimmen. RNA wird dazu in cDNA umgeschrieben und diese mit spezifischen Primern amplifiziert.

Neben dem Primerpaar befindet sich bei der Taqman RT-PCR eine fluoreszenzmarkierte Sonde im Ansatz, die zwischen den beiden Primerbindungsstellen an die zu amplifizierende DNA bindet. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (6-carboxy-fluorescein, FAM) und am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff (6-carboxy-tetra-methylrhodamine, TAMRA) markiert. Durch die räumliche Nähe des Reporterfarbstoffes zum Quencherfarbstoff wird die Fluoreszenz-Emission unterdrückt. Trifft die Taq-Polymerase bei der Amplifikation auf die Fluoreszenzsonde, wird diese durch die Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Der Fluoreszenzfarbstoff, welcher mittels eines Argon-Lasers angeregt wird, wird freigesetzt und kann Licht emittieren. Aufgrund der Spezifität der Sonde kann so die Zunahme eines PCR-Produktes während der gesamten Reaktion gemessen werden. Um Voluminaschwankungen aufgrund von Pipettierfehlern auszugleichen, enthält der für die TaqMan-PCR verwendete Reaktionspuffer einen passiven Referenzfarbstoff (ROX), der in die Analyse der Fluoreszenzwerte einbezogen wird.

Reaktionsansatz

Murine Proben:	5' Primer (3 μ M)	2 μ l
	3' Primer (3 μ M)	2 μ l
	Fluoreszenzprobe	0,25 μ l
	ROX	0,5 μ l
	H ₂ O _{bidest}	2,75 μ l
	Platinum Quantitative - PCR SuperMix-UDG	12,5 μ l
	cDNA (~30 ng/ μ l)	5 μ l

Reaktionsansatz

Humane Proben:	TaqMan Gene Expression Assay	1,25 μ l
	ROX	0,5 μ l
	Platinum Quantitative- PCR SuperMix-UDG	18,25 μ l
	cDNA (~30 ng/ μ l)	5 μ l

Die Reagenzien wurden gemischt, in eine 96-Lochplatte (Quali PCR Platten, Kisker) überführt, mit Folie (PCR-Folie Ultra Clear RT PCR, Kisker) bedeckt/verschlossen und im TaqMan System

das entsprechende PCR-Programm (50 °C/2 min; 95 °C/10 min und 40 Zyklen mit 95 °C/15 sec, 60 °C/1 min) durchgeführt. Zur Messung wurde ein ABI 7000 Sequence Detection System verwendet, ausgerüstet mit der firmeneigenen Software (ABI Prism 7000 SDS) in der Version 2.0. Die Auswertung erfolgte mittels eines Excel-Programmes (Microsoft) über die $2\Delta\text{ct}$ -Methode mit HPRT als Bezugsgen.

2.4.4.2.2 Lightcycler

Für die RT-PCR ohne interne Sonde wurde der Lightcycler verwendet. Zum PCR-Ansatz wird SYBR-Green dazugegeben, ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagert und durch Laser-Anregung bei 470 nm, die Emission bei 530 nm gemessen werden kann. Nach erfolgter Amplifikation wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, mit der die Spezifität der Amplifikation überprüft werden kann. Spezifische Amplifikationsprodukte besitzen Schmelzpunkte über 80 °C, welche als Peak in der zweiten Ableitung einer Temperatur-Fluoreszenz-Kurve detektiert werden. Nebenprodukte hingegen schmelzen deutlich unter 80 °C und zeigen keinen ausgeprägten Peak in der zweiten Ableitung.

Reaktionsansatz	5' Primer (20 µM)	0,25 µl
	3' Primer (20 µM)	0,25 µl
	MgCl ₂ (25 mM)	0,8 µl
	H ₂ O _{bidest}	6,7 µl
	LightCycler FastStart-	1 µl
	DNA Master SYBR Green I	
	cDNA (10 ng/µl)	1 µl

Die Proben wurden für den Lightcycler in spezielle Glaskapillaren pipettiert. Der Ansatz wurde zunächst für 10 min auf 95 °C erhitzt, um die Polymerase zu aktivieren, gefolgt von der Amplifikation (60 °C, 5 sec), abschließender Extension (2 min bei 72 °C) und Kühlung (1 min bei 40 °C). Die Auswertung erfolgte wie oben beschrieben mittels Excel (Microsoft).

2.4.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 50 µl H₂O von der Ionenaustauschsäule eluiert.

2.4.6 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind in der Lage, bestimmte DNA-Abschnitte zu erkennen und diese spezifisch zu schneiden. Je nach Enzym wurden 1-5 U/µg DNA eingesetzt. Der Verdau wurde bei den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen im entsprechenden Puffer durchgeführt.

Restriktionsansatz	DNA-Lösung	x µl
	Restriktionsenzym	1-5 U/µg DNA
	10 x Puffer	2 µl
	H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

2.4.7 Dephosphorylierung von DNA

Um die Selbstligation von Vektoren nach der Restriktion zu minimieren, wurden diese direkt nach der Restriktionsspaltung mit dem Enzym calf intestinal alkaline phosphatase (CIP) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben behandelt.

2.4.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit glatten bzw. überhängenden Enden erfolgte mit der „T4 DNA Ligase“ (Roche, Mannheim, D), nach Herstellerprotokoll. Ligationen wurden in einem Volumen von 50 µl (davon 5 µl 10 x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl)) durchgeführt. Um die intramolekulare bzw. intermolekulare Ligation des Vektors zu vermeiden,

wurde die Donor-DNA in etwa 3-fachem Überschuss eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte bei 14 °C für 12 h.

2.4.9 Phenol/Chloroform-Extraktion

Der DNA enthaltende Ansatz wurde mit 300 µl H₂O_{bidest} aufgefüllt und mit derselben Menge Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol gut gemischt. Die Phasen wurden durch einminütige Zentrifugation bei 14000 U/min getrennt, die wässrige Phase abgenommen und mit 300 µl Chloroform gemischt. Nach erneuter Phasentrennung wurde die wässrige Phase abgenommen und wie im nächsten Schritt beschrieben, die DNA gefällt.

2.4.10 Fällung von DNA

Zur Fällung aus wässrigen Lösungen wurden der DNA 0,1 Volumen 3M Na-Acetat (pH 4,8), 0,8 Volumen Isopropanol und 1 µg *Escherichia coli* tRNA zugegeben, im Vortexer gemischt und für 30 min bei – 80 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 14000 U/min und 4 °C für 30 min wurde der Überstand dekantiert und das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen. Die Lösung wurde abermals bei 14000 U/min für 10 min zentrifugiert und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge oder an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in H₂O_{bidest} aufgenommen und bei – 20 °C gelagert.

2.4.11 Transformation von DNA mittels Elektroporation

Für die Elektroporation wurde ein Aliquot kompetenter Zellen mit 5 µl Plasmid-DNA-Lösung gemischt und in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette bei 1,8 kV, 25 µF und 200 Ω transformiert. Die Mischung wurde in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und eine Stunde bei entsprechender Temperatur (27 °C für *Yersinia*, 37 °C für *E. coli*) inkubiert. Die Selektion der Bakterien erfolgte durch Anzucht auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum.

2.4.12 Transformation von DNA mittels Hitzetransformation

Zur Transformation von DNA wurden 10 - 200 ng Plasmid-DNA zu 200 µl kompetenten Zellen gegeben und der Ansatz für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 2 min, danach wurden die Zellen 5 Minuten auf Eis gelagert, bevor 800 µl LB-Medium zugegeben wurde und die Zellen für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt wurden. Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4.13 Sequenzspezifische Mutagenese

Mit Hilfe der sequenzspezifischen Mutagenese kann gezielt eine Mutation in einem gewünschten Gen eingeführt werden. Die Sequenzänderung wurde im dsDNA Vektor durch eine PCR mit zwei zueinander komplementären Primern, die den gewünschten Basenaustausch enthalten, durchgeführt. Der Einbau der Primer resultierte in einem mutiertem Plasmid mit versetzten Bruchstellen. Das DNA-Template wurde mit Dpn1, einer Endonuklease (Zielsequenz: 5'-Gm6ATC-3'), die spezifisch methylierte DNA schneidet, verdaut. Dadurch blieb nur mutierte, zirkuläre dsDNA übrig, die in kompetente *E. coli* Zellen transformiert wurde.

2.4.14 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen wurde zunächst das Zellkulturmedium abgesaugt, 3×10^6 Zellen in 1 ml Trizol gelöst und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Pro 1 ml Trizol wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben, kräftig geschüttelt und für weitere 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation (12000 U/min, 4 °C) wurde die klare obere Phase vorsichtig abpipettiert und die RNA mit 1,5 ml eiskaltem Isopropanol versetzt. Danach wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit die RNA präzipitiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (14000 U/min, 4 °C, 30 min) wurden überschüssige Salze durch Waschen mit Ethanol 70 % entfernt. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur wurde das RNA Sediment in DEPC-H₂O aufgelöst. Die Konzentration wurde photometrisch

bestimmt und die Qualität der RNA auf einem Agarosegel kontrolliert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

2.4.15 Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte durch photometrische Messung einer Probe bei 260 nm in einer Quarzglas Präzisionsküvette. Dabei entspricht eine Absorption von 1 der Konzentration von 40 µg/ml RNA. Für die Reinheitsbestimmung der RNA wurde zusätzlich noch die OD bei 280 nm gemessen. Der Quotient A_{260}/A_{280} verringert sich mit zunehmender Proteinverunreinigung und sollte über 1,6 liegen.

2.4.16 Agarosegelelektrophorese von RNA

Zur Qualitätskontrolle wurde 1 µg RNA in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurde 0,5 g Agarose in 42,5 ml Wasser aufgeköcht und nach dem Abkühlen 2,5 ml Formaldehyd (37 %) und 5 ml 10 x MOPS hinzugegeben

10 x MOPS	MOPS	0,2 M (pH 7,0)
	Natriumacetat	80 mM
	EDTA	10 mM (pH 8,0)
10 x RNA-Ladepuffer	Glycerol	50 % (v/v) in DEPC-H ₂ O
	EDTA	10 mM (pH 8,0)
	Bromphenolblau	0,25 % (m/v)
	Xylenolcyanol FF	0,25 % (m/v)
Probenzubereitung	Formamid	5 µl
	Formaldehyd	2 µl
	5 x MOPS	2 µl
	DEPC-H ₂ O	1 µl
	RNA (1 µg/µl)	1 µl

Der Ansatz wurde gemischt und für 10 min auf 70 °C erhitzt, anschließend 5 min auf Eis gekühlt und vor dem Auftragen mit 1 µl 10 x Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x MOPS-Puffer bei 100 V für 40 min.

2.4.17 Erststrang cDNA Synthese für RT-PCR

Bei der cDNA Synthese werden durch das Enzym Reverse Transkriptase komplementäre DNA Kopien aus der isolierten RNA synthetisiert. In einem 10 µl Ansatz wurden 5-20 µg RNA eingesetzt und mit 1 µl Random Hexamer Primer für 10 min bei 70 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion 1-2 min auf Eis gekühlt und schließlich 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden 4 µl First strand buffer (Promega, Mannheim, D), 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP und 0,5 µl RNase Inhibitor gegeben, gut durchmischt und 2 min bei 42 °C inkubiert. Dann wurde jeweils 1 µl Reverse Transkriptase (M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus, Promega, Mannheim, D) zugefügt und die Ansätze für 1 h bei 42 °C inkubiert.

2.4.18 Zweitstrang cDNA Synthese, *in vitro* Transkription und Markierung der cRNA für die Analyse auf MOE430A Mikroarrays

Für die Analyse der Proben auf MOE430A Mikroarrays wurde zusätzlich zur Erststrang cDNA Synthese (Kapitel 2.4.17) eine Zweitstrangsynthese durchgeführt. Hierzu wurden die Proben mit dem one-cycle cDNA Synthesis Kits der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) entsprechend der Angaben des Herstellers weiterverarbeitet. Die *in vitro*-Transkription der cDNA und die Biotin-Markierung der cRNA erfolgte mit dem GeneChip Expression 3'-Amplification Kit (Affymetrix, Santa Clara, USA) nach Herstellerangaben. Die Biotin-markierte cRNA wurde danach mit dem GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix, Santa Clara, USA) aufgereinigt und zweimal mit 30 µl DEPC-H₂O eluiert. Die Qualität der cRNA wurde durch RNA-Gelelektrophorese kontrolliert und die Menge über die Messung der optischen Dichte bestimmt. Vor der Hybridisierung auf Mikroarrays (Affymetrix, Santa Clara, USA) wurde die cRNA fragmentiert. Hierzu wurden 15 µg cRNA mit 8 µl 5 x Fragmentierungspuffer gemischt und mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 40 µl eingestellt. Die Probe wurde schließlich für 35 min bei 95 °C in einem

Thermocycler mit beheizbarem Deckel inkubiert. Bis zum Auftragen auf den Array, wurde die fragmentierte cRNA in Hybridisierungscocktail bei -80 °C gelagert.

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Anzucht und Stammhaltung von Bakterien

Die Stämme wurden 12-16 Stunden im entsprechenden Medium angezüchtet, Flüssigkulturen wurden bei 160 U/min geschüttelt. Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurden die Kulturen bei 4000 U/min für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal mit sterilem PBS gewaschen, in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, aliquotiert und bei - 80 °C gelagert.

E. coli Inkubation bei 37 °C in LB-Medium

Y. enterocolitica Inkubation bei 27 °C in LB-Medium / BHI-Medium

PBS	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	2 mM
	pH 7,4	

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen

Die optische Dichte von Bakterienkulturen wurde in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) gegen das entsprechende Leermedium gemessen. 1 ml einer Bakteriensuspension mit einer OD₆₀₀ von 0,5 enthält ca. 1,5 x 10⁸ Bakterien. Für Infektionsversuche wurde eine MOI von 50:1 verwendet.

2.5.3 Herstellung elektrokompeter Zellen

Für die Herstellung elektrokompeter Bakterien wurden die *E. coli* Stämme DH10B und DH5 α verwendet. Eine in LB-Medium angezogene Übernachtskultur wurde 1:100 in YT-Medium verdünnt und bei 37 °C inkubiert. In der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6) wurde die Bakteriensuspension für 15-20 min auf Eis gekühlt, anschließend für 10 min bei 4000 U/min 4 °C zentrifugiert und zweimal mit H₂O_{bidest} gewaschen. Es folgen zwei weitere Waschschrirte mit 10 % Glycerin/H₂O_{bidest}. Die so präparierten Bakterien wurden in 10 % Glycerin/H₂O_{bidest} resuspendiert, als 50 μ l Aliquots schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.5.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurden 50 ml SOC-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur der *E. coli*-Stämme DH10B bzw. DH5 α beimpft und für 1 h bei 37 °C inkubiert. 25 ml des Ansatzes wurden in 500 ml LB-Medium gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4000 U/min und 4 °C abzentrifugiert. Im Folgenden wurde stets zügig und auf Eis gearbeitet. Das Pellet wurde in 4 ml TfbI resuspendiert und schließlich weitere 16 ml TfbI zugegeben. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 15 min und Zentrifugation für 5 min bei 2000 U/min, wurden die Bakterien in 16 ml gekühltem TfbII resuspendiert.

Die Bakteriensuspension wurde zu je 200 μ l in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

TfbI	Kaliumacetat	10 mM
	RbCl	100 mM
	MnCl ₂	50 mM
	CaCl ₂	10 mM
	15 % Glycerin	
	H ₂ O _{bidest}	ad 500 ml

TfbII	MOPS pH 8,0	10 mM
	RbCl	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	15 % Glycerin	
	H ₂ O _{bidest}	ad 100 ml

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Verwendete Zelllinien und Kulturbedingungen

Tab. 2-8: Humane und murine Zelllinien und deren Herkunft

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft	Medium
AGS	Humane Magenadenokarzinom Zelllinie	ATCC CRL-1739	D-MEM
J774A.1	Murine Makrophagen Zelllinie (Balb/c Hintergrund)	ATCC TIB-67	RPMI 1640
HeLa	Humane Zervixadenokarzinom Zelllinie	ATCC CCL-2	D-MEM
P388D1	Murine Makrophagen Zelllinie (DBA/2 Hintergrund)	ATCC CCL 46	D-MEM
RAW 264.7	Murine Makrophagen Zelllinie (Balb/c Hintergrund)	ATCC TIB-71	D-MEM
X63-GMCSF	Plasmozytom X63-Ag8-653 mit GM-CSF transfiziert	(Karasuyama und Melchers, 1988)	D-MEM
L929	Murine Fibroblasten, M-CSF sekretierend	(Sanford <i>et al.</i> , 1948)	RPMI 1640
293FT	Abgeleitet von der Zelllinie 293, exprimiert das SV40-T-Antigen sowie das Neomycinresistenzgen unter Kontrolle des CMV-Promotors und der SV40-Polyadenylierungssequenz	Invitrogen (Karlsruhe, D)	D-MEM
HEK293	Humane embryonale Nierenzelllinie	(Graham <i>et al.</i> , 1977)	D-MEM

Die Zellen wurden in 90 % D-MEM bzw. RPMI 1640 (Tab. 2-8) mit 10 % FBS, 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin in Kultur gehalten. Zum Einfrieren wurden die Zellen in 90 % FBS mit 10 % DMSO suspendiert, langsam (15 °C/min) auf -80 °C gekühlt und schließlich in Flüssigstickstoff gelagert. Zum Auftauen von Zelllinien werden die Zellen im Wasserbad auf 37 °C gebracht, dann langsam mit Zellkulturmedium verdünnt, pelletiert, in frischem Medium resuspendiert und in Kultur genommen.

2.6.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer und Färbung mit Trypanblau, welches tote Zellen anfärbt. 20 µl einer Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypanblau-Lösung (0,5 % (m/v) Trypanblau in 0,85 % (m/v) NaCl-Lösung) gemischt. Davon wurden 10 µl in die Zählkammer pipettiert und die Anzahl der Zellen in zwei großen Quadraten (entspricht 2 x 16 kleinen Quadraten) bestimmt. Die Zellkonzentration wurde folgendermaßen errechnet:

$$\text{Anzahl Zellen/ml} = \text{ausgezählte Zellzahl} \times 10^4$$

2.6.3 Transfektion von Zellen

2.6.3.1 Transfektion mit FuGene (Roche)

Am Tag vor der Transfektion wurden pro 6-well 2×10^5 Zellen angesetzt. Die Verdünnung der DNA erfolgte in OPTIMEM Medium (Invitrogen, Karlsruhe, D), der weitere Verlauf der Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurde 48 h nach der Transfektion Selektionsmedium zugegeben (1 µg/ml G418, 400 µg/ml HygromycinB oder 10 µg/ml Blasticidin).

2.6.3.2 Calcium Phosphat Transfektion

Am Tag vor der Transfektion wurden pro 6-well 2×10^5 Zellen angesetzt. Eine Stunde vor Transfektion wurde das Medium gewechselt. 100 µl 2,5 M CaCl₂ wurden in einem 15 ml Gefäß mit 25 µg DNA gemischt, mit einem Volumen HEPES versetzt und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. 200 µl der Mischung wurden zu den Zellen gegeben und weiter im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach vier Stunden wurde das Medium entfernt und frisches vorgewärmtes Medium zugeben.

2.6.3.3 Transfektion mit ExGen 500 (Fermentas)

Die Transfektion von Zellen mit ExGen 500 erfolgte nach Angaben des Herstellers. Pro 6-well wurden am Tag vor der Transfektion $1,5 \times 10^5$ Zellen angesetzt und diese mit 3 μg DNA transfiziert.

2.6.4 Herstellung von GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor)-haltigem Zellkulturüberstand

Für die Ausdifferenzierung von dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark, wurden die Zellen mit GM-CSF stimuliert. Dafür wurden X63-GMCSF-Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale in Kultur genommen und nach 2 Tagen auf 5 große Zellkulturflaschen (225 cm^2) aufgeteilt. Nach dem Absterben aller Zellen (etwa 10 Tage), wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand durch eine 0,2 μM Sterilfiltermembran filtriert. Das Filtrat wurde in 50 ml Aliquots bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Zur Ausdifferenzierung der dendritischen Zellen wurde RPMI mit 5 % Überstand frisch angesetzt.

2.6.5 Ausdifferenzierung von murinem Knochenmark zu dendritischen Zellen (DCs)

Die Gewinnung von dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark erfolgte wie bei (Lutz *et al.*, 1999). Die Knochenmarkszellen wurden in modifiziertem RPMI mit 10 % FCS, 5 % GM-CSF, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin und 50 μM β -Mercaptoethanol angezüchtet. 2×10^6 Knochenmarkszellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und in eine bakteriologische Petrischale überführt, in der sie bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert wurden. Drei Tage nach der Knochenmarksentnahme wurden 10 ml frisches angereichertes Medium ergänzt. An Tag 6 und 8 nach der Isolation wurden jeweils 10 ml des Kulturüberstandes abzentrifugiert, das Zellpellet in frisch angereichertem Medium resuspendiert und zurück in die Petrischale zu der adhärenen Fraktion gegeben. Am zehnten Tag nach der Knochenmarksisolation sind ca. 50 % unreife (MHC-II niedrigpositiv) und ca. 25 % reife (MHC-II hochpositiv) dendritische Zellen zu detektieren.

2.6.6 Herstellung von M-CSF-haltigem Zellkulturüberstand

Für die Ausdifferenzierung von murinen Knochenmarkszellen zu Makrophagen wurden die Zellen mit M-CSF stimuliert. Dafür wurden L929 Zellen in Kultur genommen, nach 3 Tagen auf 5 Zellkulturschalen (10 cm) und nach weiteren 3 Tagen auf 10 Zellkulturschalen ausgeweitet. Nachdem die Zellen zu 50 % konfluent waren, wurde alle zwei Tage der Überstand gesammelt und frisches Medium auf die Zellen gegeben, bis sich die Zellen vom Boden ablösten. Der gesammelte Überstand wurde durch eine 0,2 µM Sterilfiltermembran filtriert und in Aliquots zu 50 ml bei -20 °C eingefroren.

2.6.7 Ausdifferenzierung von murinem Knochenmark zu Makrophagen

Die aus den Knochen gewonnenen Zellsuspensionen wurden bei 1200 U/min und 4 °C 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Zellkulturmedium mit 10 % M-CSF aufgenommen, ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Am nächsten Tag wurden nicht-adhärente Zellen abgespült, ausgezählt und 10⁶ Zellen pro 6-well-Zellkulturschalen ausgesät. An Tag 5 wurde ein Volumen frisches angereichertes Medium zu den Zellen gegeben. An Tag 8 waren die Zellen zu Makrophagen ausdifferenziert.

2.6.8 Infektion von Zellen

Für Infektionsversuche wurden die Zellen in 6-well-Zellkulturschalen (3 ml Medium pro well) subkultiviert. Vor Infektion der Zellen wurde das Medium abgenommen, mit PBS gewaschen und gegen antibiotikafreies Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden mit einer MOI (*multiplicity of infection* = Verhältnis Anzahl Bakterien zu Anzahl eukaryontischer Zelle) von 50 infiziert.

2.6.9 Färbung des Aktinzytoskeletts

Zur Untersuchung des Aktinzytoskeletts wurde das Phallotoxin Phalloidin verwendet, welches spezifisch F-Aktin anfärbt. Hierzu wurden die Zellen auf Deckgläsern kultiviert und 10 min mit 3,7 %-igem Formaldehyd in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Die Lyse der Zellen erfolgt durch eine dreiminütige Inkubation in Aceton bei -20 °C. Nach einem Waschschrift (5 min mit PBS) erfolgt die Färbung der Zellen mit FITC-markiertem Phalloidin für 30 min. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit PBS wurden die Deckgläser in Fluoroguard (Biorad) eingebettet und mit Nagellack versiegelt.

2.7 RNA Interferenz (RNAi)

Unter RNA-Interferenz (RNAi, auch RNA-silencing) versteht man einen Vorgang, bei welchem die Expression einzelner Zielgene durch *short interfering* RNA (siRNA) gehemmt wird. Durch das Einbringen von dsRNA in die Zelle kann so prinzipiell jedes beliebige Transkript gezielt herunterreguliert werden. Der Mechanismus der RNAi wurde erstmals in Pilzen und Pflanzen entdeckt und spielt wahrscheinlich als Abwehrsystem gegen RNA-Viren und Transposons eine Rolle. Die dsRNA wird in der Zelle durch die Dicer-Ribonuclease in viele kleine 19-24 nt lange Fragmente zerschnitten. Diese siRNA-Fragmente werden dann in einem Enzymkomplex (RISC: RNA-induced silencing complex) aufgenommen, der die komplementäre mRNA bindet und degradiert.

2.7.1 Herstellung eines lentiviralen shRNA Expressionsvektors

Die *short hairpin* RNA (shRNA) ist eine kurze RNA Sequenz, die *sense* und *antisense* Sequenzen des Zielgens enthalten, verbunden durch ein 4 nt langes Zwischenstück (*hairpin loop*). shRNA Sequenzen können von einem Vektor aus transkribiert werden, der einen Polymerase III Promotor enthält. Der U6 Promotor ist für die Expression von shRNA Molekülen geeignet, da er eine starke konstitutive Aktivität aufweist und in den meisten Zelltypen aktiv ist. Wie in Abb. 2-1 dargestellt, bildet das entstehende Transkript eine kurze Haarnadelstruktur aus, wird vom Kern ins Zytoplasma transportiert und dort vom Dicer zur funktionstüchtigen siRNA prozessiert.

Die Herstellung der shRNA Expressionsvektoren erfolgte mit Hilfe des BLOCK-iT™ U6 RNAi Entry Vector Kits und des BLOCK-iT™ Lentiviral RNAi Expression Systems der Firma Invitrogen (Karlsruhe, D). Folgende Schritte wurden durchgeführt: Klonierung der shRNA in den Entry-Vektor, Klonierung der shRNA Expressionskassette in einen lentiviralen Destinationsvektor, Herstellung Lentivirus-haltigen Überstandes und Transduktion der Zielzellen.

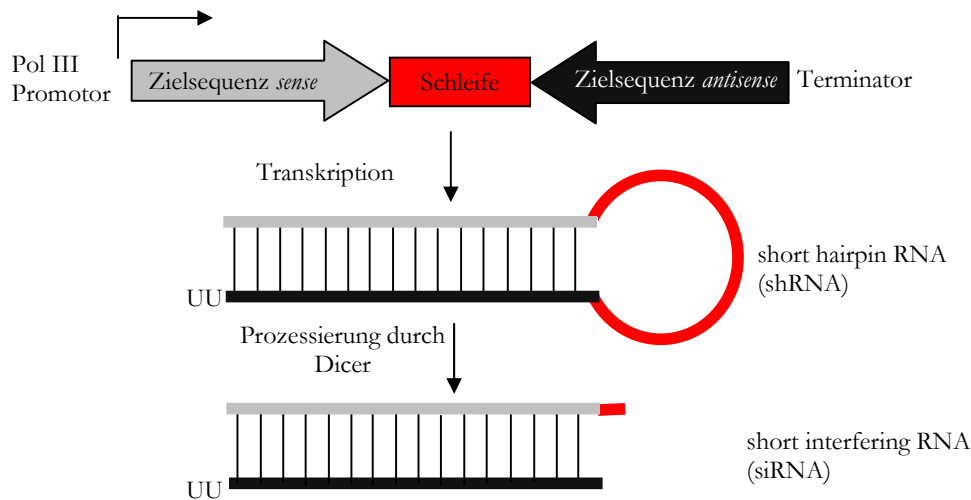


Abb. 2-1: Prozessierung der shRNA in funktionsfähige siRNA. Nach der Transkription durch den Polymerase III Promotor bildet das Konstrukt als Haarnadelstruktur eine dsRNA, welche dem Enzym Dicer als Substrat dient und zu siRNA Molekülen prozessiert wird.

2.7.2 Hybridisierung der Oligonukleotide und Klonierung in pENTR/U6

Die shRNA Oligonukleotide wurden mit Hilfe des RNAi-Designers der Firma Invitrogen entwickelt und synthetisiert („BLOCK-iT™ RNAi Designer“: <https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress>). Die Hybridisierung der Oligonukleotidpaare und die Klonierung in den Entry-Vektor pENTR/U6 erfolgte nach Angaben des Herstellers (BLOCK-iT™ U6 RNAi Entry Vector Kit; Invitrogen, Karlsruhe, D). Nach der Transformation in *E. coli* wurden positive Klone auf LB-Agarplatten mit Kanamycin selektiert. Aus 5-10 Kolonien pro Ansatz wurde die Plasmid DNA isoliert und durch Sequenzierung (AGOWA, Berlin) überprüft.

MATERIAL UND METHODEN

Tab. 2-9: Oligonukleotide für die Herstellung von shRNA Konstrukten

Zielgen	Start	Sequenz
RhoA	687 top	CAC CGC CGG TGA AAC CTG AAG AAG GCG AAC CTT CTT CAG GTT TCA CCG GC
	687 bottom	AAA AGC CGG TGA AAC CTG AAG AAG GTT CGC CTT CTT CAG GTT TCA CCG GC
RhoB	775 top	CAC CGC ACA GAG CTG GCC CGC ATG ACG AAT CAT GCG GGC CAG CTC TGT GC
	775 bottom	AAA AGC ACA GAG CTG GCC CGC ATG ATT CGT CAT GCG GGC CAG CTC TGT GC
	800 top	CAC CGG AAC CCG TGC GCA CGG ATG ACG AAT CAT CCG TGC GCA CGG GTT CC
	800 bottom	AAA AGG AAC CCG TGC GCA CGG ATG ATT CGT CAT CCG TGC GCA CGG GTT CC
	841 top	CAC CGC ATC CAA GCC TAC GAC TAC CCG AAG GTA GTC GTA GGC TTG GAT GC
	841 bottom	AAA AGC ATC CAA GCC TAC GAC TAC CTT CGG GTA GTC GTA GGC TTG GAT GC
RhoC	603 top	CAC CGC CTC CAG GTC CGC AAG AAC ACG AAT GTT CTT GCG GAC CTG GAG GC
	603 bottom	AAA AGC CTC CAG GTC CGC AAG AAC ATT CGT GTT CTT GCG GAC CTG GAG GC
ROCK1	1998 top	CAC CGC ACC AGT TGT ACC CGA TTT ACG AAT AAA TCG GGT ACA ACT GGT GC
	1998 bottom	AAA AGC ACC AGT TGT ACC CGA TTT ATT CGT AAA TCG GGT ACA ACT GGT GC
ROCK2	2228 top	CAC CGC AGC TGG AAT CTA ACA ATA GCG AAC TAT TGT TAG ATT CCA GCT GC
	2228 bottom	AAA AGC AGC TGG AAT CTA ACA ATA GTT CGC TAT TGT TAG ATT CCA GCT GC
DIAPH1	1150 top	CAC CGC ATG GAG ATG GAT GAC TTT ACG AAT AAA GTC ATC CAT CTC CAT GC
	1150 bottom	AAA AGC ATG GAG ATG GAT GAC TTT ATT CGT AAA GTC ATC CAT CTC CAT GC
PKN1	681 top	CAC CGG ACA GTA AGA CCA AGA TTG ACG AAT CAA TCT TGG TCT TAC TGT CC
	681 bottom	AAA AGG ACA GTA AGA CCA AGA TTG ATT CGT CAA TCT TGG TCT TAC TGT CC
PKN2	1033 top	CAC CGC AGT AGC AGA AGG TGC AAA GCG AAC TTT GCA CCT TCT GCT ACT GC
	1033 bottom	AAA AGC AGT AGC AGA AGG TGC AAA GTT CGC TTT GCA CCT TCT GCT ACT GC
RTKN	497 top	CAC CGG ATT CCA CTC ATG TGG AAG GCG AAC CTT CCA CAT GAG TGG AAT CC
	497 bottom	AAA AGG ATT CCA CTC ATG TGG AAG GTT CGC CTT CCA CAT GAG TGG AAT CC
RHPN1	384 top	CAC CGC TGA TCT CAG TGC ACT TTG GCG AAC CAA AGT GCA CTG AGA TCA GC
	384 bottom	AAA AGC TGA TCT CAG TGC ACT TTG GTT CGC CAA AGT GCA CTG AGA TCA GC
RHPN2	131 top	CAC CGC CGG AGT AAA TTG CAG AAT CCG AAG ATT CTG CAA TTT ACT CCG GC
	131 bottom	AAA AGC CGG AGT AAA TTG CAG AAT CTT CGG ATT CTG CAA TTT ACT CCG GC
	95 Top	CAC CGC CGG AGT AAA TTG CAG AAT CCG AAG ATT CTG CAA TTT ACT CCG GC
	95 bottom	AAA AGC CGG AGT AAA TTG CAG AAT CTT CGG ATT CTG CAA TTT ACT CCG GC
KTN1	1390 top	CAC CGC AGA TGA AGT TTC AGC AAG TCG AAA CTT GCT GAA ACT TCA TCT GC
	1390 bottom	AAA AGC AGA TGA AGT TTC AGC AAG TTT CGA CTT GCT GAA ACT TCA TCT G
CIT	685 top	CAC CGC GTT CAT CTG ATG GGA TAC GCG AAC GTA TCC CAT CAG ATG AAC GC
	685 bottom	AAA AGC GTT CAT CTG ATG GGA TAC GTT CGC GTA TCC CAT CAG ATG AAC GC
M-RIP	82 top	CAC CGC AGG AAA TTC CAG GCC AAC ACG AAT GTT GGC CTG GAA TTT CCT GC
	82 bottom	AAA AGC AGG AAA TTC CAG GCC AAC ATT CGT GTT GGC CTG GAA TTT CCT GC
PRKCE	200 top	CAC CGG TAG TGT TCA ATG GCC TTC TCG AAA GAA GGC CAT TGA ACA CTA CC
	200 bottom	AAA AGG TAG TGT TCA ATG GCC TTC TTT CGA GAA GGC CAT TGA ACA CTA CC
VEZF1	303 top	CAC CGG TGC ACC AGA AAC ATT AAA GCG AAC TTT AAT GTT TCT GGT GCA CC
	303 bottom	AAA AGG TGC ACC AGA AAC ATT AAA GTT CGC TTT AAT GTT TCT GGT GCA CC
PIP5KC	209 top	CAC CGC CCT GGC CAT GGG AAG AAG TCG AAA CTT CTT CCC ATG GCC AGG GC
	209 bottom	AAA AGC CCT GGC CAT GGG AAG AAG TTT CGA CTT CTT CCC ATG GCC AGG GC
PLD1	2349 top	CAC CGC AGG CAC TAT ATC TAT ATC GCG AAC GAT ATA GAT ATA GTG CCT GC
	2349 bottom	AAA AGC AGG CAC TAT ATC TAT ATC GTT CGC GAT ATA GAT ATA GTG CCT GC

2.7.3 Klonierung der shRNA Expressionskassette in den lentiviralen Vektor

Zur Herstellung des lentiviralen Vektors wurde die shRNA-Expressionskassette in den pLENTI6/BLOCK-iT™ Destinationsvektor nach Herstellerangaben kloniert (BLOCK-iT™ Lentiviral RNAi Gateway Vector Kit, Invitrogen). Dieses System verwendet die *Gateway*® Technologie, welche auf der sequenzspezifischen Rekombination durch eine Rekombinase des Bakteriophagen λ basiert. Hierbei rekombinieren die zwei *attL* Stellen des Entry-Klones mit den *attR* Stellen des Destinationsvektors. Durch die Rekombination gehen das *ccdB*-Gen und das Chloramphenicol-Resistenzgen (*CmR*) des Destinationsvektors verloren (Abb. 2-2).

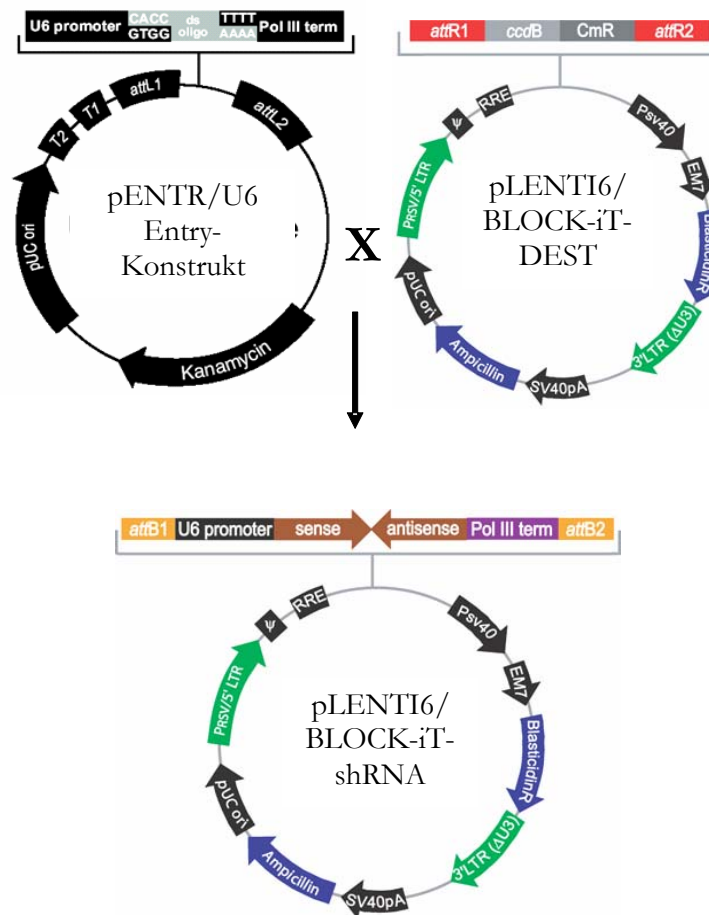


Abb. 2-2: Schematische Übersicht über die Konstruktion des lentiviralen shRNA-Expressionsvektors (entnommen von www.invitrogen.com). Mit Hilfe der Gateway Technologie wird über Rekombination die Expressionskassette aus dem Entry-Vektor in den Destinationsvektor inseriert.

Das so genannte Suizid-Gen *ccdB* kodiert für einen DNA-Gyrase Inhibitor, wodurch das Wachstum der *E. coli* Stämme verhindert wird und dadurch eine Selektion positiver Klone möglich ist (Bernard *et al.*, 1993). Der Destinationsvektor besitzt außerdem ein Ampicillin-Resistenzgen und ein Blasticidin-Resistenzgen für die spätere Selektion in eukaryontischen Zellen. Nach Transformation des shRNA Expressionsplasmids in den *E. coli* Stamm DH5 α , erfolgte daher die Selektion positiver Klone auf LB-Agarplatten mit Ampicillin. Zur Kontrolle der Insertion der shRNA Expressionskassette wurden die Plasmide mit EcoRV verdaut. Beim Destinationsvektor entstehen zwei Fragmente von 6402 bp und 2272 bp Länge. In den shRNA-kodierenden Vektoren hingegen haben diese Fragmente eine Größe von 6402 bp und 414 bp.

2.7.4 Produktion des lentiviralen Überstandes

Die Expressionskonstrukte wurden zusammen mit dem ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen) zur Virusproduktion in die Zelllinie 293FT transfiziert. Der ViraPower™ Mix enthält drei so genannte *packaging* Plasmide (pLP1, pLP2 und pLP/VSVG), die für die Verpackung der Lentiviren benötigt werden. 6×10^6 293FT Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale wurden mit Hilfe des FuGene-Reagenz (Roche, Mannheim, D) mit 6 μ g des lentiviralen Vektors und dem ViraPower™ Mix kotransfiziert. Nach 16 h wurde das Medium gewechselt. Nach 4 Tagen wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und sterilfiltriert. Der virale Überstand wurde entweder direkt zur Transduktion der Zielzellen weiterverwendet oder in 2 ml Aliquots bei -80 °C eingefroren.

2.7.5 Transduktion der lentiviralen Vektoren in Zielzellen

Die Zielzellen wurden am Tag vor der Transduktion in einer Dichte von 2×10^6 pro 6-well-Schale ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und der Virusüberstand in verschiedenen Verdünnungen mit Zellkulturmedium zu den Zellen gegeben. Zur Kontrolle der Transduktionseffizienz wurden auch Zellen mit einem GFP-exprimierenden Vektor transduziert und die Fluoreszenz 48 h nach der Transduktion im Fluoreszenzmikroskop überprüft. 48 h nach der Transduktion wurden das Medium gegen Blasticidinhaltiges Zellkulturmedium ausgetauscht und stabile Zellen über 10 Tage selektiert.

2.8 Tierexperimentelle Methoden

2.8.1 Verwendete Mausstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse (Tab. 2-10:) wurden entweder in der lokalen Tierhaltung des Max-von-Pettenkofer Institutes gezüchtet oder von Charles River Laboratories, Bad Königshofen, bezogen. Die Mäuse wurden unter SPF- (spezifisch-pathogenfreien) Bedingungen gehalten.

Tab. 2-10: Mausstämme

Name	Ursprünglicher Inzuchtstamm	Kommentar	Referenz
C57BL/6	C57; (Little und Bagg, 1924)	Schwarze Fellfarbe <i>H-2^b</i> Haplotyp, Bcg/Tty/Lshs Phänotyp	(Rikke <i>et al.</i> , 1995)
Balb/c	Balb (Bagg Albino); Bagg, 1913; Snell, 1932	Albino <i>H-2^d</i> Haplotyp, Bcg/Tty/Lshs Phänotyp	(Potter, 1985)

Detaillierte Informationen über die einzelnen Inzuchtstämme sind auf der Internetseite der Jackson Laboratorys, USA aufgeführt (<http://www.informatics.jax.org>).

2.8.2 Isolierung von Knochenmark

Zur Präparation von Stammzellen aus dem Knochenmark wurden die Tiere der verschiedenen Mausstämme im Alter von 4 - 6 Wochen verwendet. Die Tötung der Mäuse erfolgte durch Begasung mit CO₂. Die Femure der beiden Hinterbeine wurden entnommen und von Muskel- und Bindegewebe befreit. Die Knochen wurden beidseits geöffnet, mittels einer 27G-Kanüle kaltes RPMI-Medium durch die Knochen gespült und die darin enthaltenen Knochenmarkszellen in einem 50 ml Gefäß aufgefangen.

2.8.3 Präparation der Milz und Gewinnung von Zellsuspensionen

Zur Entnahme der Milz wurden die Versuchstiere durch Begasung mit CO₂ getötet, das Organ unter sterilen Bedingungen entnommen und in PBS aufgenommen. Die Milz wurde zur

Gewinnung von Einzelzellsuspensionen mit Medium in eine Petrischale überführt und mit dem Stempel einer 5 ml Spritze durch einen Nylonfilter (Porengröße 100 µm) gerieben. Diese Suspension wurde in ein 15 ml Gefäß überführt und bei 1200 U/min 5 min bei Raumtemperatur pelletiert. Die Zellen wurden nochmals mit PBS gewaschen und schließlich in 100 µl PBS aufgenommen. Diese Suspension wurde zur Färbung mit Antikörpern verwendet.

2.8.4 Intravenöse (*i.v.*) Infektion

Definierte Zellzahlen von *Yersinia enterocolitica* wurden in 1 x PBS aufgenommen. Die Mäuse wurden für einige Minuten mit Rotlicht bestrahlt, um die Durchblutung der Schwanzvenen zu verstärken und dann in einer PVC-Röhre so fixiert, dass ihr Schwanz zugänglich blieb. 5 - 10 x 10² Zellen in 200 µl PBS wurden in die Schwanzvene injiziert.

2.9 Proteinbiochemische Methoden

2.9.1 Isolierung sekretierter YOPs aus dem Kulturüberstand

Zunächst wurde eine Yersinien-Kultur in BHI-Medium bei 27 °C für 16 h geschüttelt, 1:40 mit BHI verdünnt und 2 h bei 37 °C weitergeschüttelt. Die Stimulation der Sekretion erfolgte durch Zugabe von EGTA, Glucose und MgCl₂. Nach Inkubation bei 37 °C für weitere 3 h wurde die Kultur für 15 min bei 4000 U/min und 4 °C zentrifugiert, der Kulturüberstand abgenommen und die Proteine durch Zugabe von 10 % Trichloressigsäure 1 h auf Eis gefällt. Die gefällten Proteine wurden 20 min bei 14000 g und 4 °C abzentrifugiert, das Pellet in eiskaltem Aceton resuspendiert, 15 min auf Eis stehen gelassen und bei 14000 U/min und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Der letzte Waschschrift erfolgte mit H₂O_{bidest}. Das Pellet wurde in 30 µl Probenpuffer aufgenommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Sekretionsmedium

BHI-Medium 37 g
EGTA 5 mM
Glucose 0,2 % (m/v)
MgCl₂ 10 mM
H₂O_{bidest} ad 1 L

2.9.2 Herstellung von Zelllysaten für SDS-Polyacrylamidgele

Zur Herstellung von Zelllysaten für SDS-Polyacrylamidgele wurden 1×10^6 Zellen mit PBS gewaschen, 5 min bei 1200 U/min abzentrifugiert und schließlich in 24 μ l RIPA Puffer aufgenommen. Nach kurzem vortexen wird das Lysat 30 min auf Eis inkubiert, mit 6 μ l 4 x Probenpuffer versetzt und 10 min bei 99 °C aufgeköcht.

4 x Probenpuffer	Tris	0,4 g
	SDS	1,2 g
	Glycerin	7,5 ml
	β -Mercaptoethanol	2,5 ml
	Bromphenolblau (2 % Lösung)	0,5 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 50 ml
RIPA	1 M Tris/HCl pH 8,0	5 ml
	1 M NaCl	15 ml
	10 % SDS	1 ml
	Nonidet P40	1 ml
	Na-Deoxycholat	0,5 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 100 ml

2.9.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Proteine können im elektrischen Feld auf Grund ihrer Ladung durch Elektrophorese aufgetrennt werden. Bei der Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) werden die Proteine zunächst mit Natriumdodecylsulfat (SDS) als anionischem Detergens in der Gegenwart von β -Mercaptoethanol als reduzierendem Agens denaturiert, wodurch die Proteine komplett entfaltet werden. Das SDS bindet quantitativ an die Polypeptide, wobei sich die negative Ladung des Moleküls proportional zur Größe des Polypeptids und somit zum Molekulargewicht verhält. Im elektrischen Feld wandern die SDS-beladenen Polypeptide je nach Molekulargewicht unterschiedlich schnell zur Anode und trennen sich so auf.

MATERIAL UND METHODEN

Zur Auftrennung von Proteinen wurde ein 12 %-iges Trenngel mit einem 5 %-igen Sammelgel überschichtet und die Proteine nach 10 min Denaturierung bei 99 °C auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in 1 x SDS-Laufpuffer bei 160 V für 1,5 h. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel 2 h mit Coomassie-Lösung gefärbt. Zur Entfärbung wurde das Gel 2 h oder über Nacht in Entfärberlösung gelassen.

12 % Trenngel	Acrylamid (40 %)	1,5 ml
	Tris-HCl (1M, pH 8,0)	1,8 ml
	SDS (10 %)	50 µl
	H ₂ O _{bidest}	1,6 ml
	APS (0,1 %)	50 µl
	TEMED	100 µl
5 % Sammelgel	Acrylamid (40 %)	625 µl
	Tris-HCl (1M, pH 6,8)	630 µl
	SDS (10 %)	50 µl
	H ₂ O _{bidest}	3,7 ml
	APS (0,1 %)	50 µl
	TEMED	100 µl
10 x SDS Laufpuffer	Tris	30,3 g
	Glycin	144,1 g
	SDS	10 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 1 L
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R 250	1,5 g
	Methanol	455 ml
	Eisessig	80 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 5 L
Coomassie-Entfärbelösung	Methanol	40 % (v/v),
	Essigsäure	10 % (v/v)

2.9.4 Western Blot

Das SDS-Gel wurde 90 min bei einer Stromstärke von 350 mA in einer Minigel Blotting Kammer (Bio-Rad, München, D) in 1x Westernblotpuffer auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper für 1 h. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBS-T folgte die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper für 1 Stunde. Im Anschluss wurde die Membran erneut dreimal mit 1x TBS-T gewaschen. Zur Detektion wurde die Peroxidase mit dem „ECL-Western Blotting System“ (GE Healthcare, München) nach Herstellerangaben entwickelt und ein Röntgenfilm zur Belichtung aufgelegt.

1 x Westernblotpuffer	Tris	30,3g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 1 L
10 x TBS	Tris	20 mM
	NaCl	150 mM
TBS-T	Tween 20	0,5 % (v/v) in TBS
Blockierlösung	BSA	2 % (m/v) in TBS-T

2.9.5 Antikörper

2.9.5.1 Primäre Antikörper

Tab. 2-11: Primärantikörper und deren Herkunft

Primärantikörper	Konjugat	Herkunft/Referenz
Ratte α -Maus MHC-II (I-A/I-E)	FITC	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Hamster α -Maus CD11c	PE	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Maus α -Maus MHC-II (I-A ^b)	Biotin	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Hase α -KLF2 (Human und Maus)		Chemicon International (Hampshire, UK)
Hase α -Human Rhoophilin		Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)

2.9.5.2 Sekundäre Reagenzien

Tab. 2-12: Verwendete sekundäre Reagenzien und deren Herkunft

Sekundärantikörper	Konjugat	Herkunft/Referenz
Streptavidin	APC	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Ziege α -Hase-IgG	HRP	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)

2.9.6 Ponceaufärbung

Nach dem Blotten können Proteine auf der Membran mit Ponceau S-Lösung sichtbar gemacht werden. Die Ponceau S-Färbung ist eine reversible Färbung, die Membran kann für den immunologischen Nachweis weiterverwendet werden. Dafür wurde die Membran für etwa 5 min in Ponceau S-Lösung getaucht und die überschüssige Farbe mit Wasser abgewaschen.

Ponceau S-Lösung	Ponceau	0,5 % (m/v)
	Essigsäure	1 % (v/v)

2.10 Immunologische Methoden

2.10.1 Oberflächenfärbung von dendritischen Zellen

Für die Oberflächenfärbung von dendritischen Zellen wurden diese mit FACS-Puffer (PBS mit 0,5 % BSA und 0,02 % NaN_3 , pH 8,0) gewaschen. Die Antikörper (Tab. 2-11) wurden in kaltem FACS-Puffer verdünnt und in 100 μl Volumen zu den Zellen gegeben, gemischt und für 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen ein Mal gewaschen und bei 4 °C im Dunkeln bis zur FACS-Analyse gelagert.

2.10.2 Apoptosemessung

Während der Apoptose wird Phosphatidylserin (PS), welches sich in lebenden Zellen an der Innenseite der Zellmembran befindet, auf die Außenseite der Membran transloziert. Annexin V bindet an PS. Durch Markierung von Zellen mit FITC-AnnexinV kann man somit apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachweisen. Da auch nekrotische Zellen angefärbt werden, wird

zusätzlich mit Propidiumiodid gefärbt, ein Farbstoff, der nur in nekrotische Zellen eindringt. Für die Annexin-Färbung wurde das AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit I (Pharmingen, Heidelberg) verwendet. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in FACS-Puffer resuspendiert (ca. 1×10^6 Zellen/ml), nach Herstellerangaben gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

2.10.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie (FACS = *fluorescence activated cell sorter*) ist eine Methode zur Bestimmung der Größe, Granularität und der relativen Fluoreszenzintensität von Zellen. Die Zellen werden in einer Einzelzellsuspension durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet. Dadurch wird beim Passieren jeder Zelle das Licht gestreut. Die Emission, die sich proportional zur Menge an gebundenem Antikörper verhält, wird durch einen Photomultiplier in elektrische Signale umgewandelt und gibt Auskunft über die Anzahl fluoreszierender Zellen sowie deren Fluoreszenzintensität. Durch Lichtstreuung erhält man zusätzlich Informationen über Größe und Granularität der Zelle. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mithilfe der FlowJo Software (Tree Star Inc., Ashland, USA).

2.10.4 Sortierung dendritischer Zellen am High-Speed-Cell-Sorter MoFlo

Mit Hilfe des High-Speed-Cell-Sorters MoFlo können gewünschte Zellen aus einer Mischpopulation angereichert werden. Dabei werden abzutrennende Zellpopulationen mithilfe der Software markiert, die Trägerflüssigkeit, welche eine gewünschte Zelle enthält, mit einer elektrischen Ladung belegt und die Zellsuspension durch ein elektrisches Feld geleitet. Die sortierten Zellen werden in FACS Röhren mit vorgelegtem FBS aufgefangen. Zur Anreicherung unreifer (MHC-II^{int}) dendritischer Zellen aus einer Mischpopulation wurden ca. 1×10^7 Zellen mit anti-CD11c-PE und anti-MHC-II-biotin Antikörpern und einem Streptavidin-APC Konjugat gefärbt. Lebende CD11c⁺ MHC-II^{int} Zellen wurden angereichert. Die Bedienung des High-Speed-Cell-Sorters erfolgte durch Dr. Matthias Schiemann an der Technischen Universität München.

2.10.5 Präparation und Färbung von Gewebeschnitten

Vor dem Schneiden wurden die Milzen mit Einbettmedium in Kunststoffschälchen eingebettet und sofort in Flüssigstickstoff eingefroren. In dieser Form lassen sich die Gewebe dauerhaft bei -80 °C lagern. Von dem Gewebe wurden mit Hilfe eines Mikrotoms bei -20 °C $6\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte gefertigt und diese auf APES beschichteten Objektträgern aufgenommen. Anschließend wurden die Schnitte etwa 1 min bei 50 °C auf einem Heizblock getrocknet und 10 min in Aceton fixiert. Nach dem vollständigen Trocknen an der Luft wurden die Gewebeschnitte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur Färbung der Gewebeschnitte wurden diese zunächst für 5 min in PBS eingeweicht, anschließend für 20 min in einer feuchten Kammer mit 3 % Paraformaldehyd in PBS fixiert und danach mit PBS gewaschen. Nach Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper wird ein zweiter, gegen den Fc-Anteil des Primärantikörpers gerichteter biotinylierter Antikörper zugegeben. Es folgte eine Inkubation mit HRP konjugiertem Streptavidin bzw. einem Fluoreszenzfarbstoff wie Cy3 oder FITC. Die Fluoreszenzfarbstoffe können mit einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden.

2.11 Analyse von Mikroarrays

Mit Hilfe der Mikroarray-Technologie ist es möglich, die mRNA-Expression tausender Gene gleichzeitig zu untersuchen (Lockhart und Winzler, 2000). Sie stellt somit eine geeignete Methode zur Erstellung von zellulären Genexpressionsprofile dar.

2.11.1 Beschreibung der Mikroarrays MOE430A

Die in dieser Arbeit verwendeten murinen Mikroarrays MOE430A (Affymetrix, Santa Clara, USA) enthalten mehrere hunderttausend Oligonukleotide mit Sequenzen aus 22690 Transkripten. Diese Oligonukleotide wurden aus Sequenzen in den Datenbanken UniGene, GenBank®, dbEST, RefSeq, und UCSC ausgewählt. Die DNA-Oligonukleotid Proben (25-mer), deren Sequenz einer cDNA-Sequenz aus oben genannten Datenbanken komplementär ist, wurden auf eine Fläche von $18\text{ }\mu\text{m} \times 18\text{ }\mu\text{m}$ direkt auf die Glasoberfläche des Arrays synthetisiert. Diese werden als „Perfect Match“ (PM) bezeichnet. Im Gegensatz zu den „Perfect Match“ (PM)

Proben ist bei den so genannten „Mismatch“ (MM) Proben die zentrale Base verändert. Zusammen bilden das PM- und MM-Oligonukleotid ein „Probe Pair“ (PP). 11 dieser Probe Pairs aus unterschiedlichen Bereichen derselben cDNA-Sequenz werden als „Probe Set“ (PS) bezeichnet (Abb. 2-3).

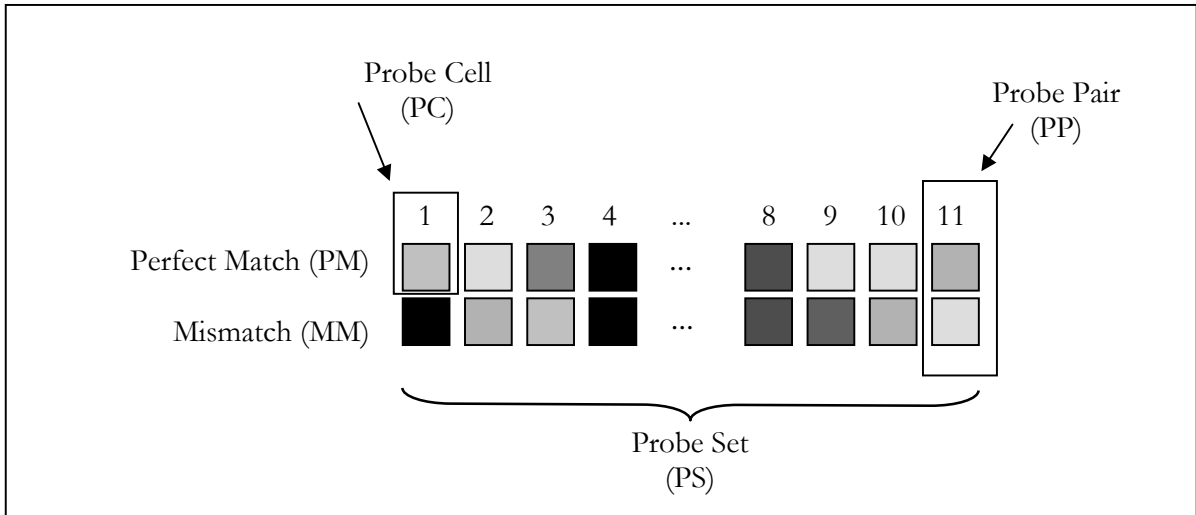


Abb. 2-3: Schematische Darstellung eines Probe Sets. Jedes „Probe Set“ (PS) besteht aus 11 „Probe Pairs“ (PP), welche jeweils aus 2 „Probe Cells“ (PC) den „Perfect Match“ (PM) und „Mismatch“ (MM) bestehen.

2.11.2 Hybridisierung, Waschen und Färben der Mikroarrays

Die wie unter Kapitel 2.4.17 und Kapitel 2.4.18 beschrieben aufbereitete cRNA wurde gemäß Herstellerangaben auf Affymetrix MOE 430A Mikroarrays hybridisiert. Zur Detektion der Fluoreszenzsignale wurde der Chip in die computergesteuerte Waschstation eingesetzt, welche die Waschungen bei 50 °C in Buffer B und die dreistufige Färbeprozedur (1. Streptavidin, 2. biotinylierter Anti-Streptavidin-Antikörper, 3. SAPE-Lösung) durchführt. Zwischen den einzelnen Färbungen und zum Schluss wurde mit Wasch Puffer A gewaschen. Anschließend wurde der Chip aus der Waschstation entnommen und auf Luftblasen in der Hybridisierungskammer untersucht. Der Chip wurde mit einem Argon-Laser gescannt und die Roh-Fluoreszenzdaten mit der Affymetrix® Microarray Suite 5 Software ausgewertet.

2.11.3 Auswertung der Mikroarraydaten

2.11.3.1 Normalisierung der Mikroarraydaten

Die Mikroarray-Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Um die Arrays untereinander vergleichbar zu machen, mussten zunächst eventuelle Unterschiede in der Gesamt-Fluoreszenzintensität korrigiert werden. Dieser Prozess wird als Normalisierung bezeichnet und wurde nach der Methode von Li und Wong durchgeführt (Li und Wong, 2001). Hierbei wurden alle Fluoreszenzwerte auf jedem einzelnen Array nach ihrer Intensität geordnet. Der Array mit der mittleren Gesamtintensität wird als Baseline ausgewählt. Zur Normalisierung auf diesen „Baseline-Array“ werden die Gene ermittelt, die sich im Rang zwischen dem zu normalisierenden und dem „Baseline-Array“ nur geringfügig unterscheiden. Diese Gene mit ähnlichen Intensitäten werden als „invariant set“ definiert. Auf Basis des „invariant set“ erfolgt eine abschnittsweise lineare Normalisierung.

2.11.3.2 Analyse einzelner Arrays

Zur Umsetzung der Fluoreszenzintensitäten in numerische Genexpressionswerte wurde der modellbasierte Ansatz von Li und Wong (Li und Wong, 2001) gewählt. Dafür wird angenommen, dass innerhalb desselben Probenpaares die PM Intensität mit steigender mRNA-Konzentration schneller steigt als die MM Intensität. Der Zusammenhang wird in ein mathematisches Modell gefasst, welches die Differenz zwischen PM und MM-Intensität beschreibt (PM/MM difference model). Folgende Parameter gehen in die Berechnung der Modells ein: PM/MM Intensitäten des Probepairs, die Basisintensität des Probepairs aufgrund unspezifischer Hybridisierung, der Anstieg der MM-Intensität, der darüber hinausgehende Anstieg der dazugehörigen PM-Intensität, sowie eine Fehlergröße.

2.11.3.3 Identifikation differentiell exprimierter Gene und Cluster-Analyse

Zur Identifikation differentiell exprimierter Gene wurden die Daten in Excel importiert und mit Hilfe des Excel-plugins SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) (Tusher *et al.*, 2001) nach

Anleitung ausgewertet. Dieses Programm berechnet anstelle eines p-Wertes eine „False discovery rate“ (FDR) als Maß für statistische Signifikanz. Die FDR beschreibt den Anteil falsch positiver Gene unter allen differentiell exprimierten Genen. Zur Identifikation koexprimierter Gene wurde eine so genannte Cluster-Analyse mit dem Programm Cluster (Eisen *et al.*, 1998) durchgeführt. Hierbei werden die Gene nach Ähnlichkeit des Expressionsmusters gruppiert. Die Visualisierung der Mikroarraydaten erfolgte mit dem Programm TreeView (Eisen *et al.*, 1998) (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>).

2.11.3.4 Einteilung differentiell exprimierter Gene in funktionelle Gruppen

Die Einteilung differentiell exprimierter Gene in funktionelle Gruppen erfolgte mit GeneOntology (GO) (Ashburner *et al.*, 2000). Dabei wurden die GO-Beschreibungen über die Annotationsdatenbank NetAffx von Affymetrix bezogen (Liu *et al.*, 2003). Auf Basis einer hypergeometrischen Verteilung wurden Gruppen ko-exprimierter Gene auf statistisch signifikante Anreicherung funktioneller GO-Kategorien getestet. Die p-Werte geben die Wahrscheinlichkeit an, dass eine zufällig gewählte Gengruppe gleicher Größe dieselbe Anzahl an Genen der entsprechenden GO-Gruppe enthält.

3 Ergebnisse

3.1 Transkriptionsantwort muriner dendritischer Zellen auf Infektion mit *Yersinia enterocolitica*

Für die Abwehr einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica* ist die Produktion von TNF- α , IL-12, IL-18 und IFN- γ , sowie die Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen nötig. T-Zellen werden durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) aktiviert. Dendritische Zellen (DC) sind wichtige APCs, welche in der Lage sind, naive T-Zellen zu aktivieren. Es konnte gezeigt werden, dass mit *Y. enterocolitica* infizierte DCs nicht mehr in der Lage sind CD4+ T-Zellen zu aktivieren (Erfurth *et al.*, 2004). Desweiteren ist in *Y. enterocolitica* infizierten Mäusen die CD8-T-Zellantwort reduziert (Trülzsch *et al.*, 2005). Um die Interaktion zwischen *Yersinia enterocolitica* und DCs umfassend zu charakterisieren, sollten zunächst mit Hilfe der Mikroarray-Technologie mRNA-Expressionsprofile bestimmt werden.

3.1.1 Optimierung der Infektionsbedingungen

Zur Etablierung des Infektionsmodells wurden zunächst die Infektionsbedingungen optimiert. Hierzu wurden dendritische Zellen mit verschiedenen MOIs (*multiplicity of infection*) infiziert. Um den Anteil infizierter DCs zu messen, wurde für diese Versuche ein Yersinienstamm verwendet, welcher ein an YopE fusioniertes *gfp* transloziert. Infizierte dendritische Zellen lassen sich somit einfach durch die Messung von GFP identifizieren.

Wie in Abb. 3-1 zu sehen, nimmt der Anteil GFP-positiver DCs wie erwartet mit steigender Infektionsdosis zu, von 11,7 % bei einer MOI von 1:1, auf über 70 % bei einer MOI von 50:1. Um eine möglichst homogene Population infizierter DCs vorliegen zu haben, wurde für weitere Versuche eine MOI von 50:1 eingesetzt.

ERGEBNISSE

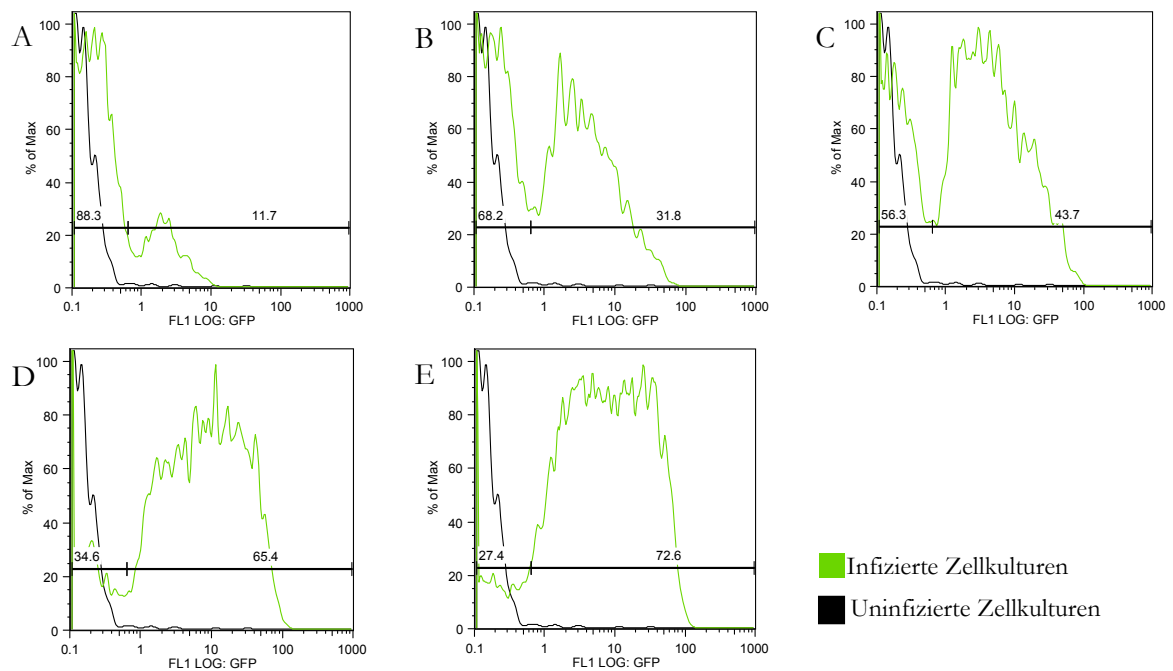


Abb. 3-1: Infektion von dendritischen Zellen mit steigender Dosis des Yersinienstammes WA(pTTS,pYopE-GFP). Gemessen wurde die GFP Translokation im Durchflusszytometer. (A) MOI 1:1. (B) MOI 5:1. (C) MOI 10:1. (D) MOI 25:1. (E) MOI 50:1

Es ist bekannt, dass eine Infektion mit *Y. enterocolitica* in dendritischen Zellen Apoptose induziert (Erfurth *et al.*, 2004). Um daher die maximal mögliche Infektionsdauer zu bestimmen wurden dendritische Zellen mit einer MOI 50:1 für eine bis fünf Stunden infiziert. Apoptotische Zellen wurden mit FITC-VAD-FMK, einem zellpermeablen Caspase-3 Substrat, angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Der Anteil apoptotischer Zellen nimmt mit steigender Infektionszeit zu. Bei einer Infektionsdauer von einer Stunde sind 17,9 % der Zellen apoptotisch, was für Genexpressionsanalysen akzeptiert werden kann. Nach zwei Stunden sind 32,1 %, nach drei Stunden 53,5 %, nach vier Stunden 72,1 % und nach fünf Stunden 72,8 % der dendritischen Zellen apoptotisch.

Somit ergibt sich aus diesen Experimenten folgendes optimiertes Infektionsprotokoll: dendritische Zellen wurden mit einer MOI von 50:1 für eine Stunde infiziert, anschließend wurden extrazelluläre Yersinien durch Zugabe von Gentamicin abgetötet und nach einer weiteren Stunde Inkubation wurde RNA isoliert.

3.1.2 Sortieren dendritischer Zellen

Nach der Infektion der dendritischen Zellen, wurden diese mit anti CD11c-PE und anti MHC-II-biotin Antikörpern und einem Streptavidin-APC Konjugat gefärbt und in einem MoFlo high performance flow cytometer (Cytomation, Inc., Fort Collins, CO) untersucht.

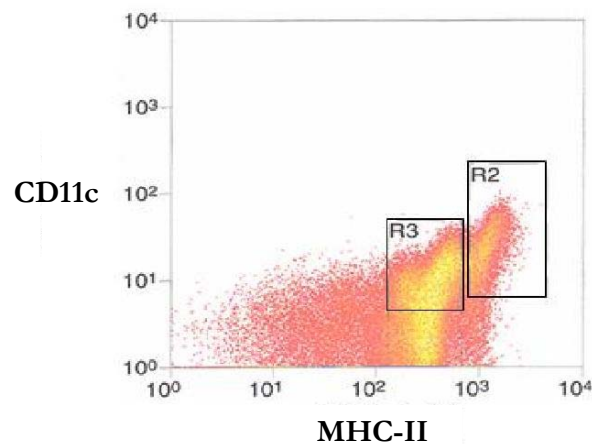


Abb. 3-2: Sortieren dendritischer Zellen mit dem MoFlo high performance flow cytometer. CD11c⁺ MHC-II^{int} Zellen (R3) wurden von CD11c⁺ MHC-II^{hoch} Zellen (R2) getrennt und daraus RNA isoliert.

Wie in Abb. 3-2 zu sehen, lassen sich die zwei Populationen dendritischer Zellen (unreife CD11c⁺ MHC-II^{int} und reife CD11c⁺ MHC-II^{hoch}) identifizieren. Lebende CD11c⁺ MHC-II^{int} Zellen wurden herausortiert. Im Anschluss erfolgte die Reanalyse der Reinheit der sortierten Zellpopulation. Diese betrug routinemässig >99 %.

3.1.3 Mikroarrayanalyse nach Infektion von dendritischen Zellen mit *Yersinia enterocolitica*

Zur Analyse der Transkriptionsantwort muriner dendritischer Zellen nach einer *Yersinia*-Infektion wurde aus diesen sortierten DCs RNA isoliert und für die Hybridisierung auf MOE430A Mikroarrays aufbearbeitet (Kapitel 2.4.17 und 2.4.18).

3.1.4 Qualitätskontrolle der Mikroarraydatensätze

Für die Analyse der Daten wurden die Arrays zunächst mit Hilfe der dchip Software (Li und Wong, 2001; Li und Wong, 2001) normalisiert, um Unterschiede der einzelnen Arrays in der Fluoreszenzintensität zu korrigieren. Hierbei wurde eine Lowess-Fit (*locally weighted regression scatter plot smoothing*) Normalisierung durchgeführt, welche ein über den ganzen Datenbereich zusammengesetztes lineares Regressionsmodell darstellt und die Korrektur nicht-linearer Messfehler erlaubt. Als Qualitätskontrolle der Normalisierung diente ein MvA Plot, der die log-Ratios der Fluoreszenzintensitäten zweier Arrays M (y-Achse) in Abhängigkeit der durchschnittlichen logarithmierten Intensitäten A (x-Achse) darstellt. In Abb. 3-3 sind die MvA Plots zweier Arrays nach Normalisierung dargestellt.

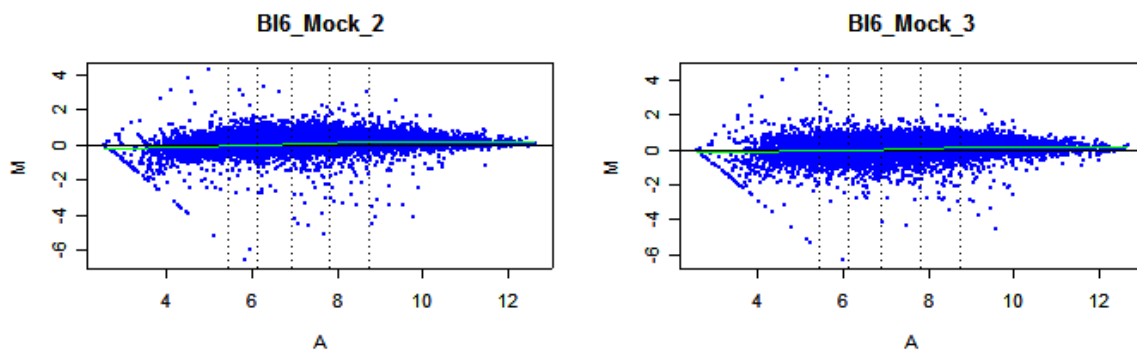


Abb. 3-3: MvA Plot zweier Arrays nach der Normalisierung (nach Li und Wong). Darstellung der log-Ratios der Fluoreszenzintensitäten auf der y-Achse in Abhängigkeit zum Mittelwert zwischen der Fluoreszenzintensität des normalisierten Arrays und der eines virtuellen Baseline-Arrays auf der x-Achse. Mock steht für nichtinfizierte Zellen, hier dargestellt sind die Replikate 2 und 3 von dendritischen Zellen aus C57BL/6 Mäusen.

Wie in Abb. 3-3 zu sehen, resultiert die Normalisierung der Arrays in einer symmetrisch eng um die die Horizontale $M=0$ liegende Punktwolke, deren Lowess-Fit Linie annähernd linear verläuft. Die senkrechten gestrichelten Linien zeigen die 10 %, 25 %, 50 %, 75 % und 90 % Perzentilen an. Diese schneiden die x-Achse bei allen Arrays an nahezu identischer Stelle. Insgesamt zeigen diese QC- (*quality control*) Parameter ein homogenes und technisch einwandfreies Mikroarray-Experiment an.

Als weitere Qualitätskontrolle wurden alle Arrays mit Hilfe einer Clusteranalyse nach Ähnlichkeit des Genexpressionsmusters gruppiert.

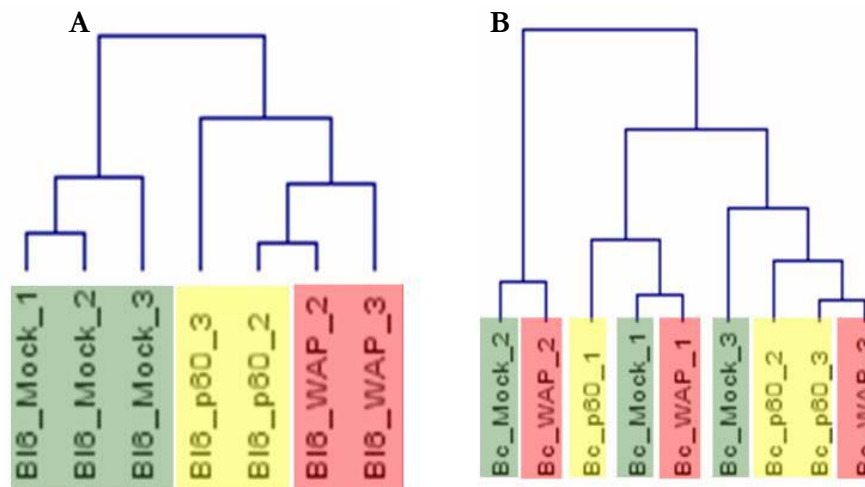


Abb. 3-4: Einfluss der experimentellen Bedingungen auf das Genexpressionsmuster dendritischer Zellen Clusterdiagramm dendritischer Zellen aus **A)** C57BL/6 und **B)** BALB/c Mäusen nach Infektion mit WA(pTTSpYop1) bzw. WA(pTTSpP60).

Abb. 3-4 zeigt das auf Basis von 9 Arrays erstellte Clusterdiagramm dendritischer Zellen aus C57BL/6 (Abb. 3-4-A) und BALB/c Mäusen (Abb. 3-4-B). Die Clusteranalyse wurde zur Qualitätskontrolle herangezogen. Die geforderte Gruppierung zeigt sich nur für die Arrays von dendritischen Zellen aus C57BL/6 Mäusen (Abb. 3-4-A). Das Genexpressionsmuster von dendritischen Zellen aus BALB/c Mäusen hingegen zeigte eine große Variabilität.

3.1.5 Detektion differentiell exprimierter Gene

Die Identifikation differentiell exprimierter Gene erfolgte mit Hilfe des Excel-plugins SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) (Tusher *et al.*, 2001). Hierzu wurde ein Distanzmaß $d(\text{obs})$ berechnet, welches als Maß für differentielle Genexpression gilt. Durch Permutationen des Datensatzes werden 100 Messungen des Distanzmaßes $d(\text{exp})$ vorgenommen, was eine Abschätzung der Signifikanz von $d(\text{obs})$ erlaubt. Als statistisches Maß für differentielle Genexpression wird die FDR (*False discovery rate*), welche den Anteil falsch positiver Gene unter allen differentiell exprimierten Genen beschreibt, abgeschätzt.

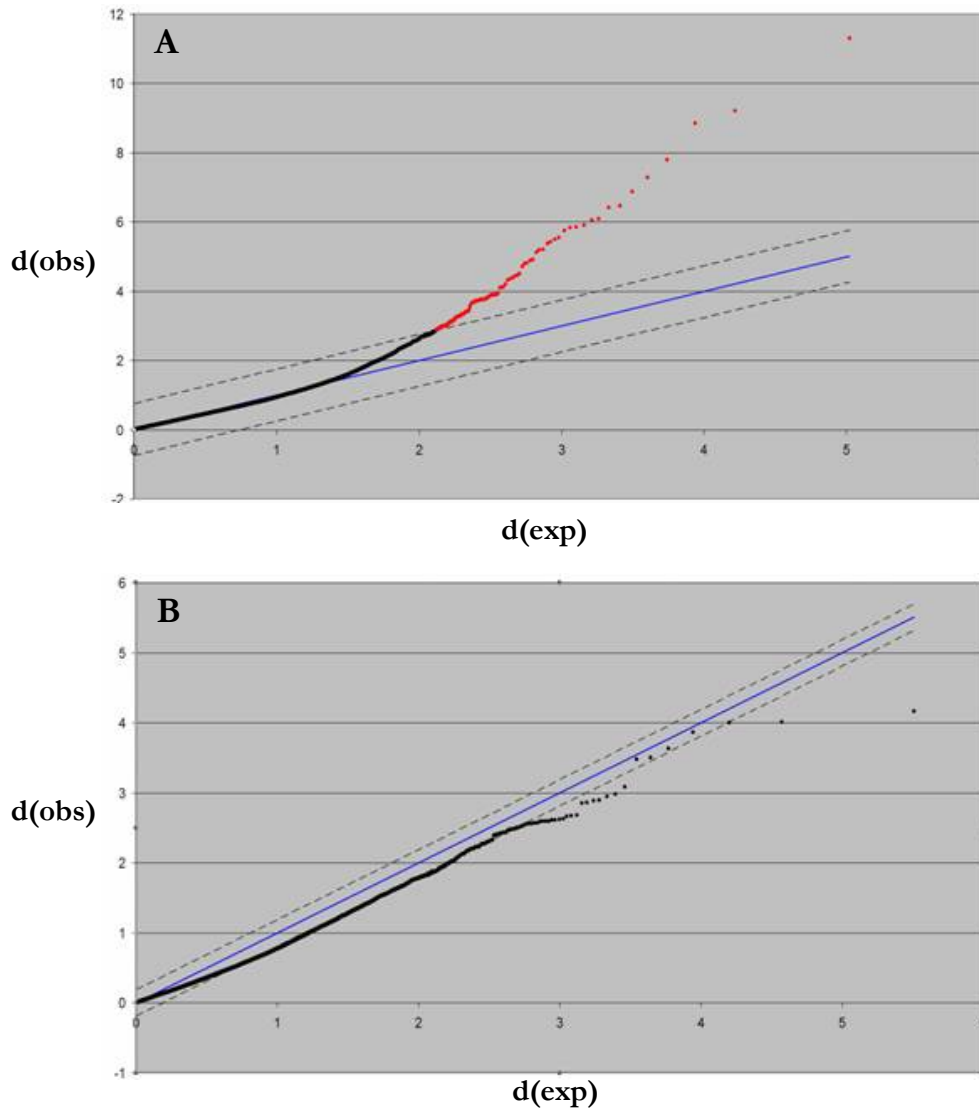


Abb. 3-5: SAM-Plot von A) C57BL/6 und B) BALB/c Mäusen. Außerhalb des durch δ charakterisierten Korridors gelegenen Gene werden als signifikant unterschiedlich exprimiert.

Abb. 3-5 stellt $d(\text{obs})$ und $d(\text{exp})$ gegenüber. Die durchgezogene Linie ist die Diagonale $d(\text{obs})=d(\text{exp})$. Jedes Gen ist als Punkt dargestellt. Je weiter ein Punkt von der Diagonalen entfernt liegt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass das korrespondierende Gen differentiell exprimiert ist. Die Graphen zeigen, dass nur in C57BL/6 DCs eine signifikante differentielle Genexpression detektierbar ist. Die kleinste erreichbare FDR lag in C57BL/6 DCs bei 10 % und erlaubte die Detektion von 112 differentiell exprimierten Genen. In BALB/c DCs hingegen konnte bei einer FDR von 10 % kein Gen als differentiell exprimiert detektiert werden.

3.1.6 Transkriptionsprofil muriner dendritischer Zellen

Nach der Infektion dendritischer Zellen aus C57BL/6 Mäusen mit *Yersinia enterocolitica* konnten bei einer FDR von 10 % 112 Gene als differentiell exprimiert detektiert werden (Tab. 6-1, siehe Anhang). Es wurde eine hierarchische Clusteranalyse der Expressionswerte dieser Gene durchgeführt. Hierbei werden die Expressionsprofile von Genen unter den drei verschiedenen Bedingungen (Mock, p60 und WAP) ermittelt und Gene mit ähnlichen Expressionsmustern gruppiert. Wie in Abb. 3-6 zu sehen, konnten sechs verschiedene Gruppen koexprimierter Gene identifiziert werden

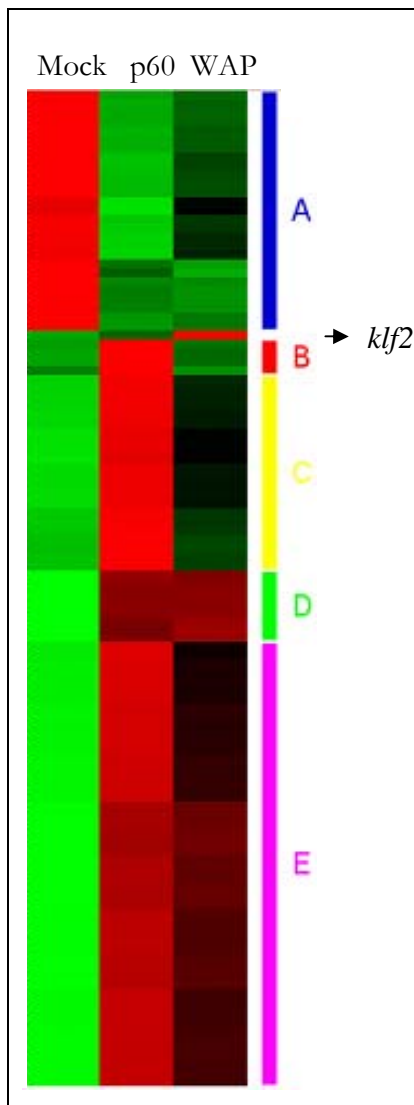


Abb. 3-6: Infektion mit *Yersinia enterocolitica*. Gruppe A enthält Gene, deren Expression nach Infektion supprimiert wird, unabhängig vom Bakterienstamm; in Gruppe B und C sind Gene enthalten, deren Induktion durch eine Infektion mit WA(pYV) unterdrückt wird (in Gruppe B stark und in Gruppe C schwach); in Gruppe D und E sind Gene enthalten, welche nach Infektion mit beiden Bakterienstämmen induziert werden (in Gruppe D stark, in Gruppe E schwach). Nur ein Gen, *klf2*, wird nach Infektion mit WA(pYV) induziert.

Gruppe A enthält 27 Gene, deren Expression im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (Mock) durch bakterielle Infektion unabhängig vom Bakterienstamm supprimiert werden. Dies sind vor allem Gene mit metabolischer Funktion ($p=0.006$; der p-Wert stellt ein Maß für die statistisch signifikante Anreicherung dieser Gene in einer funktionellen Gruppe dar). Zwei Gruppen an Genen, werden durch die Infektion mit dem avirulenten Stamm WA(pTTS, pP60) induziert. Deren Induktion wird jedoch stark (Gruppe B) oder leicht (Gruppe C) durch die Translokation der Yops inhibiert. Die Gruppen B (4 Gene) und C (22 Gene) sind statistisch signifikant angereichert für Gene, welche für Proteine mit anti-apoptotischer Funktion kodieren ($p=0.0005$). In Gruppe C ist unter anderem c-FLIP (CASP8 and FADD-like apoptosis regulator) enthalten, welches für ein anti-apoptotisches Protein kodiert. In Gruppe D und E sind vor allem Gene enthalten, welche nach Infektion mit beiden Bakterienstämmen induziert werden. Gruppe D enthält 8 Gene, die für pro-apoptotische Proteine kodieren ($p=0.0003$). Hierzu gehören unter anderem das Protein Bim, welches in die Mitochondrien der Zelle importiert wird, wo es Apoptose induziert oder GADD45b, welches eine Rolle bei der TGF- β induzierten Apoptose spielt. Innerhalb der Gruppe E (50 Gene) lässt sich eine statistisch signifikante Anreicherung von Genen aus der Immunantwort nachweisen ($p<10^{-6}$). Interessanterweise fand sich ein Gen (*klf2*), welches nur nach Infektion mit dem voll virulenten Wildtyp-Yersinienstamm WA(pYV) induziert wird. Klf2 ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor mit bekannt inaktivierender Funktion in einer Vielzahl an Geweben.

Neben der Induktionshemmung eines pro-inflammatorischen und anti-apoptotischen Genexpressionsprogrammes kommt es durch die Translokation der Yops also auch zu einer Induktion eines inaktivierenden Genes in dendritischen Zellen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde der Mechanismus der *klf2*-Induktion näher charakterisiert.

3.1.7 Identifizierung des für die *klf2*-Induktion verantwortlichen Yops

Zur Bestätigung der Mikroarraydaten wurden Knochenmarkszellen mit GM-CSF zu dendritischen Zellen differenziert und mit den Yersinienstämmen WA(pTTS,pP60) und WA(pYV) infiziert. Zusätzlich wurden die dendritischen Zellen mit verschiedenen Yop-Monosekretionsmutanten infiziert und die Expressionshöhe der *klf2* mRNA mittels RT-PCR analysiert.

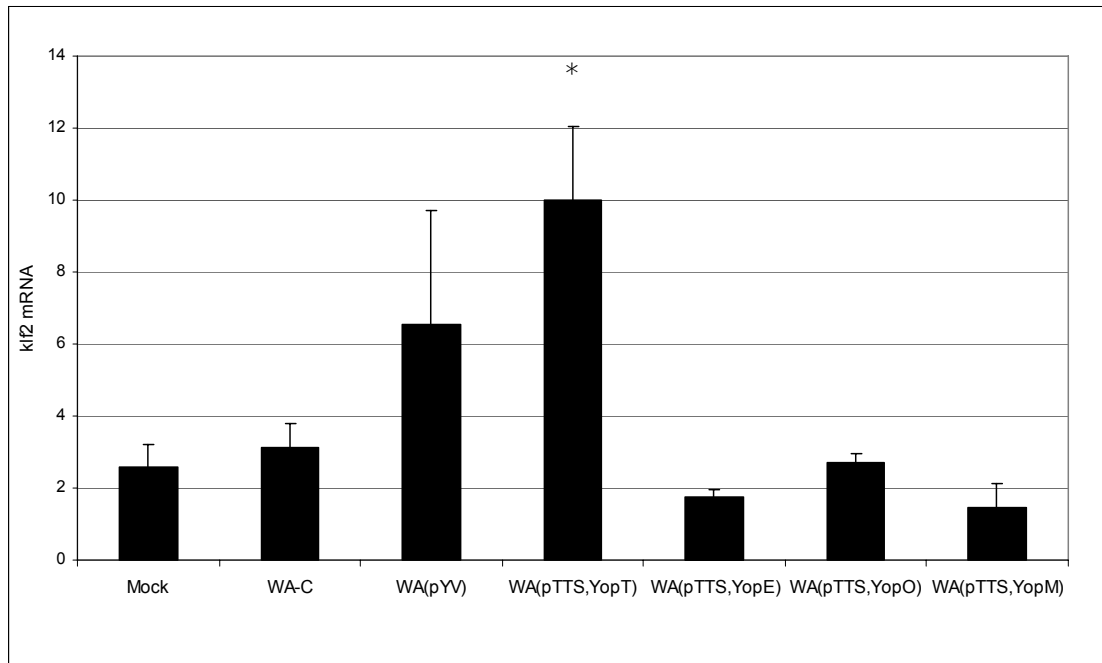


Abb. 3-7: Induktion der *klf2* mRNA wird durch YopT vermittelt. Knochenmarkszellen wurden mit Hilfe von GM-CSF zu dendritischen Zellen differenziert und mit den angegebenen Yersinienstämmen infiziert. Die relative *klf2* mRNA-Expression in Bezug auf die *hprt* mRNA Expression wurde in der RT-PCR gemessen. *= $p < 0,05$

Wie in Abb. 3-7 zu sehen, bewirkt die Infektion von dendritischen Zellen sowohl mit dem Wildtypstamm WA(pYV), als auch mit der YopT-Monosekretionsmutante einen signifikanten Anstieg der *klf2* mRNA. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Induktion von *klf2* in dendritischen Zellen von der Translokation des Virulenzproteins YopT abhängig ist. Da die *klf2*-Induktion auch in J774 Makrophagen, in AGS und HeLa Zellen nachzuweisen ist und durch Verwendung dieser immortalisierten Zelllinien der Zeitaufwand der Differenzierung dendritischer Zellen umgangen werden kann, wurden im weiteren Verlauf soweit nicht anders erwähnt, J774 Makrophagen eingesetzt.

3.2 Mechanismus der *klf2*-Induktion

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde der Mechanismus der *klf2*-Induktion näher analysiert. Folgenden Fragen wurden dabei experimentell bearbeitet: 1. Ist für die *klf2*-Induktion eine Protein-Neusynthese nötig? 2. Spielen Rho-GTPasen eine Rolle in der YopT-vermittelten *klf2*-Induktion, wenn ja welche Rho-GTPasen? 3. Ist die *klf2*-Induktion abhängig vom Serum response factor SRF? 4. Ist die durch YopT ausgelöste Umlagerung des Aktinzytoskeletts für diese Induktion verantwortlich?

3.2.1 Einfluss von Cycloheximid auf die Expression von *klf2*

Es wurde zunächst untersucht, ob für die *klf2*-Induktion durch das Effektorprotein YopT eine Protein-Neusynthese notwendig ist oder ob es sich um einen unmittelbaren Effekt handelt. Hierzu wurden die Zellen mit Cycloheximid behandelt, welches die Proteinsynthese blockiert. Durch die Hemmung der Translation kann untersucht werden, ob die *de novo* Proteinsynthese für die YopT vermittelte Induktion von *klf2* benötigt wird. J774 Makrophagen wurden 30 Minuten vor der Yersinieninfektion mit Cycloheximid behandelt und der Effekt auf die *klf2* Expression mittels RT-PCR untersucht.

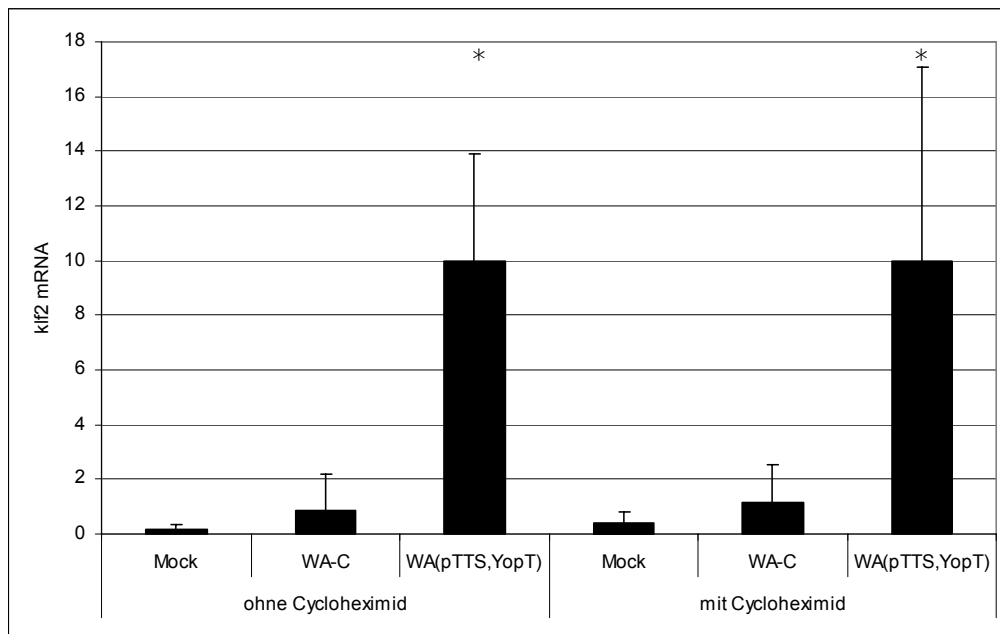


Abb. 3-8: Die Inhibierung der Proteinbiosynthese hat keinen Effekt auf die *klf2*-Induktion. J774 Makrophagen wurden 30 min vor der Infektion mit WA-C bzw. WA(pTTS, YopT) mit 10 µg/ml Cycloheximid behandelt. Dargestellt ist die relative *klf2* mRNA-Expression, normalisiert auf die *hprt* mRNA Expression. *=p<0,05

Wie in Abb. 3-8 zu sehen, konnten nach der Inkubation der Zellen mit Cycloheximid keine Veränderungen in der YopT-abhängigen *klf2*-Induktion festgestellt werden. Die Induktion von *klf2* durch die Infektion mit einer YopT Monosekretionsmutante konnte nicht aufgehoben werden, dieser Effekt ist demzufolge von der Aktivität bereits synthetisierter Proteine abhängig. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde nach möglichen Signalwegen gesucht.

3.2.2 Untersuchungen zur Funktion von Rho-GTPasen bei der Induktion des Transkriptionsfaktors *klf2*

In früheren Arbeiten konnten gezeigt werden, dass YopT in der Lage ist, RhoA zu inaktivieren, wodurch dieses sich von der Plasmamembran löst und sich im Zytosol anreichert (Zumbühl *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass YopT auch mit zwei weiteren Rho-GTPasen, Rac1 und Cdc42 interagiert (Shao *et al.*, 2002). Um zu untersuchen ob Rho-GTPasen in der YopT vermittelten *klf2*-Induktion eine Rolle spielen, wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt. Die Exotoxine C3bot aus *Clostridium botulinum* und das C3 ähnliche Toxin C3stau (EDIN-B) aus *Staphylococcus aureus* sind Glukosyltransferasen, welche eine ADP-Ribosylierung von Rho bewirken. C3bot und C3stau sind spezifisch für RhoA, RhoB und RhoC (Chardin *et al.*, 1989), C3stau modifiziert zusätzlich RhoE (Wilde *et al.*, 2001). Diese Exoenzyme haben keine Wirkung auf Cdc42 und Rac (Narumiya und Morii, 1993). J774 Makrophagen wurden über Nacht mit den Toxinen C3stau und C3bot inkubiert, parallel wurden diese mit dem Wildtyp-Yersinienstamm WA(pYV) infiziert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem irrelevanten Protein, dem *Y. enterocolitica* YopE Chaperon SycE, behandelt. Die Expressionshöhe der *klf2* mRNA wurde mittels RT-PCR analysiert.

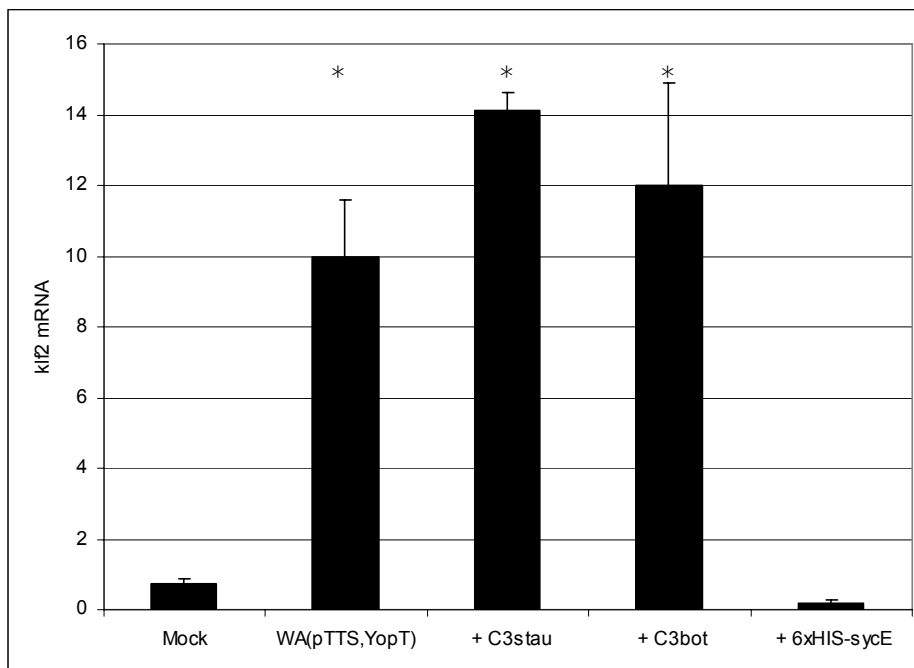


Abb. 3-9: Inhibierung von Rho führt zur Induktion von *klf2*. J774 Makrophagen wurden mit dem Yersinienstamm WA(pTTS, YopT) infiziert oder mit 60 µg/ml C3stau bzw. 12,5 µg/ml C3bot über Nacht behandelt. Mittels Real-Time PCR wurde die Induktion der *klf2* untersucht. In dieser Abbildung ist die relative *klf2* mRNA-Expression, normalisiert auf die *hprt* mRNA Expression dargestellt. *=p<0,05

Wie in Abb. 3-9 zu sehen, führte die spezifische Inhibierung von Rho durch C3 Toxine ebenso wie die Infektion mit dem YopT translozierenden Yersinienstamm WA(pTTS,YopT) zur Induktion von *klf2*. Im Vergleich dazu kam es zu keiner *klf2*-Induktion in Zellen die mit dem irrelevanten Protein SycE behandelt wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Induktion der *klf2* mRNA über die Inaktivierung von Rho, nicht jedoch von Rac oder Cdc42 vermittelt wird.

3.2.3 Einfluss des Serum response factors (SRF) in der *klf2* Regulation

Es ist bekannt dass Rho eine Rolle in der Regulation der Transkription spielt. So wird Rho für die Aktivierung des *Serum response factors* benötigt (Hill *et al.*, 1995). Der *Serum response factor* (SRF) ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der eine Vielzahl an Genen reguliert, die unter anderem an der Zelldifferenzierung und Proliferation beteiligt sind. Für die Aktivierung des SRF ist der Kofaktor MAL nötig, der durch die Stimulation mit Serum in Abhängigkeit von RhoA in den Kern transloziert. MAL interagiert im Kern mit SRF und induziert die Transkription verschiedener Zielgene. Um zu untersuchen, ob *klf2* über den *Serum response factor* SRF reguliert exprimiert wird, wurde zunächst untersucht, ob SRF in J774 Makrophagen aktiv ist. Hierzu wurden die Zellen nach 48 Stunden Serumentzug für eine bis drei Stunden mit Serum stimuliert und die mRNA Level der SRF Zielgene *junB* und *c-fos* quantifiziert.

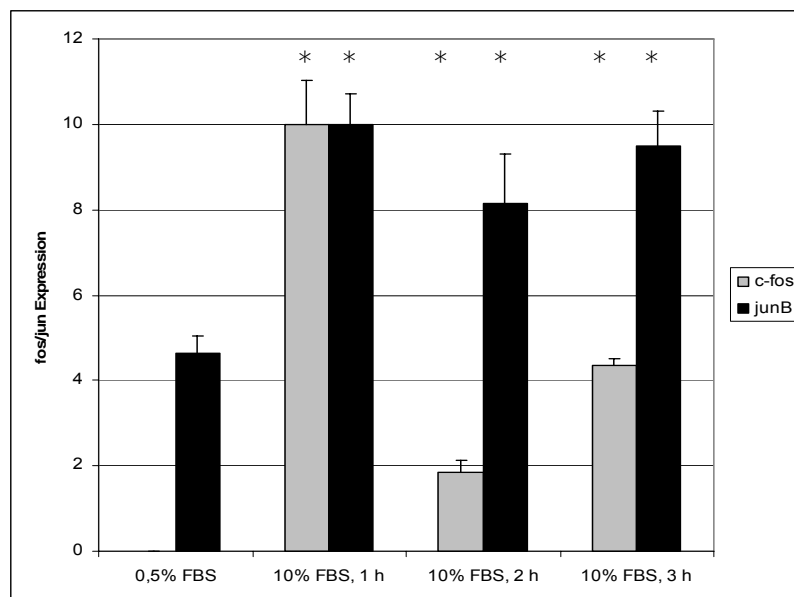


Abb. 3-10: Serumstimulation von J774 Zellen führt zu einer Induktion von *c-fos* und *junB*. J774 Makrophagen wurden nach 48 Stunden Serumentzug mit 10 % FBS für verschieden lange Zeiträume restimuliert. Die Expressionshöhen der SRF regulierten Gene *c-fos* und *junB* wurde mittels RT-PCR gemessen.*= $p < 0,05$

Wie in Abb. 3-10 zu sehen, wurden die zwei durch SRF regulierten Gene *c-fos* und *junB* nach Restimulation der Zellen mit Serum induziert, so dass daraus geschlossen werden kann, dass SRF in den Zellen aktiv ist. Um zu untersuchen ob die SRF Aktivität einen Einfluss auf die Expression von *klf2* hat oder YopT vermittelte Induktion von *klf2* modifiziert, wurden Zellen nach Serumentzug (0,5 % FBS für 48 Stunden) mit dem plasmidlosen Wildtypstamm WA-C und dem voll virulenten Yersinienstamm WA-(pYV) infiziert und durch die Restimulation mit 10 % Serum aktiviert.

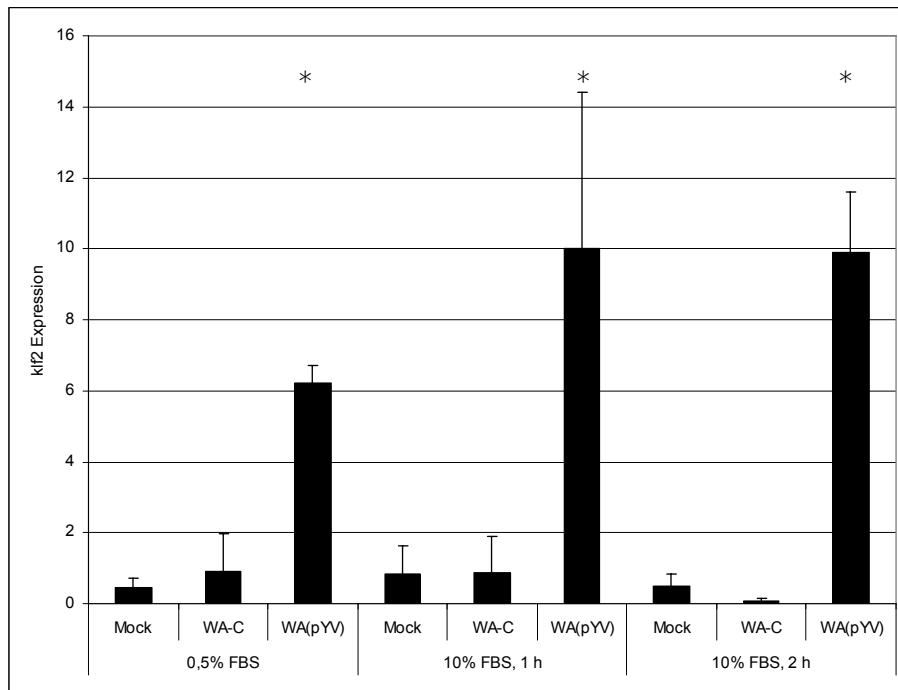


Abb. 3-11: Die Restimulation der Zellen hat keinen Effekt auf die YopT vermittelte *klf2*-Induktion. J774 Makrophagen wurden nach 48 Stunden Serumentzug mit den *Yersinia*-Stämmen WA-C bzw. WA(pYV) infiziert und mit 10 % FBS für verschieden lange Zeiträume restimuliert. Mittels Real-Time PCR wurde die *klf2* mRNA-Expression, normalisiert auf die *hprt* mRNA Expression quantifiziert. *=p<0,05

Wie in Abb. 3-11 zu sehen, hatte die Restimulation der Zellen mit Serum keinen Einfluss auf die *klf2* mRNA Expressionshöhe (Vergleich zwischen Mock 0,5 % FBS und Mock 10 % FBS, 1h oder 2h). Die Infektion der Zellen mit dem Yersinienstamm WA(pYV) führte zur Induktion von *klf2* sowohl in J774 Zellen die unter Serumentzug gehalten wurden, wie auch in Serum-restimulierten J774-Zellen mit maximaler SRF-Aktivität.

Des Weiteren wurde untersucht, ob eine Infektion mit YopT die Expressionshöhe der SRF Zielgene unter stationären Bedingungen beeinflusst. Hierzu wurden die *fos* und *jun* mRNA Expressionswerte aus den bereits beschriebenen Mikroarraydatensätzen aus unserer Arbeitsgruppe entnommen (Hoffmann *et al.*, 2004).

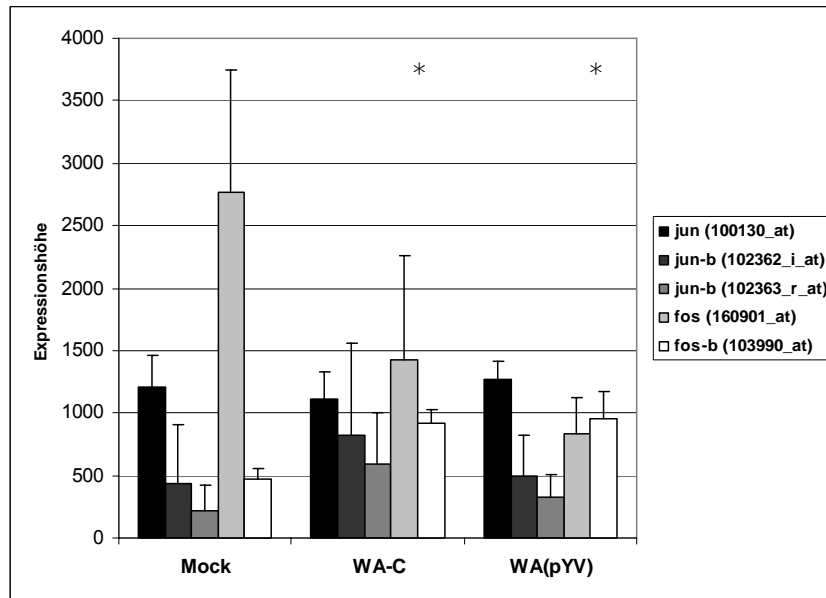


Abb. 3-12: Die Expression der SRF Zielgene wird durch YopT nicht verändert. mRNA Expressionshöhen von *fos* und *jun* 2 Stunden nach Infektion mit den angegebenen *Y. enterocolitica* Stämmen, entnommen aus einem Mikroarraydatensatz. Affymetrix *probe set identifiers* sind in der Legende angegeben. *= $p < 0,05$

jun ist auf dem Array durch drei verschiedene Probe Sets vertreten, wobei die Infektion der Zellen mit WA-C und WA(pYV) zu keiner signifikanten Veränderung der Expressionslevel führte (Abb. 3-12). *fos* wird auf dem Array durch zwei verschiedene Probesets vertreten. Während für das Probeset 160901_at (*fos*) keine statistisch signifikante Regulation gemessen wurde, wurde für das Probeset 103990_at (*fos-b*) eine zweifache Induktion der *fos-b* mRNA durch die Stämme WA-C und WA(pYV) gemessen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression einiger SRF Zielgene durch eine Infektion mit Bakterien induziert werden können, dass aber die Anwesenheit von YopT keinen Einfluss auf deren Expression hat. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die YopT-vermittelte *klf2*-Induktion unabhängig von SRF funktioniert und dass YopT nicht in das SRF-Signalling eingreift.

3.2.4 Untersuchungen zum Einfluss von Aktin auf die Expression von *klf2*

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass *klf2* in Endothelzellen durch Scherstress induziert wird (Dekker *et al.*, 2002). Scherkräfte bewirken eine Polarisierung und Migration der Zellen. Dieser Vorgang beinhaltet eine Umlagerung des Aktinzytoskeletts. Veränderungen in der Aktindynamik beeinträchtigen nicht nur das Zytoskelett, sondern können auch die Transkription beeinflussen.

So können Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder SRF durch die Zerstörung des Aktinzytoskeletts aktiviert werden (Kustermans *et al.*, 2005; Sotiropoulos *et al.*, 1999). Außerdem führt YopT zu einer Depolymerisierung des Aktinzytoskeletts. Daher wurde untersucht, ob für die Aktivierung von *klf2* die Umlagerung des Aktinzytoskeletts eine Rolle spielt. J774 Makrophagen wurden hierfür mit den Aktin destabilisierenden Toxinen Cytochalasin D (Abb. 3-13) und Latrunculin B (Abb. 3-14) behandelt und der Effekt auf die *klf2* Expression mittels RT-PCR untersucht.

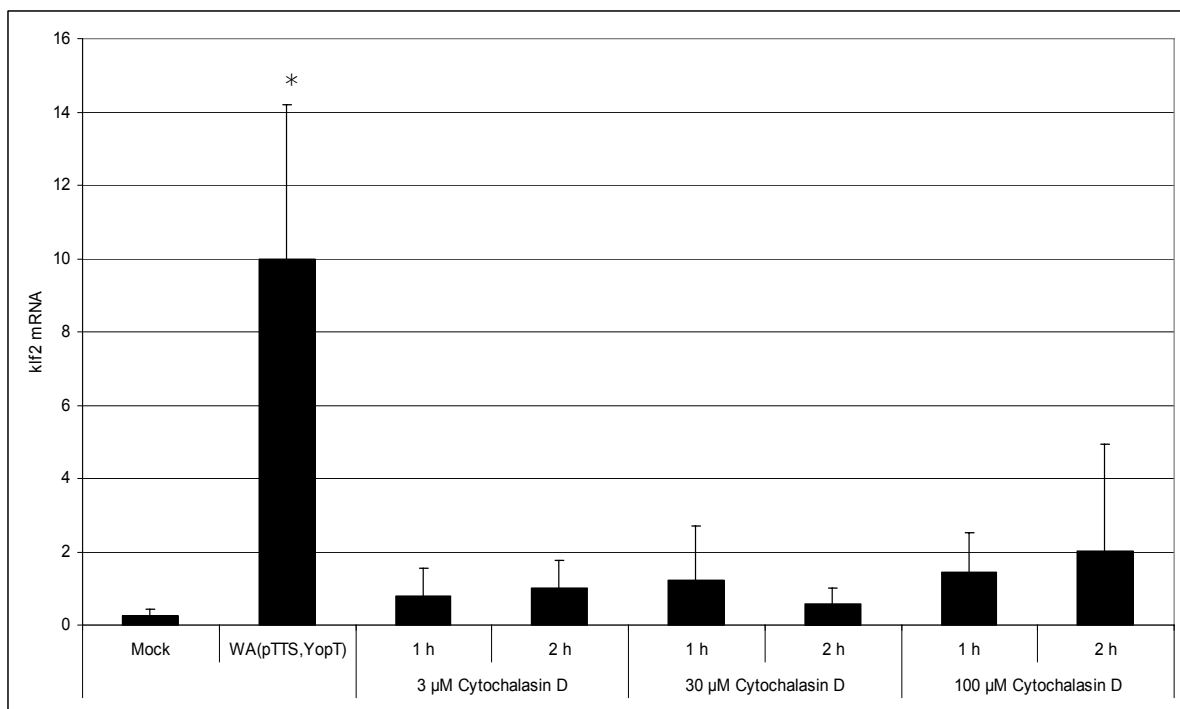


Abb. 3-13: Die *klf2* Expression wird unabhängig von Aktin reguliert. J774 Zellen wurden mit WA(pTTS;YopT) infiziert bzw. mit den angegebenen Konzentrationen an Cytochalasin D für eine bzw. zwei Stunden behandelt. Dargestellt ist die relative *klf2* mRNA-Expression, normalisiert auf die *hprt* mRNA Expression. *=p<0,05

Cytochalasin D ist ein Mykotoxin, welches sich an das Ende der Aktinfilamente anlagert und so deren weitere Polymerisation unterbricht (Cooper, 1987). Wie in Abb. 3-13 zu sehen, führt diese Zerstörung des Aktinzytoskeletts zu keiner signifikanten Induktion der *klf2* mRNA im Vergleich zu Zellen, die mit dem Yersinienstamm WA(pTTS;YopT) infiziert wurden.

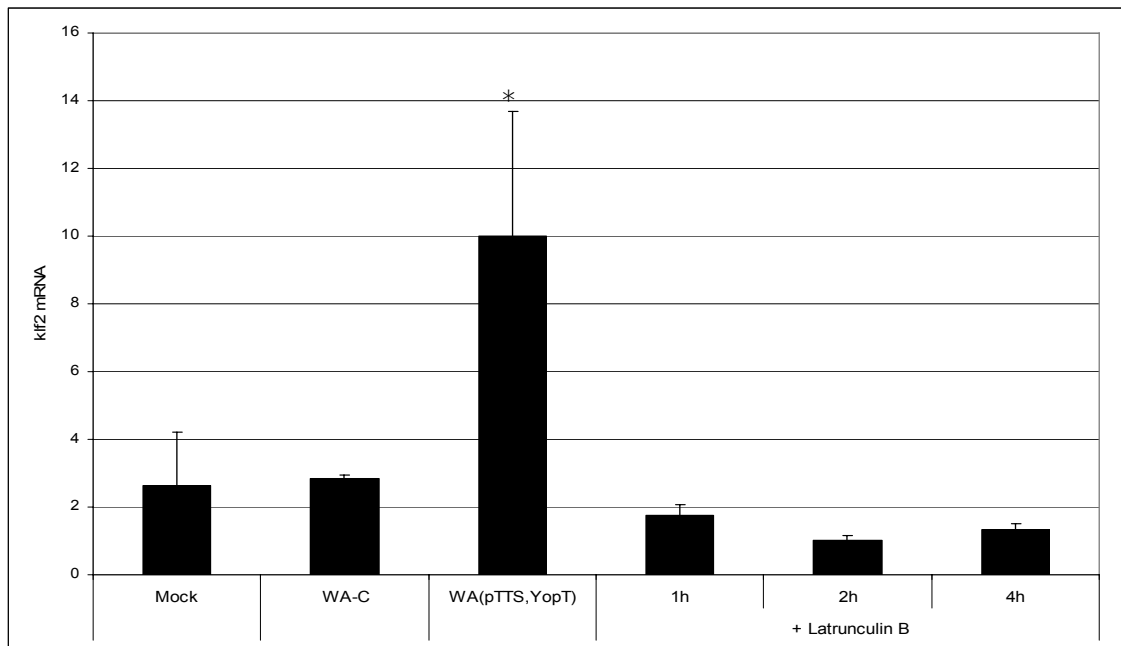


Abb. 3-14: Depolymerisation des Aktinzytoskeletts hat keinen Einfluss auf die *klf2* Expression. J774 Zellen wurden mit WA(pTTS,YopT) infiziert bzw. mit 0,3 μ M Latrunculin B für 1-4 Stunden behandelt. Mittels RT-PCR wurde die relative *klf2* mRNA-Expression in Bezug auf die *hprt* mRNA Expression gemessen. *=p<0,05

Bei Latrunculin B handelt es sich um ein Toxin aus dem Meeresschwamm *Latrunculia magnifica*, welches um das etwa 10-100-fache wirksamer ist als Cytochalasine und darüber hinaus weniger toxische Nebeneffekte auf die Zellen hat. Wie Cytochalasin D, verhindert es die Polymerisation des Aktins und zerstört die Organisation der Mikrofilamente (Spector *et al.*, 1983). Wie in Abb. 3-14 zu sehen, wurde die Expression von *klf2* auch durch die Behandlung der Zellen mit Latrunculin B nicht verändert. Diese Versuche zeigen, dass die durch YopT induzierte Aktindepolymerisation nicht für die *klf2*-Induktion verantwortlich ist.

3.2.5 Die Rolle von Rho bei der Induktion von *klf2*

Neben der Verwendung bakterieller Toxine können Rho-GTPasen durch den Einsatz von dominant negativen Konstrukten der Rho-Proteine ausgeschaltet werden. Diese Mutanten binden aufgrund eines Aminosäureaustauschs mit höherer Affinität an das entsprechende GEF, können aber nicht mit ihren Effektorproteinen interagieren. Dies führt zur Depletion von GEF in der Zelle, so dass für die endogenen Wildtyp-Rho-Proteine keine funktionstüchtigen GEFs mehr zur Verfügung stehen und somit das Rho-Signalling gehemmt wird. Die Verwendung dominant

negativer Mutanten ist nicht immer von Vorteil, da der Inhibierungsgrad von der Expressionshöhe der Mutante abhängig ist (Braga *et al.*, 2000). Darüber hinaus sind viele der GEFs nicht spezifisch für einzelne Rho-GTPasen, wodurch dominant negative Mutanten auch die Aktivierung anderer Rho-GTPasen inhibieren können (Schmidt und Hall, 2002). Um diese Probleme zu umgehen, wurden in der vorliegenden Arbeit die verschiedenen Rho-GTPasen mit Hilfe der RNAi-Technologie ausgeschaltet.

3.2.5.1 Gezieltes Ausschalten von *rhoA*, *rhoB* und *rhoC* mit Hilfe von shRNAs

3.2.5.1.1 Konstruktion der Expressionsvektoren und Herstellung des lentiviralen Überstandes

Um die Rho-GTPase, welche für die *klf2*-Induktion verantwortlich ist zu identifizieren, wurden *rhoA*, *rhoB* und *rhoC* einzeln spezifisch ausgeschaltet. Hierzu wurde die Methode der RNA Interferenz gewählt. Dazu wurde ein Vektorsystem verwendet, welches die stabile Expression von *short hairpin* RNA (shRNA) in eukaryontischen Zellen ermöglicht (Kapitel 2.7).

Für die Konstruktion von shRNAs gegen *rhoA*, *rhoB* und *rhoC* wurde zunächst nach geeigneten Sequenzmotiven innerhalb der cDNA Sequenz des Zielgens gesucht und deren Spezifität überprüft. Nach Klonierung der shRNA Oligonukleotide in den Entry-Vektor pENTR/U6 wurden zwischen 4 und 6 Klone jedes Ansatzes sequenziert, da das Vorkommen von Punktmutationen in der shRNA Sequenz häufig ist. Nach der Rekombination in den eukaryontischen Expressionsvektor pLENTI6/BLOCK-iT-DEST wurden die Bakterienklone anhand einer *EcoRV* Restriktion auf die Insertion der U6-RNAi-Kassette kontrolliert. Hierfür war das Überprüfen von bis zu 10 Bakterienklonen nötig, um richtig inserierte U6 Kassetten zu finden. Die Verpackungszellen 293FT wurden mit shRNA-Expressionsplasmiden unter Zugabe des ViraPower Packaging Mix transfiziert. Nach zwei Tagen wurden lentivirale Partikel, die in den Überstand abgegeben wurden, gesammelt und gereinigt.

3.2.5.1.2 Infektion der Zielzellen

Für den knockdown der Zielgene wurden aufgrund der schweren Transfizierbarkeit von J774 Zellen AGS Zellen ausgewählt. Hierfür wurden AGS Zellen mit dem viralen Überstand

transduziert. Parallel dazu wurden auch Zellen mit einem *eGFP* exprimierendem lentiviralem Expressionskonstrukt transduziert um die Transduktionseffizienz im Fluoreszenzmikroskop und im Durchflusszytometer zu quantifizieren.

Zur Bestimmung der notwendigen Virusmenge wurden drei verschiedene Verdünnungen mit Zellkulturmedium getestet. Eine Verdünnung des Virusüberstandes mit Zellkulturmedium 1:1 führte in AGS Zellen zu Transduktionseffizienzen von nahezu 100 %. Zur Selektion stabiler shRNA exprimierender Zellen wurde dem Medium Blasticidin zugesetzt und über 10 Tage selektiert.

3.2.5.2 Inaktivierungseffizienz der transduzierten shRNA Konstrukte

Zur Messung der Inaktivierungseffizienz wurde aus den transduzierten Zellen die Ziel-mRNA mittels RT-PCR quantifiziert. Als Kontrolle dienten AGS Zellen, die mit einer randomisierten shRNA unter identischen Bedingungen transfiziert wurden.

Die Expression der RhoA shRNA in AGS Zellen führte zu einer deutlichen Reduktion der endogenen *rboA* mRNA um 96,7 % (Abb. 3-15 A). Für das Ausschalten von RhoB wurden gegen drei verschiedene Zielsequenzen von *rboB* shRNAs hergestellt. Nur mit einer der drei getesteten shRNAs konnte ein effizienter knockdown von 81,9 % (Abb. 3-15 B) erreicht werden. Die endogene *rboC* Expression konnte in shRhoC transfizierten Zellen um 95,22 % reduziert werden (Abb. 3-15 C). Um mögliche off-Target-Effekte der shRNA auf andere *rbo*-mRNAs als die Ziel-mRNA zu identifizieren, wurde die mRNA Expression aller drei Rho-Transkripte in jeder shRNA-transformierten Zelllinie gemessen. shRNA Konstrukte gegen RhoA hatten keinen Einfluss auf die mRNA Expression von *rboB* und *rboC* (Abb. 3-15 A). Die Transfektion von shRhoB wirkte sich nicht auf die mRNA Expression von *rboC* aus (Abb. 3-15 B) und shRhoC Konstrukte hatten keinen Einfluss auf die *rboB* mRNA Expression (Abb. 3-15 C). Trotz der Überprüfung der Spezifität der shRNA-Oligonukleotide mittels BLAST wurde die *rboA* mRNA Expression in allen 3 Zelllinien herabreguliert, wobei die stärkste Inaktivierung in shRhoA Zellen gemessen wurde. Eine RT-PCR mit *rboA* mRNA zeigte eine Abnahme von 96,7 % in shRhoA-transduzierten Zellen, im Vergleich zu einer Reduktion von 61,7 % in shRhoB-transduzierten Zellen und einer Abnahme von 68,2 % in shRhoC-transduzierten Zellen, verglichen mit dem *rboA* mRNA Level in shRandom-transduzierten Kontrollzellen.

ERGEBNISSE

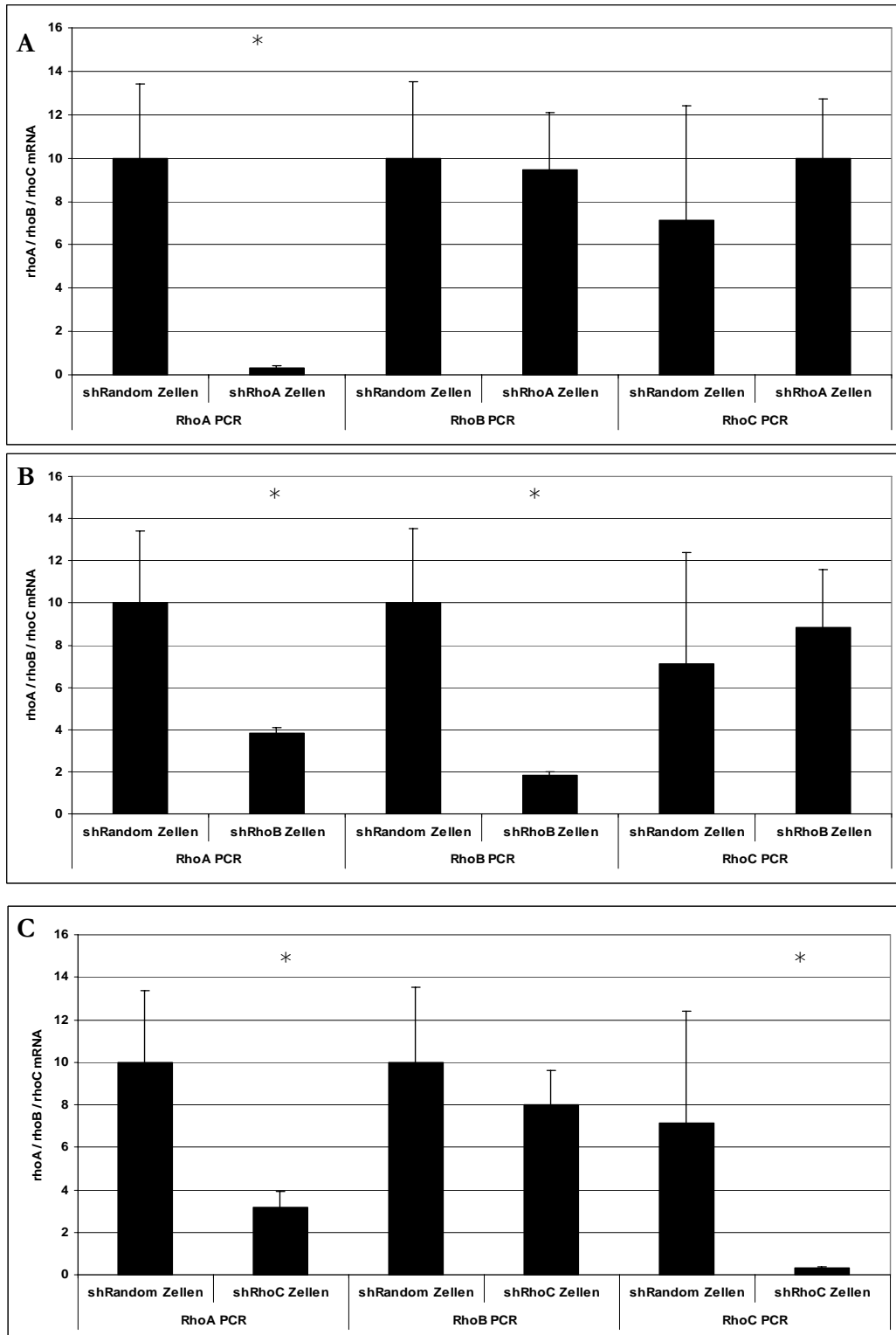


Abb. 3-15: Transduktion von shRNA Konstrukten führt zum effektiven knockdown der Zielgene. Gemessen wurde die Expressionshöhe von *rhoA*, *rhoB* und *rhoC* mRNA in **A**: shRhoA-transduzierten Zellen; **B**: shRhoB-transduzierten Zellen und **C**: shRhoC-transduzierten Zellen im Vergleich zu Zellen die mit einer Kontrolle (shRandom) transduziert wurden. Die relative mRNA Expression wurde in Bezug auf die *hprt* mRNA Expression gemessen. *= $p < 0,05$

3.2.5.3 Effekt auf die Induktion von *klf2*

Nachfolgend wurde untersucht, inwieweit die Suppression der *rhoA*, *rhoB* und *rhoC* mRNA Expression durch spezifische shRNA Konstrukte Auswirkungen auf die *klf2*-Induktion hatten. Im Folgenden wurde RNA aus den drei shRNA-transduzierten Zelllinien extrahiert, RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und RT-PCRs zur Untersuchung der *klf2* mRNA-Expression durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten AGS Zellen, die mit Virus des Vektors pLENTI6-DEST mit einer randomisierten shRNA unter identischen Bedingungen infiziert wurden. Als Positivkontrolle wurden AGS Zellen mit dem Yersinienstamm WA(pTTS,YopT) infiziert.

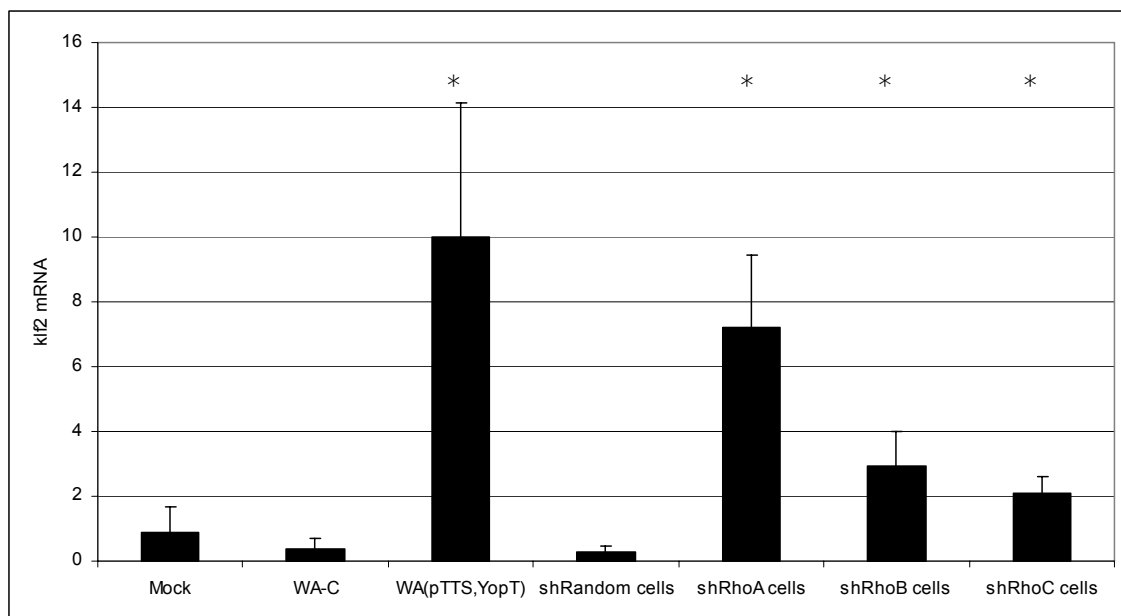


Abb. 3-16: Knockdown der *rhoA* mRNA führt zu einer starken Induktion von *klf2*. In shRhoA, shRhoB und shRhoC Zelllinien und untransfizierten Zellen wurde mittels RT-PCR die Expressionshöhe der *klf2* mRNA in Bezug auf die *hprt* mRNA Expression gemessen. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem Yersinienstämmen WA(pTTS,YopT) und WA-C infiziert. Mock beschreibt uninfizierte AGS Zellen. *=p<0,05

Wie in Abb. 3-16 zu sehen, führt das Ausschalten der *rhoA* mRNA zu einer starken Induktion der *klf2* mRNA (7,2-fach), ähnlich wie die Translokation von YopT. Die *klf2*-Induktion in shRhoB- und shRhoC-transduzierten Zellen ist wesentlich geringer (2,9- bzw. 2,1-fach). Da die Transfektion der RhoB- und RhoC-shRNA auch die mRNA Expression von *rhoA* supprimiert, legen diese Ergebnisse den Schluss nahe, dass RhoA für die YopT vermittelte Induktion von *klf2* verantwortlich ist.

3.2.6 Identifizierung von Rho-Effektoren, welche die anhaltende Induktion von *klf2* vermitteln

Rho-GTPasen interagieren in GTP gebundenem Zustand mit ihren Effektorproteinen, wobei die Interaktion über deren Rho-Bindedomäne (RBD) erfolgt. Bei den bisher bekannten Effektoren handelt es sich meist um Kinasen. Die Rho-Effektoren Kinectin, Rhotekin, Citron Kinase, Rhoophilin, PKN1 (Proteinkinase N1), mDia (Diaphanous) und die am besten untersuchten Rho-Kinasen (ROK) kontrollieren verschiedene Prozesse in der Zelle. Um den für die *klf2*-Induktion verantwortlichen Rho-Effektor zu identifizieren, wurden zunächst die gut charakterisierte ROK mit Hilfe des Inhibitors H1152 inaktiviert.

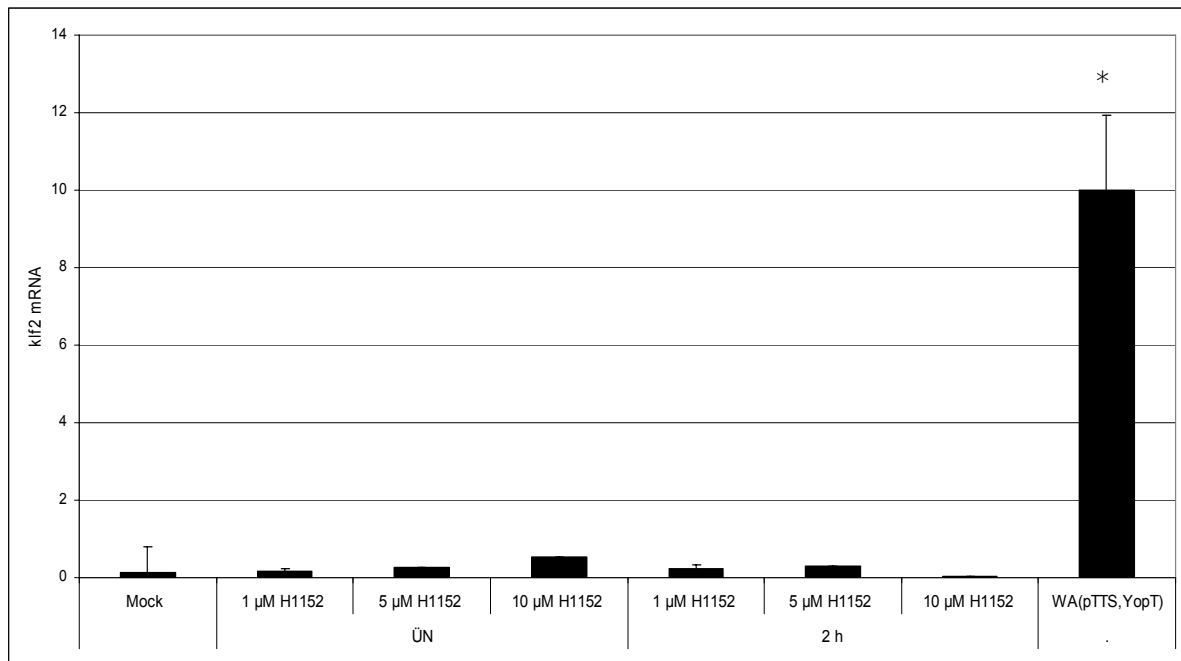


Abb. 3-17: Rho-Kinase Inhibierung führt zu keiner *klf2*-Induktion. J774 Zellen wurden über Nacht oder für 2 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen an H1152 behandelt. Die Expressionshöhen der *klf2* mRNA sind relativ zur *hprt* mRNA angegeben. *= $p < 0,05$

Wie in Abb. 3-17 zu sehen führt die Hemmung des Rho-Effektors Rho-Kinase zu keiner Induktion der *klf2* mRNA.

Das Effektorprotein Proteinkinase N1 (PKN1) kann mit Hilfe des Inhibitors HA1077 gehemmt werden. HA1077 inhibiert darüber hinaus den Rho-Effektor Rho-Kinase, sowie die Proteinkinase A, Proteinkinase N2 (PKN2) und MS-Kinase 1 (MSK1). J774 Makrophagen wurden über

verschiedene Zeiträume mit verschiedenen Konzentrationen an HA1077 behandelt (Abb. 3-18) und der Effekt auf die *klf2* Expression untersucht.

Wie in Abb. 3-18 zu sehen führt die Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor HA1077 zu keiner Induktion von *klf2*. Dies zeigt, dass das Rho-Effektorprotein PKN1, wie auch die Rho-Kinase, nicht für die andauernde Induktion der *klf2* Expression verantwortlich ist.

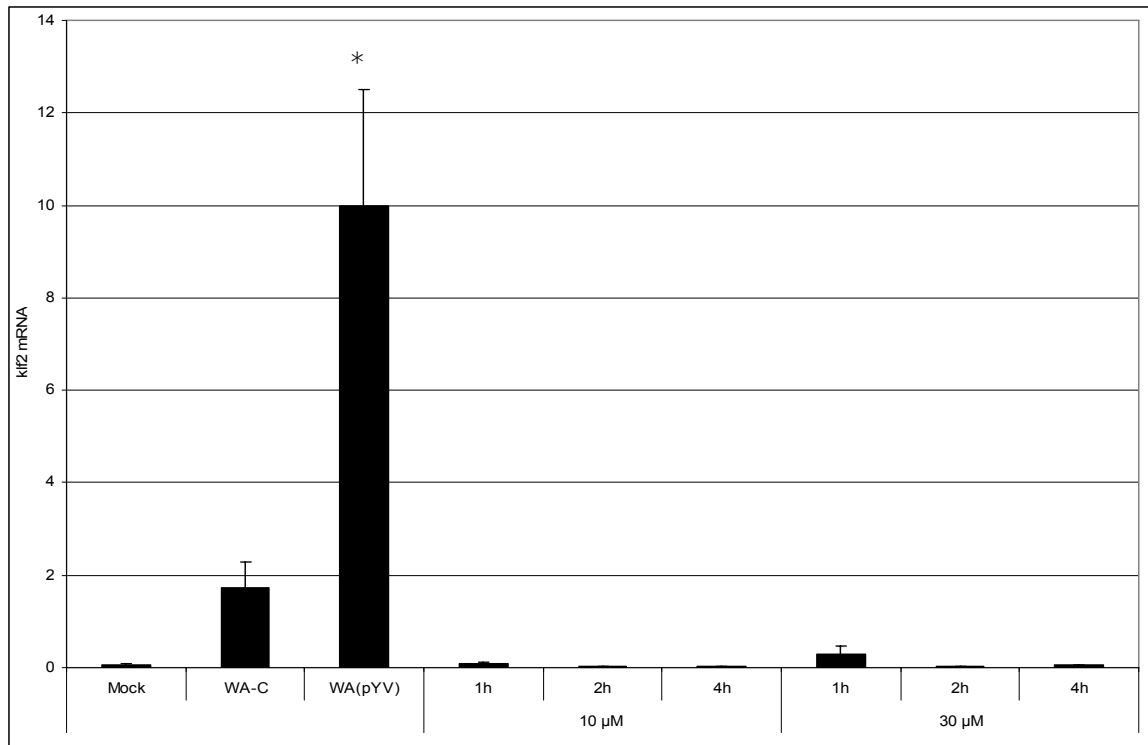


Abb. 3-18: Inhibierung des Rho-Effektorproteins PKN1 führt zu keiner Induktion von *klf2*. J774 Makrophagen wurden für die angegebenen Zeiträume und Konzentrationen mit dem Inhibitor HA1077 behandelt und die Expressionshöhe der *klf2* mRNA mittels RT-PCR in Bezug auf *hprt* gemessen. *= $p < 0,05$

Um den Einfluss weiterer Rho-Effektorproteine auf die *klf2* Expression zu untersuchen, wurden für einige der bekannten Effektoren wie in Kapitel 2.7 beschrieben lentivirale shRNA-Expressionsvektoren konstruiert, da für andere Rho-Effektoren keine spezifischen Inhibitoren verfügbar sind. Die Konstruktion der Expressionsvektoren und die Infektion der Zielzellen erfolgte wie für die Rho-shRNA Konstrukte in Kapitel 3.2.5.1.1 und 3.2.5.1.2. beschrieben. Es wurden shRNAs gegen beide Isoformen von ROK (ROK1 und ROK2) konstruiert, wobei jedoch nur das Ausschalten von ROK2 erfolgreich war.

ERGEBNISSE

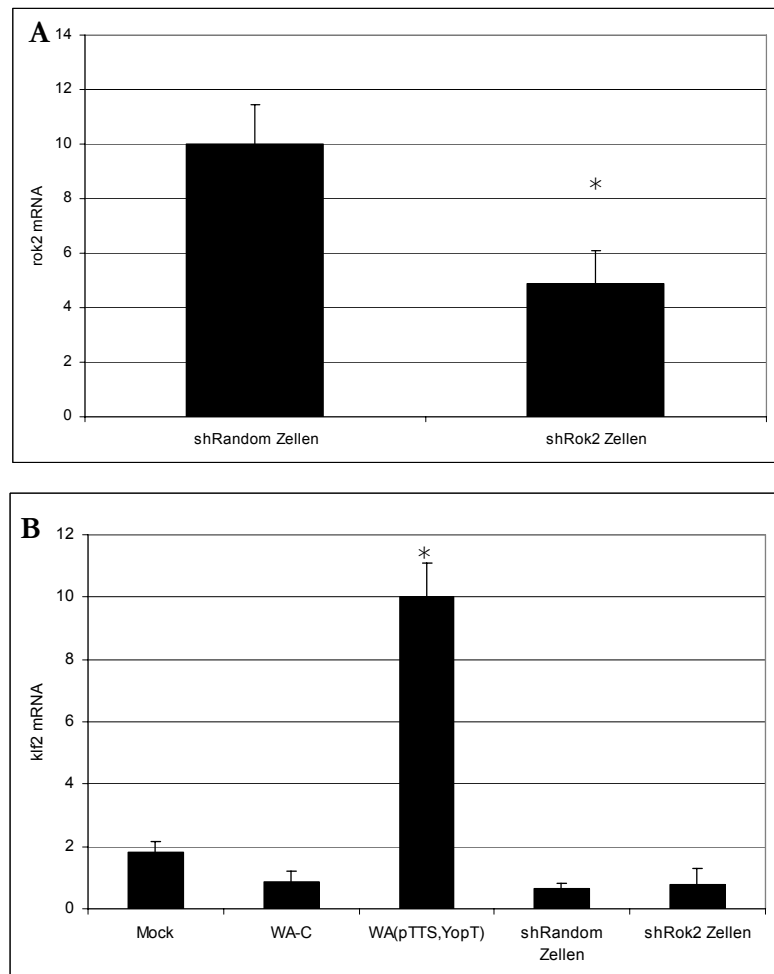


Abb. 3-19: Knockdown von *rok2* bewirkt keine Induktion von *klf2*. **A:** Expression der *rok2* mRNA in shRok2 sowie in shRandom Zellen. **B:** In shRok2 Zelllinien und untransfizierten Zellen wurde mittels RT-PCR die Expressionshöhe der *klf2* mRNA in Bezug auf die *hprt* mRNA Expression gemessen. Als Kontrolle dienten Zellen mit einer randomisierten shRNA, sowie Zellen die mit dem Yersinienstämmen WA(pTTS,YopT) und WA-C infiziert wurden. Mock beschreibt uninfizierte AGS Zellen. *=p<0,05

Wie in Abb. 3-19-A zu sehen, führte die Expression der Rok2 shRNA in AGS Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Ziel-mRNA um 51 %. Das Ausschalten von Rok2 mittels shRNA Konstrukten führte zu keiner Induktion von *klf2* (Abb. 3-19-B). Diese Daten bestätigen die Ergebnisse der vorherigen Versuche, bei denen der Einsatz des Rok-spezifischen Inhibitors keinen Effekt auf die *klf2* mRNA Expression hatte.

Lentivirale shRNA-Expressionsvektoren für die Rho-Effektorproteine PKN1, RTKN, KTN1, PLD1, PIP5K, VEZF1, CIT, RHPN1 und RHPN2 wurden in AGS Zellen transfiziert. Das Ausschalten von einigen dieser Proteine war erfolgreich. Die knockdown-Effizienzen der *pkn1*, *rtkn*, *pld1*, *pip5k*, und *vezf1* mRNA lagen unter 15 % und waren somit zu gering, um einen Effekt auf die *klf2* Expression zu untersuchen.

ERGEBNISSE

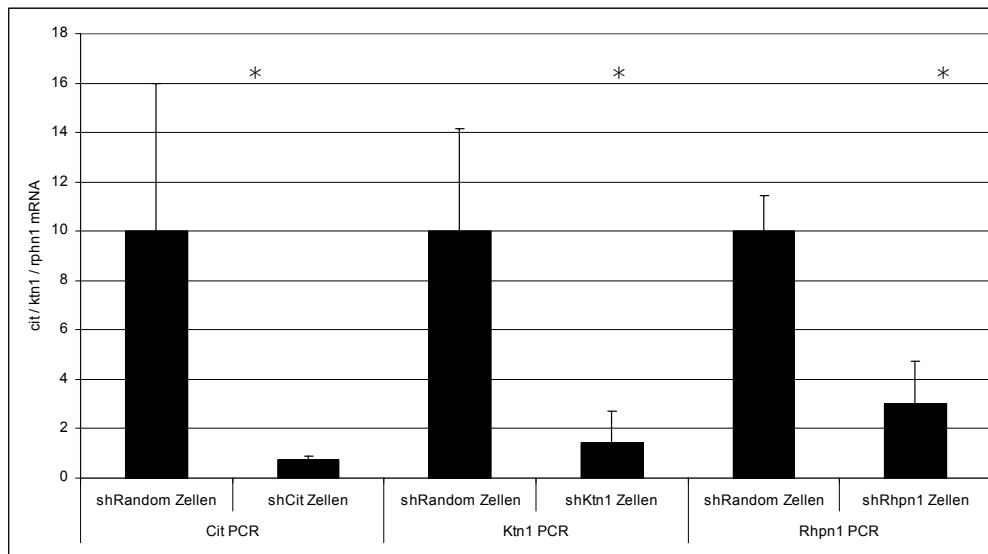


Abb. 3-20: Transduktion von shRNA gegen einige Rho-Effektorproteine führt zum effektiven knockdown der Zielgene. Gemessen wurde die Expressionshöhe der *cit*, *ktn1* und *rhpn1* mRNA im Vergleich zu Zellen die mit einer Kontrolle (shRandom) transduziert wurden. Die relative mRNA Expression wurde in Bezug auf die *hprt* mRNA Expression gemessen. *=p<0,05

Wie in Abb. 3-20 zu sehen, konnte jedoch für die Effektorproteine CIT, KTN1 und RHPN1 eine sehr hohe knockdown-Effizienz erzielt werden. Für die Analyse des Effektes auf die *klf2* Expression wurde aus den entsprechenden Zelllinien RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine RT-PCR auf die entsprechenden Zielgene durchgeführt.

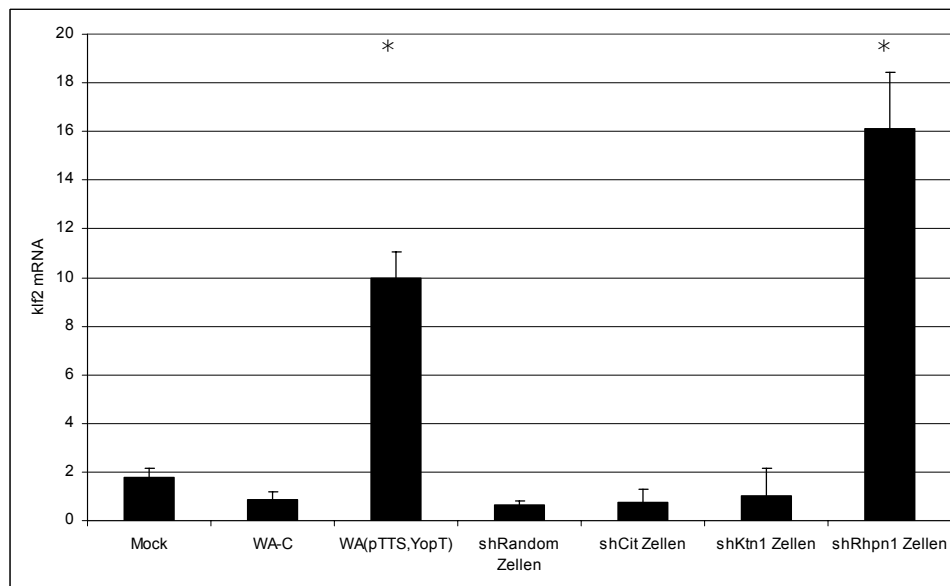


Abb. 3-21: Knockdown von *rhpn1* bewirkt die Induktion von *klf2*. Expression der *klf2* mRNA in shCit, shKtn1, shRhp1, sowie in shRandom Zellen. Die relative mRNA Expression wurde in Bezug auf die *hprt* mRNA Expression gemessen. *=p<0,05

Wie in Abb. 3-21 zu sehen führt das Ausschalten der Rho-Effektoren Cit und Ktn1 zu keiner Induktion von *klf2*. Der knockdown von Rhpn1 hingegen bewirkt eine starke Induktion der *klf2* mRNA. Somit kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass die *klf2*-Expression über RhoA und Rhophilin-1 reguliert wird.

4 Diskussion

4.1 Genexpressionsprofil dendritischer Zellen nach Infektion mit *Yersinia enterocolitica*

Dendritische Zellen (DC) haben eine entscheidende Position in der Erkennung und Präsentation von Antigenen und sind daher wichtig für die Regulation der Immunabwehr. In den meisten Geweben liegen DCs in ihrer unreifen Form vor. Unreifen dendritischen Zellen fehlen die Oberflächenmarker CD40, CD54 und CD86, welche für die Aktivierung von T-Zellen nötig sind. DCs sind auf die Aufnahme von Antigenen und deren Prozessierung spezialisiert (Satthaporn und Eremin, 2001). Die Aufnahme von Antigenen kann über Phagozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose beispielsweise über den Mannose-, F γ - Fe- oder den C-Typ Lectin-Rezeptor DEC-205 erfolgen (Banchereau *et al.*, 2000). Die Antigene werden im Komplex mit MHC-II-Molekülen auf ihrer Oberfläche präsentiert. Durch die Aufnahme des Antigens kommt es zur Reifung und Mobilisierung der DCs. Sie wandern in die Lymphorgane, Milz und Lymphknoten, wo sie die Antigene T-Zellen präsentieren und diese dadurch aktivieren (Steinman, 1991). T-Zellen interagieren schließlich mit weiteren Zellen des Immunsystems, wie B-Zellen zur Produktion von Antikörpern und Makrophagen für die Produktion und Freisetzung von Zytokinen. Dendritische Zellen sind also wichtige Aktivatoren der Immunantwort. Es konnte gezeigt werden, dass eine Infektion dendritischer Zellen mit *Y. enterocolitica* deren immunstimulatorische Fähigkeiten unterdrücken kann. Mit *Y. enterocolitica* infizierte DCs sind nicht mehr in der Lage, eine effektive T-Zellaktivierung hervorzurufen (Erfurth *et al.*, 2004; Schoppet *et al.*, 2000).

Der Annahme folgend, dass eine Infektion von dendritischen Zellen mit *Yersinia enterocolitica* die zelluläre Signaltransduktion modifiziert und eine Änderung des Transkriptomts hervorruft, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Transkriptionsprofil dendritischer Zellen in umfassendem Maßstab untersucht.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Veränderung des Transkriptionsprofils in murinen dendritischen Zellen nach Infektion mit verschiedenen *Yersinia enterocolitica* Stämmen untersucht.

Hierbei wurde gezeigt, dass eine *Yersinia*-Infektion das Genexpressionsprofil der DCs auf zwei unterschiedlichen Wegen modifiziert: zum einen wird ein pro-inflammatorisches und ein anti-apoptotisches Genexpressionsprogramm supprimiert, zum anderen wird *klf2*, ein Transkriptionsfaktor mit inhibierender Funktion, induziert. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Mechanismen, die der *Yersinia*-induzierten Induktion von *klf2* zugrunde liegen, näher charakterisiert.

Yersinia enterocolitica gelangen nach der oralen Aufnahme in die M-Zellen im Follikel-Assoziierten Epithel (FAE) der Peyerschen Plaques des Dünndarms, wo sie sich vermehren und zu den Lymphknoten, zur Leber und Milz disseminieren können. Die Bekämpfung einer Yersinieninfektion erfordert das koordinierte Zusammenspiel der angeborenen und erworbenen Immunantwort. Die unspezifische angeborene Immunantwort erfolgt sehr schnell über die Erkennung von konservierten Strukturen der Bakterien, so genannter PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*). Zu diesen gehören neben anderen das Flagellin, LPS oder CpG Motive (Werling und Jungi, 2003). Diese PAMPs interagieren mit den entsprechenden Wirtsrezeptoren, den so genannten PRRs (*pattern recognition receptors*). Zu den am besten untersuchten PRRs gehören *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) auf der Zelloberfläche vieler Zellen, sowie die intrazellulären *NOD-like* Rezeptoren (NLRs) (Meylan *et al.*, 2006). Durch die PAMP-PRR Interaktion kommt es über die Aktivierung von NF κ B und MAP-Kinasen zur Produktion und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (Mansell *et al.*, 2004; Zhong und Kyriakis, 2007). Zusätzlich zur Induktion pro-inflammatorischer Substanzen kommt es über die Aktivierung inflammatorischer Caspasen zu einer Induktion pro-apoptotischer Mechanismen (Aliprantis *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2004). Die sehr schnelle Aktivierung des Immunsystems über PAMPs führt schließlich zur Initiierung der erworbenen Immunantwort.

Bei einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica* kommt es zu einer Aktivierung der TLR2- und TLR4-Signalkaskaden (Zhang und Bliska, 2003). Das chromosomal kodierte LPS der Yersinien interagiert mit TLR4 (Haase *et al.*, 2003) und das pYV-Plasmid kodierte LcrV bewirkt über die Interaktion mit TLR2 zum einen die Suppression von TNF- α und IFN- γ , zum anderen die Induktion von IL-10 (Sing *et al.*, 2002; Brubaker, 2003). Zusätzlich zu diesen Interaktionen der Yersinien mit PRRs der Wirtszelle induziert die Interaktion des chromosomal kodierten Invasins mit β 1-Integrinen die Sekretion von IL-1, IL-8 und TNF- α (Kampik *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass YopB, welches zusammen mit YopD und LcrV einen Kanal in der

eukaryontischen Zelle ausbildet, zu einer Induktion von IL-8 führt und die MAP-Kinasen JNK und ERK aktiviert (Viboud *et al.*, 2003).

Alle diese erwähnten Effekte erklären die große Zahl an Genen dendritischer Zellen, welche sowohl durch die Infektion mit dem Wildtyp Yersinienstamm, als auch mit dem Kontrollstamm WA(pTTS,pP60) induziert werden. Der Kontrollstamm besitzt alle chromosomalen Effektoren (Inv und LPS), sowie pYV-Plasmid kodiertes YopB und LcrV. Eine Vielzahl an Genen wird in dendritischen Zellen durch die Infektion mit Yersinien induziert. Hier finden wir eine statistisch signifikante Anreicherung von Genen, die für pro-apoptotische Proteine kodieren. Hierzu gehört z.B. das Protein BBC3 (*Bcl2-binding component*), welches in die Mitochondrien der Zelle importiert wird und dort Apoptose induziert (Han *et al.*, 2001) oder GADD45b, welches eine Rolle bei der TGF- β induzierten Apoptose spielt (Yoo *et al.*, 2003). Zusätzlich zur Induktion eines pro-apoptotischen Genexpressionsprogrammes in dendritischen Zellen, kommt es durch eine Yersinieninfektion zu einer Induktion einer Vielzahl an Genen aus der Immunantwort. Hierzu gehört auch TLR2, welches die Suppression von TNF- α und IFN- γ , aber auch die Induktion von IL-10 bewirkt (Sing *et al.*, 2002; Brubaker, 2003). IL-10 inhibiert die Synthese einer Reihe von Zytokinen, wie IFN- γ , IL-2 und TNF- β in Th1-Zellen und stellt ein wichtiges anti-inflammatorisches Zytokin dar (Fiorentino *et al.*, 1991). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Effekten von LcrV auf TLR2 (Sing *et al.*, 2002). Die meisten Untersuchungen hinsichtlich der Interaktion von Yersinien mit Wirtszellen wurden mit Makrophagen oder Epithelzellen durchgeführt. Es konnte aber beispielsweise gezeigt werden, dass dendritische Zellen die wie auch in dieser Arbeit aus dem Knochenmark generiert wurden ähnlich auf eine LPS Stimulation über TLR4 reagieren wie murine Makrophagen (Boonstra *et al.*, 2003). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die TLR2 Aktivierung wie in anderen Zelltypen über LcrV erfolgt. Die Gene IL-1 β und TNF werden in DCs nach Infektion mit Yersinien induziert. IL-1 stellt ein wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin dar. Es aktiviert B-Zellen, NK-Zellen und T-Zellen und stimuliert die Freisetzung weiterer Zytokine, wodurch es zu einer verstärkten pro-inflammatorischen Immunantwort kommt (Pike und Nossal, 1985; Cooper *et al.*, 2001; Houssiau *et al.*, 1989). Diese Ergebnisse stimmen mit Expression profiling Experimenten überein, in denen diese Gene nach Infektion einer Vielzahl an Zelltypen, inklusive dendritischer Zellen, mit verschiedenen pathogenen Erregern wie *E. coli*, *C. albicans* oder Influenza induziert werden (Jenner und Young, 2005). Diese Gruppe an Genen stellt daher wahrscheinlich ein infektionsinduziertes allgemeines Transkriptionsprogramm dar, durch das eine generelle

Immunantwort ausgelöst wird. Durch die Aufnahme und Prozessierung des Pathogens durch dendritische Zellen und die Präsentation der Antigene kommt es zur Sekretion proinflammatorischer Moleküle, wodurch die T-Zellantwort aktiviert und die adaptive Immunantwort induziert wird. Diese Daten verdeutlichen die wichtige Rolle dendritischer Zellen in der Aktivierung der spezifischen Immunantwort.

Zusätzlich zu der großen Gruppe an reguliert exprimierten Genen, die als allgemeine Antwort auf eine bakterielle Infektion gesehen werden kann, findet sich auch eine Gruppe an Genen, deren Induktion durch die Translokation der Anti-Wirts-Effektorproteine (Yops) inhibiert wird (Gruppe B+C). Die Injektion von Yops beeinträchtigt die Wirtsabwehr auf unterschiedliche Weise und ermöglicht das extrazelluläre Überleben der Bakterien (Simonet *et al.*, 1990). Die sechs translozierten Yops interagieren über verschiedene Mechanismen mit den Signaltransduktionswegen der Wirtszelle und können die unspezifische Immunantwort teilweise überwinden. YopP/YopJ hemmt die Freisetzung der Zytokine IL-8 und TNF- α (Boland und Cornelis, 1998) und ist für die Induktion von Apoptose verantwortlich (Ruckdeschel *et al.*, 1997b). Des Weiteren inhibiert YopP/J sowohl den NF κ B-Signalweg als auch den MAP-Kinase-Signalweg (Ruckdeschel *et al.*, 1997a; Ruckdeschel *et al.*, 1998; Orth *et al.*, 1999). YopE, YopT und YopO/YpkA greifen in die Regulation des Aktinzytoskeletts ein, indem sie die GTPasen Rho und Rac angreifen. Dies führt zur Zerstörung des Aktinzytoskeletts und beeinträchtigt dadurch die Phagozytose (Aepfelbacher und Heesemann, 2001; Aepfelbacher *et al.*, 1999). Die Tyrosinphosphatase YopH ist für die Auflösung von fokalen Adhäsionskomplexen verantwortlich, wodurch die integrinvermittelte Phagozytose gehemmt wird (Persson *et al.*, 1997; Black *et al.*, 1998). Die Funktion des Effektorproteins YopM ist bis heute unbekannt.

Dieses breite Spektrum an Effekten auf verschiedene Signalkaskaden der Wirtszelle erklärt, dass die Infektion mit Yop-translozierenden Yersinien zu einer differentiellen Expression vieler Gene in dendritischen Zellen führt. Zwei Gruppen an Genen (B+C), die durch Infektion mit dem Wildtyp-, Yop-translozierenden-Yersinienstamm supprimiert werden, sind statistisch signifikant angereichert für Gene, welche für Proteine mit anti-apoptotischer Funktion kodieren. Hierzu gehört unter anderem c-FLIP (*CASP8 and FADD-like apoptosis regulator*), welches die rezeptorvermittelte Aktivierung der Caspase-8 blockiert (Kataoka, 2005). Unsere Daten sind komplementär zu Ergebnissen von Gröbner *et al.*, die auf Proteinebene zeigen konnten, dass eine Infektion mit Yersinien zur Degradation von c-FLIP führt. Sie konnten diesen Effekt auf YopP

zurückführen (Gröbner *et al.*, 2007). Es ist bekannt, dass c-FLIP bei der Reifung dendritischer Zellen induziert wird und dadurch Apoptose verhindert (Leverkus *et al.*, 2000). Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass einige pro-apoptotische Gene (*gadd45b*, *bbc3*) unabhängig von der Translokation der Yops induziert werden und somit resistent gegenüber der Wirkung von YopP sind. YopP supprimiert also die Expression anti-apoptotischer Gene, während eine hohe Expression pro-apoptotischer Gene gewährleistet bleibt.

Zudem wird die Induktion einiger wichtiger Regulatoren der Immunantwort wie junB, IL-1 α , IL-6 und IL-8 durch die Translokation der *Yersinia* Effektorproteine supprimiert. junB aktiviert die Expression von IL-4 und IL-5 und vermittelt dadurch die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th2-Zellen (Hartenstein *et al.*, 2002). Das Zytokin IL-6 aktiviert die Reifung von Makrophagen (Mitani *et al.*, 2000), führt zur Proliferation von T-Zellen (Takeda *et al.*, 1998) und induziert die Sekretion anti-apoptotischer Regulatoren (Teague *et al.*, 1997). Die hier ermittelten Daten stehen in Einklang mit Ergebnissen verschiedener Veröffentlichungen, die den Einfluss einer Yersinieninfektion auf Epithelzellen und vor allem auf Makrophagen untersuchen (Sauvonnet *et al.*, 2002b; Bohn *et al.*, 2004; Zhang und Bliska, 2005; van Erp *et al.*, 2006). In Makrophagen konnte gezeigt werden, dass der Effekt der IL-8 Suppression YopP abhängig ist (Boland und Cornelis, 1998). Diese Immunantwort, die spezifisch durch die Translokation der Yops hervorgerufen wird, wirkt der pro-inflammatorischen Wirtszellantwort entgegen und bewirkt vor allem eine Suppression der Genexpression in dendritischen Zellen.

Die Infektion von dendritischen Zellen bewirkt also zum einen eine Induktion pro-inflammatorischer und pro-apoptotischer Gene, zum anderen wird durch die Translokation der Yops die Induktion eines anti-apoptotischen und pro-inflammatorischen Genexpressionsprogrammes verhindert. Darüber hinaus wurde ein Gen (*klf2*) identifiziert, welches nur durch die Infektion mit dem Wildtyp-Yersinienstamm induziert wird und inhibierende Funktionen aufweist.

4.2 Mechanismus der *Yersinia*-induzierten *klf2*-Induktion

4.2.1 Eigenschaften des Transkriptionsfaktors KLF2

Das Zinkfingerprotein KLF2 gehört zur Familie der Sp1/Krüppel-ähnlichen Transkriptionsfaktoren, welche über drei tandemartige Cys₂His₂ Zinkfinger Motive an GC-reiche

DNA-Abschnitte binden (Kaczynski *et al.*, 2003; Lomberk und Urrutia, 2005). KLF2 ist zwischen Mensch und Maus stark konserviert (Nukleotid-Identität: 85 %; Aminosäure-Identität: 90 %) und wird dort vor allem in der Lunge und der Milz, aber auch im Herz, im Skelettmuskel, im Pankreas und in der Plazenta exprimiert (Anderson *et al.*, 1995; Wani *et al.*, 1999a). In der Maus wird *klf2* maximal an Tag 7 und 15 der Embryogenese exprimiert und spielt dort eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass *klf2*-knockout Mäuse schwere Defekte in der Lungenentwicklung aufweisen und infolge gestörten Gefäßaufbaues an Hämorrhagien versterben (Kuo *et al.*, 1997a; Wani *et al.*, 1999b; Wani *et al.*, 1998). Dies verdeutlicht die wichtige Rolle von KLF2 als Transkriptionsfaktor in der späten Lungenentwicklung und der Gefäßentwicklung. Die zelluläre Funktion von KLF2 wurde bisher vor allem in Endothelzellen untersucht. So konnte gezeigt werden, dass Scherkräfte und Statine zu einer Induktion von KLF2 führen. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Synthese von anti-inflammatorischen Faktoren wie der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und Thrombomodulin (Sen-Banerjee *et al.*, 2005). Darüber hinaus verhindert die Überexpression von *klf2* die Expression von Adhäsionsmolekülen als Antwort auf pro-inflammatorische Zytokine (SenBanerjee *et al.*, 2004).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass KLF2 zu einer Inhibierung von PAR-1 (*protease-activated receptor-1*) führt, wodurch die nukleäre Akkumulation von NFκB verhindert wird (Lin *et al.*, 2006). Diese Daten verdeutlichen die Rolle von KLF2 als wichtigen Regulator der endothelialen Genexpression.

In Adipozyten konnte gezeigt werden, dass KLF2 die Expression der Zellkernrezeptoren PPAR-γ (*peroxisome proliferators-activated receptor gamma*) inhibiert (Banerjee *et al.*, 2003). PPAR-γ sind wichtige Regulatoren des Lipidmetabolismus, der Glukosehomöostase und der Zelldifferenzierung. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sie eine Rolle in der Krebsentstehung spielen und Entzündungsreaktionen in der Zelle kontrollieren können. PPAR-γ werden in Zellen des Fettgewebes, in Endothelzellen und Makrophagen exprimiert. Neben ihrer Rolle in der Fettsäureoxidation, besitzen PPAR-γ eine direkte anti-inflammatorische Aktivität. Sie inhibieren TNF-α, zusätzlich interferiert PPAR-γ mit den Transkriptionsfaktoren AP-1, NFκB und STAT-1 (Wang *et al.*, 2001; Hogan und Stephens, 2001).

In den in dieser Arbeit getesteten HeLa Zellen wurde jedoch nach zwei Stunden Infektion mit Wildtyp-Yersinien keine Suppression der *ppar-γ* mRNA oder Induktion der *enos* detektiert (Daten nicht gezeigt). Dies kann möglicherweise durch eine zu geringe Infektionsdauer erklärt werden.

Neben seiner Rolle in Endothelzellen und Adipozyten, konnte eine erhöhte Expression von KLF2 in einfach positiven T-Zellen (SP-Zellen, CD8+/CD4- oder CD4+/CD8-) nachgewiesen

werden. Dort spielt KLF2 eine wichtige Rolle um die Aktivierung einzelpositive T-Zellen (SP-T-Zellen) zu verhindern. Eine Überexpression von *klf2* bewirkt sowohl die Induktion eines ruhenden Zustandes von T-Lymphozyten, charakterisiert durch fehlende Proliferation, verminderte Zellgröße und Proteinsynthese, als auch die reduzierte Expression von Aktivierungsmarkern (Kuo *et al.*, 1997b; Buckley *et al.*, 2001). Auch in T-Gedächtniszellen ist die KLF2 Expression erhöht, was auf eine mögliche anti-apoptotische Funktion von KLF2 hindeuten könnte (Schober *et al.*, 1999). Die Rolle von KLF2 in B-Zellen wurde bislang nur wenig untersucht. In anergen B-Zellen konnte eine erhöhte Expression von KLF2 detektiert werden, was darauf hindeutet, dass KLF2 auch in B-Zellen einen ruhenden Phänotyp induziert (Glynn *et al.*, 2000). Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine Überexpression von *klf2* die Hemmung der Monozyten-Aktivierung zur Folge hat (Das *et al.*, 2006). Dabei wird nicht nur die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, sondern auch die Phagozytose gehemmt.

Dieser Transkriptionsfaktor hat also stark inhibitorische Funktion in Endothelzellen, Monozyten, T- und wahrscheinlich auch in B-Zellen. Diese Daten verdeutlichen, dass es sich bei KLF2 um einen wirksamen immunsuppressorischen Faktor handelt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *klf2* durch die Infektion mit *Yersinia enterocolitica* in dendritischen Zellen induziert wird. In unserer Arbeitsgruppe wurde die *klf2* Expression nach Infektion in verschiedenen Zelllinien untersucht. Hier konnte nachgewiesen werden, dass die *Yersinia*-induzierte *klf2*-Induktion auch in Makrophagen und im Epithel des oberen Gastrointestinaltrakts stattfindet (Dach *et al.*, eingereichtes Manuskript). Dies sind Zelltypen mit denen *Yersinia* in einer sehr frühen Phase der Infektion interagieren. Die *klf2*-Induktion in einer Vielzahl an Zelltypen verstärkt möglicherweise die durch Bakterien induzierte Schwächung der Immunantwort. Darüber hinaus ergaben Untersuchungen, dass auch eine Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* zu einer Induktion von *klf2* führt (Dach *et al.*, eingereichtes Manuskript).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Induktion des Transkriptionsfaktors KLF2 einen neuen Pathomechanismus von *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* darstellt, durch den es zu einer wirksamen Immunsuppression in dendritischen Zellen, Makrophagen und in Epithelzellen des oberen Gastrointestinaltrakts kommt. Es ist denkbar, dass diese Bakterien sich also die immunsuppressorischen Funktionen von KLF2 zu Nutze machen, um die antimikrobielle Wirtsantwort zu inhibieren.

4.2.2 Die Rolle von Rho-GTPasen in der *klf2*-Induktion

Untersuchungen des Zeitverlaufs der *klf2* Expression zeigten, dass es innerhalb der ersten Stunde einer Infektion *klf2* auch durch Infektion mit einem virulenzplasmidlosen Yersinienstamm induziert wird (Hoffmann *et al.*, 2004). Diese Induktion wird allerdings nach zwei Stunden Infektion supprimiert. Eine anhaltende *klf2*-Induktion erfolgte nur in Zellen, die mit Yop-translozierenden Yersinien infiziert wurden.

Unsere Arbeiten identifizierten YopT als *klf2*-induzierendes *Yersinia*-Effektorprotein. YopT ist eine Cysteinprotease, welche kleine GTPasen der Rho-Familie an ihrem C-Terminus schneidet, wodurch sich diese von ihrem Membrananker lösen und ins Zytoplasma gelangen. Dadurch sind sie nicht mehr in der Lage mit ihren Effektorproteinen zu interagieren. Neuere Studien zeigen jedoch, dass es durch die Aktivität von YopT zu einer Translokation von Rac-1 in den Nukleus kommt, wo es GEFs interagieren kann (Wong und Isberg, 2005). YopT hat zytotoxische Wirkung, was sich in der Inhibierung der Stressfaserbildung und dem Abrunden der Wirtszellen äußert (Iriarte und Cornelis, 1998). *in vitro* modifiziert YopT sowohl die Rho-GTPase RhoA, als auch Rac-1 und CDC42 (Shao *et al.*, 2002). *in vivo* konnte gezeigt werden, dass YopT bevorzugt RhoA inhibiert (Aepfelbacher *et al.*, 2003).

Die C3-artige ADP-Ribosyltransferase aus *Staphylococcus aureus* (C3stau) führte ebenso zu einer Induktion von *klf2*, wie das C3 Toxin aus *Clostridium botulinum* (C3bot). C3bot inhibiert RhoA, RhoB und RhoC, C3stau inaktiviert zusätzlich RhoE. Weitere Experimente in der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass das Protein ExoS aus *Pseudomonas aeruginosa* ebenso zu einer Induktion der *klf2* mRNA führt (Dach *et al.*, eingereichtes Manuskript). ExoS ist ein bifunktionales Toxin mit einer N-terminalen GAP Domäne und einer C-terminalen ADP Ribosyltransferase Domäne (Barbieri und Sun, 2004). Die GAP Domäne von ExoS ist für die Induktion von *klf2* verantwortlich. ExoS-GAP interagiert mit Rho, Rac und Cdc42 (Goehring *et al.*, 1999; Krall *et al.*, 2002) und bewirkt die Umlagerung des Aktinzytoskeletts (Sun und Barbieri, 2004)

All diese Toxine haben also eine inhibitorische Wirkung auf GTPasen gemeinsam und führen zu einer Induktion der *klf2* mRNA. Diese Daten legen nahe, dass diese Rho-GTPasen die *klf2* Expression supprimieren. Durch das gezielte Ausschalten der *rboA*, *rboB* und *rboC* mRNA konnte

in dieser Arbeit gezeigt werden, dass RhoA für die Expressionsregulation von *klf2* verantwortlich ist.

Neben YopT interagiert auch das Effektorprotein YopE mit GTPasen der Rho-Familie. YopE ist ein GAP (GTPase activating protein) für Rho, Rac und Cdc42. Es bewirkt die Hydrolyse von GTP und inaktiviert die GTPasen dadurch (Von Pawel-Rammingen *et al.*, 2000). Das GAP YopE ist aber nicht in der Lage die *klf2* mRNA Expression zu induzieren. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass YopE *in vivo* hauptsächlich Rac als Ziel hat (Andor *et al.*, 2001). Darüber hinaus ist es möglich, dass die *klf2*-Induktion eine kovalente Modifikation von Rho-GTPasen benötigt.

Die kurzfristige initiale *klf2*-Induktion stellt möglicherweise einen physiologischen Regulationsmechanismus bei der Aktivierung von dendritischen Zellen, Makrophagen oder epithelialen Zellen dar, der durch bakterielle Bestandteile ausgelöst wird. Die anhaltende Expression von *klf2* erfolgt spezifisch bei der Anwesenheit Rho-modifizierender Toxine wie YopT, ExoS oder C3 durch die Inhibierung von RhoA und stellt einen neuen Pathomechanismus dar. Neben *klf2* wurde bisher nur ein Gen identifiziert welches durch Rho supprimiert wird. Die Expression des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors 1A (Cdkn1a oder p21^{Waf1/Cip1}) wird über den Ras-Signalweg induziert, wobei diese Induktion durch RhoA inhibiert werden kann (Olson *et al.*, 1998). Über welches Rho-Effektorprotein diese Inhibierung vermittelt wird ist unklar. In einigen Zelltypen konnte die Rho-Kinase Rok für diesen Effekt verantwortlich gemacht werden (Lai *et al.*, 2002). Wir konnten jedoch keinen Effekt von YopT auf die Expression von *cdkn1a* in J774 Zellen nachweisen (Daten nicht gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass die Expression von *klf2* über einen anderen Mechanismus reguliert wird.

4.2.3 Einfluss der Aktindynamik auf die *klf2* Expression

Im Zytoplasma hat das Zytoskelett eine Schlüsselrolle in der Regulation vieler Prozesse, wie Zellbewegung (Wittmann und Waterman-Storer, 2001), Muskelkontraktion (Clark *et al.*, 2002), Phagozytose (May und Machesky, 2001) oder Mitose (Gachet *et al.*, 2001). Neben den eben erwähnten Funktionen konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Dynamik des Zytoskeletts auch einen Einfluss auf die Genexpression haben kann, indem es zu direkten Interaktionen mit Proteinen bestimmter Signaltransduktionswege kommt. Die Zerstörung des Zytoskeletts aktiviert

beispielsweise Proteinkinasen wie JNK1 (Shtil *et al.*, 1999; Christerson *et al.*, 1999) oder Transkriptionsfaktoren wie SRF (*Serum response factor*) (Sotiropoulos *et al.*, 1999) und NFκB (Kustermans *et al.*, 2005; Rosette und Karin, 1995). Dies verdeutlicht, dass Veränderungen des Zytoskeletts auch die Transkription bestimmter Zielgene modulieren können.

Da YopT zur Zerstörung des Zytoskeletts führt, liegt die Vermutung nahe, dass diese Veränderungen im Aktinzytoskelett für die Induktion des Transkriptionsfaktors KLF2 verantwortlich sind. Die Behandlung der Zellen mit zwei Inhibitoren der Aktinpolymerisation, Cytochalasin D und Latrunculin B, hatte jedoch keinen Effekt auf die *klf2* Expression. Darüber hinaus ist eine *Y. enterocolitica* YopE Monosekretionsmutante, welche wie YopT zu einer Depolymerisation der Aktinfilamente führt, nicht in der Lage *klf2* zu induzieren. Die YopT abhängige Induktion von *klf2* wird also unabhängig von der Veränderung des Zytoskeletts hervorgerufen.

4.2.4 Rho-vermittelte Transkriptionsregulation von *klf2*

Neben der Regulation des Aktinzytoskeletts haben Rho-GTPasen auch einen Einfluss auf die Regulation der Transkription. So sind Rho-GTPasen in der Lage den Transkriptionsfaktor SRF (*serum response factor*) zu aktivieren. SRF ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der eine Vielzahl an Genen reguliert, die unter anderem an der Zelldifferenzierung und Proliferation beteiligt sind. SRF bildet nach Stimulation mit Serum zusammen mit einem ternären Komplexfaktor (*ternary complex factor*, TCF) einen Komplex und stimuliert die Transkription von Genen, die in ihrem Promotor eine SRF-Bindungsstelle tragen (*serum response element*, SRE) (Johansen und Prywes, 1995). SRF kann aber auch unabhängig von TCFs durch aktiviertes Rho, Rac und Cdc42 aktiviert werden (Hill *et al.*, 1995). Für diese Aktivierung des SRF ist der Kofaktor MAL nötig, welcher an G-Aktin gebunden im Zytoplasma lokalisiert ist. Die Aktivierung der Rho-GTPasen führt zu einer Verminderung des intrazellulären G-Aktin Gehaltes, wodurch MAL in den Kern transloziert, wo es mit SRF interagiert und die Transkription verschiedener Zielgene induziert (Settleman, 2003; Miralles *et al.*, 2003). Einige der SRF Zielgene die von der Rho-Aktin Signalkaskade abhängig sind, sind muskelspezifische Gene oder kodieren für Bestandteile des Zytoskeletts (z.B.: Aktin und Vinkulin) (Gineitis und Treisman, 2001; Mack *et al.*, 2001).

Ob die Expression von *klf2* durch den SRF reguliert wird, wurde in dieser Studie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Translokation von YopT keinen Einfluss auf Zielgene des SRF hatte. Darüber hinaus führte die Re-Stimulation der Zellen mit Serum zu keiner Veränderung der Expressionshöhe von *klf2*. Wir können daraus folgern, dass die Rho vermittelte Suppression der *klf2* Expression unabhängig von SRF erfolgt. Neben den untersuchten bekannten Funktionen von Rho in der Regulation der Transkription, gibt es eine Vielzahl an Signalkaskaden, die über die Aktivierung verschiedener Rho Effektorproteine kontrolliert wird.

4.2.5 Die Rolle der RhoA-Effektorproteine in der Regulation der *klf2* Expression

Rho-GTPasen interagieren in ihrer aktiven GTP-gebundenen Form mit ihren Effektorproteinen. Die bisher etwa 30 identifizierten Effektoren werden aufgrund ihrer Spezifität für Rho, Rac und Cdc42 eingeteilt (Bishop und Hall, 2000). Effektorproteine von RhoA sind entweder so genannte *scaffolding*- oder Gerüstproteine, wie RhoGAP, Rhotekin, Kinectin, M-RIP (*Myosinphosphatase rho interacting protein*) und mDia (Diaphanous), Serine/Threonin Proteinkinasen wie Proteinkinase N1 (PKN1), Citron, PIP5-Kinase und Rho-Kinase (ROK) oder Lipasen wie PLD1 (Hall, 1998; Bishop und Hall, 2000). Die Aktivierung dieser Effektoren erfolgt meist über die Aufhebung autoinhibitorischer Interaktionen durch die Bindung von Rho-GTP. Der genaue Mechanismus der Effektoraktivierung ist für die meisten Proteine jedoch noch unklar (Bishop und Hall, 2000; Dvorsky und Ahmadian, 2004). Die verschiedenen identifizierten Rho Effektorproteine interagieren mit einer Vielzahl an Signaltransduktionskaskaden und vermitteln die unterschiedlichsten Effekte. Um zu untersuchen über welchen Weg die Regulation des Transkriptionsfaktors KLF2 kontrolliert wird, wurden in dieser Arbeit einige der bekannten Rho-Effektoren ausgeschaltet und der Effekt auf die *klf2* Expression untersucht.

Das Rho Effektorprotein M-RIP bindet spezifisch an MLCP (*Myosin light chain phosphatase*), die dadurch zu den kontraktilen Filamenten geleitet wird und zu einer erhöhten Bildung von Stressfasern führt (Surks *et al.*, 2005). Rhotekin spielt in der Rho-vermittelten Aktivierung von NF κ B eine Rolle (Liu *et al.*, 2004) und Diaphanous Protein (mDia) beeinflusst die Aktinpolymerisation und Organisation der Mikrotubuli (Waller und Alberts, 2003; Shimada *et al.*, 2004). Die enzymatische Aktivität der Phospholipase D kann durch Rho, Rac und Cdc42 aktiviert werden. PLD katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylcholin und führt zur Bildung von Phosphatidsäure und Cholin. Der zelluläre Botenstoff Phosphatidsäure spielt eine wichtige Rolle

im Zellwachstum und im Vesikeltransport (Walker und Brown, 2002). Ein weiterer Rho-Effektor ist VEZF1 (*Vascular endothelial cell zinc finger protein 1*). Hierbei handelt es sich um einen endothelialen Transkriptionsfaktor, der bei der Regulation der Angiogenese eine Rolle spielt (Aitsebaomo *et al.*, 2001; Aitsebaomo *et al.*, 2004).

Das RhoA-Effektorprotein Kinectin bindet an Kinesin und verstärkt dessen ATPase Aktivität (Hotta *et al.*, 1996; Alberts *et al.*, 1998; Vignal *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde Kinectin mit Hilfe von shRNA Konstrukten spezifisch ausgeschaltet und der Effekt auf die *klf2* Expression untersucht. Hier zeigte sich, dass Kinectin keine Rolle in der YopT-vermittelten Induktion der *klf2* mRNA spielt.

Das am besten untersuchte Rho Effektorprotein Rho-Kinase (Rok1/2) phosphoryliert eine Vielzahl an Substraten, wodurch es zu verschiedenen zellulären Antworten kommt, wie Muskelkontraktion, Zellmigration und die Ausbildung von Stressfasern (Riento und Ridley, 2003). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Rho Kinase keine Rolle in der YopT vermittelten *klf2*-Induktion spielt. Sowohl die Suppression der Rok-Aktivität mit Hilfe von Inhibitoren, sowie die gezielte Hemmung der Proteinexpression durch die Transduktion von spezifischen shRNA Konstrukten bewirkte keine Induktion der *klf2* mRNA.

Der Rho Effektor Citron spielt eine Rolle in der Zytokinese (Madaule *et al.*, 1998) und PKN Proteine sind Serin/Threonin Proteinkinasen, die an der Kontrolle der Apoptose, des Glukosetransports, der Zelladhäsion und des Zytoskeletts beteiligt sind (Mukai, 2003). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch diese beiden Rho Effektoren nicht für die Induktion von *klf2* verantwortlich sind. Der verwendete Rok-Inhibitor HA1077 hemmt ebenso die Proteinkinase PKN (Davies *et al.*, 2000) und führte zu keiner Induktion der *klf2* mRNA. Die Hemmung der Proteinexpression von Citron durch die Transduktion von shRNA Konstrukten hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die *klf2* Expression.

Die Hemmung der Rhoophilin-1 (Rhpn1) Proteinexpression durch die Verwendung von shRNA Konstrukten führte zu einer signifikanten Induktion des Transkriptionsfaktors KLF2. Rhpn1 wurde erstmals im Jahre 1996 beschrieben, wo es in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System mit Rho als „bait“ detektiert wurde. Es interagiert stark mit aktiviertem GTP-gebundenem RhoA, weniger stark mit RhoC und schwach mit RhoB (Watanabe *et al.*, 1996). Rhpn1 wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert (Nakamura *et al.*, 1999), am stärksten aber im Maushoden, wo es mit Ropporin interagiert (Fujita *et al.*, 2000). Andere mögliche Bindepartner wurden basierend auf dem Hefe-Zwei-Hybrid-System identifiziert. Dazu gehören TRIM37 (*tripartite motif-containing 37*), KRT15 (*Keratin 15*), CNKSR1 (*connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1*), EFEMP2 (*EGF-*

containing fibulin-like extracellular matrix protein 2, oder Fibulin-4) und NDP52 (*nuclear dot protein 52*) (Rual *et al.*, 2005). Rhpn1 enthält einige Protein-Protein Interaktionsmotive: Eine HR1 Domäne, eine zentrale BRO1 Domäne und eine C-terminale PDZ Domäne (Peck *et al.*, 2002). Die HR1- oder Rho- Bindedomäne wurde erstmals als Teil der Proteinkinase PKN1 beschrieben, welche RhoA bindet (Flynn *et al.*, 1998). HR1 Domänen finden sich in einer Reihe von Signalproteinen, wie auch in Rhotekin und PKN2, wo sie für deren Bindung an GTPasen nötig sind (Watanabe *et al.*, 1996; Reid *et al.*, 1996). Die exakte molekulare Funktion von BRO1 Domänen ist nicht bekannt. Sie werden für die Deubiquitylierung von Transportproteinen benötigt und spielen eine Rolle im Endosomenmetabolismus (Luhtala und Odorizzi, 2004). PDZ Domänen sind Proteininteraktionsdomänen, welche oft in Gerüstproteinen mit vielen unterschiedlichen Proteindomänen gefunden werden. Diese organisieren das intrazelluläre Signalling zu bestimmten subzellulären Kompartimenten (Sheng und Sala, 2001). Die Anwesenheit dieser verschiedenen Proteininteraktionsmotive suggeriert eine mögliche Rolle von Rhophilin-1 als Signalprotein. Wie genau Rhpn1 für die anhaltenden Induktion von *klf2* verantwortlich ist muss weiter untersucht werden: Eine Möglichkeit ist, dass Rhophilin-1 direkt an den *klf2* Promotor bindet und dadurch die Expression von *klf2* inhibiert. Rhpn1 könnte auch in die Signalkaskade eingreifen die zur Induktion von *klf2* führt.

Unter den bisher beschriebenen Bindepartnern von Rhpn1, enthält TRIM37 eine TRAF- (*TNF-receptor-associated factor*) Domäne, welche an sechs TRAF Proteine bindet (Zapata *et al.*, 2001). Lin und Kollegen berichten dass TRAF2 über den p38 MAP Kinaseweg indirekt *klf2* reguliert. Hier konnte gezeigt werden, dass die spezifische Inhibierung von p38 zu einem Verlust der TRAF2 abhängigen *klf2*-Induktion führt (Lin *et al.*, 2003). YopP bindet an die MAP Kinasen JNK und p38 und verhindert so deren Aktivierung (Ruckdeschel *et al.*, 1997a). Es wäre also zu erwarten, dass die Inhibierung von p38 durch YopP zu einer Abnahme der *klf2* Expression führt. Ein Einfluss von YopP auf die *klf2* Expression konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden.

Ein weiterer Rhophilin-1 Bindepartner ist CNKSR1. Dieses Gerüstprotein vermittelt die Src-abhängige Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von Raf-1, einem Regulator der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Eine Rolle in der Regulation von *klf2* erscheint unwahrscheinlich, da dieses Protein auch ein Effektorprotein von Rhophilin-2 ist. Rhpn2 wurde 2002 von Peck und Kollegen entdeckt. Rhpn1 und Rhpn2 zeigen eine Übereinstimmung von 49 % in ihrer Aminosäuresequenz. Wie Rhpn1 besitzt Rhpn2 eine Rho Bindedomäne, eine zentrale BRO1 Domäne und die C-terminale PDZ Domäne, in der die größten Unterschiede bestehen (Peck *et al.*, 2002). Rhpn2 wurde als spezifischer RhoB Interaktionspartner identifiziert, wobei es

mit der GTP-gebundenen Form von RhoB interagiert (Mircescu *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Rhpn2 durch aktiviertes RhoB an subzelluläre Strukturen rekrutiert wird und dass dieser Mechanismus BRO1 abhängig ist (Steuve *et al.*, 2006). Aufgrund der Spezifität von Rhpn2 für RhoB erscheint eine *klf2* Regulation durch das Rhpn1-Effektorprotein CNKSR1 unwahrscheinlich.

Der Rhophilin-1 Bindepartner NDP52 lokalisiert in ND 10 (*nuclear domain 10*) genannten Domänen des Zellkerns. Hierbei handelt es sich um Multiproteinkomplexe, die mit der unlöslichen nukleären Matrix assoziiert sind. Pro Zellkern finden sich zwischen 10 und 30 dieser nukleären Domänen (Korioth *et al.*, 1995; Maul *et al.*, 2000). Die genaue Funktion dieser Domänen ist jedoch noch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass sie als Proteinspeicherorte für zellregulatorische Proteine dienen (Negorev und Maul, 2001). Darüber hinaus wurde ihnen eine Rolle in der Abwehr von Virusinfektionen zugeschrieben (Regad und Chelbi-Alix, 2001). Aufgrund der derzeit wenig charakterisierten Funktion dieser Domänen, lässt sich ein Zusammenhang mit der Expressionsregulation von *klf2* nicht herstellen.

Über die Regulation von *klf2* ist nur wenig bekannt. Humanes *klf2* besteht aus drei Exons und wird vor allem durch einen Bereich -138/-111 des Transkriptionsstarts reguliert (Kozyrev *et al.*, 1999; Schrick *et al.*, 1999; Ahmad und Lingrel, 2005). Diese Region ist zwischen Maus und Mensch stark konserviert und ist essentiell für die Expression von *klf2*. Einige Faktoren die für die Expression von *klf2* in Makrophagen und Epithelzellen nötig sind wurden identifiziert. Hierzu gehören hnRNP-U und hnRNP-D (*heterogeneous ribonuclear protein*), PCAF (*p300/CBP-associated factor*) und CREB (*cAMP response element-binding*) (Ahmad und Lingrel, 2005; Huddleson *et al.*, 2005). Der Mechanismus der *klf2* Regulation in anderen Zelltypen bleibt unklar. Über hnRNP-Proteine ist wenig bekannt, sie regulieren möglicherweise das Spleißen von prä-mRNAs (Krecic und Swanson, 1999). Eine ähnliche Funktion zeigt das Zinkfingerprotein 638 (ZNF638 oder auch NP220). Die Rhophilin-1 Bindepartner Zytokeratin 15 (KRT15) und Fibulin-4 (EFEMP2) interagieren mit diesem nukleären DNA-bindenden Protein (Rual *et al.*, 2005). Es wird vermutet, dass ZNF638 genspezifische Veränderungen im Spleißen, welche durch gewebsspezifische oder entwicklungsabhängige Signale hervorgerufen werden, reguliert (Matsushima *et al.*, 1996). Die Eigenschaften des ZNF638 suggerieren einen möglichen Zusammenhang mit der Expressionsregulation von *klf2*.

4.2.6 Modell der *klf2* Expressionsregulation

Basierend auf unseren Ergebnissen lässt sich die Regulation der *klf2* Expression in dem in Abb. 4-1 dargestellten Modell zusammenfassen. Innerhalb der ersten Stunde einer bakteriellen Infektion kommt zu einer Induktion von *klf2*. Diese initiale *klf2*-Induktion stellt möglicherweise einen Regulationsmechanismus dar, der die Zelle vor einer übermäßigen inflammatorischen Antwort schützt. Über welche Signalkaskade die initiale *klf2*-Induktion erfolgt ist unklar. In Abwesenheit Rho-modifizierender Toxine wird diese Induktion im weiteren Verlauf der Infektion über RhoA und Rhophilin-1 supprimiert. Die anhaltende Induktion des Transkriptionsfaktors *klf2* über die Inhibierung von RhoA durch die bakteriellen Toxine YopT, ExoS oder C3 wird über das Rho-Effektorprotein Rhophilin-1 vermittelt und stellt einen neu beschriebenen Effekt dar. Der genaue Mechanismus der *klf2*-Suppression durch Rhophilin-1 muss weiter untersucht werden. Es ist möglich, dass Rhophilin-1 direkt an den Promotor bindet und dadurch die *klf2* Expression inhibiert, oder aber Rhophilin-1 greift in die Signalkaskade ein, die zur Induktion von *klf2* führt.

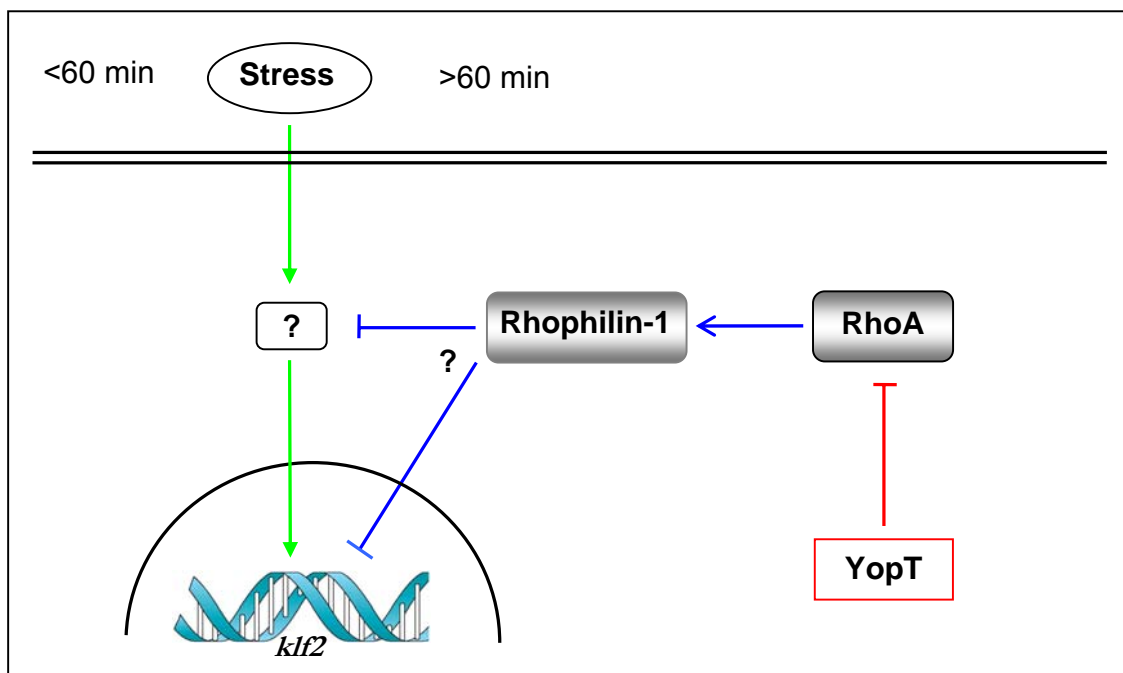


Abb. 4-1: Modell der *klf2* Regulation. Innerhalb der ersten Stunde der Infektion kommt es zur Induktion der *klf2* mRNA durch einen noch unbekanntem Mechanismus (grün). Im weiteren Verlauf wird diese Induktion über RhoA und Rhophilin-1 supprimiert (blau). Ob Rhpn-1 direkt an den *klf2* Promotor bindet oder ob es in die Signalkaskade eingreift die zur Induktion von *klf2* führt ist unklar. Diese Suppression wird durch die Wirkung von YopT auf RhoA verhindert (rot), wodurch es zu einer anhaltenden Induktion von *klf2* kommt.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die umfassende Charakterisierung der transkriptionellen Antwort von dendritischen Zellen auf eine Infektion mit *Yersinia enterocolitica*. Dabei konnte mit Hilfe von Mikroarray-Studien gezeigt werden, dass durch die Infektion mit Yersinien, die keine Virulenzproteine (*Yersinia Outer Proteins*, Yops) besitzen, ein sehr breites Spektrum an Genen differentiell exprimiert wird. Zusätzlich zu einer Induktion pro-inflammatorischer Gene kommt es auch zu einer Induktion pro-apoptotischer Gene. Neben diesem wahrscheinlich allgemein infektionsinduzierten Transkriptionsprogramm kommt es spezifisch durch die Translokation der *Yersinia*-Effektorproteine zu einer Suppression pro-inflammatorischer und anti-apoptotischer Gene. Darüber hinaus induziert die Translokation von Yops die Expression des inhibierenden Transkriptionsfaktors *klf2*. Diese Daten zeigen, dass eine Infektion mit virulenten, Yop-translozierenden Yersinien das Genexpressionsprofil der DCs auf zwei unterschiedlichen Wegen modifiziert: zum einen wird ein pro-inflammatorisches und anti-apoptotisches Genexpressionsprogramm supprimiert, zum anderen wird *klf2*, ein Transkriptionsfaktor mit inhibierender Funktion, induziert.

Darauf aufbauend wurden im Folgenden die Mechanismen, die der Yop-induzierten Induktion von *klf2* zugrunde liegen, näher charakterisiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Induktion von *klf2* in dendritischen Zellen YopT abhängig ist. Die durch YopT bedingten Umlagerungen des Aktinzytoskeletts konnten als Ursache für die Induktion von *klf2* ausgeschlossen werden. Darüber hinaus erfolgt die YopT-vermittelte *klf2*-Induktion unabhängig vom *Serum response factor* SRF und benötigt keine *de novo* Proteinsynthese. Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion von *klf2* über die YopT-vermittelte Hemmung von RhoA erfolgt und über das Rho-Effektorprotein Rhophilin-1 weiter vermittelt wird. Erstmals war es so möglich, eine neue Signaltransduktionskaskade von Rho-Proteinen mit inhibitorischer Wirkung auf die Genexpression zu charakterisieren.

6 Anhang

Tab. 6-1: Differenziell exprimierte Gene in dendritischen Zellen aus C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit *Yersinia enterocolitica*

Affymetrix ID	Name	Cluster
1451126_at	MAF1 homolog (yeast)	A
1424432_at	cDNA sequence BC016129	A
1439246_x_at	trinucleotide repeat containing 6	A
1423667_at	methionine adenosyltransferase II, alpha	A
1421077_at	SERTA domain containing 3	A
1448857_a_at	zinc finger, DHHC domain containing 12	A
1451232_at	CD151 antigen	A
1426679_at	RIKEN cDNA 3110006P09 gene	A
1426746_at	RIKEN cDNA 1810026J23 gene	A
1455128_x_at	trinucleotide repeat containing 6	A
1420965_a_at	ectodermal-neural cortex 1	A
1417406_at	SERTA domain containing 1	A
1426986_at	RIKEN cDNA 2810485I05 gene	A
1416187_s_at	proline-rich nuclear receptor coactivator 2	A
1425128_at	hypothetical protein MGC32391	A
1424987_at	RIKEN cDNA 5430435G22 gene	A
1437626_at	Brf2 gene, 3' UTR	A
1437537_at	caspase 9	A
1425557_x_at	delta sleep inducing peptide, immunoreactor	A
1424829_at	RIKEN cDNA A830007P12 gene	A
1425895_a_at	inhibitor of DNA binding 1	A
1420772_a_at	delta sleep inducing peptide, immunoreactor	A
1416630_at	inhibitor of DNA binding 3	A
1453851_a_at	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	A
1425281_a_at	delta sleep inducing peptide, immunoreactor	A
1416029_at	TGFB inducible early growth response 1	A
1415996_at	thioredoxin interacting protein	A
1450971_at	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	D
1419534_at	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	D
1427103_at	expressed sequence AI840980	D
1451264_at	RIKEN cDNA 4930488L10 gene	D
1418487_at	ankyrin repeat domain 3	D
1456005_a_at	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	D
1435449_at	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	D
1423315_at	Bcl-2 binding component 3	D
1419082_at	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 2	E
1418930_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	E
1419607_at	tumor necrosis factor	E
1421578_at	chemokine (C-C motif) ligand 4	E
1449399_a_at	interleukin 1 beta	E
1427381_at	immunoresponsive gene 1	E
1419149_at	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E, member 1	E
1422924_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	E

ANHANG

1427932_s_at	Mus musculus mVL30-1 retroelement mRNA sequence	E
1426276_at	RIKEN cDNA 9130009C22 gene	E
1417483_at	expressed sequence AA408868	E
1427736_a_at	chemokine (C-C motif) receptor-like 2	E
1415922_s_at	MARCKS-like protein	E
1426906_at	interferon activated gene 203	E
1452231_x_at	interferon activated gene 203	E
1416273_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	E
1452349_x_at	interferon activated gene 205	E
1421744_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4	E
1419858_at	Transcribed sequences	E
1424996_at	CDNA clone MGC:28609 IMAGE:4218551, complete cds	E
1451798_at	interleukin 1 receptor antagonist	E
1452348_s_at	interferon activated gene 205	E
1425687_at	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	E
1453238_s_at	RIKEN cDNA 3930401B19 gene	E
1433211_at	repetin	E
1420331_at	C-type (calcium dependent, carbohydrate recognition domain) lectin, superfamily member9	E
1417371_at	pellino 1	E
1420330_at	C-type (calcium dependent, carbohydrate recognition domain) lectin, superfamily member9	E
1419132_at	toll-like receptor 2	E
1417523_at	pleckstrin	E
1450165_at	schlafen 2	E
1426334_a_at	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	E
1448775_at	interferon activated gene 203	E
1438855_x_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	E
1449731_s_at	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	E
1448306_at	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	E
1448175_at	EH-domain containing 1	E
1417372_a_at	pellino 1	E
1425663_at	interleukin 1 receptor antagonist	E
1448748_at	pleckstrin	E
1416011_x_at	EH-domain containing 1	E
1423161_s_at	sprouty protein with EVH-1 domain 1, related sequence	E
1420088_at	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	E
1417268_at	CD14 antigen	E
1438606_a_at	chloride intracellular channel 4 (mitochondrial)	E
1451567_a_at	interferon activated gene 203	E
1423160_at	sprouty protein with EVH-1 domain 1, related sequence	E
1418580_at	RIKEN cDNA 5830458K16 gene	E
1431422_a_at	dual specificity phosphatase 14	E
1450957_a_at	sequestosome 1	E
1417263_at	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	B
1452519_a_at	zinc finger protein 36	B
1415899_at	Jun-B oncogene	B
1425666_at	zinc finger protein of the cerebellum 5	B
1417262_at	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	C
1419209_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	C

ANHANG

1450297_at	interleukin 6	C
1421473_at	interleukin 1 alpha	C
1417408_at	coagulation factor III	C
1450829_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	C
1419561_at	chemokine (C-C motif) ligand 3	C
1422305_at	interferon beta, fibroblast	C
1449984_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	C
1416576_at	suppressor of cytokine signaling 3	C
1425686_at	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	C
1422053_at	inhibin beta-A	C
1424339_at	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1	C
1448914_a_at	colony stimulating factor 1 (macrophage)	C
1425412_at	cold autoinflammatory syndrome 1 homolog (human)	C
1419530_at	interleukin 12b	C
1421065_at	Janus kinase 2	C
1455725_a_at	H3 histone, family 3B	C
1450173_at	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2	C
1451069_at	proviral integration site 3	C
1432426_a_at	RIKEN cDNA 2510010F15 gene	C
1423905_at	DNA segment, Chr 7, ERATO Doi 458, expressed	C
1448890_at	Kruppel-like factor 2 (lung)	

7 Literaturverzeichnis

- Aepfelbacher M. & Heesemann J. (2001) Modulation of Rho GTPases and the actin cytoskeleton by Yersinia outer proteins (Yops). *Int.J.Med.Microbiol.* **291**, 269-276.
- Aepfelbacher M., Trasak C., Wilharm G., Wiedemann A., Trülzsch K., Krauss K., Gierschik P., & Heesemann J. (2003) Characterization of YopT effects on Rho GTPases in Yersinia enterocolitica-infected cells. *J.Biol.Chem.* **278**, 33217-33223.
- Aepfelbacher M., Zumbühl R., Ruckdeschel K., Jacobi C.A., Barz C., & Heesemann J. (1999) The tranquilizing injection of Yersinia proteins: a pathogen's strategy to resist host defense. *Biol.Chem.* **380**, 795-802.
- Ahmad N. & Lingrel J.B. (2005) Kruppel-like factor 2 transcriptional regulation involves heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and acetyltransferases. *Biochemistry* **44**, 6276-6285.
- Aitsebaomo J., Kingsley-Kallesen M.L., Wu Y., Quertermous T., & Patterson C. (2001) Vezf1/DB1 is an endothelial cell-specific transcription factor that regulates expression of the endothelin-1 promoter. *J.Biol.Chem.* **276**, 39197-39205.
- Aitsebaomo J., Wennerberg K., Der C.J., Zhang C., Kedar V., Moser M., Kingsley-Kallesen M.L., Zeng G.Q., & Patterson C. (2004) p68RacGAP is a novel GTPase-activating protein that interacts with vascular endothelial zinc finger-1 and modulates endothelial cell capillary formation. *J.Biol.Chem.* **279**, 17963-17972.
- Aktories K. & Barbieri J.T. (2005) Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat.Rev.Microbiol.* **3**, 397-410.
- Aktories K., Schmidt G., & Just I. (2000) Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol.Chem.* **381**, 421-426.
- Alberts A.S., Bouquin N., Johnston L.H., & Treisman R. (1998) Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein beta subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *J.Biol.Chem.* **273**, 8616-8622.
- Aleksic S. & Bockemuhl J. (1990) [Microbiology and epidemiology of Yersinia infections]. *Immun.Infekt.* **18**, 178-185.
- 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**, 3325-3336.
- Alonso A., Bottini N., Bruckner S., Rahmouni S., Williams S., Schoenberger S.P., & Mustelin T. (2004) Lck dephosphorylation at Tyr-394 and inhibition of T cell antigen receptor signaling by Yersinia phosphatase YopH. *J.Biol.Chem.* **279**, 4922-4928.
- Anderson K.P., Kern C.B., Crable S.C., & Lingrel J.B. (1995) Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Kruppel-like factor: identification of a new multigene family. *Mol.Cell Biol.* **15**, 5957-5965.

- Andor A., Trülsch K., Essler M., Roggenkamp A., Wiedemann A., Heesemann J., & Aepfelbacher M. (2001) YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol.* **3**, 301-310.
- Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A., Botstein D., Butler H., Cherry J.M., Davis A.P., Dolinski K., Dwight S.S., Eppig J.T., Harris M.A., Hill D.P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J.C., Richardson J.E., Ringwald M., Rubin G.M., & Sherlock G. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat.Genet.* **25**, 25-29.
- Autenrieth I.B. & Firsching R. (1996) Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J Med.Microbiol.* **44**, 285-294.
- Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B., & Palucka K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* **18**, 767-811.
- Banerjee S.S., Feinberg M.W., Watanabe M., Gray S., Haspel R.L., Denking D.J., Kawahara R., Hauner H., & Jain M.K. (2003) The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J.Biol.Chem.* **278**, 2581-2584.
- Barbieri J.T., Riese M.J., & Aktories K. (2002) Bacterial toxins that modify the actin cytoskeleton. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **18**, 315-344.
- Barbieri J.T. & Sun J. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* **152**, 79-92.
- Barz C., Abahji T.N., Trülsch K., & Heesemann J. (2000) The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett.* **482**, 139-143.
- Bernard P., Kezdy K.E., Van Melder L., Steyaert J., Wyns L., Pato M.L., Higgins P.N., & Couturier M. (1993) The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J.Mol.Biol.* **234**, 534-541.
- Bernards A. & Settleman J. (2004) GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol.* **14**, 377-385.
- Bishop A.L. & Hall A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem.J.* **348 Pt 2**, 241-255.
- Black D.S., Montagna L.G., Zitsmann S., & Bliska J.B. (1998) Identification of an amino-terminal substrate-binding domain in the *Yersinia* tyrosine phosphatase that is required for efficient recognition of focal adhesion targets. *Mol.Microbiol.* **29**, 1263-1274.
- Black R.E., Jackson R.J., Tsai T., Medvesky M., Shayegani M., Feeley J.C., MacLeod K.I., & Wakelee A.M. (1978) Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *N.Engl.J Med.* **298**, 76-79.

- Boguski M.S. & McCormick F. (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**, 643-654.
- Bohn E., Muller S., Lauber J., Geffers R., Speer N., Spieth C., Krejci J., Manncke B., Buer J., Zell A., & Autenrieth I.B. (2004) Gene expression patterns of epithelial cells modulated by pathogenicity factors of *Yersinia enterocolitica*. *Cell Microbiol.* **6**, 129-141.
- Boland A. & Cornelis G.R. (1998) Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. *Infect.Immun.* **66**, 1878-1884.
- Boonstra A., Asselin-Paturel C., Gilliet M., Crain C., Trinchieri G., Liu Y.J., & O'Garra A. (2003) Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med.* **197**, 101-109.
- Bottone E.J. (1997) *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin.Microbiol.Rev.* **10**, 257-276.
- Bourne H.R., Sanders D.A., & McCormick F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**, 125-132.
- Braga V.M., Betson M., Li X., & Lamarche-Vane N. (2000) Activation of the small GTPase Rac is sufficient to disrupt cadherin-dependent cell-cell adhesion in normal human keratinocytes. *Mol.Biol.Cell* **11**, 3703-3721.
- Braunstein H., Tucker E.B., & Gibson B.C. (1971) Mesenteric lymphadenitis due to *Yersinia enterocolitica*: report of a case. *Am.J Clin.Pathol.* **55**, 506-510.
- Brembu T., Winge P., Bones A.M., & Yang Z. (2006) A RHOse by any other name: a comparative analysis of animal and plant Rho GTPases. *Cell Res.* **16**, 435-445.
- Brubaker R.R. (1972) The genus *Yersinia*: biochemistry and genetics of virulence. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **57**, 111-158.
- Brubaker R.R. (2003) Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to *Yersinia*: roles of Yops and LcrV (V antigen). *Infect.Immun.* **71**, 3673-3681.
- Buckley A.F., Kuo C.T., & Leiden J.M. (2001) Transcription factor LKLF is sufficient to program T cell quiescence via a c-Myc--dependent pathway. *Nat.Immunol.* **2**, 698-704.
- Butzler J.P., Alexander M., Segers A., Cremer N., & Blum D. (1978) Enteritis, abscess, and septicemia due to *Yersinia enterocolitica* in a child with thalassemia. *J Pediatr.* **93**, 619-621.
- Carter R.S., Pennington K.N., Ungurait B.J., Arrate P., & Ballard D.W. (2003) Signal-induced ubiquitination of I kappaB Kinase-beta. *J.Biol.Chem.* **278**, 48903-48906.
- Chardin P., Boquet P., Madaule P., Popoff M.R., Rubin E.J., & Gill D.M. (1989) The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *EMBO J.* **8**, 1087-1092.

LITERATURVERZEICHNIS

- Christerson L.B., Vanderbilt C.A., & Cobb M.H. (1999) MEKK1 interacts with alpha-actinin and localizes to stress fibers and focal adhesions. *Cell Motil.Cytoskeleton* **43**, 186-198.
- Clark K.A., McElhinny A.S., Beckerle M.C., & Gregorio C.C. (2002) Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **18**, 637-706.
- Cooper J.A. (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J.Cell Biol.* **105**, 1473-1478.
- Cooper M.A., Fehniger T.A., Ponnappan A., Mehta V., Wewers M.D., & Caligiuri M.A. (2001) Interleukin-1beta costimulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Eur.J Immunol.* **31**, 792-801.
- Cornelis G.R. (2002) Yersinia type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol.* **158**, 401-408.
- 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**, 1315-1352.
- Cover T.L. & Aber R.C. (1989) Yersinia enterocolitica. *N.Engl.J Med.* **321**, 16-24.
- Das H., Kumar A., Lin Z., Patino W.D., Hwang P.M., Feinberg M.W., Majumder P.K., & Jain M.K. (2006) Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates proinflammatory activation of monocytes. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A* **103**, 6653-6658.
- Davies S.P., Reddy H., Caivano M., & Cohen P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem.J* **351**, 95-105.
- Dekker R.J., van Soest S., Fontijn R.D., Salamanca S., de Groot P.G., VanBavel E., Pannekoek H., & Horrevoets A.J. (2002) Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2). *Blood* **100**, 1689-1698.
- Dukuzumuremyi J.M., Rosqvist R., Hallberg B., Akerstrom B., Wolf-Watz H., & Schesser K. (2000) The Yersinia protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J.Biol.Chem.* **275**, 35281-35290.
- Dvorsky R. & Ahmadian M.R. (2004) Always look on the bright site of Rho: structural implications for a conserved intermolecular interface. *EMBO Rep.* **5**, 1130-1136.
- Eisen M.B., Spellman P.T., Brown P.O., & Botstein D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 14863-14868.
- Erfurth S.E., Gröbner S., Kramer U., Gunst D.S., Soldanova I., Schaller M., Autenrieth I.B., & Borgmann S. (2004) Yersinia enterocolitica induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect.Immun.* **72**, 7045-7054.
- Etienne-Manneville S. & Hall A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.
- F Fiorentino D.F., Zlotnik A., Vieira P., Mosmann T.R., Howard M., Moore K.W., & O'Garra A. (1991) IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol.* **146**, 3444-3451.

- Flynn P., Mellor H., Palmer R., Panayotou G., & Parker P.J. (1998) Multiple interactions of PRK1 with RhoA. Functional assignment of the Hr1 repeat motif. *J.Biol.Chem.* **273**, 2698-2705.
- 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.
- Fu Y. & Galan J.E. (1999) A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* **401**, 293-297.
- Fujita A., Nakamura K., Kato T., Watanabe N., Ishizaki T., Kimura K., Mizoguchi A., & Narumiya S. (2000) Ropporin, a sperm-specific binding protein of rhophilin, that is localized in the fibrous sheath of sperm flagella. *J.Cell Sci.* **113 (Pt 1)**, 103-112.
- Gachet Y., Tournier S., Millar J.B., & Hyams J.S. (2001) A MAP kinase-dependent actin checkpoint ensures proper spindle orientation in fission yeast. *Nature* **412**, 352-355.
- Galyov E.E., Hakansson S., Forsberg A., & Wolf-Watz H. (1993) A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**, 730-732.
- Gineitis D. & Treisman R. (2001) Differential usage of signal transduction pathways defines two types of serum response factor target gene. *J Biol.Chem.* **276**, 24531-24539.
- Glynn R., Ghandour G., Rayner J., Mack D.H., & Goodnow C.C. (2000) B-lymphocyte quiescence, tolerance and activation as viewed by global gene expression profiling on microarrays. *Immunol.Rev.* **176**, 216-246.
- Goehring U.M., Schmidt G., Pederson K.J., Aktories K., & Barbieri J.T. (1999) The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol.Chem.* **274**, 36369-36372.
- Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., & Nairn R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen.Virol.* **36**, 59-74.
- Grant S.G., Jessee J., Bloom F.R., & Hanahan D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 4645-4649.
- Gröbner S., Adkins I., Schulz S., Richter K., Borgmann S., Wesselborg S., Ruckdeschel K., Micheau O., & Autenrieth I.B. (2007) Catalytically active *Yersinia* outer protein P induces cleavage of RIP and caspase-8 at the level of the DISC independently of death receptors in dendritic cells. *Apoptosis.* **12**, 1813-1825.
- Grosdent N., Maridonneau-Parini I., Sory M.P., & Cornelis G.R. (2002) Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect.Immun.* **70**, 4165-4176.
- Grutzkau A., Hanski C., Hahn H., & Riecken E.O. (1990) Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* **31**, 1011-1015.

- Guan K.L. & Dixon J.E. (1990) Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* **249**, 553-556.
- 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**, 4294-4303.
- Hall A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514.
- Han J., Flemington C., Houghton A.B., Gu Z., Zambetti G.P., Lutz R.J., Zhu L., & Chittenden T. (2001) Expression of *bbc3*, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A* **98**, 11318-11323.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**, 557-580.
- Hardt W.D., Chen L.M., Schuebel K.E., Bustelo X.R., & Galan J.E. (1998) *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**, 815-826.
- Hartenstein B., Teurich S., Hess J., Schenkel J., Schorpp-Kistner M., & Angel P. (2002) Th2 cell-specific cytokine expression and allergen-induced airway inflammation depend on JunB. *EMBO J* **21**, 6321-6329.
- Heesemann J. (1994) *Die Gattung Yersinia, Yersiniosen.*, Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. 7. Auflage. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York.
- Heesemann J. & Laufs R. (1983) Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J.Bacteriol.* **155**, 761-767.
- Hill C.S., Wynne J., & Treisman R. (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**, 1159-1170.
- Hoffmann C. & Schmidt G. (2004) CNF and DNT. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* **152**, 49-63.
- Hoffmann R., van Erp K., Trülzsch K., & Heesemann J. (2004) Transcriptional responses of murine macrophages to infection with *Yersinia enterocolitica*. *Cell Microbiol.* **6**, 377-390.
- Hogan J.C. & Stephens J.M. (2001) The identification and characterization of a STAT 1 binding site in the PPARgamma2 promoter. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **287**, 484-492.
- Hoiseth S.K. & Stocker B.A. (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**, 238-239.
- Holmstrom A., Olsson J., Cherepanov P., Maier E., Nordfelth R., Pettersson J., Benz R., Wolf-Watz H., & Forsberg A. (2001) LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol.Microbiol.* **39**, 620-632.

- Hotta K., Tanaka K., Mino A., Kohno H., & Takai Y. (1996) Interaction of the Rho family small G proteins with kinectin, an anchoring protein of kinesin motor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **225**, 69-74.
- Houssiau F.A., Coulie P.G., & Van Snick J. (1989) Distinct roles of IL-1 and IL-6 in human T cell activation. *J Immunol.* **143**, 2520-2524.
- Hsu L.C., Park J.M., Zhang K., Luo J.L., Maeda S., Kaufman R.J., Eckmann L., Guiney D.G., & Karin M. (2004) The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature* **428**, 341-345.
- Huddleson J.P., Ahmad N., & Lingrel J.B. (2006) Up-regulation of the KLF2 transcription factor by fluid shear stress requires nucleolin. *J.Biol.Chem.* **281**, 15121-15128.
- Huddleson J.P., Ahmad N., Srinivasan S., & Lingrel J.B. (2005) Induction of KLF2 by fluid shear stress requires a novel promoter element activated by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent chromatin-remodeling pathway. *J Biol.Chem.* **280**, 23371-23379.
- Hueck C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**, 379-433.
- Iriarte M. & Cornelis G.R. (1996) Molecular determinants of Yersinia pathogenesis. *Microbiologia* **12**, 267-280.
- Iriarte M. & Cornelis G.R. (1998) YopT, a new Yersinia Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol.Microbiol.* **29**, 915-929.
- Jackson C.L. & Casanova J.E. (2000) Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol.* **10**, 60-67.
- Jenner R.G. & Young R.A. (2005) Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat.Rev.Microbiol.* **3**, 281-294.
- Johansen F.E. & Prywes R. (1995) Serum response factor: transcriptional regulation of genes induced by growth factors and differentiation. *Biochim.Biophys.Acta* **1242**, 1-10.
- Juris S.J., Rudolph A.E., Huddler D., Orth K., & Dixon J.E. (2000) A distinctive role for the Yersinia protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 9431-9436.
- Kaczynski J., Cook T., & Urrutia R. (2003) Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol.* **4**, 206.
- Kampik D., Schulte R., & Autenrieth I.B. (2000) Yersinia enterocolitica invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in Yersinia infections. *Infect.Immun.* **68**, 2484-2492.

- Karasuyama H. & Melchers F. (1988) Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur.J.Immunol.* **18**, 97-104.
- Kataoka T. (2005) The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev.Immunol.* **25**, 31-58.
- Korioth F., Gieffers C., Maul G.G., & Frey J. (1995) Molecular characterization of NDP52, a novel protein of the nuclear domain 10, which is redistributed upon virus infection and interferon treatment. *J Cell Biol.* **130**, 1-13.
- Kozyrev S.V., Hansen L.L., Poltarau A.B., Domninsky D.A., & Kisselev L.L. (1999) Structure of the human CpG-island-containing lung Kruppel-like factor (LKLF) gene and its location in chromosome 19p13.11-13 locus. *FEBS Lett.* **448**, 149-152.
- Krall R., Sun J., Pederson K.J., & Barbieri J.T. (2002) In vivo rho GTPase-activating protein activity of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoS. *Infect.Immun.* **70**, 360-367.
- Krecic A.M. & Swanson M.S. (1999) hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**, 363-371.
- Kuo C.T., Veselits M.L., Barton K.P., Lu M.M., Clendenin C., & Leiden J.M. (1997a) The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis. *Genes Dev.* **11**, 2996-3006.
- Kuo C.T., Veselits M.L., & Leiden J.M. (1997b) LKLF: A transcriptional regulator of single-positive T cell quiescence and survival. *Science* **277**, 1986-1990.
- Kustermans G., El Benna J., Piette J., & Legrand-Poels S. (2005) Perturbation of actin dynamics induces NF-kappaB activation in myelomonocytic cells through an NADPH oxidase-dependent pathway. *Biochem.J.* **387**, 531-540.
- Lai J.M., Wu S., Huang D.Y., & Chang Z.F. (2002) Cytosolic retention of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase and a Rho-associated kinase-mediated signal impair expression of p21(Cip1/Waf1) in phorbol 12-myristate-13- acetate-induced apoptotic cells. *Mol.Cell Biol.* **22**, 7581-7592.
- Lenz T., Schulte K.L., & Meyer-Sabellek W. (1984) *Yersinia enterocolitica* septicemia during long-term immunosuppressive treatment. *J Infect.Dis.* **150**, 963.
- Lerm M., Schmidt G., & Aktories K. (2000) Bacterial protein toxins targeting rho GTPases. *FEMS Microbiol.Lett.* **188**, 1-6.
- 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.
- Leverkus M., Walczak H., McLellan A., Fries H.W., Terbeck G., Brocker E.B., & Kampgen E. (2000) Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein and concomitant down-regulation of death ligand-mediated apoptosis. *Blood* **96**, 2628-2631.

- Li C. & Wong W.H. (2001) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 31-36.
- Lin Y., Ryan J., Lewis J., Wani M.A., Lingrel J.B., & Liu Z.G. (2003) TRAF2 exerts its antiapoptotic effect by regulating the expression of Kruppel-like factor LKLF. *Mol.Cell Biol.* **23**, 5849-5856.
- Lin Z., Hamik A., Jain R., Kumar A., & Jain M.K. (2006) Kruppel-like factor 2 inhibits protease activated receptor-1 expression and thrombin-mediated endothelial activation. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **26**, 1185-1189.
- Little C.C. & Bagg H.J. (1924) The occurrence of four inheritable morphological variations in mice and their possible relation to treatment with X-rays. *J Exp Zool* **41**, 45-92.
- Liu C.A., Wang M.J., Chi C.W., Wu C.W., & Chen J.Y. (2004) Rho/Rhotekin-mediated NF-kappaB activation confers resistance to apoptosis. *Oncogene* **23**, 8731-8742.
- Liu G., Loraine A.E., Shigeta R., Cline M., Cheng J., Valmeekam V., Sun S., Kulp D., & Siani-Rose M.A. (2003) NetAffx: Affymetrix probesets and annotations. *Nucleic Acids Res.* **31**, 82-86.
- Lockhart D.J. & Winzeler E.A. (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**, 827-836.
- Lomberk G. & Urrutia R. (2005) The family feud: turning off Sp1 by Sp1-like KLF proteins. *Biochem.J.* **392**, 1-11.
- Luhtala N. & Odorizzi G. (2004) Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J.Cell Biol.* **166**, 717-729.
- Lutz M.B., Kukutsch N., Ogilvie A.L., Rossner S., Koch F., Romani N., & Schuler G. (1999) An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J.Immunol.Methods* **223**, 77-92.
- Mack C.P., Somlyo A.V., Hautmann M., Somlyo A.P., & Owens G.K. (2001) Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. *J Biol.Chem.* **276**, 341-347.
- Madaule P., Eda M., Watanabe N., Fujisawa K., Matsuoka T., Bito H., Ishizaki T., & Narumiya S. (1998) Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature* **394**, 491-494.
- Mansell A., Brint E., Gould J.A., O'Neill L.A., & Hertzog P.J. (2004) Mal interacts with tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 to mediate NF-kappaB activation by toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *J Biol.Chem.* **279**, 37227-37230.
- Marmur J., Anderson W.F., Matthews L., Berns K., Gajewska E., Lane D., & Doty P. (1961) The effects of ultraviolet light on the biological and physical chemical properties of deoxyribonucleic acids. *J.Cell Comp Physiol* **58(3)Pt 2**, 33-55.

- Matozaki T., Nakanishi H., & Takai Y. (2000) Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades. *Cell Signal.* **12**, 515-524.
- Matsushima Y., Ohshima M., Sonoda M., & Kitagawa Y. (1996) A family of novel DNA-binding nuclear proteins having polypyrimidine tract-binding motif and arginine/serine-rich motif. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **223**, 427-433.
- Maul G.G., Negorev D., Bell P., & Ishov A.M. (2000) Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct.Biol.* **129**, 278-287.
- May R.C. & Machesky L.M. (2001) Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J.Cell Sci.* **114**, 1061-1077.
- McDonald C., Vacratsis P.O., Bliska J.B., & Dixon J.E. (2003) The yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J.Biol.Chem.* **278**, 18514-18523.
- Meylan E., Tschopp J., & Karin M. (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* **442**, 39-44.
- Michaelson D., Ali W., Chiu V.K., Bergo M., Silletti J., Wright L., Young S.G., & Philips M. (2005) Postprenylation CAAX processing is required for proper localization of Ras but not Rho GTPases. *Mol.Biol.Cell* **16**, 1606-1616.
- Michaelson D., Silletti J., Murphy G., D'Eustachio P., Rush M., & Philips M.R. (2001) Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J.Cell Biol.* **152**, 111-126.
- Miralles F., Posern G., Zaromytidou A.I., & Treisman R. (2003) Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* **113**, 329-342.
- Mircescu H., Steuve S., Savonet V., Degraef C., Mellor H., Dumont J.E., Maenhaut C., & Pirson I. (2002) Identification and characterization of a novel activated RhoB binding protein containing a PDZ domain whose expression is specifically modulated in thyroid cells by cAMP. *Eur.J.Biochem.* **269**, 6241-6249.
- Mitani H., Katayama N., Araki H., Ohishi K., Kobayashi K., Suzuki H., Nishii K., Masuya M., Yasukawa K., Minami N., & Shiku H. (2000) Activity of interleukin 6 in the differentiation of monocytes to macrophages and dendritic cells. *Br.J Haematol.* **109**, 288-295.
- Moore M.S. (1998) Ran and nuclear transport. *J.Biol.Chem.* **273**, 22857-22860.
- Mukai H. (2003) The structure and function of PKN, a protein kinase having a catalytic domain homologous to that of PKC. *J.Biochem.(Tokyo)* **133**, 17-27.
- Mukherjee S., Keitany G., Li Y., Wang Y., Ball H.L., Goldsmith E.J., & Orth K. (2006) Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* **312**, 1211-1214.

- Nakamura K., Fujita A., Murata T., Watanabe G., Mori C., Fujita J., Watanabe N., Ishizaki T., Yoshida O., & Narumiya S. (1999) Rho-phillin, a small GTPase Rho-binding protein, is abundantly expressed in the mouse testis and localized in the principal piece of the sperm tail. *FEBS Lett.* **445**, 9-13.
- Narumiya S. (1996) The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J.Biochem.(Tokyo)* **120**, 215-228.
- Narumiya S. & Morii N. (1993) rho gene products, botulinum C3 exoenzyme and cell adhesion. *Cell Signal.* **5**, 9-19.
- Negorev D. & Maul G.G. (2001) Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene* **20**, 7234-7242.
- Neyt C. & Cornelis G.R. (1999) Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol.Microbiol.* **33**, 971-981.
- Nie Z., Hirsch D.S., & Randazzo P.A. (2003) Arf and its many interactors. *Curr.Opin.Cell Biol.* **15**, 396-404.
- Nobes C.D. & Hall A. (1995) Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem.Soc.Trans.* **23**, 456-459.
- Olson M.F., Paterson H.F., & Marshall C.J. (1998) Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature* **394**, 295-299.
- Orth K. (2002) Function of the *Yersinia* effector YopJ. *Curr.Opin.Microbiol.* **5**, 38-43.
- 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 superfamily by a *Yersinia* effector. *Science* **285**, 1920-1923.
- Orth K., Xu Z., Mudgett M.B., Bao Z.Q., Palmer L.E., Bliska J.B., Mangel W.F., Staskawicz B., & Dixon J.E. (2000) Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* **290**, 1594-1597.
- Pandit S.B. & Srinivasan N. (2003) Survey for G-proteins in the prokaryotic genomes: prediction of functional roles based on classification. *Proteins* **52**, 585-597.
- Pawel-Rammingen U., Telepnev M.V., Schmidt G., Aktories K., Wolf-Watz H., & Rosqvist R. (2000) GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol.Microbiol.* **36**, 737-748.
- Peck J.W., Oberst M., Bouker K.B., Bowden E., & Burbelo P.D. (2002) The RhoA-binding protein, rho-phillin-2, regulates actin cytoskeleton organization. *J.Biol.Chem.* **277**, 43924-43932.
- Perry R.D. & Fetherston J.D. (1997) *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin.Microbiol.Rev.* **10**, 35-66.

- Persson C., Carballeira N., Wolf-Watz H., & Fallman M. (1997) The PTPase YopH inhibits uptake of Yersinia, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J.* **16**, 2307-2318.
- Philipsen S. & Suske G. (1999) A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2991-3000.
- Pike B.L. & Nossal G.J. (1985) Interleukin 1 can act as a B-cell growth and differentiation factor. *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A* **82**, 8153-8157.
- Portnoy D.A. & Falkow S. (1981) Virulence-associated plasmids from Yersinia enterocolitica and Yersinia pestis. *J Bacteriol.* **148**, 877-883.
- Potter M. (1985) History of the BALB/c family. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **122**, 1-5.
- Putzker M., Sauer H., & Sobe D. (2001) Plague and other human infections caused by Yersinia species. *Clin.Lab* **47**, 453-466.
- Regad T. & Chelbi-Alix M.K. (2001) Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene* **20**, 7274-7286.
- Reid T., Furuyashiki T., Ishizaki T., Watanabe G., Watanabe N., Fujisawa K., Morii N., Madaule P., & Narumiya S. (1996) Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J.Biol.Chem.* **271**, 13556-13560.
- Ridley A.J. (2001) Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* **11**, 471-477.
- Ridley A.J. & Hall A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399.
- Riento K. & Ridley A.J. (2003) Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **4**, 446-456.
- Rikke B.A., Zhao Y., Daggett L.P., Reyes R., & Hardies S.C. (1995) Mus spretus LINE-1 sequences detected in the Mus musculus inbred strain C57BL/6J using LINE-1 DNA probes. *Genetics* **139**, 901-906.
- Rosette C. & Karin M. (1995) Cytoskeletal control of gene expression: depolymerization of microtubules activates NF-kappa B. *J Cell Biol.* **128**, 1111-1119.
- Rosqvist R., Forsberg A., & Wolf-Watz H. (1991) Intracellular targeting of the Yersinia YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect.Immun.* **59**, 4562-4569.
- Rual J.F., Venkatesan K., Hao T., Hirozane-Kishikawa T., Dricot A., Li N., Berriz G.F., Gibbons F.D., Dreze M., Ayivi-Guedehoussou N., Klitgord N., Simon C., Boxem M., Milstein S., Rosenberg J., Goldberg D.S., Zhang L.V., Wong S.L., Franklin G., Li S., Albala J.S., Lim J., Fraughton C., Llamosas E., Cevik S., Bex C., Lamesch P., Sikorski R.S., Vandenhaute J., Zoghbi H.Y., Smolyar A., Bosak S., Sequerra R., Doucette-Stamm L., Cusick M.E., Hill D.E.,

- Roth F.P., & Vidal M. (2005) Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* **437**, 1173-1178.
- Ruckdeschel K., Harb S., Roggenkamp A., Hornef M., Zumbihl R., Kohler S., Heesemann J., & Rouot B. (1998) *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J.Exp.Med.* **187**, 1069-1079.
- Ruckdeschel K., Machold J., Roggenkamp A., Schubert S., Pierre J., Zumbihl R., Liautard J.P., Heesemann J., & Rouot B. (1997a) *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-alpha production. *J.Biol.Chem.* **272**, 15920-15927.
- Ruckdeschel K., Roggenkamp A., Lafont V., Mangeat P., Heesemann J., & Rouot B. (1997b) Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. *Infect.Immun.* **65**, 4813-4821.
- Russmann H., Igwe E.I., Sauer J., Hardt W.D., Bubert A., & Geginat G. (2001) Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant *Salmonella* expressing hybrid *Yersinia* type III proteins. *J.Immunol.* **167**, 357-365.
- Sanford K.K., Earle R.R., & Likely G.D. (1948) The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J Natl Cancer Inst* **9**, 229-246.
- Satthaporn S. & Eremin O. (2001) Dendritic cells (I): Biological functions. *J R.Coll.Surg.Edinb.* **46**, 9-19.
- Sauvonnet N., Lambermont I., van der B.P., & Cornelis G.R. (2002a) 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.
- Sauvonnet N., Pradet-Balade B., Garcia-Sanz J.A., & Cornelis G.R. (2002b) Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors. *J.Biol.Chem.* **277**, 25133-25142.
- Schmidt A. & Hall A. (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* **16**, 1587-1609.
- Schober S.L., Kuo C.T., Schluns K.S., Lefrancois L., Leiden J.M., & Jameson S.C. (1999) Expression of the transcription factor lung Kruppel-like factor is regulated by cytokines and correlates with survival of memory T cells in vitro and in vivo. *J.Immunol.* **163**, 3662-3667.
- Schoppet M., Bubert A., & Huppertz H.I. (2000) Dendritic cell function is perturbed by *Yersinia enterocolitica* infection in vitro. *Clin.Exp Immunol.* **122**, 316-323.
- Schotte P., Denecker G., Van Den B.A., Vandenabeele P., Cornelis G.R., & Beyaert R. (2004) Targeting Rac1 by the *Yersinia* effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta. *J.Biol.Chem.* **279**, 25134-25142.

- Schrack J.J., Hughes M.J., Anderson K.P., Croyle M.L., & Lingrel J.B. (1999) Characterization of the lung Kruppel-like transcription factor gene and upstream regulatory elements. *Gene* **236**, 185-195.
- Sen-Banerjee S., Mir S., Lin Z., Hamik A., Atkins G.B., Das H., Banerjee P., Kumar A., & Jain M.K. (2005) Kruppel-like factor 2 as a novel mediator of statin effects in endothelial cells. *Circulation* **112**, 720-726.
- SenBanerjee S., Lin Z., Atkins G.B., Greif D.M., Rao R.M., Kumar A., Feinberg M.W., Chen Z., Simon D.I., Lusinskas F.W., Michel T.M., Gimbrone M.A., Jr., Garcia-Cardena G., & Jain M.K. (2004) KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *J.Exp.Med.* **199**, 1305-1315.
- Settleman J. (2003) A nuclear MAL-function links Rho to SRF. *Mol.Cell* **11**, 1121-1123.
- Shao F. & Dixon J.E. (2003) YopT is a cysteine protease cleaving Rho family GTPases. *Adv.Exp Med.Biol.* **529**, 79-84.
- Shao F., Merritt P.M., Bao Z., Innes R.W., & Dixon J.E. (2002) A Yersinia effector and a Pseudomonas avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* **109**, 575-588.
- Shayegani M., DeForge I., McGlynn D.M., & Root T. (1981) Characteristics of Yersinia enterocolitica and related species isolated from human, animal, and environmental sources. *J Clin.Microbiol.* **14**, 304-312.
- Sheng M. & Sala C. (2001) PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu.Rev.Neurosci.* **24**, 1-29.
- Shimada A., Nyitrai M., Vetter I.R., Kuhlmann D., Bugyi B., Narumiya S., Geeves M.A., & Wittinghofer A. (2004) The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Mol.Cell* **13**, 511-522.
- Shtil A.A., Mandlekar S., Yu R., Walter R.J., Hagen K., Tan T.H., Roninson I.B., & Kong A.N. (1999) Differential regulation of mitogen-activated protein kinases by microtubule-binding agents in human breast cancer cells. *Oncogene* **18**, 377-384.
- Siderovski D.P. & Willard F.S. (2005) The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int.J.Biol.Sci.* **1**, 51-66.
- Simonet M., Richard S., & Berche P. (1990) Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of Yersinia pseudotuberculosis harboring the pYV plasmid. *Infect.Immun.* **58**, 841-845.
- Sing A., Rost D., Tvardovskaia N., Roggenkamp A., Wiedemann A., Kirschning C.J., Aepfelbacher M., & Heesemann J. (2002) Yersinia V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp Med.* **196**, 1017-1024.
- Skrzypek E., Cowan C., & Straley S.C. (1998) Targeting of the Yersinia pestis YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol.Microbiol.* **30**, 1051-1065.

- Sotiropoulos A., Gineitis D., Copeland J., & Treisman R. (1999) Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* **98**, 159-169.
- Spector I., Shochet N.R., Kashman Y., & Groweiss A. (1983) Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* **219**, 493-495.
- Steinman R.M. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu.Rev.Immunol.* **9**, 271-296.
- Steuve S., Devosse T., Lauwers E., Vanderwinden J.M., Andre B., Courtoy P.J., & Pirson I. (2006) Rhophilin-2 is targeted to late-endosomal structures of the vesicular machinery in the presence of activated RhoB. *Exp.Cell Res.* **312**, 3981-3989.
- Sun J. & Barbieri J.T. (2004) ExoS Rho GTPase-activating protein activity stimulates reorganization of the actin cytoskeleton through Rho GTPase guanine nucleotide disassociation inhibitor. *J.Biol.Chem.* **279**, 42936-42944.
- Surks H.K., Riddick N., & Ohtani K. (2005) M-RIP targets myosin phosphatase to stress fibers to regulate myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *J Biol.Chem.* **280**, 42543-42551.
- Takai Y., Sasaki T., & Matozaki T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* **81**, 153-208.
- Takeda K., Kaisho T., Yoshida N., Takeda J., Kishimoto T., & Akira S. (1998) Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol.* **161**, 4652-4660.
- Teague T.K., Marrack P., Kappler J.W., & Vella A.T. (1997) IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *J Immunol.* **158**, 5791-5796.
- Trülsch K., Geginat G., Sporleder T., Ruckdeschel K., Hoffmann R., Heesemann J., & Russmann H. (2005) Yersinia outer protein P inhibits CD8 T cell priming in the mouse infection model. *J Immunol.* **174**, 4244-4251.
- Trülsch K., Roggenkamp A., Aepfelbacher M., Wilharm G., Ruckdeschel K., & Heesemann J. (2003) Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of Yersinia enterocolitica. *Int.J.Med.Microbiol.* **293**, 167-177.
- Trülsch K., Sporleder T., Igwe E.I., Russmann H., & Heesemann J. (2004) Contribution of the major secreted yops of Yersinia enterocolitica O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect.Immun.* **72**, 5227-5234.
- Tusher V.G., Tibshirani R., & Chu G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 5116-5121.
- van Erp K., Dach K., Koch I., Heesemann J., & Hoffmann R. (2006) Role of strain differences on host resistance and the transcriptional response of macrophages to infection with Yersinia enterocolitica. *Physiol Genomics* **25**, 75-84.

- Viboud G.I., So S.S., Ryndak M.B., & Bliska J.B. (2003) Proinflammatory signalling stimulated by the type III translocation factor YopB is counteracted by multiple effectors in epithelial cells infected with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol.Microbiol.* **47**, 1305-1315.
- Vignal E., Blangy A., Martin M., Gauthier-Rouviere C., & Fort P. (2001) Kinectin is a key effector of RhoG microtubule-dependent cellular activity. *Mol.Cell Biol.* **21**, 8022-8034.
- Vojtek A.B. & Der C.J. (1998) Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J.Biol.Chem.* **273**, 19925-19928.
- Von Pawel-Rammingen U., Telepnev M.V., Schmidt G., Aktories K., Wolf-Watz H., & Rosqvist R. (2000) GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol Microbiol* **36**, 737-48.
- Walker S.J. & Brown H.A. (2002) Specificity of Rho insert-mediated activation of phospholipase D1. *J Biol.Chem.* **277**, 26260-26267.
- Waller B.J. & Alberts A.S. (2003) The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **13**, 435-446.
- Wang P., Anderson P.O., Chen S., Paulsson K.M., Sjogren H.O., & Li S. (2001) Inhibition of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB in CD4 T cells by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. *Int.Immunopharmacol.* **1**, 803-812.
- Wani M.A., Conkright M.D., Jeffries S., Hughes M.J., & Lingrel J.B. (1999a) cDNA isolation, genomic structure, regulation, and chromosomal localization of human lung Kruppel-like factor. *Genomics* **60**, 78-86.
- Wani M.A., Means R.T., Jr., & Lingrel J.B. (1998) Loss of LKLF function results in embryonic lethality in mice. *Transgenic Res.* **7**, 229-238.
- Wani M.A., Wert S.E., & Lingrel J.B. (1999b) Lung Kruppel-like factor, a zinc finger transcription factor, is essential for normal lung development. *J.Biol.Chem.* **274**, 21180-21185.
- Watanabe G., Saito Y., Madaule P., Ishizaki T., Fujisawa K., Morii N., Mukai H., Ono Y., Kakizuka A., & Narumiya S. (1996) Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhophilin as targets of small GTPase Rho. *Science* **271**, 645-648.
- Wennerberg K., Rossman K.L., & Der C.J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *J.Cell Sci.* **118**, 843-846.
- Werling D. & Jungi T.W. (2003) TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **91**, 1-12.
- Wilde C., Chhatwal G.S., Schmalzing G., Aktories K., & Just I. (2001) A novel C3-like ADP-ribosyltransferase from *Staphylococcus aureus* modifying RhoE and Rnd3. *J.Biol.Chem.* **276**, 9537-9542.
- Wittmann T. & Waterman-Storer C.M. (2001) Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J.Cell Sci.* **114**, 3795-3803.

- Woestyn S., Allaoui A., Wattiau P., & Cornelis G.R. (1994) YscN, the putative energizer of the Yersinia Yop secretion machinery. *J Bacteriol.* **176**, 1561-1569.
- Wong K.W. & Isberg R.R. (2005) Yersinia pseudotuberculosis spatially controls activation and misregulation of host cell Rac1. *PLoS.Pathog.* **1**, e16.
- Yao T., Meccas J., Healy J.I., Falkow S., & Chien Y. (1999) Suppression of T and B lymphocyte activation by a Yersinia pseudotuberculosis virulence factor, yopH. *J.Exp.Med.* **190**, 1343-1350.
- Yoo J., Ghiassi M., Jirmanova L., Balliet A.G., Hoffman B., Fornace A.J., Jr., Liebermann D.A., Bottinger E.P., & Roberts A.B. (2003) Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. *J Biol.Chem.* **278**, 43001-43007.
- Zapata J.M., Pawlowski K., Haas E., Ware C.F., Godzik A., & Reed J.C. (2001) A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. *J.Biol.Chem.* **276**, 24242-24252.
- Zerial M. & McBride H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**, 107-117.
- Zhang Y. & Bliska J.B. (2003) Role of Toll-like receptor signaling in the apoptotic response of macrophages to Yersinia infection. *Infect.Immun.* **71**, 1513-1519.
- Zhang Y. & Bliska J.B. (2005) Role of macrophage apoptosis in the pathogenesis of Yersinia. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **289**, 151-173.
- Zhong J. & Kyriakis J.M. (2007) Dissection of a signaling pathway by which pathogen-associated molecular patterns recruit the JNK and p38 MAPKs and trigger cytokine release. *J Biol.Chem.* **282**, 24246-24254.
- Zhou H., Monack D.M., Kayagaki N., Wertz I., Yin J., Wolf B., & Dixit V.M. (2005) Yersinia virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF-kappa B activation. *J.Exp.Med.* **202**, 1327-1332.
- Zumbihl R., Aepfelbacher M., Andor A., Jacobi C.A., Ruckdeschel K., Rouot B., & Heesemann J. (1999) The cytotoxin YopT of Yersinia enterocolitica induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J.Biol.Chem.* **274**, 29289-29293.

Danksagung

Bei meinem Betreuer Dr. Reinhard Hoffmann möchte ich mich für die Bereitstellung des Themas und für die wissenschaftliche Betreuung auch nach seinem Umzug an die TU bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Heesemann für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit am Lehrstuhl für Bakteriologie des Max von Pettenkofer-Institutes.

Herrn Prof. Dr. Overmann danke ich für die externe Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

Herzlichen Dank an Prof. Dr. Schleicher für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein Dankeschön an alle ehemaligen und jetzigen Lab-Mädels aus dem 2. und 4. Stock, Andrea, Bettina, Brigitte, Isabel, Kathrin, Katrin und Moni für den Spaß in und außerhalb des Institutes.

Außerdem ein riesiger Dank an Andrea, Beate, Kay und vor allem Kristina für ihre Freundschaft und die moralische Unterstützung während dieser Arbeit.

Ich danke ganz besonders meinen Eltern und meiner Familie für einfach alles, was sie für mich getan haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Kristina Dach
Geburtsdatum	11.07.1977
Geburtsort	Frankenthal

Schul Ausbildung

1983-1985	Grundschule Frankenthal
1985-1987	Grundschule Pegnitz
1987-1996	Gymnasium Pegnitz

Hochschulstudium

10/1996 – 06/2003	Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
08/2002 – 06/2003	Diplomarbeit am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg Betreuung durch PD Dr. Ulrich Dobrindt Thema: Untersuchungen zum Einfluss von Therapeutika auf die Genexpression uropathogener <i>Escherichia coli</i>
08/2000 - 05/2001	Auslandsstudium an der University of Texas at Austin, USA

Promotion

01/2004 – 01/2008	Promotion am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München Betreuung durch PD Dr. Reinhard Hoffmann Thema: Expressionsregulation des Transkriptionsfaktors KLF2 durch bakterielle Toxine
-------------------	--

München, _____