

Aus dem Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie
Der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand:

Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

mRNA-Induktion des inaktivierenden Transkriptionsfaktors
klf2
durch bakterielle Pathogene

Dissertation

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

vorgelegt von

Josip Zovko

aus

München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Beuers
Prof. Dr. Maximilian Stehr

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv.-Doz. Dr. med. Reinhard Hoffmann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2009

Meiner Familie

*Der erste Schluck aus dem Becher der Natur
führt zum Atheismus,
aber auf dem Grund wartet Gott.*

Werner Heisenberg

I.	Einleitung	10
1.	Die Gattung <i>Yersinia</i>	10
1.1	<i>Yersinia pestis</i>	10
1.2	<i>Yersinia enterocolitica</i> und <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	11
2.	Virulenzfaktoren von <i>Yersinia</i>	12
2.1	T3SS (Typ-3-Sekretionssystem)	12
2.2	<i>Yersinia</i> Effektorproteine	13
2.2.1	YopH	13
2.2.2	YopP/J	14
2.2.3	YopE	14
2.2.4	YopO/YpkA	15
2.2.5	YopT	15
2.2.6	YopM	16
3.	<i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.1	EDIN vermittelte Virulenz von <i>Staphylococcus aureus</i>	18
4.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
4.1	ExoS – ein wichtiger Virulenzfaktor von <i>P. aeruginosa</i>	18
5.	<i>Salmonella enterica</i>	19
5.1	Virulenzfaktoren von <i>Salmonella enterica</i> Subspezies <i>enterica</i>	20
6.	Struktur und Funktion von <i>klf2</i>	21
7.	Zielsetzung	22

II.	Material und Methoden	23
1.	Material	23
1.1	Bakterienstämme und Antibiotikaresistenzen	23
1.2	Plasmide	25
1.3	Zelllinien	26
1.4	Primer und Oligonukleotide	26
1.5	Stocklösungen von Nukleotiden und Primern für PCR	27
1.6	Antikörper	27
1.7	Antibiotika	28
1.8	Nährmedien und Zusätze für Bakterienkulturen	28
1.8.1	LB Medium/ Agar	28
1.8.2	LB Medium mit 0,3M NaCl	28
1.8.3	BHI (Brain Heart Infusion)	28
1.8.4	Medium zur Induktion der Virulenzproteinexpression bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
1.8.5	Einfriermedium für Bakterienkulturen	29
1.8.6	Stocklösungen für Stimulatoren zur Isolierung von Überstandsproteinen aus Yersinien	29
1.8.7	GC Agar	29
1.9	Nährmedien und Zusätze für Zellkulturen	29
1.9.1	Allgemeines	29
1.9.2	Zellkulturmedien und –zusätze	29
1.9.3	Einfriermedium für Zelllinien	30
1.10	Chemikalien, Enzyme und Kits	30
1.10.1	Allgemeines	30
1.10.2	Enzyme	30
1.10.3	Kits	31
1.11	Puffer und Lösungen	31
1.11.1	DNA Gelelektrophorese	31
1.11.2	SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese)	31
1.11.3	Westernblot	33
1.11.4	Nukleotide für Erststrang cDNA Synthese und PCR	34

INHALTSVERZEICHNIS

1.11.5 Granulozytenisolierung	34
1.11.6 Lymphozytenisolierung	35
1.12 Geräte	35
2. Methoden	36
2.1 Mikrobiologische Methoden	36
2.1.1 Kultivierung von Bakterien	36
2.1.2 Einfrieren von Bakterien	36
2.1.3 Auftauen von Bakterien	37
2.1.4 Messung der optischen Dichte von Bakterien	37
2.1.5 Herstellung elektrokompenter Bakterien	37
2.1.6 Elektroporation	38
2.2 Zellbiologische Methoden	38
2.2.1 Einfrieren von Zelllinien	38
2.2.2 Auftauen von Zelllinien	38
2.2.3 Zellzahlbestimmung	39
2.2.4 Isolierung von Granulozyten aus humanen Vollblut	39
2.2.5 Isolierung von Lymphozyten aus humanem Vollblut	40
2.3 Infektionsversuche mit <i>Y. enterocolitica</i> und <i>Y. pseudotuberculosis</i>	40
2.3.1 Einstellung der MOI (Multiplizität der Infektion)	40
2.3.2 Infektion verschiedener Zelllinien	41
2.4 Infektionsversuche mit verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Erregern	41
2.4.1 Einstellung der OD (optische Dichte)	41
2.5 Arbeiten mit Proteinen	42
2.5.1 Isolierung von Überstandsproteinen aus <i>Yersinia</i> Kulturen	42
2.5.2 SDS-PAGE mit Färbung nach Coomassie	42
2.5.3 Westernblot	43
2.5.4 Kultivierung von <i>P. aeruginosa</i> für Westernblotdetektion sezernierter Proteine	44
2.6 Arbeiten mit Nukleinsäuren	44
2.6.1 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)	44
2.6.2 Isolierung von RNA aus infizierten Zellen	46
2.6.3 cDNA Synthese für Real-Time-PCR mit Random-Hexameren	47

2.6.4	Plasmidisolierung	47
2.6.5	Site-Directed-Mutagenesis	48
III.	Ergebnisse	49
1.	YopT-vermittelte Induktion von <i>klf2</i> mRNA in verschiedenen Zelltypen	49
1.1	<i>klf2</i> -Induktion in verschiedenen murinen und humanen Zelllinien	49
1.2	Zusammenfassung	53
2.	Nachweis von pYV-Plasmid und Yop Sekretion in <i>Y. pseudotuberculosis</i>	53
2.1	Screening der Yersinien auf das Vorhandensein des pYV Plasminides mittels PCR	54
2.2	Screening der Yersinien auf Yop-Sekretion mittels SDS-PAGE	54
2.3	Zusammenfassung	55
3.	Induktion von <i>klf2</i> in J774 Mausmakrophagen durch <i>Y. enterocolitica</i> und <i>Y. pseudotuberculosis</i>	55
4.	<i>klf2</i>-Induktion in J774-Mausmakrophagen durch verschiedene Gram-positive und Gram-negative Bakterien	58
4.1	<i>klf2</i> -Induktion in J774-Makrophagen eine Stunde nach Infektion mit verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien	59
4.2	<i>klf2</i> -Induktion in J774-Makrophagen zwei Stunden nach Infektion mit verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien	60
4.3	<i>klf2</i> -Induktion in J774-Makrophagen vier Stunden nach Infektion mit verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien	61
5.	Identifikation <i>klf2</i>-induzierender bakterieller Toxine	62
5.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	63
5.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64

5.3	<i>Salmonella</i> Typhimurium	68
IV.	Diskussion	72
1.	Die Familie der Krüppel-Like-Faktoren	72
2.	Die Funktion von Klf2	73
3.	Induktion von <i>klf2</i> durch verschiedene Bakterienarten	76
4.	YopT und <i>klf2</i> -Regulation	76
5.	EDIN und <i>klf2</i> -Regulation	77
6.	ExoS und <i>klf2</i> -Regulation	79
7.	<i>Klf2</i> -Regulation durch einzelne Salmonellentoxine	81
8.	Mögliche Mechanismen der <i>klf2</i> mRNA Expression	84
9.	Bedeutung der bakteriell induzierten <i>klf2</i> Expression für das Infektionsgeschehen	87
V.	Zusammenfassung	90
VI.	Abkürzungen	91
VII.	Ein-Buchstabenkodierung für Aminosäuren	97
VIII.	Anhang (PCR- und SDS-PAGE Gele)	98
IX.	Literaturverzeichnis	106

INHALTSVERZEICHNIS

X. Danksagung	119
XI. Lebenslauf	120

I. Einleitung

Gastrointestinale Erkrankungen führen auch heute im Zeitalter der modernen Medizin noch immer zu signifikanter Morbidität und Mortalität. Insbesondere in Ländern der dritten Welt, wo die Hygienestandards nicht den unseren entsprechen, versterben vor allem Kleinkinder und ältere Menschen an Durchfallerkrankungen. Bekannt ist, dass unterschiedliche bakterielle Erreger über Toxine/Moduline Zellen der Infektabwehr manipulieren bzw. umprogrammieren können. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein neues Pathogenitätsprinzip untersucht werden, das bei *Yersinia enterocolitica* entdeckt wurde. So ist seit geraumer Zeit bekannt, dass in murinen Makrophagen nach Infektion mit *Yersinia enterocolitica* verstärkt ein inaktivierender Transkriptionsfaktor (*klf2*) exprimiert wird (Hoffmann et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, ob diese *klf2*-Induktion yersinienspezifisch ist, oder ob auch andere bakterielle Erreger mit bekanntem T3SS bzw. mit bekannten zytotoxischen oder immunsuppressiven Toxinen *klf2*-Expression induzieren können. Außerdem soll der Frage nachgegangen werden, welche weiteren Zelltypen außer Makrophagen auf diese Weise beeinflusst werden können.

1. Die Gattung *Yersinia*

Yersinien sind Gram-negative Stäbchenbakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Von den bislang bekannten elf Yersinienarten sind nur drei humanpathogen:

- *Yersinia pestis*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Yersinia pseudotuberculosis*

1.1 *Yersinia pestis*

Yersinia pestis ist der Erreger der Pest. Je nach Übertragungsmodus kommt es zu einer von zwei klinischen Verlaufsformen: Bei Übertragung durch den Biss eines infizierten Rattenfloh kommt es zunächst zu einer eitrigen Einschmelzung regionärer Lymphknoten (Bubonen) und somit zur Beulenpest. Diese kann nach Einbrechen der

Abzesse in die Blutbahn zu einem systemischen Verlauf führen, während dessen auch die Lunge betroffen wird. Durch Abhusten infektiöser Yersinien kann es auf respiratorischen Weg zu Tröpfcheninfektionen von Kontaktpersonen kommen; die resultierende Lungenpest ist durch einen fulminanten Verlauf mit hoher Letalität gekennzeichnet.

Im getrockneten Blut können *Y. pestis* mehrere Wochen, in Flohkot und feuchter Erde hingegen mehrere Monate überleben. Eine Abtötung der Erreger durch Hitze, UV-Licht und Desinfektionsmittel ist möglich.

1.2 *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis*

Yersinia enterocolitica und *Yersinia pseudotuberculosis* sind sporenlose aerob- oder fakultativ anaerob wachsende Bakterien, die mono- oder peritrich begeißelt sein können. Die Geißelbildung erfolgt bei Temperaturen zwischen 22°C und 28°C, nicht aber bei 37°C. Darüber hinaus sind sie psychrophil und können somit auch bei 4°C im Kühlschrank überleben.

Die Übertragung erfolgt oral, meistens durch Genuss kontaminierter Speisen, z.B. unzureichend gegartem Schweinefleisch. Nach Befall des MALT (v.a. der Peyer'schen Plaques im terminalen Ileum) kommt es dort zunächst zu einer Bakterienvermehrung mit Abszessbildung. Über rupturierende Abszesse können die Erreger nun sowohl ins Darmlumen einbrechen, als sich auch über die mesenterialen Lymphknoten ausbreiten. Je nach Lebensalter kann es dabei zu unterschiedlichen Erkrankungen kommen. Während bei Kindern Fieber und Durchfall im Vordergrund stehen, die nach 1-2 Wochen folgenlos ausheilen, kommt es bei Jugendlichen eher zu einer mesenterialen Lymphadenitis mit Fieber. Häufig imponiert die Yersiniose mit abdominalen Beschwerden im rechten unteren Quadranten, was oft zur Fehldiagnose der Appendizitis führt (sog. Pseudo-Appendizitis). Auch hier kommt es im Regelfall zu einem folgenlosen Abheilen nach 1-2 Wochen.

Im Erwachsenenalter hingegen können Yersinieninfektionen ein buntes Bild an Krankheiten verursachen. Neben der klassischen Yersiniose mit Fieber und Durchfall kann es in Abhängigkeit vom Immunstatus auch zu einer Pharyngitis, Myalgie, einem grippalen Infekt, Abszessen, Hepatitiden und anderen Erkrankungen kommen. Selten entwickelt sich eine Yersiniose zu einer septischen Allgemeinerkrankung mit

multiplen Leber- und Milzabszessen. Entsprechende Disposition kann 1-2 Wochen nach durchgemachter Yersiniose zu einer HLA-B27 assoziierten reaktiven Arthritis führen (Medizinische Mikrobiologie, 8.Auflage; 2001).

2. Virulenzfaktoren von *Yersinia*

Um in den Wirtsorganismus eindringen und darin trotz eines intakten Immunsystems überleben und eine klinisch manifeste Infektion hervorrufen zu können, haben sich in verschiedenen Bakterienarten unterschiedliche Überlebensstrategien und Pathogenitätsfaktoren entwickelt. Eines dieser Pathogenitätsprinzipien ist die Translokation bakterieller Proteine mit Anti-Wirts-Funktionen direkt in das Zytoplasma der Wirtszelle. Dies wird u. a. durch bakterielle Proteintranslokationssysteme erreicht. *Yersinia* und weitere Erreger bakterieller Infektionskrankheiten besitzen ein sog. Typ 3-Sekretionssystem, welches den Proteintransport in Wirtszellen vermittelt.

2.1 T3SS (Typ-3-Sekretionssystem)

Das T3SS von Yersinien ist auf einem 70 kB großen, für die Virulenz essentiellen Plasmid (pYV, Yersinia Virulence Plasmid) kodiert. Neben dem *Yersinia* Secretion Complex (Ysc), der das eigentliche T3SS darstellt, werden auch sog. *Yersinia* outer proteins (Yops) kodiert. Diese sind entweder an der Proteintranslokation beteiligt oder interagieren als Effektor-Yops intrazellulär mit Proteinen der Wirtszelle (Sorg et al., 2001). Zu den Effektor-Yops gehören:

- YopH
- YopP/J
- YopE
- YopO/ YpkA
- YopT
- YopM

Diese Yops beeinflussen auf mannigfaltige Weise die Phagozytose, die Organisation des Zytoskelettes, (Fallman et al., 1995; Persson et al., 1997; Rosqvist et al., 1990; Visser et al., 1995) und die Produktion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine

und Adhäsine der Wirtszelle (Boland and Cornelis, 1998; Denecker et al., 2002; Palmer et al., 1998; Schulte et al., 1996). Dadurch wird eine effektive antibakterielle Immunantwort des Wirtes verhindert.

Um eine intrazelluläre Translokation zu erreichen, muss der Translokationsapparat (oder Injectisom) die innere und äußere Bakterienmembran wie auch die Wirtszellmembran überspannen. Das fertige Injectisom hat drei molekular und funktionell distinkte Bereiche: eine zytoplasmatische ATPase (Woestyn et al., 1994), drei Transmembranproteine (YscC, YscW, YscJ) und eine extrabakteriell liegende „Nadel“ (Blocker et al., 2001; Hoiczkyk and Blobel, 2001; Kimbrough and Miller, 2000; Kubori et al., 1998; Kubori et al., 2000). Weiterhin sind die Translokatorproteine YopB, YopD und LcrV beteiligt, welche eine Pore in der Wirtszellmembran bilden und so die intrazelluläre Translokation der Effektor-Yops ermöglichen (Hakansson et al., 1996b; Neyt and Cornelis, 1999; Rosqvist et al., 1991; Sory and Cornelis, 1994). Diese Translokation kann allerdings nur bei nativen, ungefalteten Proteinen stattfinden; um dies zu gewährleisten, sind auf dem pYV-Plasmid Yop-spezifische Chaperone kodiert (Menard et al., 1994; Wattiau et al., 1994; Wattiau and Cornelis, 1993).

2.2 *Yersinia* Effektorproteine

2.2.1 YopH

YopH (51 kDa) ist eine Tyrosinphosphatase, deren C-terminales Ende Homologie zu eukaryoten Phosphatasen aufweist (Guan and Dixon, 1990). Es ist in der Lage, die Radikalbildung in Makrophagen (Bliska and Black, 1995), sowie die Komplementrezeptor und F_c-Rezeptor vermittelte Phagozytose durch Polymorphonukleäre Leukozyten (PMN's) und Makrophagen zu inhibieren (Fallman et al., 1995; Ruckdeschel et al., 1996). Darüberhinaus hat es eine Homologie zu SptP von *Salmonella* Typhimurium, das ebenfalls eine Phosphataseaktivität besitzt (Kaniga et al., 1996).

2.2.2 YopP/J

YopP (in *Yersinia enterocolitica*) bzw. YopJ (in *Yersinia pseudotuberculosis*), (beide je 32,5 kDa) induzieren Apoptose in murinen Makrophagen (Monack et al., 1997). Des Weiteren hemmen sie die Expression proinflammatorischer Gene (TNF, IL-8) (Boland and Cornelis, 1998; Denecker et al., 2002; Schesser et al., 1998). YopP hemmt die Phosphorylierung von IKKbeta, was die Dissoziation von NFkB und seinem Inhibitor verhindert, so dass NFkB nicht in den Zellkern translozieren kann (Ruckdeschel et al., 1998; Orth et al., 1999). Weiterhin hemmt YopP die Phosphorylierung und somit Signaltransduktion über die MAP-Kinasen ERK, p38, und JNK. Auf molekularer Ebene wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, die dieses vermitteln könnten. In Frage kommt eine Interferenz mit Ubiquitylierung/Sumoylierung und damit veränderte Abbauraten. So unterbindet YopJ die NFkB Aktivierung durch Deubiquitylierung der an der Signaltransduktion beteiligten Proteine TRAF2, TRAF6 und Ikbα (Zhou et al., 2005); zum Anderen wurde eine Acetyltransferaseaktivität von YopP beschrieben, die direkt mit der Phosphorylierung interagiert (Mittal et al., 2006; Mukherjee et al., 2006).

2.2.3 YopE

YopE ist ein 23 kDa Effektorprotein, welches als GAP für Rho-GTPasen wirkt. Die GAP-Aktivität führt zu einem Austausch von gebundenem GTP durch GDP, was die GTPasen in einen „inaktivierten“ Zustand versetzt und die Interaktion mit den Effektorproteinen verhindert. Dieser GDP–GTP-Austausch ist reversibel. Die wichtigsten zellulären Zielstrukturen von YopE sind GTPasen der Rho-Familie (Rho, Rac, CDC42). Interaktion mit diesen GTPasen führt zu Depolymerisierung des Aktin-Zytoskelettes und somit zu einer Hemmung der Phagozytose (Andor et al., 2001). Überraschenderweise ist eine davon völlig verschiedenartige Wirkung von YopE beschrieben, nämlich die Hemmung der Prozessierung von Pro-Interleukin 1beta durch Caspase-1 über eine Hemmung der Caspase-1 Aktivierung (Schotte et al., 2004).

2.2.4 YopO/YpkA

YopO (*Y. enterocolitica*) bzw. YpkA (*Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*) (je 81,7 kDa) ist ein Protein mit mehreren funktionellen Domänen und interagiert mit den GTPasen Rho und Rac-1 (Dukuzumuremyi et al., 2000). N-terminal ist eine autophosphorylierende Serin/Threonin Kinase-Domäne lokalisiert, die Homologie zu eukaryoten Proteinkinasen aufweist. Die C-terminale Hälfte besitzt Homologie zu Rho-Bindungsdomänen (Galyov et al., 1993; Hakansson et al., 1996a). Nur nach Interaktion mit Aktin geht die YopO Kinase-Domäne in den aktiven Zustand über, da *in vitro* Aktin als Kofaktor für die Aktivierung der YopO Kinaseaktivität erforderlich ist. Allerdings betreffen diese Interaktionen nicht den GDP/GTP Austausch von GTPasen, der unabhängig von der YopO Kinaseaktivität ist (Juris et al., 2002; Juris et al., 2000). Die zellulären Effekte verbleiben nach wie vor unklar. So konnte eine Arbeitsgruppe zeigen, dass die Interaktion von YopO mit RhoA, nicht aber die Kinaseaktivität für die Störung der Aktinzytoskelettarchitektur entscheidend ist (Dukuzumuremyi et al., 2000). Allerdings beschreiben andere Arbeitsgruppen in diesem Zusammenhang die Bedeutung der Kinaseaktivität von YopO (Juris et al., 2002). Auch für YpkA (*Y. pseudotuberculosis*) scheint die Kinaseaktivität für die Störung der Aktinzytoskelettarchitektur bedeutsam zu sein. So wird durch YpkA vermittelte Phosphorylierung der Aminosäure Serin (S47) von Gαq, die Gαq nachgeschaltete Signalkaskade (PLC-β aber auch RhoA) inhibiert, und folglich eine Reorganisation von Aktin-Stress-Filamenten in HEK293A Zellen unterbunden (Navarro et al., 2007).

2.2.5 YopT

YopT (35,5 kDa) ist eine Zysteinprotease, die *in vitro* die GTPasen Rho, Rac und CDC42 nahe an ihrem Carboxyl-terminalen Membrananker schneidet. Folge sind eine Umverteilung der Rho-Proteine von der Membran ins Zytosol mit anschließender Depolymerisation des Aktins und Zerstörung der Aktinzytoskelettstruktur (Shao et al., 2002; Zumbihl et al., 1999). Neuere Untersuchungen jedoch zeigen, dass *in vivo* das membrangebundene RhoA, nicht aber Rac und CDC42 von YopT geschnitten werden (Aepfelbacher et al., 2003). YopT aus *Y. pseudotuberculosis* kann allerdings neben RhoA auch Rac-1 schneiden,

das dann in den Zellkern wandert (Wong et al., 2005). Der C-terminale Teil von YopT ist wichtig für die proteolytische Aktivität, wohingegen der N-terminale Teil an die kleinen GTPasen bindet (Sorg et al., 2003).

2.2.6 YopM

YopM (41,6 kDA) besitzt Homologie mit der Thrombin-Binde-Domäne in der α -Kette des humanen Glycoproteins Ib (GPI ba) sowie dem Willebrand-Faktor (Leung and Straley, 1989). Diese Homologie ergibt sich aus der Tatsache, dass YopM weitgehend aus 12-20 Leucin Rich Repeats (LRR) aufgebaut ist. Diese kommen als weitverbreitete Motive in vielen Proteinen vor. Dabei weist YopM zwischen den einzelnen Yersinienstämmen Größenvariabilität auf (Viboud et al., 2005). Die exakte Funktion von YopM bleibt nach wie vor rätselhaft. Über einen mikrotubulus-abhängigen Prozess gelangt YopM zum Nukleus (Skrzypek, et al., 1998), allerdings ist nicht klar welche funktionelle Rolle die Translokation in den Zellkern hat. So wurde auf Basis von Mikroarray-Analysen vorgeschlagen, dass YopM regulatorisch auf Gene wirke die das Zellwachstum und den Zellzyklus beeinflussen, jedoch konnten weitere Untersuchungen keinen Beweis für eine Genregulation durch YopM erbringen (Sauvonnet et al., 2002b; Hoffmann et al., 2004). McDonald et al konnten zeigen, dass YopM an die beiden zellulären Kinasen PRK2 (Protein Kinase C-like 2) und RSK1 (Ribosomal S6 Protein Kinase 1) bindet und dadurch aktiviert. Dieser Komplex dient vermutlich als Gerüst, das die Rekrutierung weiterer Interaktionspartner gewährleisten soll (McDonald et al., 2003). Obwohl in seiner Funktion unverstanden ist YopM dennoch ein sehr wichtiger Virulenzfaktor, denn nach oraler Gabe von *Y. enterocolitica* YopM Deletionsmutanten konnte in Mäusen keine nachfolgende systemische Infektion nachgewiesen werden (Trulzsch et al., 2004).

3. *Staphylococcus aureus*

Staphylokokken sind Gram-positive, unbewegliche, fakultativ anaerobe, nicht-sporenbildende, Katalase-positive Haufenkokken. Sie lassen sich in Koagulase-

EINLEITUNG

negative und Koagulase-positive Spezies unterteilen, zu letzteren gehört *S. aureus* als wichtigster Vertreter.

Wichtige durch *S. aureus* hervorgerufene Erkrankungen sind eitrige Erkrankungen, wie Abszesse, Furunkel, Karbunkel, eitrige Parotitiden und Empyeme. Auch erysipelartige Erkrankungen und eine (häufig fulminant verlaufende) akute Endokarditis kann durch *S. aureus* hervorgerufen werden. *S. aureus* produziert eine Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren, wie z.B.:

- Protein A: Immunglobuline bindendes Oberflächenprotein
- Clumpingfaktor: Verklumpung von Plasma durch Aktivierung von Fibrinmonomeren
- Kapsel
- Plasmakoagulase: Verklumpung von Blutplasma
- Die Superantigene Stimulation von T-Zellen
- EDIN (Epidermal Cell Differentiation Inhibitor)

Protein A ist ein Oberflächenprotein von *S. aureus*. Es bindet Immunglobuline an ihrem F_C Teil, unterbindet damit die Opsonierung und Antigenerkennung durch Makrophagen und andere APC und wirkt daher antiphagozytär. Clumpingfaktor ist ebenfalls ein Oberflächenprotein, führt durch Aktivierung von Fibrinmonomeren zu einer Verklumpung von Plasma und ist aufgrund seiner Bindungsfähigkeit an Fibrinogen ein wichtiges Adhäsion. Eine Kapsel kann bei fast allen *S. aureus* Stämmen nachgewiesen werden und hat antiphagozytäre Eigenschaften. Die Plasmakoagulase ist ein von *S. aureus* sezerniertes Enzym, das ebenfalls zur Verklumpung von Blutplasma führt. Die Verklumpung führt zur Bildung eines „Fibrinschutzwalls“ um die Staphylokokken, der sie vor Erkennung durch das Immunsystem schützt. Innerhalb dieses Walls kann sich *S. aureus* vermehren und anschließend durch Freisetzung von Fibrinolysin (Staphylokinase) ins umliegende Gewebe eindringen. Superantigene sind Peptide, die an die V_β Region des TCR und an den MHC Klasse II Rezeptor binden und damit die Kontaktdauer des TCR-MHC Komplexes verlängern. In der Folge kommt es zu einer massiven Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine mit dem klinischen Bild einer schweren Sepsis (Fieber, DIC und kardiovaskulärer Schock) (Medizinische Mikrobiologie, 8. Auflage, 2001; Abbas and Lichtman Updated Edition, 2005).

3.1 EDIN vermittelte Virulenz von *Staphylococcus aureus*

EDIN ist eine ADP-Ribosyltransferase, die kleine GTPasen der Rho-Familie modifiziert. Derzeit sind drei Isoformen bekannt: EDIN-A, EDIN-B und EDIN-C (Inoue et al., 1991). ADP-Ribosylierung der Aminosäure Asparagin (N41) von RhoA, RhoB und RhoC führt zu deren Inaktivierung (Aktories et al., 2004), was die Bildung von Aktin–Stress-Filamenten unterdrückt. Dadurch wird beispielsweise in HUVEC-Zellen die Bildung fokaler Adhäsionen unterbunden. Ebenso wird die Migration von Endothelzellen gehemmt, die Wundheilung gestört, die terminale Keratinozytendifferenzierung *in vitro* inhibiert sowie die epidermale Hyperplasie durch Keratinozytenproliferation *in vivo* induziert (Aepfelbacher et al., 1997; Sugai et al., 1992). Ein klinischer Fallbericht bringt die subglottische Stenose mit Methicillin resistenten EDIN synthetisierenden *S. aureus* in Verbindung (Yamada et al., 2001).

4. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonaden sind nicht-fermentierende, sporenlose Gram-negative Stäbchenbakterien. Als Umwelt- und Wasserkeim sind Pseudomonaden ubiquitär verbreitet. Die medizinisch wichtigste Art ist *P. aeruginosa*. Insbesondere bei immunsupprimierten Patienten, z.B. nach großflächigen Verbrennungen, bei Neutropenie und im Rahmen einer zystischen Fibrose kann *P. aeruginosa* Wundinfektionen, Septikämien, und Pneumonien hervorrufen. Dies wird durch eine Fülle verschiedenartiger Virulenzfaktoren, wie z.B. Fimbrien, Adhäsine, Hämolysine, Lipasen, Siderophore und Lipopolysaccharid vermittelt. Eine besondere Bedeutung besitzen die durch ein T3SS in die Zielzelle translozierten intrazellulären Toxine ExoS, ExoT und ExoU.

4.1 ExoS – ein wichtiger Virulenzfaktor von *P. aeruginosa*

ExoS führt *in vitro* zu Inhibition der DNA-Synthese, Veränderungen der Zell-Morphologie (Abrundung durch Depolymerisierung des Aktin-Zytoskelettes) und zur verminderten Adhäsion von HT-29 Zellen in Zellkultur (Fraylick et al., 2001; Frithz-Lindsten et al., 1997; Olson et al., 1997; Olson et al., 1999). ExoS ist ein Inhibitor für

GTPasen der Rho-Familie und besitzt zwei verschiedene katalytische Domänen. AA 96-233 haben eine Rho-GAP Aktivität, während AA 233-453 eine ADPRT-Aktivität aufweisen (Goehring et al., 1999; Iglewski et al., 1978; Knight et al., 1995). Die GAP-Domäne weist Homologie zu YopE von *Yersinia* und SptP von *Salmonella* auf und inhibiert Rho, Rac und CDC42 (Fu and Galan, 1999). *In vivo* kann die ADP-Ribosyltransferase-Domäne Rac, CDC42 und auch Rho inhibieren (Henriksson et al., 2002). ExoS wird durch ein T3SS in die Zelle transloziert. Nach der Translokation verbleibt ExoS zeitweise über seine Membran-Lokalisationsdomäne (MLD) mit der Plasmemembran der Wirtszelle assoziiert und gelangt dann über einen vesikelassoziierten Transport zum Golgiapparat (Zhang et al., 2007).

5. *Salmonella enterica*

Die Gattung *Salmonella* gehört zur Familie der Enterobacteriaceae. Die Spezies *Salmonella enterica* ist sehr heterogen und wird in fünf Subspezies unterteilt. Die Subspezies *S. enterica* Subspezies *enterica* ist humanpathogen und kann durch Serotypisierung (O- und H-Oberflächenantigene) in über 2.000 Serovare (z.B. Typhi, Typhimurium, Enteritidis) differenziert werden. Anhand der hervorgerufenen Krankheitsbilder lassen sich typhöse und enteritische Serovare unterscheiden. Nach fäkal-oraler Übertragung kommt es bei typhösen Salmonellen zunächst zur Adhärenz ans Darmepithel mit anschließender Internalisierung über die M-Zellen und Migration ins Subepithelium. Durch Intra- und extrazellulär überlebende Bakterien kommt es - via den mesenterialen Lymphknoten - zu einer Dissemination in die Blutbahn mit Besiedelung von Milz, Leber und anderen Organen mit den Symptomen Fieber, Splenomegalie Kopfschmerzen und Appetitlosigkeit. Im weiteren Verlauf wird der Darm erneut befallen (sekundärer Darmbefall), was mit Nekrosen der Peyer'schen Plaques und hämorrhagischen Darmulzerationen einhergeht. Folge sind eine Entzündungsreaktion mit Diarrhöen und Elektrolytverlust. Klinisch nimmt der Typhus daher einen stadienhaften Verlauf mit Stadium incrementi (Fieber, relative Bradykardie, Obstipation) Stadium fastigii (Diarrhoe) und Stadium decrementi (Entfieberung, Symptombesserung).

Auch die enteritischen Salmonellen werden fäkal-oral übertragen und führen nach einer Inkubationszeit von 5-72 Stunden zu Übelkeit, Erbrechen, Fieber, Durchfall,

Kopfschmerzen und Myalgien. Dabei kommt es zunächst zur Adhäsion mit anschließender Invasion der M-Zellen und des Darmepithels. Folge ist u. a. eine IL-8 Freisetzung aus den Epithelzellen mit massiver Einwanderung polymorphkerniger Granulozyten (PMN), die zur Prostaglandinfreisetzung führen. Daher kommt es zu einer verstärkten Adenylatzyklasestimulation in den Mukosaepithelzellen mit erhöhter Cl⁻ Sekretion bei gleichzeitig gehemmter Na⁺ Resorption. Folge sind eine verminderte Wasserresorption und Durchfall (Medizinische Mikrobiologie, 8. Auflage, 2001).

5.1 Virulenzfaktoren von *Salmonella enterica* Subspezies *enterica*

Ähnlich wie *Y. enterocolitica* oder *P. aeruginosa* benutzen auch Salmonellen T3SS, um Virulenzproteine in das Zytoplasma von Wirtszellen zu bringen. *Salmonella* besitzt zwei verschiedene T3SS, die auf zwei chromosomal lokalisierten Pathogenitätsinseln (SPI, *Salmonella* Pathogenicity Island 1 und 2) kodiert sind (Galan, 1999; Hensel, 2000).

Während SPI-1 für die Aufnahme des Bakteriums in die Epithelzellen benötigt wird, ist SPI-2 vor allem für das intrazelluläre Überleben des Bakteriums erforderlich (Galan, 2001). SPI-1 hat eine Größe von etwa 40 kbp und kodiert für zahlreiche Komponenten des T3SS, die für die Invasion von *Salmonella* erforderlich sind. Hervorzuheben ist InvA, ohne das eine erfolgreiche Invasion von *Salmonella* in die Zelle nicht möglich ist. Weitere SPI-1 Proteine sind SptP und SopE. SPI-2 hat ebenfalls eine Größe von etwa 40 kbp, unterscheidet sich aber strukturell und funktionell von SPI-1. SPI-2 Effektorproteine sind unter anderem für die bakterielle Replikation in Makrophagen von Bedeutung (Marcus et al., 2000).

SopE ist ein Guanin–Nukleotid-Austauschfaktor für GTPasen der Rho-Familie (CDC 42, Rac-1), und führt über Aktivierung dieser G-Proteine zur Neuordnung des Aktin-Zytoskeletts. Obwohl über SPI-1 transloziert, wird SopE von einem Prophagen außerhalb der eigentlichen SPI-1 kodiert (Hardt et al., 1998b; Hardt et al., 1998a).

SopE2 stimmt zu 70% in der Aminosäuresequenz von SopE überein und hat auch ähnliche Funktionen wie SopE (Bakshi et al., 2000; Stender et al., 2000). Interessanterweise kann eine Doppelmutante für SopE/E2 immer noch zu einer Neuordnung des Aktinzytoskeletts führen (Zhou et al., 2001), weshalb vermutet wird, dass noch weitere Mechanismen daran beteiligt sind. Ein möglicher Kandidat für die

Regulation des Aktinzytoskeletts ist SopB (SycD) (Galyov et al., 1997; Hong and Miller, 1998). SopB ist eine Inositolphosphatase, die GTPasen der Rho-Familie (Rac, CDC42) aktiviert und zu einer Aktinzytoskelettneuordnung, einer Aktivierung von MAP Kinasen (Erk, Jnk/p38) und einer Destabilisierung von Tight-junctions führt (Galan, 2001). Im Gegensatz zu SopE/E2 aktiviert es aber die GTPasen nicht direkt, sondern indirekt über zelluläre Inositolphosphatasen (Zhou et al., 2001). Über die MAP Kinasen kommt es auch zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Aktivatorprotein 1 (AP-1) und Nuklear Faktor-κB (NF-κB) (Hobbie et al., 1997). Ebenso wie SopE wird auch SopB von einem Prophagen kodiert (Hardt et al., 1998b) und über das SPI-1 T3SS transloziert.

SptP ist ein Inhibitor für GTPasen der Rho-Familie und hat zwei funktionell unabhängige Domänen. Die N-terminale Domäne hat eine GAP-Aktivität und besitzt Homologie zu YopE (*Y. enterocolitica*) und ExoS (*Pseudomonas aeruginosa*). Über die GAP Aktivität inaktiviert SptP CDC42 und Rac-1. Dadurch antagonisiert es die Effekte von SopE/SopE2, was eine Neuorganisation des Aktinzytoskeletts zur Folge hat. Die C-terminale Domäne hat Homologie zu YopH und verschiedenen eukaryotischen Tyrosinphosphatasen und weist eine Tyrosinphosphataseaktivität auf. Über diese beeinflusst SptP die MAP Kinase Erk und kehrt so den SopE/E2 vermittelten Aktin-Umbau wieder um (Fu and Galan, 1999; Kaniga et al., 1996; Murli et al., 2001; Stebbins and Galan, 2000).

6. Struktur und Funktion von klf2

LKLF (Klf2) ist ein zur Familie der Zink-Finger-Proteine gehörender, auf Chromosom 19 kodierter Transkriptionsfaktor mit einem Molekulargewicht von 38 kDa (Kaczynski et al., 2003; Wani et al., 1999). Neben Klf2 werden noch 15 weitere Proteine zu dieser Familie gezählt (Suzuki et al., 2005). Im Einzelnen zeichnen sie sich durch folgendes aus:

- Eine DNA-Bindedomäne
- Ein nukleäres Lokalisationssignal
- Eine Transkriptionsregulationsdomäne

Die DNA-Bindedomäne stimmt auf Aminosäureebene zwischen den einzelnen Mitgliedern der Klf-Familie zu 65% überein (Kaczynski et al., 2003) und enthält das Zink-Finger-Motiv (Gibson et al., 1988; Klevit, 1991).

Die Transkriptionsregulationsdomäne hingegen ist weniger stark konserviert und hat in Abhängigkeit davon, an welchen Promotor sie bindet, aktivierende und/oder inaktivierende Funktion (Cook et al., 1999; Song et al., 2002). So ist beispielsweise *klf11* ein potenter Repressor der Transkription (Cook et al., 1998).

Klf2 wird sowohl in humanen als auch in murinen Zellen exprimiert. In der Maus wird *klf2* im Wesentlichen in Lunge, Milz (Anderson et al., 1995) und T-Lymphozyten exprimiert. *klf2*-defiziente Mäuse versterben zwischen Tag 11,5 und 13,5 dpc aufgrund einer gestörten Lungenreifung sowie einer nicht funktionstüchtigen Tunica media des Gefäßsystems (Buckley et al., 2001; Kuo et al., 1997b; Kuo et al., 1997a; Wani et al., 1998). In verschiedenen experimentellen Systemen konnte jedoch für Klf2 eine stark inaktivierende Funktion auf verschiedenste zelluläre Prozesse nachgewiesen werden (Kuo et al., 1997b; Kuo et al., 1997a). So sind Jurkat T-Zellen nach Überexpression eines *klf2* Transgenes nicht mehr zu Proliferation und Proteinbiosynthese in der Lage, und *klf2*^{-/-} T-Zellen aus Knochenmarks-chimären Mäusen zeigen einen aktivierten Phänotyp und hohe Empfindlichkeit für FAS-vermittelte Apoptose.

7. Zielsetzung

Ausgehend von der Beobachtung, dass *Yersinia enterocolitica* über YopT in J774 Mausemakrophagen *klf2*-Expression induzieren kann, sollen in der hier vorgestellten Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Findet die *klf2*-Induktion nach bakterieller Infektion nur in makrophagenartigen Zellen statt, oder kann dies auch in anderen Zellen geschehen?
- 2) Gibt es – außer *Y. enterocolitica* – noch andere Bakterienarten, die in Mausemakrophagen eine anhaltend hohe *klf2* mRNA Expression induzieren können? Wenn ja – welche Virulenzproteine kommen als *klf2*-Induktoren in Frage?

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Bakterienstämme und Antibiotikaresistenzen

Tabelle II-1: Verwendete Yersinienstämme

Stamm-Nr MvPI/ CDC	Genotyp/Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>Yersinia enterocolitica</i>		
WA (pYV)	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:8 enthält pYV-Plasmid Wildtypstamm 314	MvPI, (Heesemann and Laufs, 1983)
WA-C	Plasmidloses ("cured") Derivat von WA-314	MvPI, (Heesemann and Laufs, 1983)
WA (pTTS, pYopT)	WA-C Derivat, das nur YopT transloziert	MvPI, (Trulzsch et al., 2003b)
WA (pYV ΔYopT)	YopT defiziente WA(pYV)-Mutante	MvPI, (Trulzsch et al., 2004)
8081	Serotyp O8	MvPI, (Snellings et al., 2001)
A127/90	Serotyp O8	MvPI, (Foultier and Cornelis, 2003)
MRS 40	Serotyp O9	MvPI, (Pelludat et al., 2002)
57	Serotyp O8 b,e,f,i E661 Montana	MvPI
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>		
5	IP 3295	MvPI
531	146	MvPI
533	201	MvPI
534	346	MvPI
542	III pl B1	MvPI
589	Serotyp O1b	MvPI
591	Serotyp O2a	MvPI
593	Serotyp O2c	MvPI
594	Serotyp O3	MvPI
596	Serotyp O4b	MvPI
598	Serotyp O5b	MvPI
601	Serotyp O8	MvPI
603	Serotyp O10	MvPI
686	200	MvPI

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle II-2: Verwendete Gram-negative und Gram positive Bakterien mit Antibiotikaresistenz

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Herkunft/Referenz	Antibiotikaresistenz
<i>EPEC</i> E2348796		MvPI, (Gansheroff et al., 1999)	
<i>EHEC</i> O157:EDL 933		MvPI, (Gansheroff et al., 1999)	
<i>EHEC</i> Y13/89-1		MvPI, (Zhu et al., 2001)	
<i>Citrobacter rodentium</i>		MvPI, (Frankel et al., 1996)	
<i>Citrobacter freundii</i>		MvPI, ATCC 29219	
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD		MvPI, ATCC BAA-697	
<i>Helicobacter pylori</i> P12		MvPI, (Schmitt and Haas, 1994)	
<i>Helicobacter pylori</i> TIGR		MvPI, (Tomb et al., 1997)	
<i>Campylobacter jejuni</i> C31	cdtA negatives klinisches Isolat	R. Haas MvPI	
<i>Campylobacter jejuni</i> C63	cdtA positives Isolat	MvPI, (Gebert et al., 2003)	
<i>Campylobacter jejuni</i> C64 cdt A+	cdtA positives Isolat	MvPI, (Gebert et al., 2003)	
<i>Hafnia alvei</i> 10790		MvPI, (Janda et al., 1999)	
<i>Shigella flexneri</i> M90T		MvPI, (Sansonetti et al., 1982)	
<i>Staphylococcus aureus</i> 57	Klinisches Isolat, EDIN positiv	M. Aepfelbacher MvPI	
<i>S. aureus</i> Newman	EDIN negativer Referenzstamm	M. Aepfelbacher MvPI	
<i>S. aureus</i> 113 WT	EDIN-negatives klinisches Isolat	M. Aepfelbacher MvPI	
<i>S. aureus</i> 113 pBR-EDIN	<i>S. aureus</i> 113 transformiert mit Expressionsplasmid für EDIN	M. Aepfelbacher MvPI	Chloramphenicol
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Wildtyp-Stamm, ExoS positiv	Michael Hogardt MvPI, (Stover et al., 2000)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAK	Wildtyp-Stamm, ExoS Überproduktion	Michael Hogardt MvPI, (Frank et al., 1994)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA 103	ExoS negativer Wildtyp-Stamm	Michael Hogardt MvPI, (Frank et al., 1994)	
PAO1 Δ pcrD	T3SS-defizientes PAO1-Derivat	Michael Hogardt MvPI, (Hornef et al., 2000)	Streptomycin
PAO1 Δ ExoS	exoS-defizientes PAO1-Derivat	Michael Hogardt MvPI	Streptomycin
PAO1 Δ ExoS (pUCP ExoS)	PAO1 Δ ExoS rekomplementiert mit exoS-Expressionsplasmid	MvPI, (Maresso et al., 2004)	Spectinomycin und Chloramphenicol
PAO1 Δ ExoS (pUCP ExoS R146K)	PAO1 Δ ExoS rekomplementiert mit GAP-defizientem exoS-Expressionsplasmid	Diese Studie, (Maresso et al., 2004)	Streptomycin + Carbenicillin
PAO1 Δ ExoS (pUCP ExoS E381D)	PAO1 Δ ExoS rekomplementiert mit ADPRT-defizientem exoS-Expressionsplasmid	Diese Studie, (Maresso et al., 2004)	Streptomycin + Carbenicillin

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle II-2: Fortsetzung

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Herkunft/Referenz	Antibiotikaresistenz
PAO1ΔExoS (pUCP ExoS R146K E381D)	PAO1ΔExoS rekomplementiert mit GAP- und ADPRT-defizientem <i>exoS</i> -Expressionsplasmid	Diese Studie	Streptomycin + Carbenecillin
PAO1 ΔExoS (pUCP ExoS R146K E379D E381D)	PAO1ΔExoS rekomplementiert mit GAP- und ADPRT-defizientem <i>exoS</i> -Expressionsplasmid	Diese Studie, (Radke et al., 1999)	Streptomycin + Carbenecillin
PAK Δ <i>pcrD</i>	T3SS-defizientes PAK-Derivat	Michael Hogardt MvPI, (Hornef et al., 2000)	Streptomycin
PAK ΔExoS	<i>exoS</i> -Defizientes PAK-Derivat	Michael Hogardt MvPI	Streptomycin
<i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium SL 1344	Wildtyp-Stamm	Frank Ebel MvPI, (Hoiseh and Stocker, 1981)	
SL 1344 Δ <i>invA</i>	SPI-1 TTSS defizientes SL-1344 Derivat	H. Rüssmann MvPI	Kanamycin
SL 1344 Δ <i>sptP</i>	<i>sptP</i> -defizientes SL-1344 Derivat	H. Rüssmann MvPI	Kanamycin
SL 1344 Δ <i>sopE</i>	<i>sopE</i> -defizientes SL-1344 Derivat	W.-D. Hardt, Zürich	Kanamycin + Streptomycin
SL 1344 Δ <i>sopE2</i>	<i>sopE2</i> -defizientes SL-1344 Derivat	W.-D. Hardt, Zürich	Tetracyclin+ Streptomycin
SL 1344 Δ <i>sopE</i> Δ <i>sopE2</i>	<i>sopE</i> - und <i>sopE2</i> -defizientes SL-1344 Derivat	W.-D. Hardt, Zürich	Kanamycin + Streptomycin + Tetracyclin

1.2 Plasmide

Tabelle II-3: Yersinien- und Pseudomonas Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
Yersinienplasmide		
pTTS pYopT	pACYC184 mit Insertion des YopT SycT Gens	MvPI (Trulzsch et al., 2003b)
pYV ΔYopT	pYV mit YopT Austausch durch Km ^r aus pACYC 177	MvPI (Trulzsch et al., 2004)
Pseudomoasplasmide		
pUCP ExoS	Wildtyp ExoS Expressions-Plasmid	Joe Barbieri University of Wisconsin USA, (Maresso et al., 2004)
pUCP ExoS (R146K)	ExoS Mutante mit mutierter GAP Domäne	Joe Barbieri University of Wisconsin USA, (Maresso et al., 2004)
pUCP ExoS (E381D)	ExoS Mutante mit mutierter ADPRT Domäne	Joe Barbieri University of Wisconsin USA, (Maresso et al., 2004)
pUCP ExoS (R146K, E379D, E381D)	ExoS Mutante mit mutierter GAP und ADPRT Domäne	Joe Barbieri University of Wisconsin USA, (Maresso et al., 2004)
pUCP ExoS (R146K, E381D)	ExoS Mutante mit mutierter GAP und ADPRT Domäne	Diese Studie

MATERIAL UND METHODEN

1.3 Zelllinien

Tabelle II-4: Murine Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Referenzquelle
J774 A1	Makrophagen	ATCC TIB-67
P388D1	Makrophagen	ATCC CCL-46
RAW 264.7	Makrophagen	ATCC TIB-71
ANA-1	Makrophagen	(Cox et al., 1989)
NIH/ 3T3	Fibroblasten	ATCC CRL-1658
PA6S	Fibroblasten	(Kodama et al., 1982)

Tabelle II-5: Humane Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Referenzquelle
Daudi	B-Zell-Lymphom (Burkitt)	ATCC CCL-213
NALM 6	B-Zell ALL	(Han and Minowada, 1978)
U937	Histiozytäres Lymphom	ATCC CRL-1593.2
Jurkat	T-Zell ALL	(Schneider et al., 1977)
Hek 293	Embryonales Nierenzellkarzinom	ATCC CRL-1573
HeLa	Cervixkarzinom	ATCC CCL-2
AGS	Adenocarcinom des Magens	ATCC CRL 1739
MKN-28	Adenocarcinom des Magens	(Imanishi et al., 1989)
CaCo2	Coloncarzinom	ATCC HTB 37
Granulozyten		Eigenblut
Mononukleäre Zellen		Eigenblut

1.4 Primer und Oligonukleotide

Tabelle II-6: PCR-Primer (5' → 3')

Gen	5' Primer	3' Primer
YopH	GGATCCAACCTTATCATTAAGCGATCTTCAT	GGATCCGCTATTTAATAATGGTCGCCCTTG
YscM	ATGAATTCAATGAAAATCAATACTCCTCAATCG	ATAGGATCCTCAGCCGTCAGCCGCCG
SycD	CATATGCAACAAGAGACGACAGACAC	GGATCCTCATGGGTTATCAACGAACTCATG
YscF	CGCGGATCCTTATGGGAACTTCTGTAGGATG	AGCTAGCCATATGAGTAATTTCTCTGGGTTTGC
YopQ	GGATCCGCACCTGATACAATAATAATACATC	GCCGCTCATCCCATAATACATTTTTGATCG

Tabelle II-7: Primer und Sonden für Quantitative Echtzeit-PCR (5' → 3')

Gen	5'Primer	3'Primer	Fluoreszenzsonde
KLF2-TM	GCCTTATCATTGCAACTGGG	CACACTTGTCCGGCTCGTT	TGAGCTTACCCGCCACT
HPRT-TM	GCTGGTGAAAAGGACCTCT	CACAGGACTAGAACACCTGT	TTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG

Die Fluoreszenzsonden sind FAM (5') und TAMRA (3') markiert. Die verwendeten Primer stammen alle von Metabion (München).

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle II-8: Oligonukleotide zur cDNA Synthese

Bezeichnung	Sequenz	Herkunft
Random Hexamer Primer	pd(N) ₆	Roche, Mannheim

1.5 Stocklösungen von Nukleotiden und Primern für PCR

PCR:

- dNTP 2,5 mM
- Primer Stocklösung (100 µM) in 1:5 Verdünnung verwenden

Quantitative Echtzeit-PCR:

- dNTP 10 mM
- Primer Stocklösung (100 µM) in 3 µM Verdünnung verwenden
- *hprt* und *Iklf* Stocklösung (100 µM) in 1:5 Verdünnung verwenden

cDNA Synthese

- Random Primer (100 µM) in 1:10 Verdünnung verwenden

1.6 Antikörper

Tabelle II-9: Erstantikörper für Westernblotdetektion

Bezeichnung	Spezifität	Herkunft	Verdünnung
α-YopT	Polyklonales Antiserum gegen YopT von <i>Y. enterocolitica</i> (Kaninchen)	Max von Pettenkofer Institut, München	1:5000
α-SopE	Polyklonales Antiserum gegen SopE von <i>Salmonella</i> Typhimurium (Kaninchen)	W.-D. Hardt, Zürich	1:5000
α-SopE2	Polyklonales Antiserum gegen SopE2 von <i>Salmonella</i> Typhimurium (Kaninchen)	W.-D. Hardt, Zürich	1:500
α-ExoS	Polyklonales Antiserum gegen ExoS von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Kaninchen)	Max von Pettenkofer Institut, München	1:5000

Tabelle II-10: Zweitantikörper für Westernblotdetektion

Bezeichnung	Spezifität	Herkunft	Verdünnung
Anti rabbit IgG	Horse radish peroxidase (HRP) gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchenimmunglobulin	Amersham Pharmacia Biotech, USA	1:5000

1.7 Antibiotika

Tabelle II-11: Antibiotikastocklösungen

Antibiotikum	Endkonzentration	Stocklösung (-20°C)
Kanamycin	50 µg/ml	5 mg/ml in H ₂ O
Tetracyclin	20 µg/ml	2 mg/ml in 70% Ethanol
Spectinomycin	50 µg/ml	5 mg/ml in H ₂ O
Streptomycin	20–50 µg/ml	1–10 mg/ml in H ₂ O
Carbenecillin	5 mg/ml	500 mg/ml in H ₂ O
Chloramphenicol	20 µg/ml	2 mg/ml in 70% Ethanol

1.8 Nährmedien und Zusätze für Bakterienkulturen

1.8.1 LB Medium/ Agar

20 g Bacto-Trypton

10 g Bacto-Hefeextrakt

10 g NaCl

ddH₂O ad 2 l und autoklavieren (15 Minuten bei 121°C und 1 bar)

Zur Agar Herstellung noch mindestens 15 g/l Agar zugeben.

1.8.2 LB Medium mit 0,3M NaCl

LB Medium nach Vorschrift herstellen und dann mittels 5 M NaCl auf eine Endkonzentration von 0,3 M NaCl bringen (z.B. 33,33 ml 5 M NaCl auf 500 ml LB Medium).

1.8.3 BHI Medium (Brain Heart Infusion)

37 g BHI Fertigpulver in einem Liter destillierten Wasser lösen und autoklavieren (15 Minuten bei 121°C und 1 bar).

1.8.4 Medium zur Induktion der Virulenzproteinexpression bei *Pseudomonas aeruginosa*

1 M MgCl₂ 2,0 ml

0,5 M EGTA 1,0 ml

BHI 97,0 ml

MATERIAL UND METHODEN

1.8.5 Einfriermedium für Bakterienkulturen

Bakterienkulturen werden in folgendem Medium eingefroren: 85% LB Medium und 15% Glycerin.

1.8.6 Stocklösungen für Stimulatoren zur Isolierung von Überstandsproteinen aus Yersinien

1 M MgCl₂ in H₂O

500 mM EGTA in H₂O pH 8,0

20% Glucose in H₂O

1.8.7 GC Agar

8% Pferdeserum

Vancomycin (10 mg/l)

Trimetoprim (5 mg/l)

Nystatin (1 mg/l)

1.9 Nährmedien und Zusätze für Zellkulturen

1.9.1 Allgemeines

Das Standard-Zellkultur-Nährmedium ist DMEM (Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% FBS (Invitrogen, Karlsruhe). Abweichend davon werden CaCo2 und MKN in DMEM mit 20% FBS kultiviert.

1.9.2 Zellkulturmedien und –zusätze

Standardzellkulturmedium:

- DMEM Zellkulturmedium
- 10% FBS
- 50 µM beta-Mercaptoethanol (Invitrogen, Karlsruhe)
- 2 mM L-Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe)

MATERIAL UND METHODEN

- 1x Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)

Zellkulturmedium für CaCo2 und MKN:

- DMEM Zellkulturmedium
- 20% FBS
- 1:100 Nicht essentielle Aminosäuren (Invitrogen)

Tabelle II-12: Zellkulturzusätze

Substanz	Konzentration
L- Glutamin 200 mM	100x Konzentrat (Invitrogen, Karlsruhe)
FBS	Fötale bovines Serum (hitzeinaktiviert)
Non Essentielle Aminosäuren	100x Konzentrat (Invitrogen, Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	100x Konzentrat: 10.000 IE/l Penicillin + 5.000 µg/ml Streptomycin
β-Mercaptoäthanol	Endkonzentration 50 µM
Trypsin EDTA	0,05% Trypsin, 0,5 M EDTA-Na in Hanks gepufferter Salzlösung

1.9.3 Einfriermedium für Zelllinien

Zelllinien werden in 90% FBS und 10% DMSO durch langsames Herunterkühlen (1°C/min) eingefroren und auf Flüssigstickstoff gelagert.

1.10 Chemikalien, Enzyme und Kits

1.10.1 Allgemeines

Die zum Einsatz kommenden Chemikalien sind von Sigma (Deisenhofen), Roche (Mannheim) oder Invitrogen (Karlsruhe). Der für die Quantitative Echtzeit-PCR benötigte Universal-Mastermix stammt von Applied BioSystems (Darmstadt) oder von Invitrogen (Karlsruhe). Die zur cDNA Synthese benötigte Superscript Reverse Transkriptase wird von Invitrogen (Karlsruhe) oder Promega (Mannheim) bezogen. Die fertigen PCR-Ansätze zur quantitativen Echtzeit-PCR von humanem *klf2* und *hprt* liefert Applied Bio Systems (Darmstadt).

1.10.2 Enzyme

Das verwendete Restriktionsenzym *DpnI* wurde von New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

MATERIAL UND METHODEN

1.10.3 Kits

Das zur Isolierung von Plasmid DNA verwendete QIA-Filter Plasmid Midi Kit wurden von Qiagen in Hilden bezogen.

1.11 Puffer und Lösungen

Tabelle II-13: Puffer und Lösungen

Lösung/ Puffer	Verwendete Chemikalien
PBS	137 mM NaCl/ 2,7 mM KCl/ 10 mM Na ₂ HPO ₄ / 2 mM KH ₂ PO ₄ / pH 7,4
TRIS pH 6,8/ 8,0	121,1 g Tris in 100 ml H ₂ O lösen; pH Einstellung durch Zugabe 5M HCl

1.11.1 DNA Gelelektrophorese

Agarosegel

Zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels 100 mg Agarose in 100 ml 1x TAE Puffer durch aufkochen lösen.

50x TAE-Puffer Stocklösung

- 242,0 g TRIS
- 57,1 ml Eisessig
- 37,2 g Na₂EDTA x 2H₂O
- ad 1,0 l H₂O
- pH 8,5 einstellen

DNA Laufpuffer

Zur Herstellung von DNA Laufpuffer 50x TAE zu 1x TAE verdünnen (10 ml 50x TAE + 490 ml ddH₂O).

1.11.2 SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese)

12% Trenngel

- 1,5 ml 40% Acrylamid
- 1,8 ml 1 µM TRIS pH 8,0

MATERIAL UND METHODEN

- 3,7 ml H₂O
- 100 µl APS (Ammoniumpersulfat)
- 10 µl TEMED
- Gel gießen und mit Butanol überschichten. Nach der Polymerisation Butanol abgießen.

5% Sammelgel

- 625 µl 40% Acrylamid
- 630 µl 1 µM TRIS pH 6,8
- 3.700 µl H₂O
- 100 µl APS (Ammoniumpersulfat)
- 10 µl TEMED
- Gel gießen, Kamm einsetzen und Polymerisation abwarten.

10x SDS Glycin Puffer

- 30,3 g TRIS
- 144,0 g Glycin
- 10,0 g SDS
- ad 1 l H₂O

APS 10%

1 g Ammoniumpersulfat in 10 ml ddH₂O lösen und bei 4°C lagern.

Laufpuffer

10x SDS Glycin Puffer zu 1x SDS Glycin Puffer verdünnen.

2x SDS Probenpuffer (2x Lämmli)

- 1 ml 1 M TRIS pH 6,8
- 4 ml 10% SDS
- 1 ml H₂O
- einige Körnchen Bromphenolblau
- Vor Gebrauch 2 ml 1 M DTT auf 10 ml Probenpuffer geben

MATERIAL UND METHODEN

Coomassiefärbelösung

- 0,25 g Coomassie Brilliant Blau R250
- 90 ml Methanol:H₂O 1:1 gemischt
- 10 ml Eisessig

Coomassieentfärbelösung

- 40% Eisessig
- 40% Methanol
- 20% H₂O

Coomassieblitzentfärber

- 250 ml Aqua dest
- 50 ml Eisessig
- 200 ml Äthanol

1.11.3 Westernblot

1x Nassblot Transferpuffer

- 3,03 g TRIS
- 14,4 g Glycin
- 200 ml Methanol
- ad 1.000 ml H₂O

Blockierlösung für Westernblot

- 1 % Milchpulver (entspricht 1 g)
- 100 ml PBS
- 0,2% Tween (entspricht 200 µl)

Ponceau-Lösung

- 1 g Ponceau S
- 2 ml Eisessig
- ad 200 ml H₂O

MATERIAL UND METHODEN

Chemolumineszierende Lösung (= ECL Reagenz):

Zur Herstellung von ca. 12 ml Arbeitslösung benötigt man:

- 12 ml TRIS-HCl pH 8,5
- 3,8 µl 30% H₂O₂
- 60,0 µl 250 mM Luminol gelöst in DMSO
- 26,6 µl 90 mM p-Cumarinsäure gelöst in DMSO

1.11.4 Nukleotide für Erststrang cDNA Synthese und PCR

dNTP-Mix 10 mM

- 100 µl dATP (100 mM)
- 100 µl dGTP (100 mM)
- 100 µl dCTP (100 mM)
- 100 µl dTTP (100 mM)
- ddH₂O ad 1 ml

dNTP-Mix 2,5 mM

- 25 µl dATP (100 mM)
- 25 µl dGTP (100 mM)
- 25 µl dCTP (100 mM)
- 25 µl dTTP (100 mM)
- ddH₂O ad 1 ml

1.11.5 Granulozytenisolierung

- 3% Dextran T 500 in 0,9% NaCl (salzige Dextranlösung); dies entspricht 7,5 g Dextran in 250 ml 0,9% NaCl
- 0,9% NaCl bei Raumtemperatur (9 g auf 1 l H₂O)
- Ficoll Hypopaque 1,077 g/ml
- 0,2% NaCl eiskalt
- 1,6% NaCl eiskalt
- PBS mit 10 mM Glucose

MATERIAL UND METHODEN

1.11.6 Lymphozytenisolierung

Balancierte Salzlösung zur Lymphozytenisolierung

Lösung A

Tabelle II-14: Zusammensetzung Lösung A

Endkonzentration	Einzusetzende Menge
0,1% Glucose	1 g/l Aqua Dest
50 μ M CaCl 2x H ₂ O	7,4 mg/l oder 50 μ l einer 1M Stocklösung auf 1l Aqua Dest
980,0 μ M MgCl ₂ x 6H ₂ O	199,2 mg/l oder 980 μ l einer 1 M Stocklösung auf 1l Aqua Dest
5,4 mM KCl	402,6 mg/l oder 5,4 ml einer 1M Stocklösung auf 1l Aqua Dest
0,145 mM TRIS	17,565 g/l oder 14,5 ml einer 1M Stocklösung auf 1l Aqua Dest

Substanzen in etwa 950 ml Aqua Dest lösen, pH auf 7,6 mit 10 N HCl einstellen und Volumen mit Aqua Dest auf 1 l auffüllen.

Lösung B

- 0,14 M NaCl (8,19 g/l)

Zuletzt Lösung A (10 ml) und Lösung B (90 ml) im Verhältnis 1:10 mischen.

1.12 Geräte

Tabelle II-15: Geräte

Gerät	Modell	Firma
Real Time PCR Cycler	ABI Prism 7.700 sequenz detection System	Applied Bio Systems
Thermocycler		Biometra

2. Methoden

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Kultivierung von Bakterien

Kulturen von *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* werden in LB Medium bzw. BHI über Nacht bei 27°C angesetzt. Für einen Infektionsversuch werden die Übernachtskulturen 1:10 verdünnt und für zwei Stunden bei 37°C bebrütet. Im Kühlschrank können beide Stämme auf LB Agar Platten ca. zwei Wochen überleben.

Helicobacter pylori wächst auf GC-Agar-Platten in einer mikroaerophilen Atmosphäre von 85% N₂, 10% CO₂ und 5% O₂ bei einer Temperatur von 37°C. Dabei gilt es zu beachten, dass der Erreger jeden zweiten Tag neu ausplattiert werden muss. Für einen Infektionsversuch erntet man *Helicobacter pylori* von der Platte, überführt ihn in DMEM-Medium und misst die OD bei einer Wellenlänge von 550 nm.

Campylobacter jejuni wächst bei 37°C in einer 5%igen CO₂ Atmosphäre auf Columbia Blutagarplatten. Für Infektionsversuche wählt man das dem *Helicobacter* entsprechende Vorgehen.

Staphylococcus aureus wächst bei 37°C auf Columbia Blutagarplatten.

Alle anderen in dieser Arbeit Verwendung findenden Bakterienstämme wachsen auf LB-Agar Platten und werden für Infektionsversuche in LB Medium kultiviert. Eine Ausnahme stellen die Salmonellenstämme dar, die in LB Medium mit 0,3 M NaCl angesetzt werden müssen.

Allen Agar Platten und Medien kann bei Bedarf Antibiotikum zugesetzt werden. (Konzentration siehe Seite 28 Tabelle II-11)

2.1.2 Einfrieren von Bakterien

Sollen Bakterien über längere Zeit gelagert werden, so werden sie bei -80°C eingefroren. Dazu überführt man eine Kolonie in 10 ml LB Medium und bebrütet sie über Nacht bei 37°C (27°C bei Yersinien). Am darauf folgenden Tag wird die Übernachtskultur für 10 Minuten bei 4.000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 2 ml

MATERIAL UND METHODEN

Einfriermedium aufgenommen und resuspendiert. Zuletzt die Bakteriensuspension gleichmäßig auf 1 ml Röhrchen verteilen und bei -80°C lagern.

2.1.3 Auftauen von Bakterien

Zum Auftauen entnimmt man mit einer sterilen Öse oder Pipettenspitze etwas von der tiefgefrorenen Bakteriensuspension, verstreicht diese auf einer geeigneten Agarplatte und bebrütet sie über Nacht bei 37°C (27°C bei Yersinien).

2.1.4 Messung der optischen Dichte von Bakterien

Die optische Dicht (OD) einer Yersinienlösung wird mittels eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gemessen. Dabei entspricht eine $OD_{600} = 0,6$ einer Bakteriensuspension von $1,5 \times 10^8$ Bakterien pro ml. Bei allen übrigen Gram-negativen Bakterienstämmen sowie bei *S. auerus* hingegen wird die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm (OD_{550}) gemessen, da die Ermittlung der Bakterienkonzentration pro ml anhand des McFarland Standards erfolgt. Dabei entspricht eine $OD_{550} = 0,5$ einer Bakteriensuspension von 6×10^8 Bakterien pro ml.

2.1.5 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Ziel ist es Bakterien für eine erleichterte Aufnahme von Plasmid-DNA zu präparieren. Hierzu wird das Verfahren nach Tung und Chow (Tung und Chow K.A., 1995) angewandt. Dazu zunächst 2 ml einer Übernachtskultur in 200 ml LB-Medium überführen und im Schüttler bei 37°C so lange inkubieren, bis sich eine $OD_{600} = 0,6$ einstellt. Dann in vier sterile, vorgekühlte 50 ml Gefäße überführen und für 15 Minuten bei 6.000 rpm und 4°C zentrifugieren. Danach den Überstand verwerfen, das Pellet in 4x 50 ml eiskaltem sterilen Wasser resuspendieren und für 15 Minuten bei 6.000 rpm und 4°C zentrifugieren. Pellet nun in zwei Röhrchen sammeln und Überstand verwerfen. Waschvorgang mit 2x 50 ml kaltem Wasser wiederholen und ein drittes Mal für 15 Minuten bei 6.000 rpm und 4°C zentrifugieren. Erneut Überstand restlos entfernen und Waschvorgang mit 2x 2,5 ml eiskaltem sterilen 10%

MATERIAL UND METHODEN

Glycerin wiederholen. Nochmals für 15 Minuten bei 6.000 rpm und 4°C zentrifugieren.

Pellet zuletzt in 2x 250 µl eiskaltem sterilen Glycerin aufnehmen und auf Aliquots von je 40 µl verteilen, in flüssigem Stickstoff schockfrieren und bis zu einem Jahr bei -80°C lagern.

2.1.6 Elektroporation

Zur Transformation von DNA in elektrokompetente Bakterien gibt man 2 µl Plasmid-DNA in H₂O zu 40 µl elektrokompetenter Bakterienzellen. Dieses Plasmid-Bakterien-Gemisch wird in die Elektrotransformationsküvette gegeben und bei 1,8 kV, 25 µF und 200 Ω transformiert. Die transformierte Bakteriensuspension sofort in 1 ml Medium verdünnen, dieses bei 37°C für eine Stunde inkubieren und zuletzt auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausstreichen.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Einfrieren von Zelllinien

Ausgehend von einer Einzelzellsuspension können Zellen mehrere Jahre in Flüssigstickstoff gelagert werden. Dazu Pellet nach Zentrifugation und Absaugen des Überstandes zunächst in 5 ml Einfriermedium überführen, und Suspension anschließend auf 5x 1 ml Röhrchen verteilen. Anschließend Zellsuspension langsam (etwa 1°C pro Minute) einfrieren und am Folgetag in flüssigen Stickstoff überführen.

2.2.2 Auftauen von Zelllinien

Entnahme aus dem Flüssigstickstoff und rasches Auftauen im Wasserbad bei 37°C. Nach Desinfektion des Röhrchens, überführt man die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen und gibt tropfenweise 10 ml des nötigen Zellkulturmediums dazu. Anschließend bei 1.200 rpm für 10 Minuten zentrifugieren. Zellen in neuem Medium aufnehmen und in Zellkulturschalen überführen.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl pro ml Medium erfolgt unter Zuhilfenahme der Neubauer Zählkammer. Dabei zunächst 30 µl der Zellsuspension mit 30 µl Trypanblau-Lösung mischen, wodurch sich tote Zellen blau anfärben. Daraufhin etwa 30 µl des Gemisches in die Neubauer Zählkammer geben, in der man nur die nicht angefärbten weißen Zellen aus zwei großen Quadranten (jeweils bestehend aus 4x4 kleinen Quadranten) zählt.

Zuletzt berechnet man die Zellzahl durch folgende Formel:

$$N = Z \times 10^4$$

N= Zellzahl in 1ml Probensuspension

Z= Zellzahl in zwei großen Quadranten

Abschließend Zellen zentrifugieren, mit der nötigen Menge an frischem Medium auffüllen und mit 3×10^6 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte in 4 ml Medium pro Well aussähen.

2.2.4 Isolierung von Granulozyten aus humanem Vollblut

Das zuvor entnommene antikoagulierte Blut und die salzige Dextranlösung im Verhältnis 1:1 mischen und 20 Minuten bei Raumtemperatur sedimentieren lassen. Anschließend das leukozytenreiche Plasma (obere Phase) mittels einer Pipette aufnehmen, in ein neues Röhrchen überführen und dieses bei 1.000 rpm und 5°C für 10 Minuten zentrifugieren. Überstand verwerfen und zum Pellet dieselbe Menge an 0,9% NaCl geben wie ursprünglich Blut vorhanden war. Im Anschluss Ficoll im Verhältnis 1:5 vorsichtig unter die Zellsuspension schichten, so dass eine Trennschicht entsteht (Bsp: 10 ml Ficoll auf 40 ml Zellsuspension). Nun für 40 Minuten ohne Bremse bei 1.400 rpm und 20°C zentrifugieren, den Überstand verwerfen und das am Boden des Röhrchens befindliche Pellet weiterverwenden.

Zur Erythrozytenentfernung, 20 ml 0,2% kalter NaCl zugeben und Pellet für 30 Sekunden resuspendieren. Anschließend Isotonität durch Zugabe von 20 ml 1,6% NaCl herstellen. Danach erneut für 6 Minuten bei 1.000 rpm und 5°C zentrifugieren. Diese beiden Aufreinigungsschritte so oft wiederholen bis keine Erythrozyten mehr sichtbar sind. Die so gewonnenen Granulozyten in eiskalter 10 mM PBS/Glucose-

MATERIAL UND METHODEN

Lösung resuspendieren, Zellen zählen und ins gewünschte Medium überführen. Die isolierten Zellen müssen noch am selben Tag in die Versuche eingesetzt werden, da sie bei Übernacht-Lagerung absterben.

2.2.5 Isolierung von Lymphozyten aus humanem Vollblut

Das antikoagulierte Vollblut wird mit der ausgewogenen Salzlösung im Verhältnis 1:1 gemischt. An Stelle der ausgewogenen Salzlösung kann auch PBS bei den einzelnen Schritten verwendet werden. Nun ein Volumenanteil Ficoll vorsichtig mit zwei Volumenanteilen verdünnten Vollblutes überschichten. Keinesfalls dürfen sich die beiden Phasen mischen. Gemisch für 30 bis 40 Minuten mit 1.400 rpm bei 18 bis 20°C ohne Bremse zentrifugieren. Danach obere Serumschicht vorsichtig absaugen (dabei die Lymphozytenschicht nicht beschädigen). In einem weiteren Schritt Lymphozyten waschen. Dazu mittels Pasteurpipette Lymphozytenschicht entnehmen und in ein neues Röhrchen überführen. 6 ml der ausgewogenen Salzlösung zugeben und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren Zellen resuspendieren. Anschließend Zellen für 10 Minuten bei 1.200 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen und erneut in 6 bis 8 ml ausgewogener Salzlösung resuspendieren. Erneutes Zentrifugieren für 10 Minuten bei 1.200 rpm und Überführen der Zellen in ein geeignetes Medium schließen die Lymphozytenisolierung ab.

2.3 Infektionsversuche mit *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*

2.3.1 Einstellung der MOI (Multiplizität der Infektion)

Bakterien einer induzierten (siehe Seite 36 2.1.1) Über-Nacht Kultur für 10 Minuten bei 4.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen und Pellet in 2 ml PBS resuspendieren. Nun OD₆₀₀ einer 1:10 Verdünnung messen. Dazu auf 900 µl PBS 100 µl Bakteriensuspension geben. Idealerweise stellt sich nun eine OD₆₀₀ = 0,5 ein. Sollte die OD höher sein, erfolgt die Bestimmung des zuzugebenden Volumens PBS nach folgender Formel:

$$\text{Zuzugebendes Volumen} = \frac{\text{Restvolumen}_{\text{nach Messung}} \times \text{gemessene OD}}{\text{Gewünschte OD}}$$

MATERIAL UND METHODEN

Im Infektionsversuch werden, um eine MOI von 50:1 zu erreichen auf 3×10^6 Zellen 90 μ l der Bakteriensuspension mit der $OD_{600} = 0,5$ gegeben.

2.3.2 Infektion verschiedener Zelllinien

Zelllinien vorbereiten; dazu in einer 6-Well-Platte 3×10^6 Zellen pro Well und 4 ml Zellkulturmedium aussähen. Die Zellzahlbestimmung erfolgt dabei wie oben beschrieben.

Nach zwei Stunden OD der Bakterienkultur wie beschrieben einstellen und auf 3×10^6 Zellen 90 μ l der Bakteriensuspension geben. Nach erfolgter Infektion 6-Well-Platte für 5 Minuten bei 1.400 rpm und 5°C ohne Bremse zentrifugieren, um einen Bakterien-Zell-Kontakt zu gewährleisten. Abschließend nach 60 minütiger Infektion bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre Infektion mit Gentamycin stoppen und nach einer weiteren Stunde RNA aus infizierten Zellen isolieren.

2.4 Infektionversuche mit verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Erregern

2.4.1 Einstellung der OD (optische Dichte)

Bakterienkolonien zunächst in 5 ml LB Medium animpfen, bei 37°C über Nacht bebrüten (Ausnahmen: *Helicobacter* und *Campylobacter*) und am nächsten Morgen 1:10 verdünnen.

Verdünnte Bakteriensuspension bei 37°C so lange bebrüten, bis sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase befinden ($OD_{550} > 0,4$). Sobald die OD_{550} 0,4 überschreitet, 1 ml der Probe entnehmen und exakte OD_{550} bestimmen. Dabei entspricht eine $OD_{550} = 0,5$ einer Bakterienkonzentration von 6×10^8 /ml.

Um die Bakterienkonzentration zu ermitteln geht man nach folgender Formel vor:

$$\text{Bakterienzahl/ml} = \frac{OD_{\text{gemessen}} \times 6 \times 10^8}{0,5}$$

Zur Bestimmung der Gesamtbakterienkonzentration multipliziert man das Ergebnis mit dem Gesamtvolumen der Bakteriensuspension. Zuletzt die exakte Menge an Volumen unter zu Hilfenahme des Dreisatzes bei bekannter Bakterienzahll, gewünschter Bakterienzahl und bekanntem Gesamtvolumen errechnen und Zellen im

MATERIAL UND METHODEN

Verhältnis 1:10 und 1:100 mit Bakterien infizieren. Auch bei *Helicobacter* und *Campylobacter* nach diesem Schema vorgehen, Bakterien allerdings direkt von Platte nehmen statt eine Übernachtskultur anzusetzen.

2.5 Arbeiten mit Proteinen

2.5.1 Isolierung von Überstandsproteinen aus *Yersinia* Kulturen

Ziel ist es, die durch das T3SS freigesetzten Proteine in ausreichender Menge für Western-Blot-Versuche aus dem Kulturüberstand anzureichern. Dazu am Vorabend 5 ml BHI mit einer Bakterienkolonie animpfen und über Nacht bei 27°C bebrüten. Am nächsten Morgen Übernachtskultur 1:40 in BHI (1 ml Kultur auf 39 ml BHI) verdünnen und zwei Stunden bei 37°C im Schüttler inkubieren. Zur Stimulation der Proteinsekretion ins BHI-Medium gibt man nach zwei Stunden:

- MgCl₂ 10 mM (40 µl 1 M MgCl₂ auf 40 ml Hauptkultur)
- EGTA 5 mM (200 µl 500 mM EGTA auf 40 ml Hauptkultur)
- Glucose 0,2 % (800 µl Glucose 20% auf 40 ml Hauptkultur)

Die stimulierte Hauptkultur für weitere zwei bis drei Stunden bei 37°C inkubieren. Anschließend Bakterien bei 4.000 rpm 30 Minuten zentrifugieren und Überstand fällen. Dazu 1,0 ml des Überstandes in Reaktionsgefäße überführen, 100 µl Tri-Chlor-Essigsäure (TCA) zugeben, kurz schütteln und für eine Stunde auf Eis lagern. Anschließend Proteine bei 14.000 rpm für 20 Minuten zentrifugieren und Überstand verwerfen. Pellet in 2 ml eiskaltem Aceton aufnehmen, für 20 Minuten auf Eis stellen und bei 12.000 rpm für 10 Minuten zentrifugieren. Diesen Schritt wiederholen und anschließend frisches Aceton zum Proteinpellet hinzufügen. Zuletzt Probe bei -20°C einfrieren.

2.5.2 SDS-PAGE mit Färbung nach Coomassie

Mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei bindet SDS Proteine proportional zu ihrer molekularen Masse und führt somit zu deren Dissoziation und Lösung. Da der SDS-

MATERIAL UND METHODEN

Proteinkomplex überwiegend negativ geladen ist (Anionen), wandert er im elektrischen Feld von der Kathode (Minus-Pol) zur Anode (Plus-Pol). Zur Auftrennung der Proteine wird ein 12% Trenngel überschichtet mit einem 5% Sammelgel sowie ein 1x SDS-Laufpuffer (1x Lämmli) verwendet.

Für SDS-PAGE vorgesehene eingefrorenes Proteinpellet zunächst von Aceton trennen und mit 15 µl H₂O sowie 15 µl 2x SDS-Probenpuffer (2x Lämmli) versetzen. Sollte die Farbe anschließend nicht blau sein, einige Tropfen 1 M TRIS zugeben. Das so vorbereitete Proteinpellet für 10 Minuten bei 99°C lösen, kurz zentrifugieren und ein 12% SDS-Polyacrylamidgel beladen. Damit die Proben im Gel homogen laufen, müssen alle Geltaschen beladen sein. Zunächst Spannung bei 120 V einstellen bis alle Proben in das Sammelgel eingelaufen sind, dann bei 180 V Gel für etwa eine Stunde laufen lassen, bzw. bis die Farbbande das untere Gelende erreicht. Anschließend Gel eine Stunde in Coomassiefärbelösung färben, Färbelösung verwerfen und nochmals für eine Stunde in Coomassieentfärbelösung bzw. über Nacht in Wasser entfärben. Zuletzt Gel fotografieren.

2.5.3 Westernblot

Polyacrylamidgel mit aufgetrennten Proteinen zusammen mit Filterpapier, Nitrozellulosemembran und Schwämmchen in 1x Transferpuffer einweichen, „Sandwich“ zusammenbauen (Reihenfolge: Schwämmchen - Filterpapier - Gel - Nitrozellulosemembran - Filterpapier - Schwämmchen) und Gel für eine Stunde bei 350 mA blotten. Dabei erfolgt ein Transfer der negativ geladenen Proteine entlang des elektrischen Feldes vom Polyacrylamidgel auf die Membran. Geblottete Membran für mindestens eine Stunde in Blockierlösung (1% Milchpulver PBS/0,2% Tween) inkubieren. Anschließend Blockierlösung verwerfen und Erstantikörper in geeigneter Verdünnung zugeben. Membran in Antikörper-Lösung eine Stunde bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubieren lassen. Anschließend Membran dreimal mit Blockierlösung waschen und Zweitantikörper in geeigneter Verdünnung dazugeben. Erneut für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubieren. Zuletzt frisch hergestelltes ECL Reagenz auf Blotmembran geben, eine bis zwei Minuten einwirken lassen und einen Röntgenfilm zur Belichtung auflegen.

2.5.4 Kultivierung von *P. aeruginosa* für Westernblotdetektion sezernierter Proteine

5 ml Übernachtskultur mit Induktionsmedium herstellen und bei 37°C bebrüten. Die Übernachtskultur 1:10 verdünnen, die OD₆₀₀ auf 0,5, 1,0 und 1,5 ansteigen lassen und bei der jeweiligen OD immer 1,4 ml Kultur entnehmen und 10 Minuten bei 8.000 rpm und 4°C zentrifugieren. Ganzzelllysat herstellen. Dazu Pellet in 200 µl 2x SDS-Pufferlösung (2x Lämmli) lösen. Dieses für 10 bis 15 Minuten bei 99°C erhitzen und anschließend bei 300 bis 400 rpm zentrifugieren. Zuletzt 10 ml des Lysats auf Gel auftragen und mittels ExoS-Westernblot detektieren.

2.6 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.6.1 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Mit Hilfe der PCR-Technik kann man einzelne DNA-Fragmente unter Zugabe von Primern, Nukleotiden und Polymerase mit exponentieller Kinetik amplifizieren. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA zunächst durch Erhitzen gelöst, so dass die DNA als Einzelstrang-DNA vorliegt, an die dann die zugebenen Primer annealen können. Der dafür nötige Versuchsaufbau sieht folgendermaßen aus:

Zunächst eine Bakterienkolonie in 100 µl Wasser resuspendieren und DNA bei 99°C für 10 Minuten aufschließen. Anschließend PCR-Mix (Gesamtansatz von 20 µl) wie folgt vorbereiten:

- 1 µl 5' Primer 20 µM
- 1 µl 3' Primer 20 µM
- 2 µl Taq-Puffer
- 0,2 µl Taq-Polymerase (Ampli Taq, Roche Mannheim)
- 5 µl Bakteriensuspension
- ddH₂O ad 20 µl.

Anschließend erfolgt die Amplifikation in einem Thermocycler (Biometra) nach folgendem Schema:

- DNA eine Minute bei 94°C denaturieren
- Amplifikation der DNA-Fragmente in 30 Zyklen:
 - 30 sec denaturieren bei 94°C

MATERIAL UND METHODEN

- 30 sec Annealing der Primer bei Primer-spezifischen Temperaturen
- 60 sec pro kB Extension bei 72°C
- Auf den letzten Zyklus erfolgt ein terminaler 10 minütiger Elongationsschritt bei 72°C
- Abkühlen des PCR-Produkts auf 4°C

Die Detektion amplifizierter DNA erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dazu ein 1%iges Agarosegel mit 20 µl DNA-Amplifikat sowie 5 µl Farbstoff beladen und Gel für etwa 30 bis 40 Minuten bei 120 V in 1x TAE Puffer laufen lassen. Zuletzt Gel für 10 Minuten in Ethidiumbromidbad tauchen, im Wasserbad kurz waschen und fotografieren.

Quantitative Echtzeit-PCR (Real Time PCR):

Die semiquantitative Bestimmung der mRNA-Expression erfolgt mittels Real-Time PCR. Dazu wird neben den Primern noch zusätzlich eine fluoreszenzmarkierte Sonde verwendet, die an die amplifizierte DNA bindet. Diese Sonde hat an ihrem 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff, während sich am 3'-Ende ein Quencherfarbstoff befindet. Aufgrund der geringen räumlichen Distanz zwischen Reporter- und Quencherfarbstoff wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs zunächst unterdrückt. Trifft während der PCR die Polymerase auf die Fluoreszenzsonde, so wird diese aufgrund der Nukleaseaktivität der Polymerase abgebaut. Somit akkumuliert bei jedem PCR-Zyklus freier Reporterfarbstoff im Reaktionsgefäß, dessen Fluoreszenz nach Anregung mit einem Argon-Laser detektiert werden kann. Die Anzahl der Temperaturzyklen, bei denen die Fluoreszenz erstmals nachgewiesen werden kann, steht dabei in Beziehung zur anfangs im Reaktionsgefäß vorhandenen Menge an DNA.

Anleitung zur Durchführung einer Real Time-PCR:

- cDNA 1:20 verdünnen (1 µl cDNA auf 19 µl H₂O)
- Herstellung des PCR Mixes (je einmal für *hprt* und *Iklf*)

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle II-16: Pipettierschema zur Herstellung eines Real Time PCR Ansatzes

	ABS-ASSAY DEMAND	on ABS (Applied Bio Systems)	INVITROGEN
Universal Mastermix	10 μ l	15 μ l	12,5 μ l
Assay on Demand	1 μ l	-	-
ROX	-	-	0,5 μ l
H ₂ O	3,5 μ l	4 μ l	1 μ l
cDNA	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Probe(<i>hprt/ Ikf</i>)	-	2 μ l	2 μ l
Primer1	-	2 μ l	2 μ l
Primer2	-	2 μ l	2 μ l

- Ansatz in 96 Well PCR-Platte pipettieren und cDNA hinzufügen
- Platte in Taq Man legen und PCR starten:
 - Zur Aktivierung der Uracil-N-Glycosyltransferase (im Universal Mastermix bereits enthalten) muss man zunächst für zwei Minuten auf 50°C erhitzen. Dadurch werden die vor PCR-Beginn entstehenden Amplifikate abgebaut. Erst jetzt kommt es zur Aktivierung der Taq Polymerase und Denaturierung der Proteine für 10 Minuten bei 95°C. Anschließend wird die eigentliche Amplifikation (zwei Stufen PCR) in 40 Zyklen gestartet:
 - 95°C 15 sec
 - 60°C 30 sec
- Die Auswertung erfolgt mit Hilfe von Microsoft Excel nach der 2^{- Δ ct}-Methode mit *hprt* als Referenzgen.

2.6.2 Isolierung von RNA aus infizierten Zellen

Zur RNA Isolierung von adhärennten Zellen verwirft man zunächst den Kulturüberstand und lysiert die Zellen in 1 ml Trizol[®] (Invitrogen, Karlsruhe) pro Well einer 6-Well-Platte.

Bei nicht adhärennten Zellen diese erst zentrifugieren und anschließend in Trizol[®] aufnehmen (max. 3x10⁶ Zellen pro ml Trizol). Die Trizolsuspension in Eppendorfküvetten überführen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Anschließend die Suspension mit 200 μ l Chloroform mischen, abermals für 5 Minuten stehen lassen und für 15 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugieren. Obere (klare) Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen, mit 500 μ l Isopropanol mischen und erneut für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Daraufhin für

MATERIAL UND METHODEN

10 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugieren. Überstand verwerfen, Pellet in 75% Ethanol aufnehmen und bei -20°C lagern.

2.6.3 cDNA Synthese für Real-Time-PCR mit Random-Hexameren

Zu Beginn Äthanol-Überstand abnehmen und RNA unter Vakuum vorsichtig trocknen. Zur Inaktivierung von RNAsen wird die RNA in 15 µl Diäthylpropiocarbonat behandelten Wasser (DEPC-Wasser) für 10 Minuten bei 55°C resuspendiert. Anschließend OD messen. Dazu 1 µl Probe in 49 µl DEPC-Wasser geben (1:50 Verdünnung); OD bei 260 nm photometrisch bestimmen, wobei eine Absorption von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml RNA entspricht. Somit unter Einbeziehung der Verdünnung die gesuchte RNA-Konzentration wie folgt berechnen:

$$\frac{OD_{\text{gemessen}} \times 40 \times 50}{1.000} = OD \times 2 = \text{RNA-Konzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l})$$

Danach zwischen 5 und 20 µg RNA (aber innerhalb einer Versuchsreihe die gleiche Menge) in 9 µl DEPC-Wasser lösen, 1 µl Random Hexamer Primer (100 µM) dazu geben und 10 Minuten bei 70°C inkubieren. Im Anschluss die Probe kurz auf Eis legen und nochmals für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. In der Zwischenzeit Mastermix herstellen, bestehend aus:

- 1 µl RNase out
- 4 µl 5x First Strand Buffer
- 2 µl DTT (beim Promega-Mix statt DTT Wasser dazugeben)
- 1 µl dNTP 10mM

Pro Ansatz 8 µl Mastermix zu den 9 µl RNA pipettieren. Zuletzt noch 1 µl Superscript-Reverse Transkriptase dazugeben und Mix für eine Stunde bei 42°C inkubieren.

2.6.4 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgt mit MIDI-Präp-Kits von Quiagen (Hilden), gemäß den Herstellerangaben.

2.6.5 Site-Directed-Mutageneseis

Prinzip:

Ziel ist es, in ein Plasmid gezielt eine Punktmutation einzuführen. Dazu Plasmid-DNA zunächst aufschließen und mutagene Primer annealen. Anschließend Plasmid mittels *Pfu*-Polymerase amplifizieren, die Tochterstränge bestehen dann aus unmethylierter DNA. Durch das Restriktionsenzym *DpnI* wird in einem weiteren Schritt die parenterale methylierte DNA ohne Mutation verdaut, während das PCR-generierte Plasmid mit der Punktmutation intakt bleibt und nach Transformation in *E. coli* repliziert werden kann.

Anleitung zur Durchführung einer Site-Directed-Mutagenesis:

Zunächst Plasmid-DNA mittels PCR amplifizieren

- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- x µl (5–50 ng) dsDNA
- x µl (125 ng) Primer 1
- x µl (125 ng) Primer 2
- 1 µl dNTP 2,5 mM
- ddH₂O ad 50 µl
- 1 µl *Pfu*-Turbo DNA Polymerase (2,5 U/µl)

Thermo-Cycler Programmierung:

- 1 Zyklus 95°C 30 Sekunden
- 12 Zyklen:
 - 95°C 30 Sekunden
 - 55°C 60 Sekunden
 - 68°C 60 Sekunden/kb Plasmidlänge

Nach erfolgreicher PCR, Probe für zwei Minuten auf Eis legen, 1 µl *DpnI* zugeben (10 U/µl) und Mix für eine Stunde bei 37°C inkubieren. Zuletzt 1 bis 2 µl des Mixes in elektrokompetente Bakterien transformieren (siehe Seite 38 2.1.6). Zur Erfolgskontrolle wird das transformierte Plasmid mittels einer Mini-Präp aus den Bakterien isoliert und sequenziert.

III. Ergebnisse

Wie in Vorversuchen gezeigt werden konnte, induzieren Yop-translozierende *Y. enterocolitica* die Expression des Transkriptionsfaktors *klf2* in murinen J774-Zellen in Abhängigkeit von der Produktion von YopT. Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Findet die *klf2*-Induktion nur in J774 Mausemakrophagen statt, oder kann dies auch in anderen Zellen geschehen?
- Ist nur *Y. enterocolitica* in der Lage, *klf2* mRNA in J774-Zellen zu induzieren, oder gibt es auch andere Bakterien, die hierzu befähigt sind?

1 YopT-vermittelte Induktion von *klf2* mRNA in verschiedenen Zelltypen

Zur Bearbeitung der ersten Teilfragestellung (*klf2*-Induktion in Zelllinien aus verschiedenen Ausgangsgeweben) wurden verschiedene humane und murine Zelllinien (s.u.) für zwei Stunden mit *Y. enterocolitica* WA-C, WA(pYV), WA(pYV,ΔYopT) oder WA(pTTS, pYopT) infiziert. Die Verwendung der YopT-Mutanten WA(pYVΔYopT) (Deletion des YopT-Gens) und WA(pTTS, pYopT) (Translokation von YopT als einzigem Yop) erlaubt es, zu beurteilen, ob die *klf2*-Induktion auch, wie in J774, YopT abhängig ist.

1.1 *klf2*-Induktion in verschiedenen humanen und murinen Zelllinien

Mit den oben erwähnten Yersinienmutanten werden folgende Zelllinien infiziert:
murine Makrophagen:

- J774
- P388 D1
- RAW
- Ana-1

ERGEBNISSE

murine Fibroblasten:

- PA6S
- 3T3

humane lymphoide Zellen:

- Daudi (B-Zell-Lymphom)
- Jurkat (T-Zell-Leukämie)
- U937 (Histiozytom)
- Nalm-6 (prä-B-Zell Leukämie)

humane fetale Nierenzellen:

- HEK 293

humane Cervixkarzinomzellen:

- HeLa

humane Colonkarzinomzellen:

- CaCo2

humane Magen-Adenokarzinomzellen:

- AGS
- MKN-28

primäre humane Zellen:

- PBMC
- Granulozyten

Hierbei zeigt sich, dass ähnlich wie in J774, *klf2* durch Infektion mit *Y. enterocolitica* in allen getesteten murinen Makrophagen-Zelllinien induziert werden kann (Abbildung 1). Diese Induktion ist in allen diesen Zelllinien, strikt abhängig von YopT: Die YopT-Deletionsmutante WA(pYVΔYopT) induziert keine *klf2* mRNA Expression mehr, während Translokation von YopT alleine durch Stamm WA(pTTTS, pYopT) zur *klf2*-Induktion ausreicht. Interessanterweise zeigen p388-Zellen bereits uninfiziert eine relativ hohe *klf2* mRNA Expression, diese wird nach Infektion mit WA-C oder WA(pTTTSΔYopT) deutlich supprimiert, was mit einem hemmenden Einfluss von Klf2 auf den Aktivierungszustand der Makrophagen erklärbar ist.

Im Gegensatz zu Makrophagen-artigen Zelllinien zeigen die untersuchten murinen Fibroblasten PA6S und 3T3 allenfalls eine marginale *klf2*-Induktion nach bakterieller Infektion (siehe Abbildung 1).

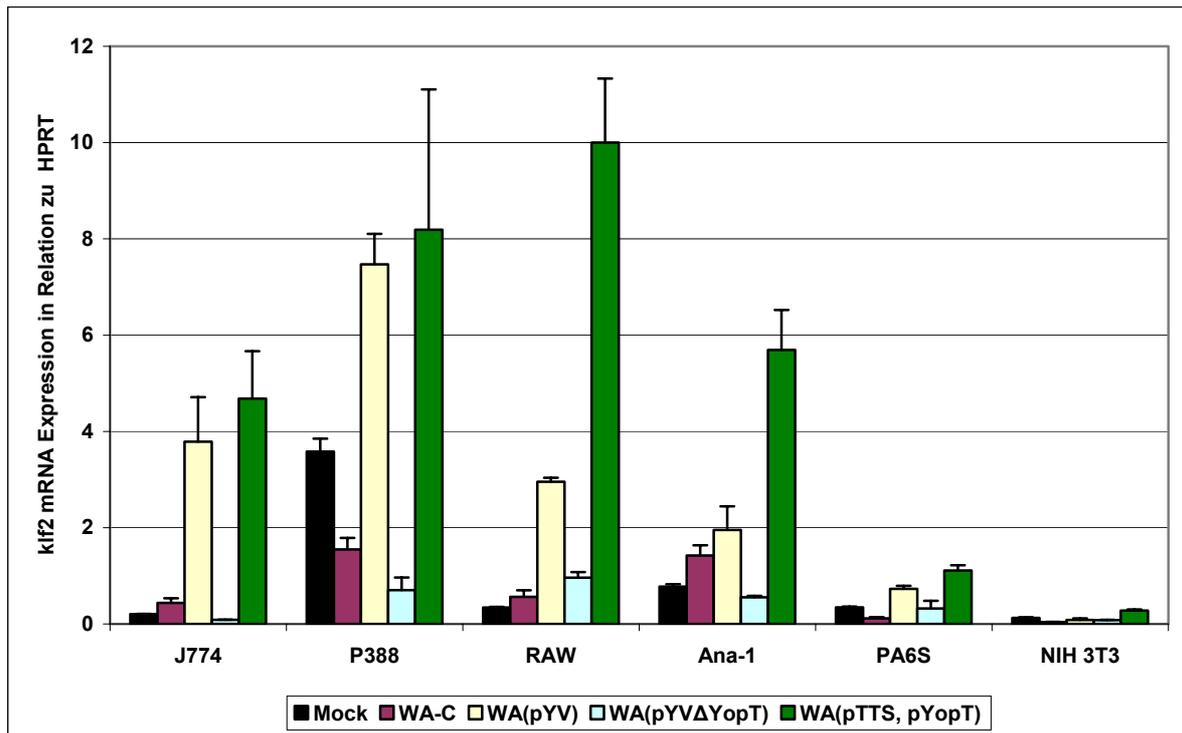


Abbildung 1: Detektion der *klf2* mRNA Expression mittels Real-Time PCR nach 2 stündiger Infektion (MOI 50:1) verschiedener muriner Zelllinien mit unterschiedlichen Yersinienmutanten. Dabei zeigt sich nach Infektion mit YopT translozierenden Yersinienmutanten eine Zunahme der *klf2* mRNA Expressionrate in Makrophagen, während dieser Effekt bei Fibroblasten (PA6S, 3T3) nicht zu beobachten ist. X-Achse: infizierte Zelllinien. Y-Achse: Expression von *klf2* mRNA in Relation zu HPRT als konstant exprimiertes Kontrollgen. Die Farbkodierung der Balken gibt die für die Infektionsversuche verwendeten Yersinienmutanten wieder. Mock: Nicht infizierte Zellen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an. Der maximale Genexpressionswert wurde auf einen arbiträren Wert von 10 skaliert. Alle anderen Werte sowie die Standardabweichung wurden an diesen Wert angeglichen.

In der Gruppe humaner Zelllinien konnte eine YopT-abhängige *klf2*-Induktion nachgewiesen werden für Zellen epithelialer Herkunft (Platten- und Magenschleimhautepithel, HeLa, AGS, MKN-28). Zellen lymphoider und embryonaler Herkunft zeigen keine anhaltende *klf2*-Induktion, ebensowenig wie ex vivo isolierte mononukleäre Zellen und Granulozyten (siehe Abbildung 2 und 3). Eine offensichtliche Ausnahme bildet die wenig differenzierte prä-B-Zelllinie Nalm-6, die nach Infektion mit WA(pTTS,pYopT) eine mäßiggradige *klf2*-Induktion zeigt. Dies könnte Ausdruck des geringen Differenzierungsgrades sein.

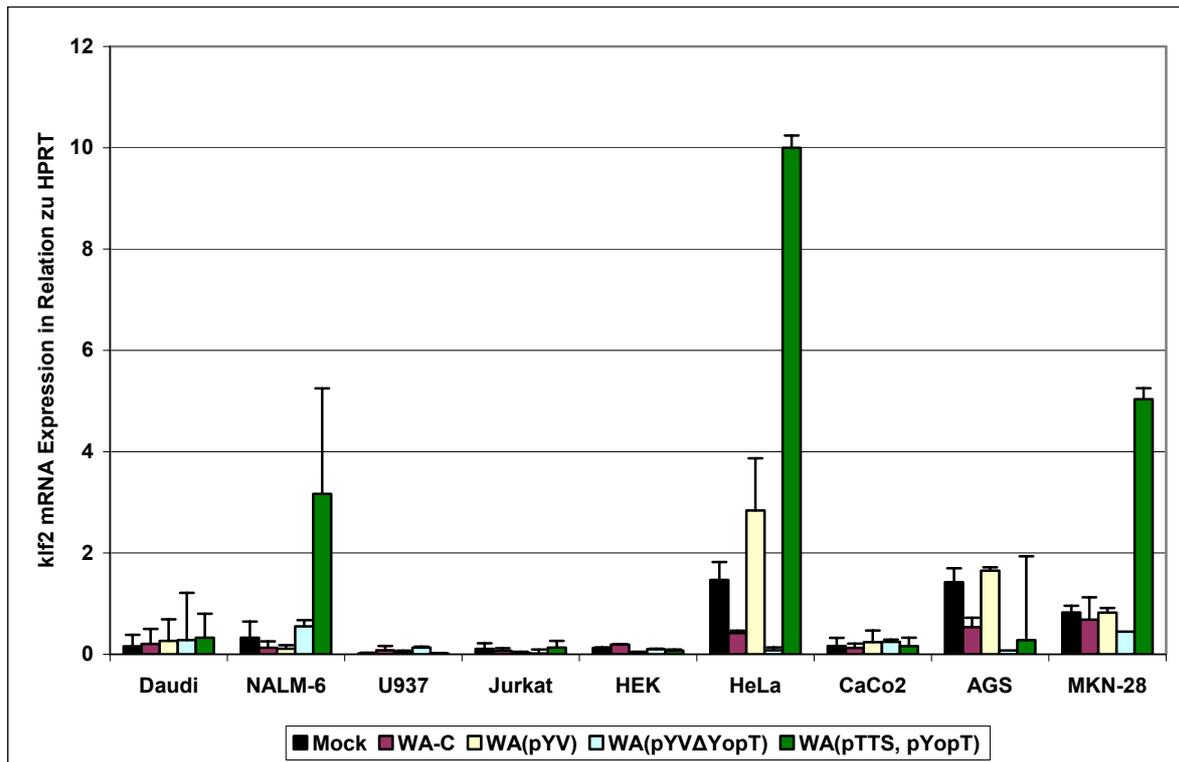


Abbildung 2: Infektion verschiedener humaner Zellen mit Yersinienmutanten über 2h (MOI 50:1). Infektion mit YopT translozierten Yersinien führt zu einer deutlichen Zunahme der *kif2* mRNA Expression in Zellen epithelialer Herkunft (HeLa, MKN-28). Die erhöhte Expressionsrate von *kif2* mRNA in der prä-B-Zelllinie Nalm-6 ist vermutlich ein Ausdruck deren geringen Differenzierungsgrades. Mock: Nicht infizierte Zellen, WA-C: PYV-Plasmidloser apathogener Yersinienstamm; WA(pYV): PYV-Plasmid positiver pathogener Yersinienstamm, (WA(pYVΔT): PYV-Plasmid positiver Yersinienstamm mit Deletion des YopT Gens; WA(pTTS,pYopT): Translokation von YopT als einzigem Yop.

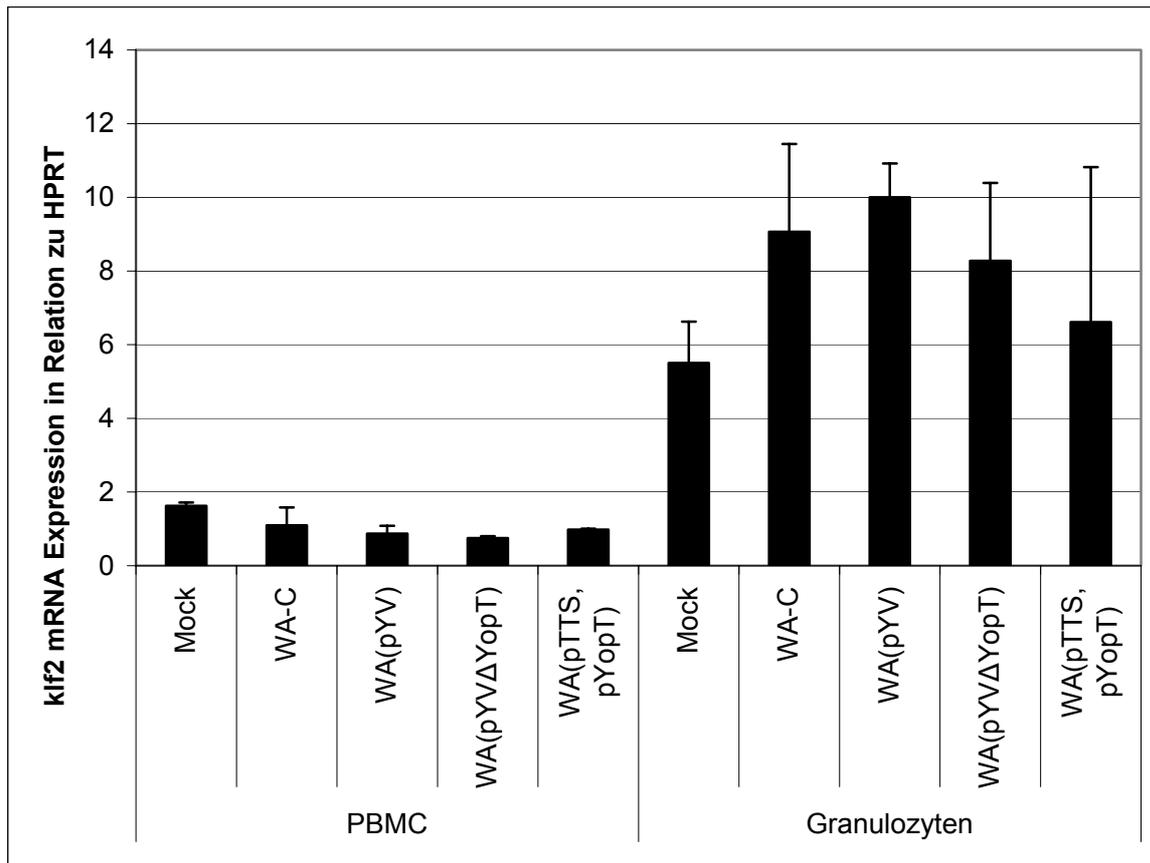


Abbildung 3: Infektion von Granulozyten und PBMC mit Yersinienmutanten über 2h (MOI 50:1). Ex vivo isolierte mononukleäre Zellen (PBMC) und Granulozyten zeigen keine erhöhte *kif2* mRNA Induktion nach Infektion mit YopT translozierenden Yersinien.

1.2 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die *kif2*-Expression nicht spezifisch für J774-Mausmakrophagen ist, sondern auch andere murine Makrophagenzelllinien diesen Effekt sehr wohl zeigen. Desweiteren ist die *kif2*-Induktion bei humanen Zervix- und Magenepithelzellen zu beobachten. Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die *kif2*-Induktion durch YopT vor allem typisch ist für Makrophagen und epitheliale Zellen.

2 Nachweis von pYV-Plasmid und Yop Sekretion in *Y. pseudotuberculosis*

Als nächste Teilfragestellung soll beantwortet werden, ob nicht nur *Y. enterocolitica*, sondern auch *Y. pseudotuberculosis* zur *kif2* mRNA Induktion in J774-Makrophagen

ERGEBNISSE

befähigt ist. Da in *Y. enterocolitica* die *klf2* mRNA-Induktion 2 Stunden nach der Infektion strikt vom Vorhandensein des pYV-Plasmides abhängig ist, wurden verschiedene *Y. pseudotuberculosis*-Stämme der Stammsammlung des Max von Pettenkofer-Institutes zunächst genotypisch auf die Präsenz von pYV-DNA und phänotypisch auf die Sekretion von Yop-Proteinen ins Kulturmedium überprüft.

2.1 Screening der Yersinien auf Vorhandensein des pYV-Plasmides mittels PCR

Der Nachweis von pYV-DNA erfolgte mittels PCR auf verschiedene, räumlich getrennte Bereiche des pYV-Plasmides: YopQ (bp 3826-4374), SycD (bp 13795-14301), YscF (bp 33405-33668), YscM1 (bp 37064-37411), YopH (bp 38085-39491). Für folgende *Y. pseudotuberculosis*-Stämme konnte somit pYV-DNA nachgewiesen werden:

Tabelle III-1: pYV-positive *Y. pseudotuberculosis*

Stamm-Nr	MvPI/ CDC	Phänotyp
5		IP 3295
531		146
533		201
534		346
542		III, pl B1
589		Serotyp O1b
591		Serotyp O2a
593		Serotyp O2c
594		Serotyp O3
596		Serotyp O4b
598		Serotyp O5b
601		Serotyp O8
603		Serotyp O10
686		200

2.2 Screening der Yersinien auf Yop-Sekretion mittels SDS-PAGE

Um sicherzustellen, dass die mittels PCR identifizierten pYV-positiven *Y. pseudotuberculosis*-Stämme auch ein funktionelles T3SS tragen, wurde mittels

ERGEBNISSE

Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Coomassiefärbung überprüft, ob Yops ins Kulturmedium sezerniert werden können. Hierbei zeigte sich, dass mit Ausnahme von Stamm 531 und Stamm 598 alle genotypisch pYV positiven *Y. pseudotuberculosis* Stämme zur Sekretion von Yops befähigt sind (PCR und SDS-PAGE Abbildungen siehe Anhang).

2.3 Zusammenfassung

Beide Screeningverfahren zusammen geben Auskunft über Geno- und Phänotyp der untersuchten Yersinien und ermöglichen somit die Auswahl der zur Bearbeitung der hier gestellten Frage geeigneten Stämme (siehe Tabelle III-2).

Tabelle III-2: Überblickstabelle pYV-Genotyp und Phänotyp der Yop-Sekretion bei *Y. pseudotuberculosis*

Stamm-Nr. MvPI/ CDC	Phänotyp	pYV-Plasmid	Yop-Sekretion
5	IP 3295	Positiv	Positiv
531	146	Positiv	Fraglich Positiv
533	201	Positiv	Positiv
534	346	Positiv	Positiv
542	III, pI B1	Positiv	Positiv
589	Serotyp O1b	Positiv	Positiv
591	Serotyp O2a	Positiv	Positiv
593	Serotyp O2c	Positiv	Positiv
594	Serotyp O3	Positiv	Positiv
596	Serotyp O4b	Positiv	Positiv
598	Serotyp O5b	Positiv	Positiv
601	Serotyp O8	Positiv	Positiv
603	Serotyp O10	Positiv	Positiv
686	200	Positiv	Positiv

3 Induktion von *klf2* in J774 Mausmakrophagen durch *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*

Um die Induzierbarkeit von *klf2* mRNA durch die verschiedenen Yersinienstämme in J774-Mausmakrophagen zu überprüfen, werden diese mit pYV-positiven und Yop

ERGEBNISSE

sezernierenden Yersinien in einer MOI (Multiplizität der Infektion) von 50:1 infiziert. Nach einer Stunde wird die Infektion mit Gentamycin gestoppt und nach einer weiteren Stunde RNA isoliert. Die gewonnene RNA wird in cDNA umgeschrieben, und die relative mRNA—Expression von *klf2* mittels *hprt* als Referenz- bzw. Housekeeping Gen quantifiziert, wobei *Y. enterocolitica* 8081 als Positivkontrolle und der plasmidfreie *Y. enterocolitica*-Stamm WAC als Negativkontrolle eingesetzt werden.

Dabei zeigt sich, dass bei *Y. enterocolitica* die *klf2* Transkription strikt pYV abhängig ist, während dies bei *Y. pseudotuberculosis* nicht zutrifft (siehe Tabelle III 3 und 4). Hier ist das Bild also heterogener als bei *Y. enterocolitica*.

Tabelle III-3: *Y. pseudotuberculosis*-Stämme die *klf2*-mRNA Expression induzieren

Stamm-Nr. MvPI	Phänotyp
5	IP 32 95
534	346
591	Serotyp O2a
601	Serotyp O8
603	Serotyp O10
686	200

Tabelle III-4: *Y. pseudotuberculosis*-Stämme die *klf2*-mRNA Expression nicht induzieren

Stamm-Nr. MvPI	Phänotyp
531	146
533	201
542	III, p I B1
589	Serotyp O1b
593	Serotyp O2c
594	Serotyp O3
596	Serotyp O4b
598	Serotyp O5b

Zusammenfassend ist daher festzuhalten, dass sowohl pYV-positive *Y. enterocolitica* als auch *Y. pseudotuberculosis* prinzipiell die Expression von *klf2* mRNA in murinen J774-Makrophagen induzieren können (siehe Abbildung 4).

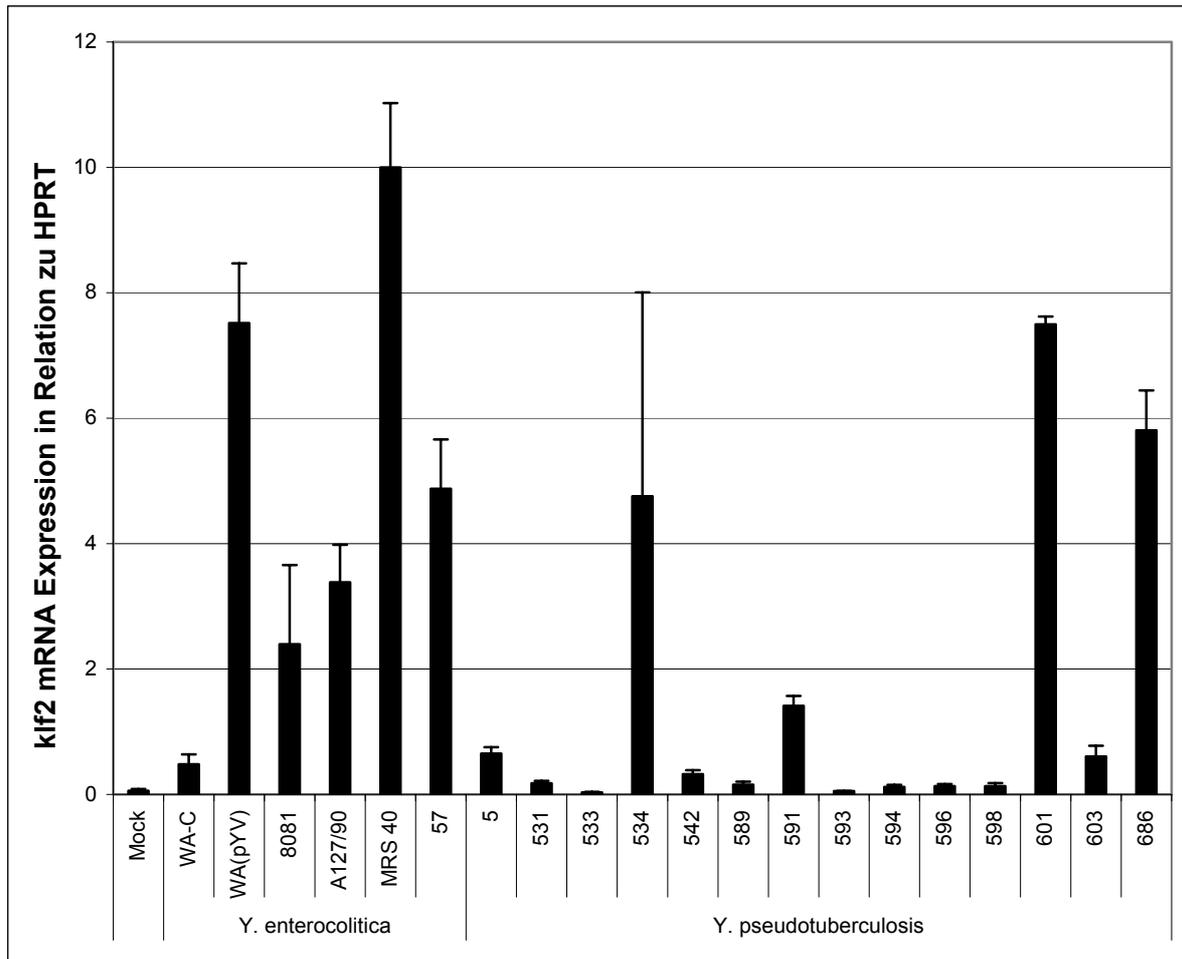


Abbildung 4: *klf2* mRNA Expression in J774-Makrophagen 2 Std. nach Infektion (MOI 50:1) mit verschiedenen *Y. enterocolitica* oder *Y. pseudotuberculosis* Stämmen. X-Achse: Mit unterschiedlichen Bakterien infizierte J774 Zellen. Y-Achse: Expression von *klf2* mRNA in Relation zu HPRT als konstant exprimiertes Kontrollgen. *Y. enterocolitica* 8081 dient als Positiv- und WA-C als Negativkontrolle. Mock: Nicht infizierte Zellen. PYV-positive *Y. enterocolitica* induzieren in J774 Makrophagen stets *klf2* mRNA Expression, wohingegen nicht alle pYV-positiven *Y. pseudotuberculosis* dazu fähig sind. Allerdings ist die *klf2* Induktion durch Stamm 5 und 603 sehr schwach.

Um zu prüfen, ob pYV-positive *Y. pseudotuberculosis* YopT synthetisieren, wurden Überstandsproteine der die *klf2* mRNA Expression induzierenden Stämme mittels Western Blot auf die Präsenz von YopT Protein hin untersucht. Wie in Abbildung 5 gezeigt, sezernieren *klf2*-induzierende *Y. pseudotuberculosis*-Stämme in der Tat YopT. Gleichzeitig kann der geringe Nachweis von YopT im Westernblot ein Hinweis auf die insgesamt geringe *klf2* Induktion durch Stamm 603 sein.

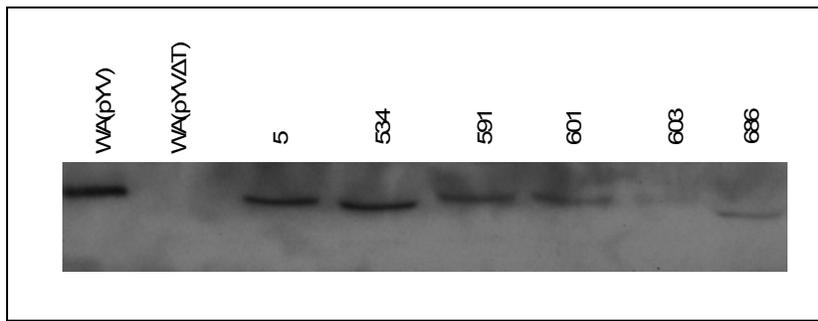


Abbildung 5: α -YopT Westernblot bei *Y. pseudotuberculosis*: Positiver Nachweis von YopT im Kulturüberstand pYV-positiver *Y. pseudotuberculosis* die *klf2* mRNA Expression in J774 Zellen induzieren. YopT wurde mittels eines polyklonalen, endogenes YopT erkennenden Antikörpers detektiert.

4 *klf2*-Induktion in J774-Mausmakrophagen durch verschiedene Gram-positive und Gram-negative Bakterien

Von diesen Ergebnissen ausgehend stellt sich nun die Frage, ob nur *Yersinia*-Spezies zur *klf2*-Induktion in murinen J774-Makrophagen befähigt sind oder ob dies auch durch andere Bakterien erfolgen kann.

Hierzu wurde eine Reihe Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien ausgewählt, die entweder ein bekanntes T3SS besitzen oder anderweitig zytotoxische oder immunsuppressive Toxine produzieren. Im Einzelnen wurden Referenzstämme folgender klinischer Isolate ausgewählt:

- *Campylobacter jejuni*
- *Helicobacter pylori*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Escherichia coli* (Pathotypen EHEC und EPEC)
- *Citrobacter freundii/ rodentium*
- *Hafnia alvei*
- *Salmonella typhimurium*
- *Shigella flexneri*
- *Listeria monocytogenes*
- *Staphylococcus aureus*

4.1 *klf2*-Induktion in J774-Makrophagen eine Stunden nach Infektion mit verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien

Vorversuche mit *Y. enterocolitica* haben gezeigt, dass auch plasmidfreie *Y. enterocolitica*-Stämme zu einer kurzfristigen *klf2*-Induktion in J774-Makrophagen in der Lage sind (Hoffmann et al., 2004). Daher sollte überprüft werden, ob dies auch für andere Bakterienarten gilt. Wie in Abbildung 6 dargestellt, ist dies in der Tat für die meisten untersuchten Bakterienstämme der Fall. Hieraus ergibt sich die Hypothese, dass eine transiente *klf2*-Expression eine physiologische Reaktion der Zelle auf Kontakt mit Bakterien darstellt. Offenbar haben manche Bakterien (*S. aureus*, *Yersinia spp.*, *P. aeruginosa*) Strategien entwickelt, eine nach >1h einsetzende Suppression der *klf2*-Expression zu verhindern. Im Weiteren sollen die dafür verantwortlichen Toxine von *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *S. Typhimurium* identifiziert werden.

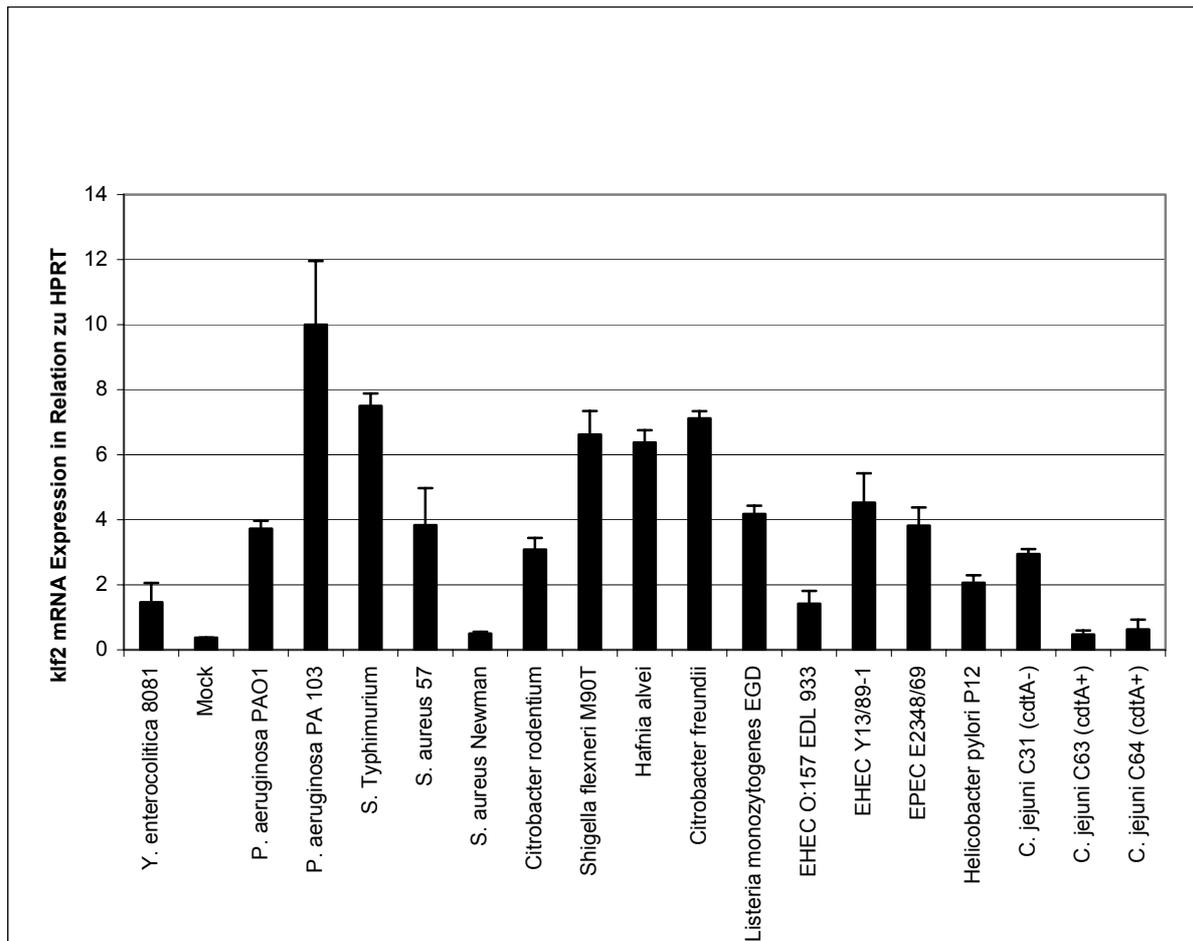


Abbildung 6: *klf2*-Induktion in J774-Makrophagen eine Stunde nach Infektion (MOI 50:1) mit verschiedenen Bakterien. Eine Stunde nach Infektion kann in J774 Makrophagen eine Zunahme der *klf2* Expressionsrate auf mRNA Ebene nachgewiesen werden. *Y. enterocolitica* 8081 dient als Positivkontrolle. Mock: Nicht infizierte Zellen.

4.2 *klf2*-Induktion in J774-Makrophagen zwei Stunden nach Infektion mit verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien

Um die *klf2*-Induktion o.g. Erreger mit der durch *Yersinia* hervorgerufenen vergleichen zu können, wurden zunächst identische Infektionsbedingungen (2 Std. Inkubationszeit) gewählt wie bei den Infektionversuchen mit *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*. Dabei zeigte sich, dass nicht alle untersuchten Bakterienspezies *klf2* mRNA Expression in J774-Zellen induzieren können. Neben *Yersinia* konnte eine signifikante Induktion von *klf2* mRNA lediglich für *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Salmonella* Typhimurium nachgewiesen werden. Allerdings ist das Ausmaß der *klf2*-Induktion durch *S. Typhimurium* deutlich geringer als durch *Yersinia*, *S. aureus* oder *P. aeruginosa*. Alle anderen untersuchten Bakterien zeigten keine signifikante Induktion von *klf2* mRNA (siehe Abbildung 7).

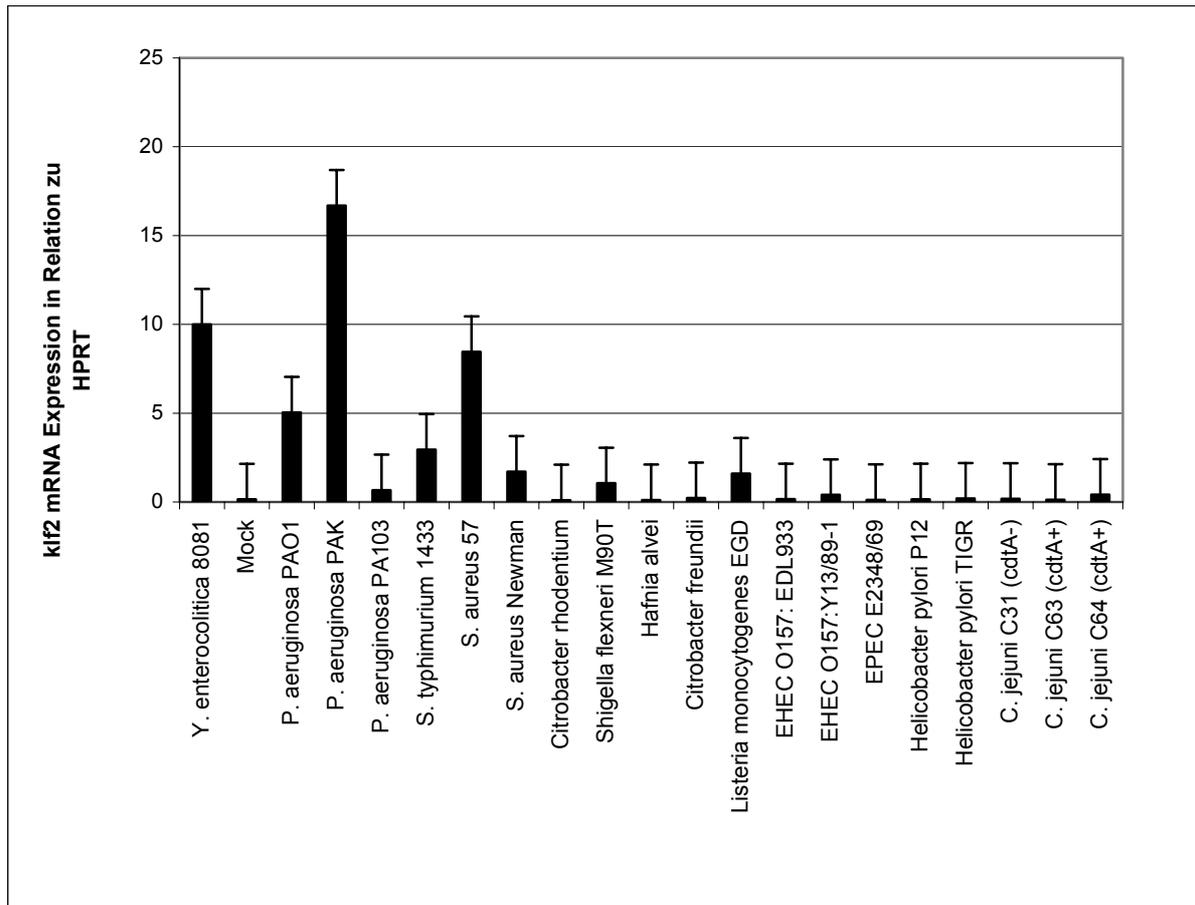


Abbildung 7: *klf2* mRNA Expression in J774-Makrophagen 2 Std. nach Infektion (MOI 50:1) mit verschiedenen Bakterien. EPEC: Enteropathogene E. coli. EHEC: Enterohämorrhagische E. coli. Zwei Stunden nach Infektion können neben *Y. enterocolitica* noch *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* und in geringeren Ausmaß auch *S. Typhimurium* die *klf2* mRNA Expression in J774 Makrophagen aufrechterhalten. *Y. enterocolitica* 8081: Positivkontrolle, Mock: Nicht infizierte Zellen

4.3 *klf2*-Induktion in J774-Makrophagen vier Stunden nach Infektion mit verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien

Als nächstes wurde die Zeitabhängigkeit der *klf2*-Induktion nach bakterieller Infektion untersucht. Dazu wurde die Infektionszeit auf 4 Stunden erhöht, wobei die J774-Makrophagen nicht mit allen Referenzstämmen infiziert wurden. So wurde von *Pseudomonas aeruginosa* und *S. aureus* nur Stämme verwendet, die bereits nach 2 Stunden eine Induktion der *klf2* mRNA-Expression zeigten.

Hierbei ergab sich ein weitgehend ähnliches Bild wie 2 Stunden nach Infektion: *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa* und *S. aureus* induzieren *klf2* mRNA Expression. Lediglich die geringe *klf2*-Induktion durch *S. Typhimurium* ist 4 Std. nach Infektion nicht mehr nachweisbar (siehe Abbildung 8).

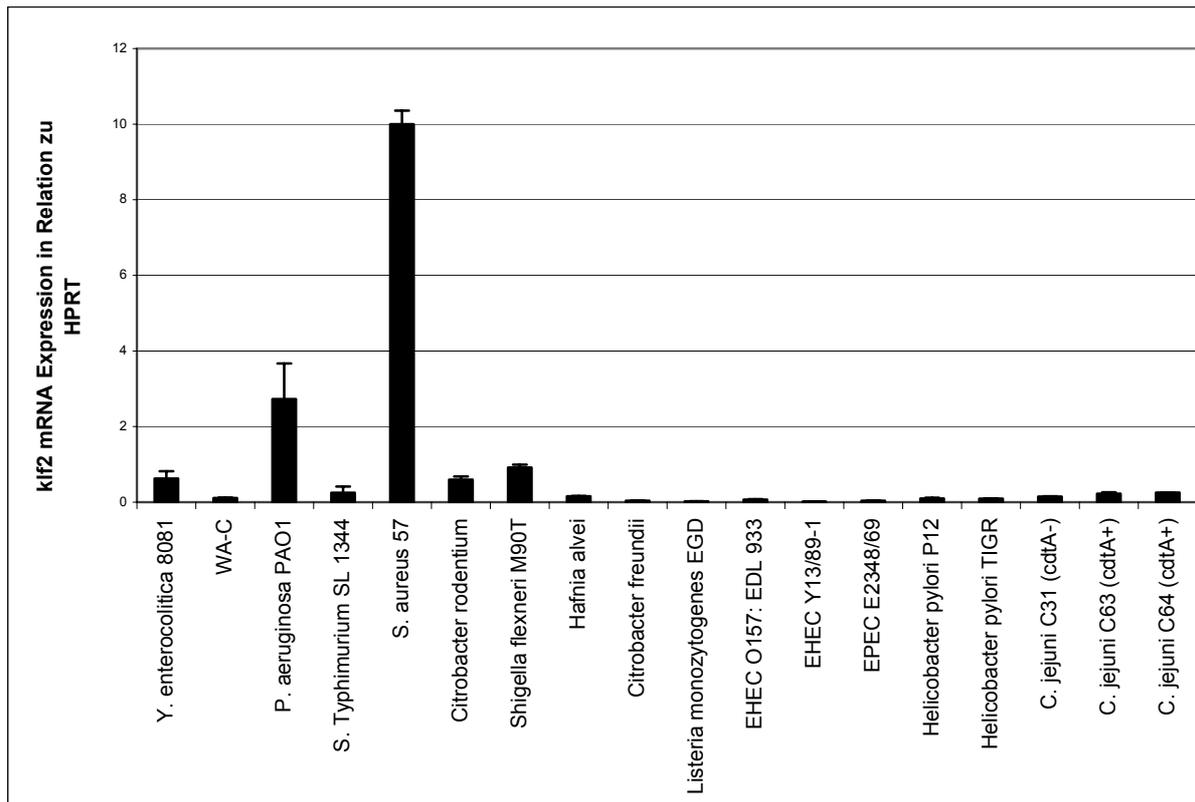


Abbildung 8: *klf2* mRNA Expression in J774-Makrophagen 4 Std. nach Infektion (MOI 50:1) mit verschiedenen Bakterien. EPEC: Enteropathogene E. coli, EHEC: Enterohämorrhagische E. coli. Vier Stunden post infektionem sind neben *Y. enterocolitica*, noch *P. aeruginosa* und *S. aureus* zur Aufrechterhaltung der *klf2* Expression in J774 Makrophagen fähig. *Y. enterocolitica* 8081: Positivkontrolle, WA-C: Negativkontrolle

5 Identifikation *klf2*-induzierender bakterieller Toxine

Wie unter Abschnitt 4 gezeigt, induzieren neben *Yersinia enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* auch *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* *klf2* Transkription in murinen J774-Makrophagen. Für *Y. enterocolitica* konnte bereits früher gezeigt werden, dass das Rho-inaktivierende Zytotoxin YopT für die *klf2* mRNA Induktion verantwortlich ist (K. van Erp, R. Hoffmann, unpublizierte Daten).

5.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus Stamm 57 (ein virulentes klinisches Isolat) induziert 2 Stunden nach Infektion *klf2* mRNA Expression in J774-Zellen (siehe Abbildung 9), während der Referenzstamm *Newman* dies nicht tut. Andere Versuche in der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Inkubation mit rekombinantem EDIN (*epidermal cell differentiation inhibitor*, eine ADP-Ribosyltransferase für kleine GTPasen der Rho-Familie) ebenfalls *klf2* mRNA Expression induziert (K. Dach und R. Hoffmann, unpublizierte Daten; (Sugai et al., 1990; Sugai et al., 1992)). Da bei *S. aureus* kein dem T3SS analoger Proteintransportkomplex bekannt ist, ist der Mechanismus, wie EDIN in das Zytoplasma der Wirtszelle gelangt, unklar. Eine Möglichkeit wäre, dass ein weiteres sekretiertes Protein von *S. aureus* die Aufnahme in die Zelle vermittelt. Unter dieser Hypothese wurden J774-Zellen mit Kulturüberständen von *S. aureus* 57, *S. aureus Newman*, *S. aureus 113 WT* und *S. aureus 113 pBR-EDIN* inkubiert (siehe Abbildung 9). Dabei zeigt sich, dass eine Infektion mit *S. aureus* Überständen nicht zur *klf2*-Induktion führt, was eher gegen diese Hypothese spricht. Desweiteren wird klar, dass ein alleiniges Vorhandensein von EDIN ebenfalls nicht ausreicht um *klf2* zu induzieren, da die Transformation eines EDIN-Expressionskonstrukts in einen EDIN-negativen *S. aureus*-Stamm diesen zur *klf2*-Induktion hätte befähigen müssen.

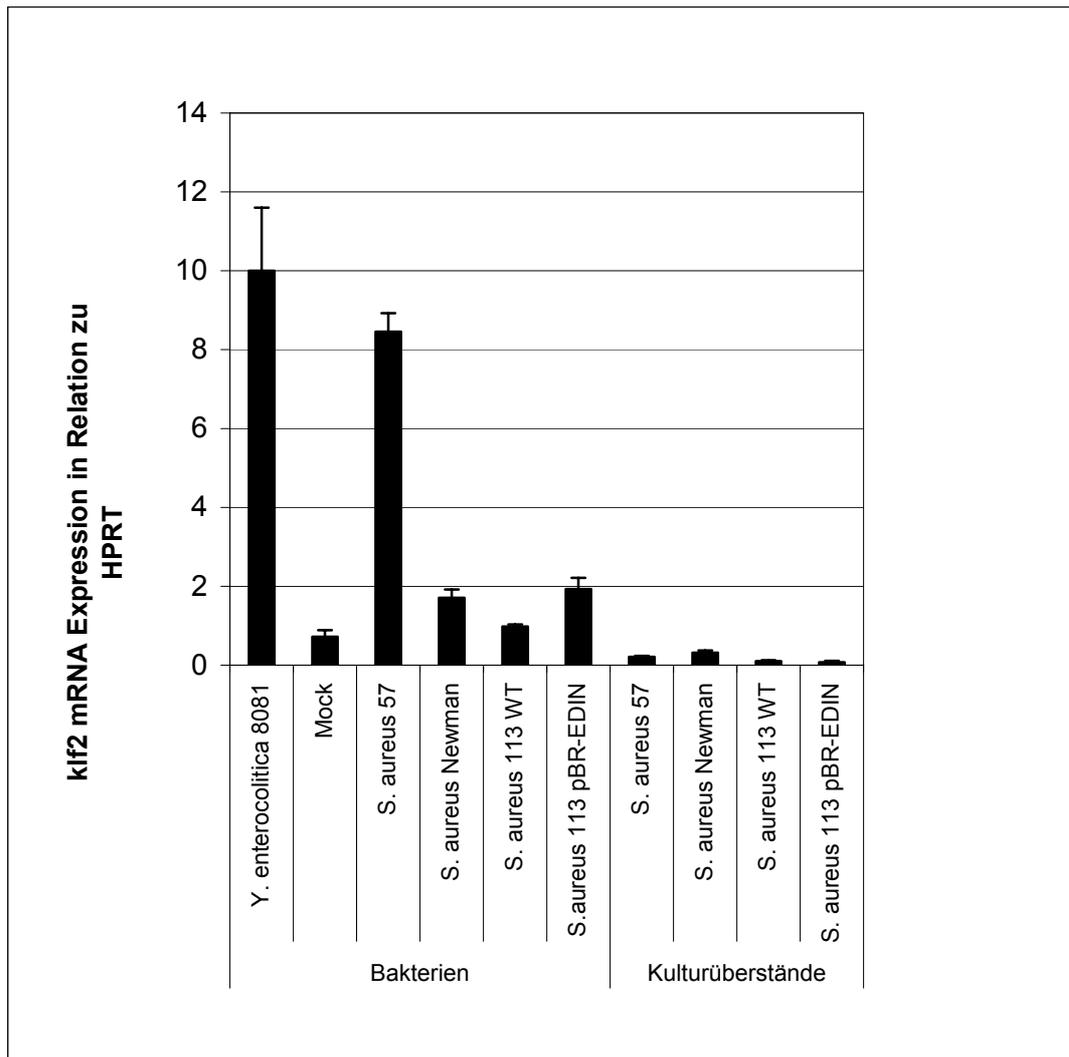


Abbildung 9: Detektion der *klf2* mRNA Expression mittels Real-Time PCR 2 Std. nach Infektion (MOI 50:1) von J774 Makrophagen mit verschiedenen *S. aureus* bzw. Inkubation der Makrophagen mit unterschiedlichen *S. aureus* Kulturüberständen über jeweils 2 Stunden. Der EDIN-positive *S. aureus* 57 kann *klf2* mRNA Expression in J774 Makrophagen induzieren, wohingegen die Applikation von EDIN haltigem Kulturüberstand alleine nicht dazu ausreicht. Ebenso wenig kann ein mit EDIN transfizierter EDIN-negativer *S. aureus* Stamm *klf2* Expression induzieren. *Y. enterocolitica*: Positivkontrolle, Mock: Nicht infizierte Zellen

5.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Wie in Abbildung 10 dargestellt, wird die *klf2* mRNA Expression durch die *P. aeruginosa*-Stämme PAO1 und PAK (ExoS+; ExoU-) induziert, nicht aber durch Stamm PA103 (ExoS-; ExoU+). T3SS negative Mutanten von PAO1 und PAK (Δ pcrD) sind jedoch nicht mehr zur *klf2*-Induktion in der Lage. Diese Daten deuten auf ein den Stämmen PAO1 und PAK gemeinsames, T3SS abhängiges Toxin als Induktor von *klf2* hin. Diese Bedingungen treffen z.B. auf ExoS zu.

ERGEBNISSE

Zur Klärung, ob ExoS an der Induktion der *klf2* mRNA Expression beteiligt ist, wurden folgende *P. aeruginosa* Mutanten eingesetzt:

- *POA1* *P. aeruginosa* Wildtyp-Stamm (ExoS+, ExoU-)
- *PAO1ΔpcrD* T3SS-defizienter *PAO1*
- *PAO1ΔexoS* ExoS-defizienter *PAO1*
- *PAK* *P. aeruginosa* Wildtyp-Stamm, (ExoS++, ExoU-)
- *PAK ΔpcrD* T3SS-defizienter *PAK*
- *PAK ΔexoS* ExoS-defizienter *PAK*
- *PA 103* *P. aeruginosa* Wildtyp-Stamm (ExoS-, ExoU+)

Auch hier diente *Y. enterocolitica* 8081 als Positivkontrolle.

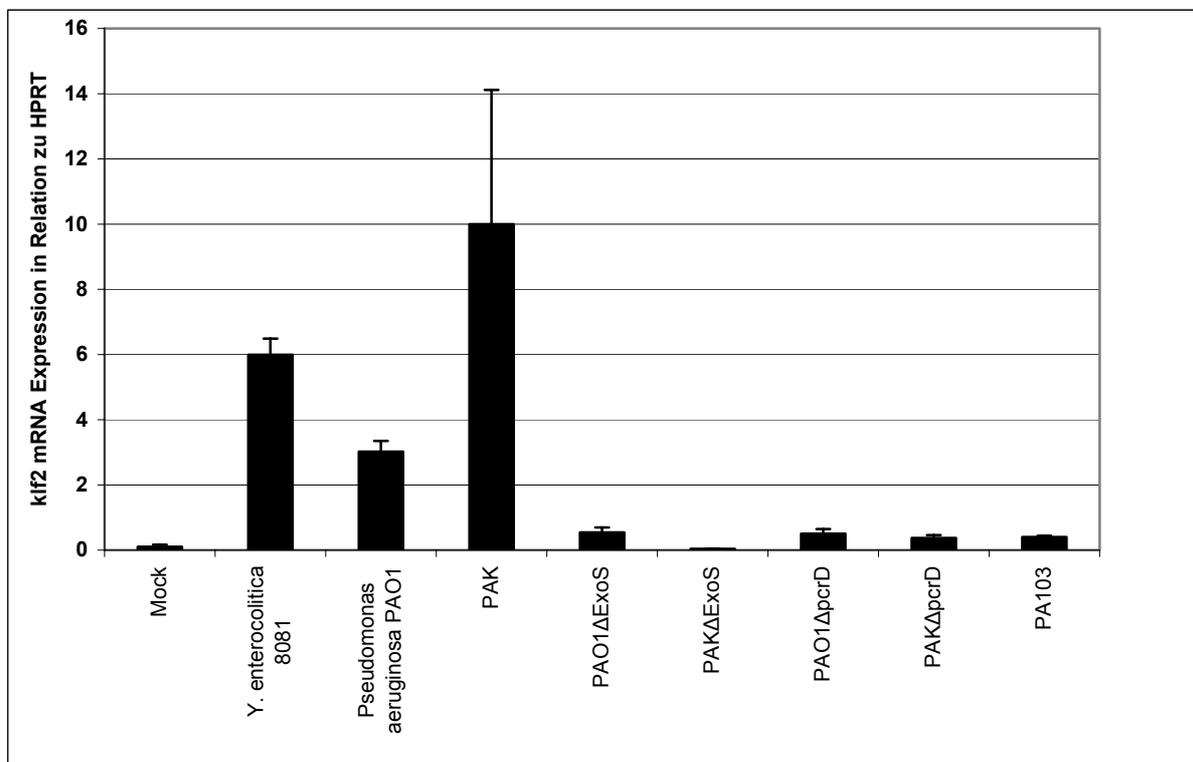


Abbildung 10: Infektion von J774 über 2 Std. mit *P. aeruginosa* PAO1, PAK, dem ExoS defizienten PA103 sowie verschiedenen Deletionsmutanten. ΔExoS: ExoS Deletionsmutante. ΔpcrD: T3SS defiziente Deletionsmutante. *Y. enterocolitica* 8081: Positivkontrolle. Mock: Nicht infizierte Zellen, PAK exprimiert im Vergleich zu PAO1 deutlich mehr ExoS. Deutlich zu erkennen ist die strikte Abhängigkeit der *klf2* Expression von der ExoS Präsenz.

Die Ergebnisse in Abbildung 10 zeigen, dass ExoS an der Induktion der *klf2* mRNA Expression beteiligt ist. Der ExoS negative Stamm PA 103 hingegen ist ebenso wenig wie die ExoS defizienten Mutanten von PAO1 und PAK zur Induktion der *klf2* mRNA Expression im Stande. Interessanterweise scheint die *klf2*-Induktion dabei von der Menge des translozierten ExoS abhängig zu sein, da der in Relation zu PAO1

ERGEBNISSE

vermehrt ExoS synthetisierende PAK Stamm im Vergleich zum PAO1 Stamm eine um etwa das Dreifache erhöhte *klf2* mRNA Expressionsrate aufweist. Dass die T3SS negativen Mutanten von PAO1 und PAK (Δ pcrD) zu keiner Expression der *klf2* mRNA im Stande sind, stützt die Vermutung, dass das T3SS abhängige ExoS an der Induktion der *klf2* mRNA durch *P. aeruginosa* beteiligt ist.

ExoS ist ein Toxin mit einer N-terminalen GAP Aktivität für GTPasen der Rho-Familie (Rho, Rac, CDC42) und einer C-terminal lokalisierten ADP-Ribosyltransferase-Domäne für zahlreiche zelluläre Substrate, u.a. GTPasen der Ras, Rab Rho-Familie oder auch Proteine der Ezrin/Moesin/Radixin-Familie (Goehring et al., 1999; Iglewski et al., 1978; Knight et al., 1995). Durch Austausch verschiedener katalytisch wichtiger Aminosäuren lassen sich gezielt GAP-defiziente (R146K), ADPRT-defiziente (E381D) und GAP- und ADPRT-defiziente (R146K E381D \pm E379D) Formen von ExoS herstellen (Barbieri and Sun, 2004).

Um zu untersuchen, welche der beiden katalytischen Aktivitäten von ExoS für die *klf2*-Induktion verantwortlich ist, wurde Stamm *PAO1 Δ ExoS* mit verschiedenen ExoS-Expressionskonstrukten komplementiert.

Im einzelnen sind das:

- *PAO1 Δ ExoS* (*pUCPExoS*) (ExoS-Wildtyp)
- *PAO1 Δ ExoS* (*pUCPExoS R146K*) (GAP-defizientes ExoS)
- *PAO1 Δ ExoS* (*pUCPExoS E381D*) (ADPRT-defizientes ExoS)
- *PAO1 Δ ExoS* (*pUCPExoS R146K, E379D, E381D*) (Gap- und ADPRT-defizientes ExoS)

Überraschenderweise wird sowohl durch die GAP-defiziente wie auch durch die ADPRT-defiziente Form von ExoS die *klf2* mRNA Expression induziert (Abbildung 11). Erst durch Inaktivierung beider funktioneller Domänen wird die *klf2*-Induktion durch ExoS verhindert. Dies wurde sowohl an der R146K, E379D, E381D-Tripelmutante wie auch an einer unabhängig mittels Site Directed Mutagenesis generierten R146K, E381D-Doppelmutante gezeigt (siehe Abbildung 11). Dies lässt den Schluss zu, dass sowohl die GAP- wie auch die ADPRT-Domäne von ExoS aus *P. aeruginosa* zur *klf2* mRNA Induktion in J774-Zellen in der Lage sind.

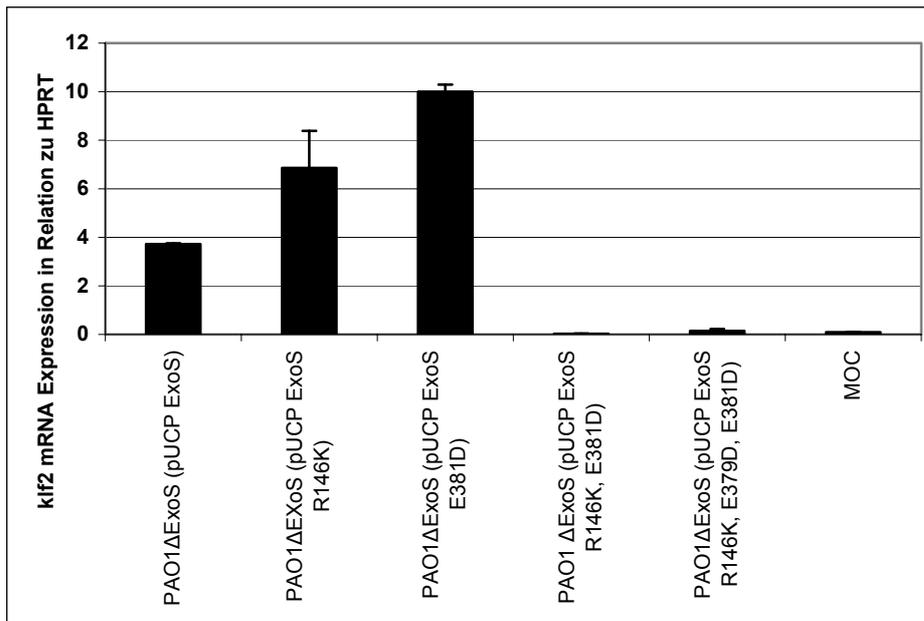


Abbildung 11: Infektion von J774 mit verschiedenen ExoS-Mutanten über 2h. Deutlich zu erkennen ist, dass weder eine GAP-Defizienz (PAO1 ΔExoS (pUCP ExoS R146K)) noch eine ADPRT-Defizienz (PAO1 ΔExoS (pUCP ExoS E381D)) für sich genommen zu einer nennenswerten Abnahme der *kif2* Expression führen. Erst Pseudomonaden mit einer kombinierten GAP-ADPRT-Defizienz von ExoS vermögen kein *kif2* mehr zu induzieren. Desweiteren vermögen die beiden ExoS Mutanten jeweils mehr *kif2* Expression zu induzieren als wildtypisches ExoS.

Um zu überprüfen, ob die rekomplementierten Mutanten die das ExoS positive pUCP-Plasmid aufgenommen haben auch ExoS synthetisieren, wird ein ExoS-Nachweis mittels eines Westernblots geführt. Dabei zeigt sich, dass in der Tat alle rekomplementierten Mutanten auch ExoS synthetisieren. Zur Kontrolle wurden PAO1 und PAK als Positiv- und PAO1ΔExoS, PAKΔExoS, PAO1ΔpcrD, PAKΔpcrD und PA103 als Negativkontrolle eingesetzt (Abbildung 12).

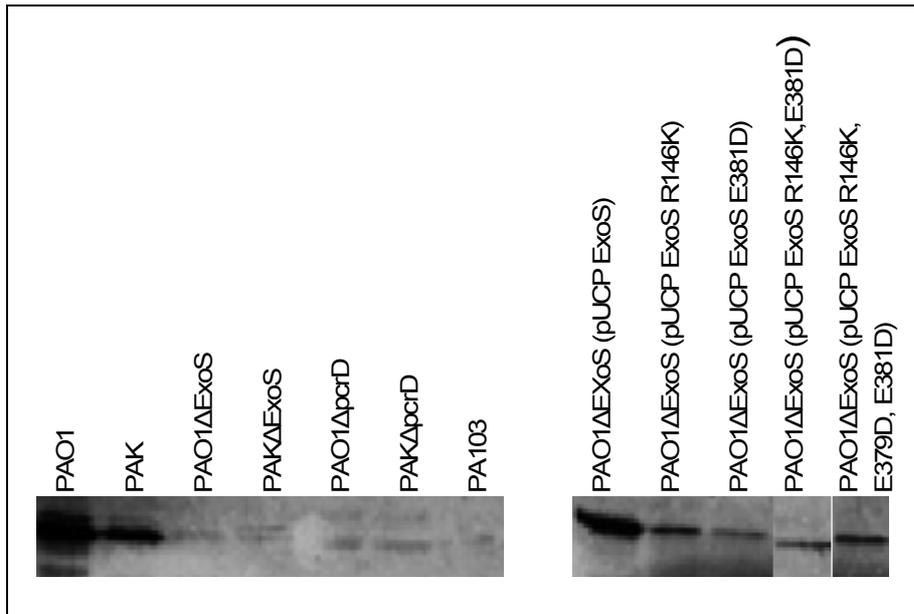


Abbildung 12: Nachweis von ExoS-Protein in Kulturüberständen verschiedener *P. aeruginosa*-Stämme und isogener Mutanten. Detektion von ExoS mit Hilfe eines Polyklonalen Antikörpers, der endogenes ExoS erkennt. PAO1ΔExoS(pUCPExoS) sezerniert dabei mehr ExoS als die jeweiligen ExoS Mutanten Stämme.

5.3 *Salmonella* Typhimurium

Wie in Abbildung 7 (Seite 61) gezeigt, ist auch *S. Typhimurium* zur Induktion der *klf2* mRNA Expression in der Lage. Auch hier werden zur Identifikation des *klf2*-induzierenden Toxins verschiedene isogene Mutanten eingesetzt. Mit Hilfe einer *invA*-defizienten Salmonellenmutante konnte SPI-1 als wichtiger Locus für die *klf2*-Induktion identifiziert werden (Abbildung 13). Drei der über SPI-1 translozierten Toxine, die mit kleinen GTPasen der Rho-Familie interagieren sind SptP und SopE/E2. Die dazugehörigen Mutanten sind:

- *S. Typhimurium* SL 1344 $\Delta invA$: (inaktiviertes SPI-1 T3SS)
- *S. Typhimurium* SL 1344 $\Delta sptP$: SptP Defizienz
- *S. Typhimurium* SL 1344 $\Delta sopE$: SopE Defizienz
- *S. Typhimurium* SL 1344 $\Delta sopE2$: SopE2 Defizienz
- *S. Typhimurium* SL 1344 $\Delta sopE/\Delta sopE2$: SopE und SopE2 Defizienz

Auch hier diente *Yersinia enterocolitica* 8081 als Kontrollstamm für die *klf2*-Induktion. Wie Abbildung 13 zeigt ist die Induktion vom Vorhandensein eines funktionellen SPI-1 T3SS abhängig. So zeigt der Wildtypstamm SL1433 wie erwartet eine *klf2*-Induktion, jedoch nicht die *invA* Mutante.

InvA ist für die Funktion des SPI-1 T3SS, über das verschiedene für die Bakterienaufnahme in die Zelle notwendige Proteine transloziert werden, essentiell; das Fehlen der *klf2*-Induktion bei Infektion mit einer *inv*-Mutante deutet auf eine wichtige Rolle eines über SPI-1 T3SS translozierten Proteins hin.

Als mögliche Kandidaten kommen die folgenden, mit kleinen GTPasen der Rho-Familie interagierenden, SPI-1 assoziierten Salmonellenproteine in Frage:

SptP gehört zur Familie der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) und zeichnet sich durch zwei katalytisch aktive Domänen aus. Das C-terminale Ende hat eine Tyrosinphosphataseaktivität und ist homolog zu YopH (Kaniga et al., 1996; Michiels and Cornelis, 1988). Die N-terminale GAP-Aktivität führt über Aktivierung von CDC42 und Rac-1 zu einer Neuorganisation des Aktin-Zytoskeletts (Fu and Galan, 1999) und weist Homologie zu ExoS und YopE auf (Kaniga et al., 1996). Da SptP, ebenso wie YopT *in vitro*, mit den kleinen GTPasen Rac und CDC42 interagiert (Fu and Galan, 1999), liegt die Vermutung nahe, dass auch SptP bei der Induktion der *klf2* mRNA Expression eine Rolle spielen könnte (Abbildung 13).

Obwohl über das T3SS von SPI-1 sezerniert, wird SopE nicht im SPI-1 Locus, sondern durch einen Prophagen kodiert (Hardt et al., 1998b). Aufgrund der Interaktion mit den Rho-GTPasen kann man eine Beteiligung von SopE und/oder SopE2 an der *klf2* mRNA Induktion vermuten.

SopE und SopE2 sind GEFs für Rac und CDC42 und sind auf Aminosäureebene zu ca. 70% identisch (Bakshi et al., 2000; Stender et al., 2000). Sie führen über Induktion von Actin-Rearrangements an der Kontaktstelle zwischen Salmonelle und Wirtszelle zu einem Membrane Ruffling und Internalisierung (Hardt et al., 1998a).

Wie in Abbildung 13 gezeigt führt Deletion von SopE2, nicht jedoch Deletion von SopE oder SptP zum Verlust der *klf2*-Induktion. Im Gegensatz dazu ist eine SopE/SopE2-Doppelmutante wiederum zu einer *klf2*-Induktion in der Lage. Um eventuelle Verwechslungen auszuschließen, wurde die Identität der SopE/SopE2-Mutante mit Hilfe eines Westernblots auf SopE und SopE2 überprüft und bestätigt (Abbildung 14).

ERGEBNISSE

Da man erwarten würde, dass eine SopE/SopE2-Doppelmutante ebenso wenig zur *klf2*-Induktion in den Lage ist wie eine SopE2-Einzelmutante und eine Verwechslung der Stämme ausgeschlossen wurde, lässt eine kritische Würdigung dieser Ergebnisse schließlich den Schluss zu, dass die Regulation der *klf2* mRNA Expression nach Salmonelleninfektion komplex und nicht allein durch die Wirkung von SopE2 erklärbar ist.

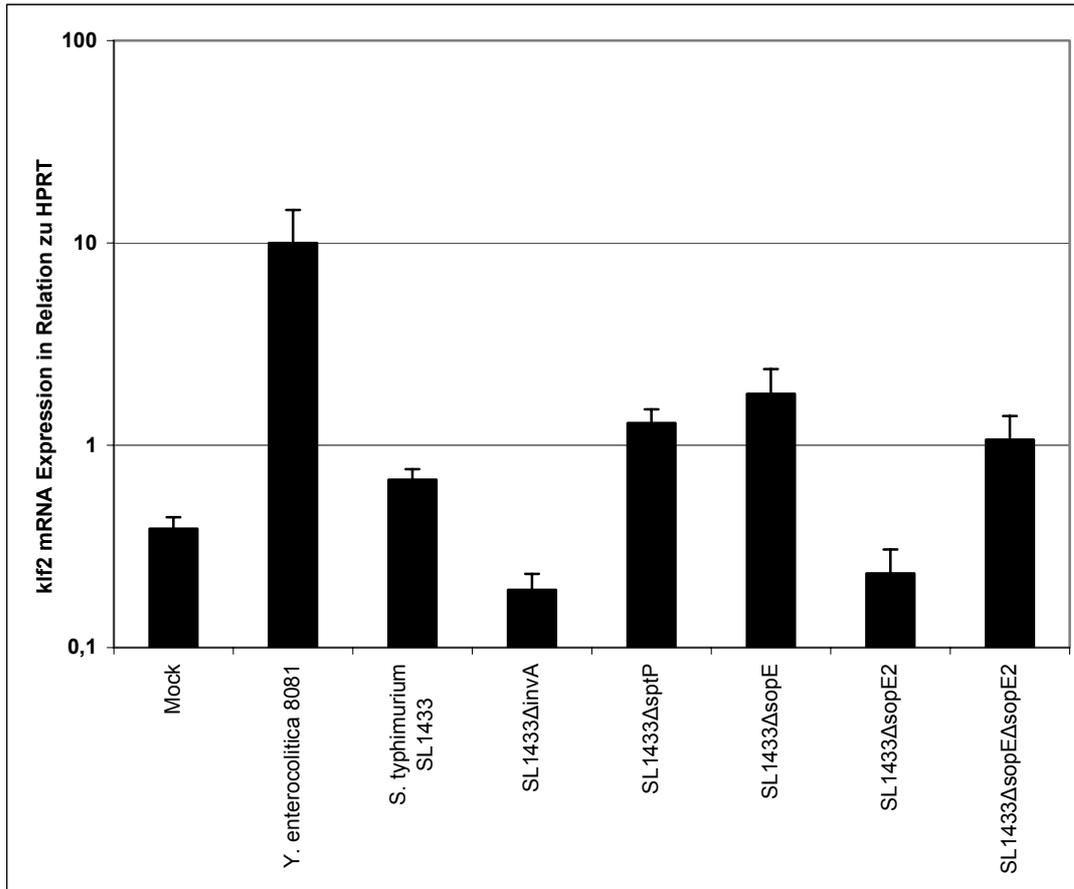


Abbildung 13: Infektion von J774 Makrophagen mit verschiedenen Salmonellamutanten über 2h. Die Regulation der *klf2* Expression durch Salmonellen ist nicht eindeutig. Weder eine SptP noch eine SopE defiziente Salmonellenmutante führen zu einer signifikanten Reduktion der *klf2* mRNA Expression. Eine SopE2 Deletionsmutante kann zwar keine *klf2* mRNA Expression mehr induzieren, jedoch ist eine Doppelmutante mit SopE/SopE2 Defizienz sehr wohl dazu fähig. *Y. enterocolitica* dient als Vergleichskontrolle. Mock: Nicht infizierte Zellen.

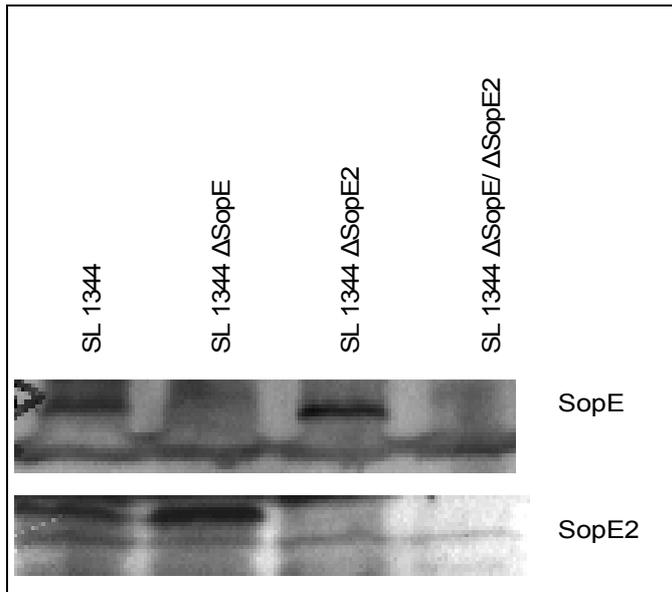


Abbildung 14: Westernblot auf SopE und SopE2. Detektion von SopE und SopE2 im Ganzzelllysate mit Hilfe polyklonaler Antikörper die das jeweilige Toxin binden. Der Salmonellen Wildtypstamm SL 1344 exprimiert beide Salmonellentoxine. In der SopE Deletionsmutante ist nur SopE2 und in der SopE2 Deletionsmutante nur SopE nachweisbar. Bei der SopE/SopE2 Doppeldeletionsmutante konnten beide Toxine nicht mehr detektiert werden.

IV. Diskussion

Genexpressionsstudien führten zur Identifikation einer Reihe von Genen, deren Expression in Makrophagen (Sauvonnet et al., 2002b; Hoffmann et al., 2004) und Epithelzellen (Bohn et al., 2004) durch die Effektorproteine (Yop) von *Yersinia enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* reguliert wird. Dabei wird die Transkriptionsantwort in Makrophagen nach Infektion mit pYV-positiven Yersinien auf zweierlei Weise beeinflusst: 1. die Induktion von Genen mit proinflammatorischer Funktion wird verhindert und 2. unterschiedliche Gene mit hemmender Wirkung auf die Entzündungsreaktion werden induziert (Hoffmann et al., 2004). Die Hemmung des proinflammatorischen Genexpressionsprogramms funktioniert wahrscheinlich über eine NFκB-Hemmung. Durch Acetylierung von IκB am Serin- und Threoninrest durch YopP (Acetyltransferase) wird die Phosphorylierung von NFκB und somit dessen Aktivierung unterdrückt (Worby and Dixon, 2006). Ein weiterer Mechanismus der YopP vermittelten Hemmung der Genexpression besteht darin, dass über den MAPK-Weg die Aktivität und Synthese von eIF2B einem wichtigen Regulator der Proteintranslation gehemmt wird (Sauvonnet et al., 2002b).

Ein weiterer Yop-Effekt auf das Transkriptom von Wirtszellen konnte von Bohn et al und Hoffmann et. al identifiziert werden. Bohn et al konnten zeigen, dass pYV-positive Yersinien in Epithelzellen zwei Stunden nach Infektion zu einer erhöhten mRNA-Expression von *NR4A2*, *klf2* und *GILZ* führen. Interessanterweise führen RhoB, Klf2 und GILZ in Zellen zu einer verminderten Gentranskription und inaktivieren diese (Bohn et al., 2004; Buckley et al., 2001). Eines dieser Gene, *klf2*, wird ebenfalls in Mausmakrophagen nach Infektion mit Yop translozierenden Yersinien induziert (Hoffmann et al., 2004).

1 Die Familie der Krüppel-Like-Faktoren

Krüppel-like-Faktoren (Klf) sind an die DNA bindende Regulatoren der Transkription, die in zellulären Differenzierungs- und Entwicklungsprozessen zahlreicher Gewebe eine wichtige Rolle spielen. Sie greifen in die Erythropoese, die Adipozytenreifung und die T-Zellregulierung ein. Des Weiteren wird ihre Bedeutung bei der

Karzinogenese bestimmter Tumoren ebenso diskutiert wie ihre Rolle bei Apoptose und Zellproliferation. So scheint *klf4* bei der Entstehung des Mammakarzinom eine Rolle zu spielen (Foster et al., 1999; Foster et al., 2000). Klfs binden an GC-reiche DNA-Abschnitte und regulieren so die Transkription. Zur Familie der Zink–Finger-Proteine gehörend, zeichnen sie sich durch drei Domänen aus: Einer C-terminalen DNA-Bindedomäne mit dem Zink–Finger-Motiv, einem nukleären Lokalisationssignal und einer N-terminalen, die Transkription regulierenden Domäne. Diese aminoterminal Domäne kann sowohl aktivierende als auch hemmende Funktion besitzen (Kaczynski et al., 2003).

2 Die Funktion von Klf2

Klf2 hat ein Molekulargewicht von ca. 38 kDa und wird durch einen 354 Basenpaare großen Open Reading Frame auf Chromosom 19 (Wani et al., 1999) kodiert. Es wird während der Gestation vor allem an den Tagen 7 bis 11 und 15 bis 17; und in Lunge und Milz erwachsener Mäuse exprimiert. In der Maus führt Deletion des *klf2* Gens zu gestörter Lungenentwicklung mit intrapulmonalen Hämorrhagien und embryonaler Letalität an dpc 11,5–13,5. Klf2-defiziente Mäuse zeigen nicht entfaltete Lungen sowie eine inkomplette Lungenreifung, die die kanalikuläre Phase nicht überschreitet. Die Entwicklung des Tracheobronchialbaumes ist dabei nicht beeinträchtigt. Ebenso wenig ist die Entwicklung der Surfactant produzierenden Typ II Pneumozyten gestört. Somit muss man davon ausgehen, dass Klf2 ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die späteren Stadien der Lungenentwicklung ist. Die embryonale Letalität zwischen Tag 11,5 und 13,5 ist auf eine fulminant verlaufende Hämorrhagie zurückzuführen, der vermutlich ein Hämatopoesedefekt und eine Instabilität der Tunica media großer Gefäße zu Grunde liegt (Wani et al., 1999; Wani et al., 1998).

Die zelluläre Funktion von *klf2* wurde in verschiedenen, ontogenetisch diversen Zelltypen untersucht. So wird in Endothelzellen *klf2* als Antwort auf Scherkräfte induziert (Dekker et al., 2002). Klf2 verhindert die Expression von Adhäsionsmolekülen als Antwort auf proinflammatorische Zytokine und fördert die Synthese antiinflammatorischer Faktoren wie z.B. eNOS (SenBanerjee et al., 2004). Dabei scheint die Scherkraft vermittelte *klf2*-Aktivierung Nukleolin abhängig zu sein.

DISKUSSION

Nukleolin bindet dabei in Makrophagen und Endothelzellen an den *klf2* Promotor und induziert die *klf2* mRNA Expression (Huddleson et al., 2006). Nukleolin ist ein zelluläres Protein, das bei der Transkription ribosomaler RNA-Gene, der Chromatindekondensation und der mRNA-Stabilisierung eine Rolle spielt (Bouche et al., 1984; Erard et al., 1990; Zaidi and Malter, 1994; Chen et al., 2000). Des Weiteren kann *klf2* die thrombinvermittelte proinflammatorische Aktivierung von Endothelzellen inhibieren (Lin et al., 2006). Im Gegenzug sind proinflammatorische Zytokine in der Lage die *klf2*-Genexpression zu inhibieren (Kumar et al., 2005). Dies zeigt dass *klf2* an der Hemmung der inflammatorischen Antwort beteiligt ist.

Daneben spielt *klf2* auch bei der Gefäßentwicklung eine wesentliche Rolle. So versterben *klf2* negative Mausembryonen an einer massiven Hämorrhagie infolge einer gestörten Gefäßmorphologie (Aneurysmen im arteriellen und venösen System als Folge einer dünnen Tunica media) (Kuo et al., 1997a).

In Präadipozyten überexprimiert bindet Klf2 an den PPAR- γ Promotor und inhibiert somit die Genexpression von PPAR- γ einem wichtigen nukleären Faktor der Adipozytenreifung (Banerjee et al., 2003). Als Folge wird die Differenzierung der Präadipozyten in Adipozyten gestört (Wu et al., 2005). Jedoch konnte kein kausaler Zusammenhang zwischen der Klf2-Expression und der Adipositaserkrankung hergestellt werden (Meirhaeghe et al., 2006).

Darüberhinaus war es möglich zu zeigen, dass *klf2* bei der Reifung einfach positiver T-Zellen (SP-Zellen, CD8+/ CD4- oder CD4+/ CD8-) induziert wird, und dessen Expression wichtig ist um die Aktivierung SP-T-Zellen zu verhindern. Daher haben *klf2* negative T-Zellen spontan einen aktivierten Phänotyp und werden rasch durch die Fas-Liganden induzierte Apoptose eliminiert (Kuo et al., 1997b). Des Weiteren ist die *klf2* Expressionsrate auch in T-Gedächtniszellen, einer weiteren ruhenden und langlebigen T-Zellpopulation erhöht, weshalb man Klf2 einen antiapoptotischen Effekt unterstellen kann (Schober et al., 1999). Konsistenterweise führt heterologe Expression eines *klf2* Transgenes in immortalisierten T-Zellen (Jurkat) zu einer verminderten Proliferation, verminderten Proteinbiosynthese (Abnahme der Proteinsynthese um 50% bei Überexpression eines *klf2*-Transgenes) und einer Abnahme der Expression von CD1a, CD71 und CD30, welche in aktivierten T-Zellen höher exprimiert werden als in ruhenden. Die Funktion von CD1a ist derzeit unklar.

DISKUSSION

CD71 spielt beim Eisenmetabolismus eine wichtige Rolle und ist in ruhenden T-Zellen vermindert exprimiert. CD30 ist ein für die Aktivierung der Zelle wichtiges Oberflächenprotein, das wohl über NFκB zur T-Zellaktivierung führt. Die Inositol-5 Phosphatase SHIP-1, ein negativer Regulator der Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen, führt in Jurkat T-Zellen zu einer Induktion von *klf2*; dies führt zu einer Hemmung der Zellproliferation (Garcia-Palma et al., 2005). Diese Daten deuten darauf hin, dass *klf2* in Jurkat T-Zellen ein wichtiger Regulator der Zellproliferation und des Zellmetabolismus ist (Buckley et al., 2001).

Für die beschriebene Hemmung der Zellproliferation scheinen sowohl die aktivierende als auch die inhibierende Domäne von *klf2* von Bedeutung zu sein. Dabei bindet Klf2 an den p21^{WAF1/CIP1} Promotor und verstärkt die Expression von p21. In der Folge wird das Wachstum von Jurkat T-Zellen unterbunden. Die genaue biochemische Funktion der inhibierenden Domäne ist bislang noch unklar (Wu and Lingrel, 2004). Allerdings ist bekannt, dass es durch Bindung von WWP1, einer E3 Ubiquitin Ligase, an die inhibierende Domäne zu einer verminderten Aktivität von Klf2 kommt, und somit zu einer verminderten Kontrolle und Regulation der inflammatorischen Antwort (Zhang et al., 2004).

Auch in Monozyten wird *klf2* exprimiert (Kuo et al., 1997b), jedoch konnten erst Das et al zeigen, dass eine Überexpression von *klf2* eine 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. Die Rekrutierung von Monozyten an Orte der Inflammation wird dagegen durch Klf2 nicht beeinflusst. Interessanterweise fanden sich bei Patienten mit Atherosklerose als Beispiel einer chronisch entzündlichen Erkrankung eine verminderte *klf2*-Expression in Monozyten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (Das et al., 2006).

Kuo et al konnten zeigen dass die *klf2*-Expression in T-Lymphozyten zu einer Inaktivierung der selbigen führt (Kuo et al., 1997b). Daher wird vermutet, dass die physiologische *klf2*-Genexpression in naiven T-Zellen eine wichtige Rolle bei deren Überleben spielt. Gleichzeitig scheint die T-Zellreifung im Thymus sowie die Erhaltung der B-Lymphozyten *klf2* unabhängig zu sein, da beispielsweise *klf2*-

negative B-Zellen nicht automatisch in den aktiven Zustand übergehen (Kuo et al., 1997b).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass Klf2 über seine vielfältigen, oftmals hemmenden Wirkungen eine zentrale Rolle in der Regulation und Kontrolle der inflammatorischen Antwort des Organismus spielt.

3 Induktion von *klf2* durch verschiedene Bakterienarten

Unsere Studien zeigten, dass *klf2* durch Infektion *in vitro* von Makrophagen und epithelialen Zellen mit *Yersinia enterocolitica*/*Y. pseudotuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oder *Salmonella* Typhimurium induziert wird. Verschiedene andere getestete Bakterienstämme, z.B. solche mit bekannten T3SS (*EPEC*, *EHEC*, *Citrobacter spp.*, *Hafnia spp.*), oder mit zytotoxischen (cytolethal distending toxin von *Campylobacter jejuni*) bzw. immunsuppressiv wirkenden Toxinen (Vac A von *Helicobacter pylori*) sowie verschiedene fakultativ intrazelluläre Bakterien (*Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*) führen hingegen zu keiner *klf2*-Induktion. Dies deutet darauf hin, dass eine anhaltende *klf2*-Induktion keine unspezifische Reaktion auf Infektion mit Bakterien ist, sondern eine spezifische Wirkung bestimmter bakterieller Toxine. Für die hier untersuchten Bakterienarten konnten die folgenden *klf2*-induzierenden Toxine identifiziert werden: YopT von *Yersinia spp.*, EDIN-B von *S. aureus*, und ExoS von *P. aeruginosa*. Die Rolle von SopE/SopE2 von *Salmonella* kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht eindeutig bestimmt werden.

4 YopT und *klf2*-Regulation

Unsere Arbeiten identifizierten YopT als *klf2*-induzierendes Yersinienprotein. Es ist eine über das T3SS translozierte Zysteinprotease. Der C-Terminus von YopT trägt die katalytische Domäne wohingegen das N-terminale Ende für die Substratbindung notwendig ist. YopT schneidet RhoA am Carboxyterminus, was zur Translokation von RhoA von der Membran ins Zytoplasma führt. Dies hat vermutlich eine Inaktivierung von RhoA zur Folge (Sorg et al., 2003; Zumbihl et al., 1999). Dabei kommt es zu

einer Aktin-Depolymerisierung, was eine Abrundung der Wirtszelle nach sich zieht (Iriarte and Cornelis, 1998). Während die Deletion von YopT zu einer verstärkten Phagozytose von *Y. enterocolitica* führt, reicht Translokation von YopT alleine nicht aus, um die Phagozytose signifikant zu hemmen, so dass an der Phagozytosehemmung noch andere Yop's beteiligt sein müssen (Grosdent et al., 2002). Wong et al konnten zeigen, dass YopT von *Y. pseudotuberculosis* zwar membrangebundenes Rac-1 von der Membran abspaltet, dieses jedoch nicht inaktiviert (Wong and Isberg, 2005). YopE hingegen kann membrangebundenes Rac inaktivieren, so dass das YopT geschnittene Rac-1 auch durch YopE nicht inaktiviert werden kann. Dies könnte die relativ wenig ausgeprägte Phagozytosehemmung durch YopT alleine erklären (Wong and Isberg, 2005). Ob dies auch für YopT von *Y. enterocolitica* gilt ist derzeit unklar.

Ob YopT mit weiteren GTPasen der Rho-Familie (CDC42 und Rac) interagiert wird derzeit allerdings noch kontrovers diskutiert. Shao et al zeigten, dass sowohl RhoA wie auch Rac-1 und CDC42 in YopT transfizierten HEK 293 Zellen geschnitten werden (Shao et al., 2002). Versuche unter physiologischeren Bedingungen hingegen konnten nur für RhoA, nicht jedoch für Rac-1 oder CDC42s eine proteolytische Modifikation und zytoplasmatische Umverteilung durch bakteriell transloziertes YopT von *Y. enterocolitica* nachweisen (Zumbihl et al., 1999; Aepfelbacher et al., 2003).

Zusammenfassend deuten diese Daten also darauf hin, dass, unter Infektionsbedingungen YopT von *Y. enterocolitica* zwar mit RhoA, nicht aber mit Rac und CDC42 interagiert. Dies legt den Schluss nahe, dass die *klf2* mRNA Induktion über eine Rho-Inhibierung vermittelt wird.

5 EDIN und *klf2*-Regulation

S. aureus besitzt eine Reihe von Exotoxinen, darunter auch ADP-Ribosyltransferasen (EDIN-Familie), die kleine GTPasen der Rho-Familie inhibieren (Matozaki et al., 2000; Takai et al., 2001; Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997). Von *S. aureus* ADPRT gibt es bislang drei bekannte Isoformen: EDIN-A, EDIN-B und

DISKUSSION

EDIN-C. Der Prototyp dieser Toxingruppe ist EDIN-A, der auf Aminosäureebene 35% Homologie zum C3-Toxin von *Clostridium botulinum* aufweist (Inoue et al., 1991). EDIN-B hat auf Aminosäureebene zu 78% Ähnlichkeit mit EDIN-A. C3-artige ADP-Ribosyltransferasen inhibieren Rho-GTPasen, nicht jedoch Rac oder CDC42 (Barbieri et al., 2002). EDIN-B inaktiviert RhoA und RhoB (Sugai et al., 1990) und inhibiert RhoE in Gegenwart von RhoA (Wilde et al., 2001). Durch Deaktivierung von Rho-GTPasen kann EDIN-B die Bildung von Aktinfilamenten in HUVEC-Zellen unterbinden, die Migration von Endothelzellen hemmen und die Wundheilung ebenso stören wie die terminale Keratinozytendifferenzierung *in vitro* inhibieren sowie das Zellwachstum stimulieren (Aepfelbacher et al., 1997; Sugai et al., 1992).

Wir konnten zeigen, dass ein EDIN-positiver *S. aureus*-Stamm eine *klf2* mRNA Expression in J774-Makrophagen zu induzieren vermag. Da, wie oben beschrieben, EDIN-B spezifisch für die Rho-GTPasen RhoA, RhoB und RhoE zu sein scheint, deutet dieser Befund - wie auch Befunde mit YopT - auf eine wichtige Rolle der Rho-GTPasen in der Regulation der *klf2*-Expression hin.

Es ist anzunehmen, dass EDIN-B intrazellulär vorliegen muss, um über Hemmung von Rho-GTPasen eine *klf2*-Induktion zu erreichen. Da die Inkubation von J774-Zellen mit rekombinantem EDIN-B (wobei EDIN-B lediglich passiv in die Zelle übergehen kann) sehr viel länger zur *klf2*-Induktion benötigt als die Infektion mit lebenden *S. aureus*, kann postuliert werden, dass die Infektion mit *S. aureus* die intrazelluläre Aufnahme von EDIN-B erleichtert. Da bei *S. aureus* (im Gegensatz zu vielen Gram-negativen Bakterienarten) kein Proteintranslokationssystem bekannt ist, stellt sich die Frage, wie *S. aureus* die Aufnahme von EDIN in das Zytoplasma der Wirtszelle erleichtert. Es ist bekannt, dass von Endothelzellen phagozytierte *S. aureus* das Endosom verlassen und im Zytoplasma frei existieren können (Menzies and Kourteva, 1998; Bayles et al., 1998). Daher wäre eine Hypothese, dass von *S. aureus* direkt ins Zytosol freigesetztes EDIN mit den Rho-GTPasen interagiert und somit eine *klf2*-mRNA Expression induzieren kann. Des Weiteren ist denkbar, dass es Kofaktoren gibt, die neben der Bindung an einen zellulären Rezeptor auch die Toxinaufnahme in die Zielzelle vermitteln, wie dies z.B. für binäre Toxine wie das Diphtherietoxin beschrieben ist. Ebenso kann aber auch die Toxinkonzentration an

den Kontaktstellen so hoch sein, dass die *klf2*-mRNA Expression auch über eine passive Aufnahme von EDIN-B in die Zielzelle erklärt werden könnte.

Die Tatsache, dass die Transfektion eines EDIN-B Expressionskonstruktes in einen EDIN-B negativen *S. aureus*-Stamm nicht ausreicht, um eine Induktion der *klf2*-mRNA Expression in J774-Makrophagen nach Infektion hervorzurufen, lässt die Hypothese zu, dass *S. aureus* weitere Komponenten besitzt, die die intrazelluläre Aufnahme von EDIN erleichtern.

6 ExoS und *klf2*-Regulation

ExoS wird über das T3SS von *Pseudomonas aeruginosa* in das Zytoplasma der Zielzelle transloziert. Es kommt in einer 49 und einer 53 kDa Form vor und hat zwei funktionelle Domänen, eine N-terminale GAP- und eine C-terminale ADPRT-Domäne. Da die 53 kDa Form im Gegensatz zur 49 kDa Form keine ADPRT-Aktivität besitzt, nimmt man an, dass es sich hierbei um eine ExoS-Vorstufe handelt (Barbieri and Sun, 2004). Für die GAP-Aktivität ist R146 essentiell; für die ADPRT-Aktivität sind E381 und E379 von Bedeutung. Dabei ist bei E381 die NAD-Glycohydrolaseaktivität des Toxins lokalisiert. E379 hingegen scheint für den Transfer der ADP-Ribose zum Arginin innerhalb des Zielproteins essentiell zu sein (Radke et al., 1999). Während die GAP-Domäne Rho, Rac und CDC42 inaktiviert (Goehring et al., 1999; Krall et al., 2002), die Neuordnung des Aktinzytoskeletts durch den Rho–Guanin–Nukleotid–Dissoziations-Inhibitor (RhoGDI) stimuliert (Sun and Barbieri, 2004) und antiphagozytotisch wirkt (Rocha et al., 2003), interagiert die ADPRT-Domäne mit zahlreichen GTPasen der Rho und Ras Familie wie Ras, Rap, Ral, Rac, CDC42 oder Rab (Henriksson et al., 2000; Henriksson et al., 2002; Maresso et al., 2004). Dabei kann membrangebundenes Rac-1 durch die GAP-Domäne inaktiviert werden, während zytosolisches Rac-1 durch die ADPRT-Domäne ribosyliert werden kann; für letztere Interaktion ist paradoxerweise beschrieben, dass Rac-1 aktiviert wird (Rocha et al., 2005). Dies könnte auch unsere Beobachtung erklären, dass wildtypisches ExoS (von *Pseudomonas* im Vergleich zu den ExoS-Mutanten stärker sezerniert) weniger stark *klf2*-Transkription zu induzieren vermag als die jeweilige GAP- bzw. ADPRT-Monomutante. So ist es durchaus vorstellbar, dass sich die beiden ExoS Domänen in ihrer Wirkung auf die Signalkaskade,

DISKUSSION

zumindest teilweise, gegenseitig aufheben. Weiterhin werden Proteine der Ezrin/Radixin/Moesin Familie innerhalb kurzer Zeit (infektionsnah) mit hoher Affinität durch ExoS ADP-ribosyliert. Diese Proteine spielen bei vielen aktinvermittelten Prozessen, wie Ausbildung der Zellform oder Phagozytose eine wichtige Rolle, und es kann davon ausgegangen werden, dass die ADP-Ribosylierung all dieser zellulären Proteine zur Phagozytosehemmung beiträgt (Maresso et al., 2004). Weiterhin induziert ExoS Apoptose über eine Induktion der Caspase 3 Aktivität und Hemmung der Phosphorylierung von Foxo3a, beides Marker für den induzierten Zelltod (Jansson et al., 2006).

Allerdings muss ExoS mit Proteinen der 14–3-3 Familie interagieren, um aktiviert zu werden. Dies geschieht über die 27 C-terminalen Aminosäuren. Bei fehlender Interaktion ist eine ADP-Ribosylierung von Ras durch ExoS nicht möglich und dadurch die Zytotoxizität von ExoS reduziert (Henriksson et al., 2000). Somit hat ExoS eine Vielzahl von zellulären Interaktionspartnern. Shaver et al konnten zeigen, dass *in vivo* vor allem die ADPRT-Domäne, weniger die GAP-Domäne, für die Ausprägung der Pneumonie in Mäusen von Bedeutung ist: Eine Inaktivierung der ADPRT-Domäne führt zu einer signifikanten Reduktion der Bakterienanzahl in der Lunge nach intranasaler Infektion (Shaver and Hauser, 2004).

Die Schlussfolgerung, ExoS-GAP sei in der Lage *klf2* zu induzieren, beruht auf einer ADPRT-defizienten Mutante (ExoS E381D). Dabei führt die Mutation von E381 wie oben schon erwähnt zu einer deutlichen Verminderung der ADPRT Aktivität gegenüber dem Wildtyp ExoS (Radke et al., 1999; Liu et al., 1996). Allerdings können ExoS R146A E381A Mutanten *in vivo* in HT-29-Zellen noch eine gewisse Zellabrundung und Ras Modifikation bewirken (Fraylick et al., 2001), die auf eine residuelle ADPRT-Aktivität der E381A Mutante hinweisen könnte. Im Gegensatz hierzu kann ExoS R146K/E381D nicht die Abrundung von HeLa Zellen auslösen. Ebenso ist ExoS E381D nicht in der Lage Moiesin zu ribosylieren (Maresso et al., 2004). Dies deutet darauf hin, dass die von uns verwendete E381D Mutante keine residuelle ADPRT-Aktivität mehr besitzt, so dass die *klf2*-Induktion durch ExoS E381D durch die GAP-Aktivität hervorgerufen wird. Dies wird durch die Ergebnisse mit den durch *Site directed mutagenesis* generierten ExoS-Varianten ebenfalls gestützt: So können sowohl ADPRT-defiziente (ExoS E381D) als auch GAP-

defiziente (ExoS R146K) Pseudomonasmutanten noch *klf2* induzieren. Erst eine Doppelmutante (ExoS E381D/R146K) mit Defizienz für sowohl die GAP wie auch die ADPRT-Aktivität ist dazu nicht mehr in der Lage.

In diesem Zusammenhang muss noch ExoT kurz erwähnt werden. Ebenso wie ExoS ein bifunktionelles Toxin (N-terminale GAP- und C-terminale ADPRT-Domäne) wirkt es *in vitro* und *in vivo* inhibitorisch auf Rho, Rac und CDC42 (Yahr et al., 1996; Krall et al., 2000; Kazmierczak and Engel, 2002). Infolge kommt es bei HeLa Zellen nach ExoT Translokation zum Zusammenbruch des Aktinzytoskeletts und zur Zellabrundung. Die hierfür relevante GAP-Aktivität von ExoT ist dabei strikt von der Aminosäure Arginin 149 (R149) abhängig, die auch für die Hemmung der Aufnahme des Bakteriums in die Zielzelle verantwortlich ist (Garrity-Ryan et al., 2000; Kazmierczak and Engel, 2002).

Daneben verfügt ExoT auch über eine gewisse ADPRT-Aktivität, da Pseudomonaden, die eine ExoT (R149K) Mutante exprimieren immer noch anti-internalisierende Effekte aufweisen und nach wie vor zu einer Störung der zytoskelettalen Architektur führen können (Garrity-Ryan et al., 2000; Sundin et al., 2001).

Aufgrund der verwandten Eigenschaften von ExoS und ExoT (sie stimmen auf Aminosäureebene zu 75% überein) (Yahr et al., 1996), ist ExoT ein weiterer potentieller Kandidat, der die *klf2*-Induktion über Rho-Modulation regulieren könnte.

7 *Klf2*-Regulation durch einzelne Salmonellentoxine

Auch *Salmonella* Typhimurium induziert *klf2* mRNA in J774-Zellen. Im Gegensatz zu *P. aeruginosa* und *Y. enterocolitica* besitzt *Salmonella* zwei unterschiedliche T3SS, die auf Pathogenitätsinseln (SPI, *Salmonella* Pathogenicity Island) kodiert sind. Das durch die SPI-1 kodierte T3SS transloziert dabei Proteine, welche für die initiale Invasion des Bakteriums notwendig sind; ein essentieller Bestandteil dieses T3SS ist das InvA-Protein, ohne das keine Proteine über das T3SS transloziert werden und es nicht zu einer Invasion der Zelle durch Salmonellen kommt (Galan et al., 1992; Ginocchio et al., 1997). Da eine *invA*-Mutante nicht mehr zur *klf2*-Induktion befähigt ist, ist ein funktionelles SPI-1 T3SS notwendig, um *klf2* zu induzieren, so dass das

DISKUSSION

Effektorprotein am ehesten unter den durch SPI-1 translozierten Proteinen zu finden sein wird. Nach den mit YopT, ExoS und EDIN-B gewonnenen Erkenntnissen kommen insbesondere die mit GTPasen der Rho-Familie interagierenden Proteine als Salmonella-Induktoren von *kif2* in Frage. Zu diesen gehören SptP, SopE und SopE2.

SopE und SopE2 (Salmonella outer protein E/E2) wirken als Austauschfaktoren (GEF) für GTPasen der Rho-Familie (Rho, Rac, CDC42), die GDP gegen GTP austauschen und so die Rho-GTPasen aktivieren. Folge ist eine Neuordnung des Aktinzytoskeletts (Hardt et al., 1998a). Obwohl sie durch das SPI-1 T3SS transloziert werden, sind SopE/E2 nicht auf der SPI-1, sondern durch einen Bakteriophagen kodiert (Hardt et al., 1998b). SopE2 ist in allen Salmonellenstämmen verbreitet, während SopE nur in einem Teil der Stämme vorkommt. SopE2 hat auf Aminosäureebene zu 70% Homologie zu SopE und übt, trotz kleiner Unterschiede in der Affinität zu Rac und CDC42, nahezu identische Funktionen aus (Bakshi et al., 2000; Stender et al., 2000; Friebel et al., 2001).

SopE und SopE2 induzieren die Invasion von Salmonellen in das Zytoplasma der Wirtszelle. Translokation von SopE/SopE2 führt an der Kontaktstelle zu Zytoskelettumbauten, welche ein *membrane ruffling* zur Folge haben. In Folge wird das Bakterium über Makropinozytose internalisiert. Ein Verlust des SopE Gens führt zu einer kleinen, aber doch signifikanten Verminderung der Invasionsfähigkeit von Salmonellenstämmen (Hardt et al., 1998b) (vermutlich aufgrund des noch vorhandenen SopE2-Gens). Allerdings können SopE/E2 Doppelmutanten sehr wohl noch eine Neuordnung des Aktinzytoskeletts induzieren; dies wird auf die Wirkung der Inositolphosphatase SopB zurückgeführt (s.u.) (Zhou et al., 2001). Des Weiteren geht die Wirkung von SopE weit über Induktion von *membrane ruffling* hinaus: Salmonella enthaltende Phagosomen rekrutieren, in Abhängigkeit von SopE, Rab5 in die Membran, welches die Fusion mit frühen Endosomen fördert und so die Phagosom-Lysosom-Fusion verhindert (Parashuraman and Mukhopadhyay, 2005).

SptP ist auf der SPI-1 kodiert und besitzt zwei katalytisch aktive Domänen. Der C-Terminus ist homolog zu YopH und besitzt Tyrosinphosphataseaktivität (Kaniga et al., 1996; Michiels and Cornelis, 1988). Der N-Terminus besitzt GAP-Aktivität und

DISKUSSION

weist Homologien zu ExoS und YopE auf (Kaniga et al., 1996). SptP führt über die GAP-Aktivität zu einer Inaktivierung von CDC42 und Rac-1 und somit zu einer Reversion der durch SopE/SopE2 induzierten Aktin-Umbauten, welche die Invasion des Bakteriums in das Zytoplasma ermöglichen (Fu and Galan, 1999).

Da die bisher identifizierten *klf2* induzierenden Toxine allesamt kleine GTPasen der Rho-Familie inaktivieren, vermuteten wir, dass SptP an der Induktion von *klf2* auch beteiligt sein könnte. Dies wurde jedoch durch Experimente mit einer SptP-Deletionsmutante widerlegt. Die Untersuchung weiterer Mutanten weist auf einen komplexen Regulationsmechanismus hin, in dem SopE und/oder SopE2 eine Rolle zu spielen scheinen; allerdings sind wahrscheinlich noch weitere SPI-1 translozierte Proteine beteiligt.

Ein möglicher Kandidat ist hier SopB. SopB ist eine Inositolphosphatase, die GTPasen der Rho-Familie (Rac, CDC42) aktiviert und zu einer Aktinzytoskelettneuordnung, einer Aktivierung von MAP Kinasen (Erk, Jnk/p38) und einer Destabilisierung von Tight-junctions führt (Galan, 2001). Im Gegensatz zu SopE/E2 aktiviert es aber die GTPasen nicht direkt, sondern indirekt über zelluläre Inositolphosphatasen (Zhou et al., 2001). Über die MAP Kinasen kommt es auch zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Aktivatorprotein 1 (AP-1) und Nuklear Faktor- κ B (NF- κ B) (Hobbie et al., 1997). Ebenso wie SopE wird auch SopB von einem Bakteriophagen kodiert (Hardt et al., 1998b) und über das SPI-1 T3SS transloziert. Aufgrund des aktivierenden Effekts auf die Rho GTPasen ist daher eine Induktion der *klf2*-Genexpression über SopB theoretisch denkbar, insbesondere da SopE2 als Aktivator von Rho-GTPasen zu einer *klf2* Induktion fähig ist. Dennoch bleibt die Frage derzeit unbeantwortet, warum die *klf2*-Geninduktion bei Salmonella durch Rho-aktivierende Toxine hervorgerufen wird, während alle anderen hier identifizierten Toxine über Rho-Inaktivierung zu einer *klf2* mRNA-Expression führen. Es ist jedoch anzumerken, dass die Induktion von *klf2* durch Salmonellen ca. 10-fach geringer ist als durch Bakterien, welche Rho-inaktivierende Toxine translozieren, was durchaus als Hinweis auf einen anderen Wirkmechanismus gedeutet werden könnte.

8 Mögliche Mechanismen der *klf2* mRNA Expression

Die regulatorischen Mechanismen zur Kontrolle der *klf2*-Expression sind derzeit recht wenig charakterisiert. Sowohl in humanen wie auch in murinen Zellen sind für die Induktion wichtige Regionen innerhalb des *klf2*-Promotors charakterisiert worden (Schrick et al., 1999; Huddleson et al., 2004). Diese sind zwischen dem humanen und murinen *klf2*-Promotor stark konserviert und sind Bindestellen für heterogene zelluläre Ribonukleoproteine und Acetyltransferasen (Ahmad and Lingrel, 2005). In humanen Endothelzellen konnte eine 62 bp-Region identifiziert werden, die für die *klf2*-Induktion unter Scherkraftbedingungen essentiell ist. Zhang et al konnten zeigen, dass eine Region zwischen Position - 138 und - 111 im *klf*-Promotor wichtig für die Transkription des *klf2*-Gens ist. hnRNP (heterogeneous nuklear riboprotein) ist ein zwischen dem Kern und dem Zytoplasma pendelndes Protein, das am Spleißen der prä-mRNA sowie der mRNA Translation beteiligt ist. Schon früher konnte gezeigt werden, dass hnRNP wichtig ist für die Aktivierung des c-myc Promotors (Lee et al., 1996; Tomonaga et al., 1996). Weitere an diese Region bindende Proteine sind die histonmodulierenden Acetyltransferasen PCAF und P-300. Über Bindung von PCAF und des heterogenen nukleären Riboproteins D kommt es zu einer Chromatin-Remodellierung mit Acetylierung von Histonen, was die *klf2*-Expression reguliert (Huddleson et al., 2005; Ahmad and Lingrel, 2005). Die Rolle von PCAF scheint dabei jedoch über eine reine Expressionsregulation hinauszugehen: In Co-Immunpräzipitationsstudien konnte gezeigt werden, dass in humanen Monozyten PCAF direkt an das Klf2-Protein zu binden vermag und einen Kofaktor für die zellulären Effekte von Klf2 darstellt (Das et al., 2006). Der TNF-Rezeptor-Assoziierte-Faktor (TRAF2) ist eine wichtige Komponente des TNF-getriggerten Signaltransduktionsweges und verantwortlich für die TNF-induzierte NFκB und JNK/SAPK Aktivierung. Microarray-Analysen haben gezeigt, dass die *klf2*-Expression in TRAF2^{-/-} Zellen drastisch reduziert ist, so dass eine Rolle von TRAF2 in der Expressionsregulation von *klf2* postuliert werden kann. Hierbei könnte eine Signaltransduktionskaskade, die über p38 MAPK verläuft, beteiligt sein, da Expression eines dominant negativen MKK6-Transgens, die Behandlung mit einem p38MAPK-Inhibitor oder die Deletion des Gens für p38 die *klf2*-Induktion hemmt (Lin et al., 2003).

DISKUSSION

In Endothelzellen wird *klf2* durch die Wirkung von Scherkräften induziert. In diesem System konnte die *klf2*-Induktion durch Behandlung der Zellen mit einem PI3K-Hemmer, nicht jedoch durch Hemmung von Erk1/2 MAPK Signaltransduktion inhibiert werden. Allerdings ist die *klf2* Expression ERK5 (eine MAPK) abhängig, da die Transkription von *klf2* in ERK5-negativen Mausembryonen deutlich reduziert ist. Auch versterben die Mausembryonen um den 9. Tag der Embryonalentwicklung aufgrund vermehrter angiogenetischer Defekte (Sohn et al., 2005). Der gut charakterisierte Effektor des PI3K-Signallings, Akt/Protein-Kinase B, hat wiederum keinen Einfluss auf die *klf2*-Induktion, wie Überexpressionsstudien mit konstitutiv aktivem Akt gezeigt haben (Huddleson et al., 2005).

Unsere eigenen Daten deuten darauf hin, dass eine anhaltende *klf2* Induktion im Kontext bakterieller Infektionen durch Inhibition von GTPasen der Rho Familie vermittelt wird. Kurzfristig (1 Stunde) nach bakterieller Infektion kommt es bei fast allen untersuchten Infektionsbedingungen zu einer *klf2*-Induktion; während in Abwesenheit von Rho-inaktivierenden Enzymen *klf2*-Expression 2 Stunden nach Infektion reprimiert wird, können YopT, ExoS oder EDIN-B eine anhaltende *klf2*-Expression vermitteln. Die initiale *klf2*-Induktion ist dabei als physiologischer Regulationsmechanismus bei der Aktivierung von Makrophagen oder epithelialen Zellen durch bakterielle Bestandteile zu sehen, während die anhaltende Expression durch Inhibition von kleinen GTPasen der Rho-Familie ein neu beschriebener Effekt ist.

Rho-GTPasen sind ubiquitär vorkommende Proteine der Signaltransduktion. Derzeit sind zehn verschiedene Rho-Proteine bekannt: RhoA, B, C, D, E, Rac-1 und 2, RacE sowie CDC42 und TC 10. Deren Aktivität wird bestimmt durch das Verhältnis von gebundenem GTP/GDP. Dabei wird die GTP/GDP-Ratio durch GEFs (Guanin Nukleotid Austausch Faktor), GDIs (Guanin Nukleotid Dissoziations Inhibitor) und GAPs (GTPase aktivierende Proteine) beeinflusst (Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997).

Schon seit längerem ist eine aktivierende Wirkung von Rho GTPasen auf zelluläre Faktoren bekannt. So aktivieren Rho GTPasen unter anderem den Transkriptionsfaktor SRF (Serum response factor), der als Wachstumsfaktor IE (immediate early) Gene wie c-fos und zytoskelettales Aktin kontrolliert. Dies

DISKUSSION

geschieht über den Koaktivator MAL, der als Antwort auf die Rho induzierte Aktinpolymerisation aus dem Zytoplasma in den Nukleulus wandert (Miralles et al., 2003). RhoA reguliert das Aktinzytoskelett sowie Gene, die Einfluss auf die Zellproliferation (Protoonkogene wie c-fos und c-jun) haben. Zur Expression von c-jun wird dabei ROCK als Effektor von RhoA benötigt. Ein Mangel an ROCK führt zu einer verminderten Expression von c-jun, allerdings wird hierbei die ROCK vermittelte Aktinpolymerisation nicht beeinflusst (Marinissen et al., 2004)

Weit weniger charakterisiert als die Rolle von Rho als transkriptionell aktivierender Cofaktor von SRF ist die Rolle als Inhibitor von Gentranskription. So führt eine Inhibierung von Rho zu einer verstärkten Expression von p21^{Waf1/Cip1} (Cyclin abhängiger Kinase Inhibitor) und somit zu einem Stopp der DNA-Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus (Olson et al., 1998). Die Adhäsion von Lungenkarzinomzellen an immobilisiertes Fibronectin führt über Erk Phosphorylierung zur Rho-Aktivierung. Folge sind eine verminderte Expression von p21^{Waf1/Cip1} und eine Stimulation des Zellzyklus (Han et al., 2005). Im Einklang damit führt eine Aktivierung des Rho-Effektorproteins ROCK (eine Serin/ Threoninkinase) zu einem Übertritt der Zelle in die G1 und S-Phase; einhergehend damit wird die Expression von Cyclin A und Cyclin D1 induziert, während die Expression von p27 reprimiert wird (Croft and Olson, 2006). Die Signaltransduktionskaskaden, die zur Rho-vermittelten Inhibierung der Expression dieser Proteine führen, sind derzeit leider nicht charakterisiert.

Bezüglich der *klf2*-Induktion durch bakterielle Toxine stellt sich nun natürlich die Frage, welche der verschiedenen GTPasen der Rho-Familie die Expression von *klf2* reprimiert. Von allen untersuchten Toxinen hat die C3-artige ADP-Ribosyltransferase EDIN-B das engste Wirkungsspektrum (Inaktivierung von RhoA, RhoB, RhoC und RhoE). Weitere Experimente in der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass auch C3-Toxin aus *Clostridium botulinum* die *klf2*-Expression zu induzieren vermag; dies lässt die Hypothese zu, dass RhoA, B, oder C an der Expressionsregulation von *klf2* beteiligt sind. Im Einklang damit konnte gezeigt werden, dass in humanen Endothelzellen *klf2* durch eine Hemmung der Geranylgeranylierung, nicht jedoch durch eine Hemmung der Farnesylierung, induziert werden kann - die oben genannten GTPasen der Rho-Familie liegen intrazellulär in geranylgeranylierter Form

vor. Die statinvermittelte *klf2*-Expression ist vermutlich auch auf diesen Mechanismus zurückzuführen (Parmar et al., 2005).

Sollte die *klf2*-Expressionsregulation über Rho-GTPasen verlaufen, stellt sich die Frage, warum wir keinen Effekt von YopE auf die *klf2*-Expression nachweisen konnten. YopE ist ein GAP für Rho GTPasen (Von Pawel-Rammingen et al., 2000), welches mit Rho, Rac und CDC42 interagiert. Allerdings konnten Andor et al zeigen, dass YopE in HUVEC Zellen den Rac-vermittelten Signalweg beeinflusst, aber kaum Effekte auf die CDC42 und Rho Signalwege hat (Andor et al., 2001). Offensichtlich ist das Spektrum der GTPasen, welche durch YopE gehemmt werden, im Kontext einer Yersinieninfektion (im Gegensatz zu überexprimierenden transfizierten Zellen) deutlich enger und umfasst nicht Rho. Allerdings sollte erwähnt werden, dass YopT und ADPRTs Rho GTPasen irreversibel inaktivieren im Gegensatz zu YopE.

9 Bedeutung der bakteriell induzierten *klf2* Expression für das Infektionsgeschehen

Die bakterienvermittelte *klf2*-Induktion könnte den Bakterien einen Selektionsvorteil bringen. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die Yersinien vermittelte *klf2*-Induktion vor allem in Makrophagen und Epithelzellen stattfindet, also Zelltypen, mit denen Yersinien während der frühen Phase der Infektion interagieren. Des Weiteren findet die Yop-vermittelte *klf2*-Expression in frühen, weitgehend undifferenzierten Lymphomzellen statt, die vermutlich noch Eigenschaften hämatopoetischer Stammzellen haben. Auch sind Toxine anderer Bakterienspezies (*S.aureus* EDIN, *Pseudomonas aeruginosa* ExoS, *Salmonella* Typhimurium SopE/E2) zur *klf2*-Induktion fähig. Dabei sind die hierfür verantwortlichen Bakterientoxine Inhibitoren von Rho-GTPasen (Ausnahme: SopE/E2). Rho-GTPasen haben, wie schon mehrfach erwähnt, zentrale Bedeutung bei der Signaltransduktion, der Neuordnung der Zytoskelettarchitektur, der Phagozytose sowie der Regulation der Proteinexpression auf Ebene der Transkription. Daher verwundert es wenig, dass verschiedene Bakterienspezies unterschiedliche Strategien entwickelt haben, um Rho-GTPasen zu ihrem Vorteil zu manipulieren. *klf2* mRNA Expression durch Inhibition von Rho-GTPasen führt zu verminderter Phagozytoseaktivität von Zellen

DISKUSSION

sowie verminderter Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Vermehrte Expression von *klf6* mRNA (ebenfalls über Hemmung von Rho-GTPasen) hemmt die Zellproliferation (Review O'Grady et al., 2007). Insgesamt induzieren die Bakterien in der befallenen Zelle wahrscheinlich eine Immunsuppression, was den Erregern einen Überlebensvorteil verschaffen könnte.

Ein weiterer Mechanismus wie Bakterien gegenüber ihren Wirtszellen einen Selektionsvorteil erlangen können beruht auf der Modifikation von Histonen. So ist inzwischen bekannt, dass Listeriolysin (LLO) von *Listeria monocytogenes*, Perfringolysin (PFO) von *Clostridium perfringens* und Pneumolysin (PLY) von *Streptococcus pneumoniae* indirekt die Histone H3 dephosphorylieren und H4 deacetylieren können. Folge ist eine Neuprogrammierung der Genexpression der befallenen Zelle mit verminderter Expression von *dusp4* (Phosphatase; wichtig für die Signaltransduktion im MAPK Pfad), IRF-3 (IFN regulierender Faktor; wichtig für die IFN Expression) und *cxcl2* (Chemoattraktives Chemokin; wichtig für die Anlockung von Leukozyten). Obwohl die hier beschriebenen Toxine die Signaltransduktion über den MAP-Kinase Pfad beeinflussen können, scheint diese Eigenschaft der Toxine nicht für deren dephosphorylierenden und deacetylierenden Effekt relevant zu sein. Daher verbleibt der Mechanismus über den dies geschieht vorerst rätselhaft (Hamon et al., 2007). Unter Berücksichtigung dessen, dass Acetyltransferasen wie PCAF einen Einfluss auf die *klf2* mRNA Regulation haben, ist die Histonmodifikation ein weiterer interessanter Weg, über den Bakterien möglicherweise die *klf2*-Expression steuern könnten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass *klf2* Induktion zunächst eine physiologische Reaktion der Zelle auf einen äußeren Reiz wie beispielsweise eine Bakterieninfektion darstellt, und es im Laufe der zellulären Antwort auf die Noxe zu einer verminderten *klf2* mRNA Expression kommt. Jedoch sind einige Bakterien in der Lage, die *klf2* mRNA Expression aufrechtzuerhalten. Da KLF2 an der Suppression von Entzündungsreaktionen (Immunzellen) beteiligt ist, könnte die Induktion von *klf2*-Expression den Erregern einen Vorteil bringen. Dabei ist dieser Effekt, wie eingangs schon erwähnt, eher toxin- als bakterienspezifisch. Da es sich bei den *klf2* induzierenden Toxinen um Inhibitoren von Rho GTPasen handelt, nehmen wir an, dass die Induktion von *klf2* über eine Inhibierung der Rho GTPasen

DISKUSSION

läuft. Des Weiteren war es möglich aufzuzeigen, dass allem voran Makrophagen und epitheliale Zellen von diesem Effekt betroffen sind; also Zellen, mit denen Bakterien nach fäkal-oralen Infektion zuerst Kontakt aufnehmen bzw. die bei der Modulation der Immunantwort eine Rolle spielen.

Zukünftige Fragestellungen können sich mit der Rolle von *klf2* in der bakteriellen Pathogenese sowie den exakten Regulationsmechanismen von *klf2* befassen. Des Weiteren kann das *klf2* induzierende pathogene Agens von *Salmonella* Typhimurium ebenso erforscht werden wie der exakte Sekretionsmechanismus von EDIN bei *S. aureus*.

V. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwiefern die *klf2*-Geninduktion spezifisch für J774 Mausmakrophagen ist, und ob neben *Y. enterocolitica* noch weitere Bakterien zur *klf2* (LKLF) Induktion befähigt sind, und falls ja, welche bakteriellen Toxine eine Rolle spielen könnten.

Dazu wurden zunächst verschiedene murine und humane Zelllinien mit genau definierten YopT-Yersinienmutanten infiziert. Dabei zeigte sich, dass pYV-Plasmid-positive YopT sezernierende Yersinien neben Makrophagen auch in epithelialen Zellen und frühen humanen Lymphomzellen *klf2*-Expression induzieren können.

Als nächstes wurde mittels Real-Time PCR analysiert, ob neben *Y. enterocolitica* auch pYV-Plasmid positive *Y. pseudotuberculosis* sowie andere Gram-negative Bakterienarten und *S. aureus* *klf2* mRNA Expression in J774 Makrophagen induzieren können. Dabei konnten wir zeigen, dass neben *Y. enterocolitica* auch pYV-Plasmid positive, YopT translozierende *Y. pseudotuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella enterica* zur *klf2*-Induktion in J774 Makrophagen fähig sind.

Zuletzt galt es noch zu klären, welche Toxine der jeweiligen Bakterienart für die *klf2*-Induktion verantwortlich sein könnten. Dabei zeigte sich, dass es sich um Toxine/Module handelt, die GTPasen der Rho-Familie inhibieren. Im Einzelnen sind das YopT (Zysteinprotease, Inhibitor von Rho-GTPasen) bei *Yersinia spp.*, EDIN (ADP-Ribosyltransferase) bei *S. aureus*, ExoS (N-terminale GAP- und C-terminale ADP-Ribosyltransferase) bei *Pseudomonas aeruginosa*. Eine Ausnahme bilden SopE/E2 (GEF-Funktion) bei *Salmonella Typhimurium*, da sie die GTPasen CDC42 und Rac aktivieren.

Zusammenfassend nehmen wir daher an, dass dies eine immunsuppressive Strategie von Bakterien ist, die ihnen im Wirtsorganismus einen Selektionsvorteil verschaffen könnte.

VI. Abkürzungen

A	Amper
α-	Anti
AA	Aminosäure (<i>Amino acid</i>)
Abb	Abbildung
ADP	Adenosin-di-phosphat
ADPRT	ADP-Ribosyltransferase
APC	Antigen-präsentierende-Zelle (<i>Antigen presenting cell</i>)
APS	Amoniumpersulfat
Aqua dest	destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin 5`-triphosphat
BHI	Brain Heart Infusion
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine serum albumine</i>)
Bsp	Beispiel
bzw.	Beziehungsweise
C-	Caroxly-
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CaCo	Caucasian Colon
CD	Cluster of differentiation
CDC	Center of Disease Control
CDC42	Cell division cycle 42
cDNA	komplementäre Desoxirbonukleinsäure
c-myc	zelluläre myc (Myelozytomatose)
CTP	Cytidin 5`-triphosphat
cxcl2	chemoattraktives Chemokin
d	desoxy-
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser aus eine Millipore Anlage
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Disseminierte intravasale Koagulopathie
DMEM	Dulbeccos Mod Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2`Desoxyribonukleosid 5`triphosphat
dpc	Day post conceptionem

ABKÜRZUNGEN

dsDNA	Doppelstrang Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
3T3	Three days after transfer inoculum 3×10^5
dusp4	Dual specificity phosphatase 4
ECL	Enzym Chemolumineszenz
EDIN	Epidermal cell differentiation inhibitor
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EGTA	Ethylen-Glycol-Tetra-Acetat
EHEC	Enterohämorrhagische Escherichia coli
eIF2B	Eucaryotic initiation factor 2B
eNOS	Endotheliale Stickoxid-Synthase
ERK	Extrazelluläre-signalregulierte-Kinase
EPEC	Enteropathogene Escherichia coli
ExoS	Exoenzym S
F	Farrad
FAM	6-Carboxyfluoreszin
FAS	TNF-Rezeptor Superfamilienmitglied
FBS	Fötales Rinderserum (<i>Fetal bovine serum</i>)
F _c	Fragment crystalline
Foxo3a	Forkhead-box-class-O 3a
g	Gramm
G1/2	Gap 1/2
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GC	Guanin/Cytosin
GDI	Guanin nucleotide dissociation inhibitor
GDP	Guanosin-di-phosphat
GEF	Guanin exchange factor
GILZ	Glucocorticoid induced leucin zipper
GIT	Gastrointestinaltrakt
GPI	Glycoprotein
GTP	Guanosin-5´triphosphat
h	hour
HCl	Salzsäure
HEK	Human embryonic kidney cell
HeLa	Henrietta Lacks
HLA	Human leukocyte antigen
hnRNP	heterogenes nukleäres Riboprotein

ABKÜRZUNGEN

hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IE	Immediate early bzw. Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IκB	Inhibitor von Kappa Beta
IκK	I Kappa Beta Kinase
IL	Interleukin
Inv	Invasin
IRF	Interferon regulierender Faktor
JNK	c-jun N-terminale Kinase
k	Kilo (10^3)
kB	Kilo Basen
kbp	Kilo Basen Paare
kDa	Killo Dalton
Klf	Krüppel Like Factor
Km ^r	Kanamycinresistenz
l	Liter
LB	Luria Bertani
Lcr	Low Calcium Response
LKLF	Lung Krüppel Like Factor
LLO	Listerionlysin
LRR	Leucin Rich Repeats
m	Milli (10^{-3})
M	molar
μ	mikro (10^{-6})
MAL	Megacaryocytic acute leukemia
MALT	Mukosa Assoziiertes Lymphatisches Gewebe
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MHC	Major Histo Compatibility
MKK	Map Kinase Kinase
MLD	Membran-Lokalisationsdomäne
MOI	Multiplizität der Infektion
mRNA	Boten Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>)
MvPI	Max von Pettenkofer Institut

ABKÜRZUNGEN

N-	Amino-
NAD	Nicotinamid Adenin Dinukleotid
NFκB	Nuclear Factor Kappa Beta
NIH	National Institute of Health
nm	nano Meter (10^{-9})
Nr	Nummer
NR4A2	Nuclear Receptor subfamily 4 groups A2
Ω	Ohm
o.g.	oben genannt
OD	optische Dichte
P.	Pseudomonas
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCAF	p300-Creb binding protein-associated factor
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFO	Perfringolysin
Pfu	Pyrococcus furiosus
pH	Konzentration der H ⁺ Ionen in einer Lösung
PI3K	Phosphadityl-Inositol 3 Kinase
PLY	Pneumolysin
PMN	Polymorphonukleäre Leukozyten
PPAR-γ	Peroxisom-proliferator-activated-receptor gamma
PRK2	Proteinkinase C-like 2
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
pYV	Plasmid Yersinia Virulenz
Rab	Ras gene from rat brain
Rac1	Ras related C3 botulinum toxin substrate 1
Ral	Ras like
Rap	Ras related protein
Ras	rat sarcoma
Rho	Ras Homolog
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho associated coiled-coil kinase
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Rounds per minute</i>)
RSK1	Ribosomal S6 protein kinase1
RT-PCR	Real-time PCR
S.	Salmonella/ Staphylococcus

ABKÜRZUNGEN

SAPK	Stress activated protein kinase
sec	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SHIP	SH2 (Src homolog 2)-domain-containing-inositol-phosphatase
sog.	sogenannt
Sop	Salmonella outer protein
SP	Single positive
SPI	Salmonella pathogenicity island
spp.	Spezies
SptP	Salmonella Protein Tyrosin Phosphatase
Src	sarcoma virus transforming gene product
SRF	Serum response factor
Std	Stunde
s.u.	siehe unten
Syc	Specific Yop chaperone
T-	Thymus
TAE	Tri-Acetat-EDTA-Puffer
TAMRA	6-Caroxytetramethylrodamin
Taq	Thermus aquaticus
TCA	Tri-Chlor-Essigsäure
TCR	T cell receptor
TEMED	Tetra-Methyl-Ethylen-Diamin
TNF	Tumor Nekrose faktor
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter factor
TRIS	Tris (hydroxymethyl-)Aminoethan
TTSS/T3SS	Typ –Drei-Sekretions-System
TTP	Thymin 5'-triphosphat
TWEEN	Polyoxymethylen-Sorbitan-Monolaureat
U	Units
u.a.	unter anderem
UV	Ultra Violett
V	Volt
v.a.	vor allem
VcrA	Vakuolisierendes Zytotoxin A
vgl	Vergleiche
WT	Wildtyp
WWP1	WW-domain containing protein 1

ABKÜRZUNGEN

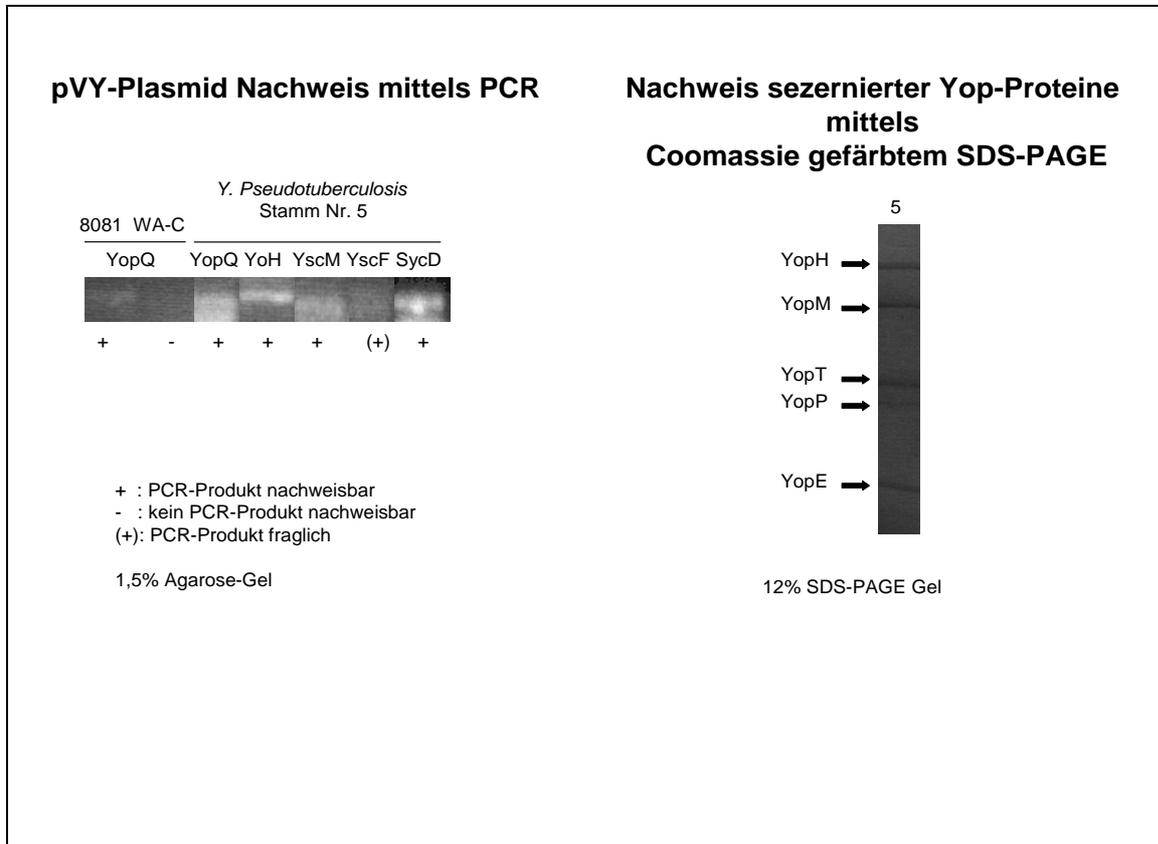
Y.	Yersinia
Yop	Yersinia outer protein
Ypk	Yersinia Proteinkinase
Ysc	Yersinia secretion
z.B.	zum Beispiel

VII. Ein-Buchstabenkodierung für Aminosäuren

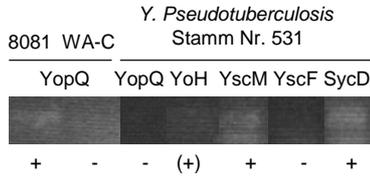
A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

VIII. Anhang (PCR- und SDS-PAGE Gele)

Nachweis des pVY-Plasmids mittels PCR und der sezernierten Yops mittels Coomassie gefärbtem SDS-PAGE



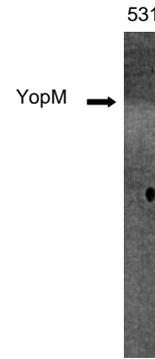
pVY-Plasmid Nachweis mittels PCR



+ : PCR-Produkt nachweisbar
 - : kein PCR-Produkt nachweisbar
 (+): PCR-Produkt fraglich

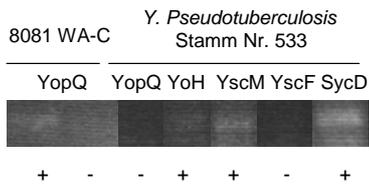
1,5% Agarose-Gel

**Nachweis sezernierter Yop-Proteine
mittels
Coomassie gefärbtem SDS-PAGE**



12% SDS-PAGE Gel

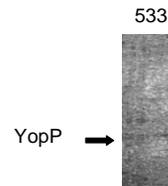
pVY-Plasmid Nachweis mittels PCR



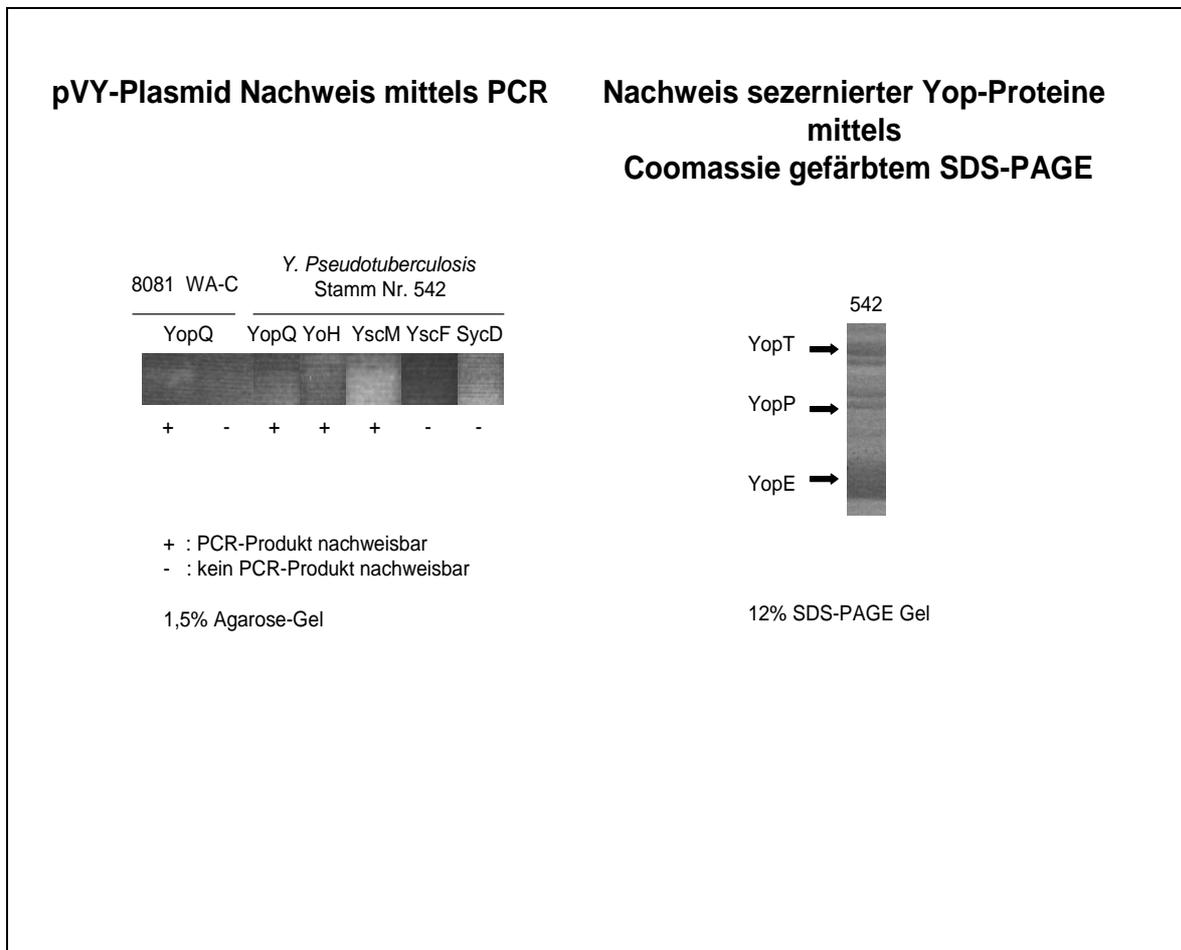
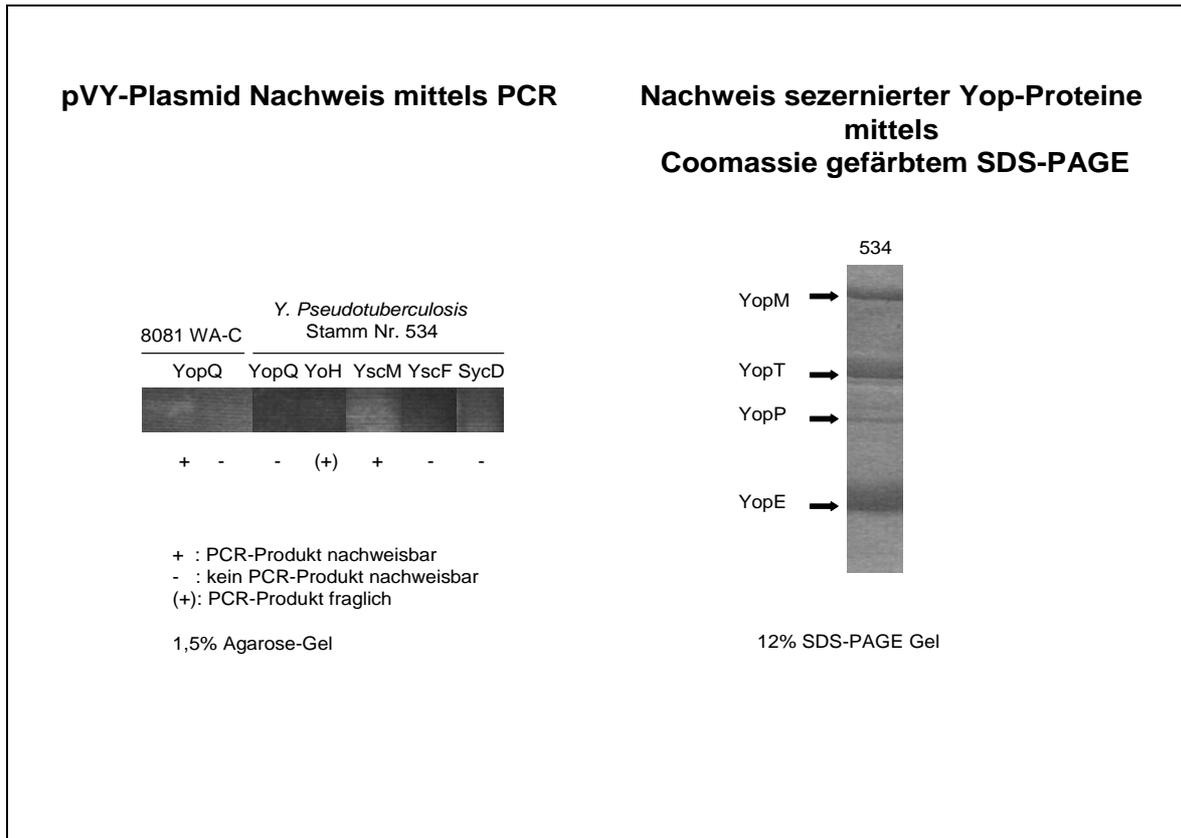
+ : PCR-Produkt nachweisbar
 - : kein PCR-Produkt nachweisbar

1,5% Agarose-Gel

**Nachweis sezernierter Yop-Proteine
mittels
Coomassie gefärbtem SDS-PAGE**

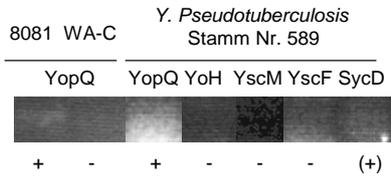


12% SDS-PAGE Gel



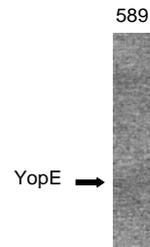
pVY-Plasmid Nachweis mittels PCR

**Nachweis sezernierter Yop-Proteine
mittels
Coomassie gefärbtem SDS-PAGE**



+ : PCR-Produkt nachweisbar
 - : kein PCR-Produkt nachweisbar
 (+): PCR-Produkt fraglich

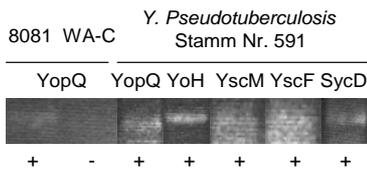
1,5% Agarose-Gel



12% SDS-PAGE Gel

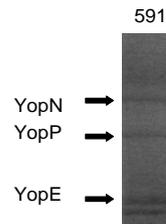
pVY-Plasmid Nachweis mittels PCR

**Nachweis sezernierter Yop-Proteine
mittels
Coomassie gefärbtem SDS-PAGE**



+ : PCR-Produkt nachweisbar
 - : kein PCR-Produkt nachweisbar

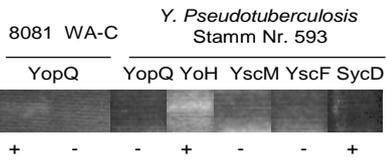
1,5% Agarose-Gel



12% SDS-PAGE Gel

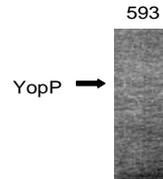
pVY-Plasmid Nachweis mittels PCR

**Nachweis sezernierter Yop-Proteine
mittels
Coomassie gefärbtem SDS-PAGE**



+ : PCR-Produkt nachweisbar
- : kein PCR-Produkt nachweisbar

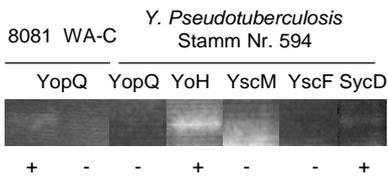
1,5% Agarose-Gel



12% SDS-PAGE Gel

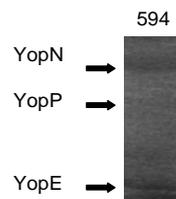
pVY-Plasmid Nachweis mittels PCR

**Nachweis sezernierter Yop-Proteine
mittels
Coomassie gefärbtem SDS-PAGE**



+ : PCR-Produkt nachweisbar
- : kein PCR-Produkt nachweisbar

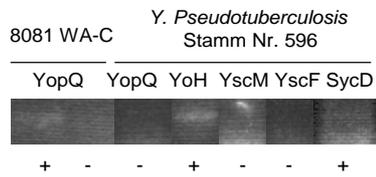
1,5% Agarose-Gel



12% SDS-PAGE Gel

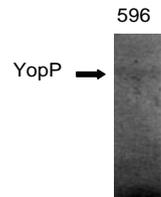
pVY-Plasmid Nachweis mittels PCR

**Nachweis sezernierter Yop-Proteine
mittels
Coomassie gefärbtem SDS-PAGE**



+ : PCR-Produkt nachweisbar
- : kein PCR-Produkt nachweisbar

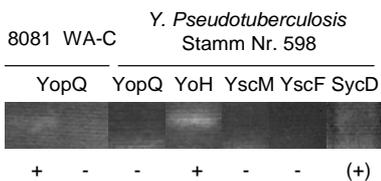
1,5% Agarose-Gel



12% SDS-PAGE Gel

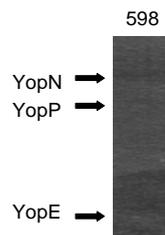
pVY-Plasmid Nachweis mittels PCR

**Nachweis sezernierter Yop-Proteine
mittels
Coomassie gefärbtem SDS-PAGE**



+ : PCR-Produkt nachweisbar
- : kein PCR-Produkt nachweisbar
(+): PCR-Produkt fraglich

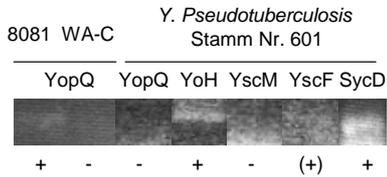
1,5% Agarose-Gel



12% SDS-PAGE Gel

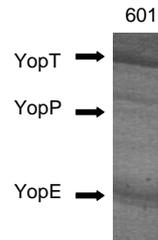
pVY-Plasmid Nachweis mittels PCR

**Nachweis sezernierter Yop-Proteine
mittels
Coomassie gefärbtem SDS-PAGE**



+ : PCR-Produkt nachweisbar
- : kein PCR-Produkt nachweisbar
(+): PCR-Produkt fraglich

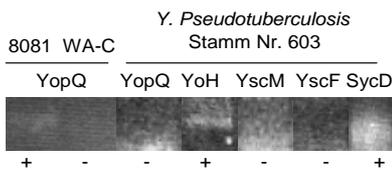
1,5% Agarose-Gel



12% SDS-PAGE Gel

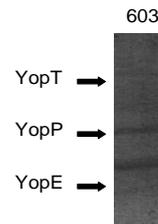
pVY-Plasmid Nachweis mittels PCR

**Nachweis sezernierter Yop-Proteine
mittels
Coomassie gefärbtem SDS-PAGE**



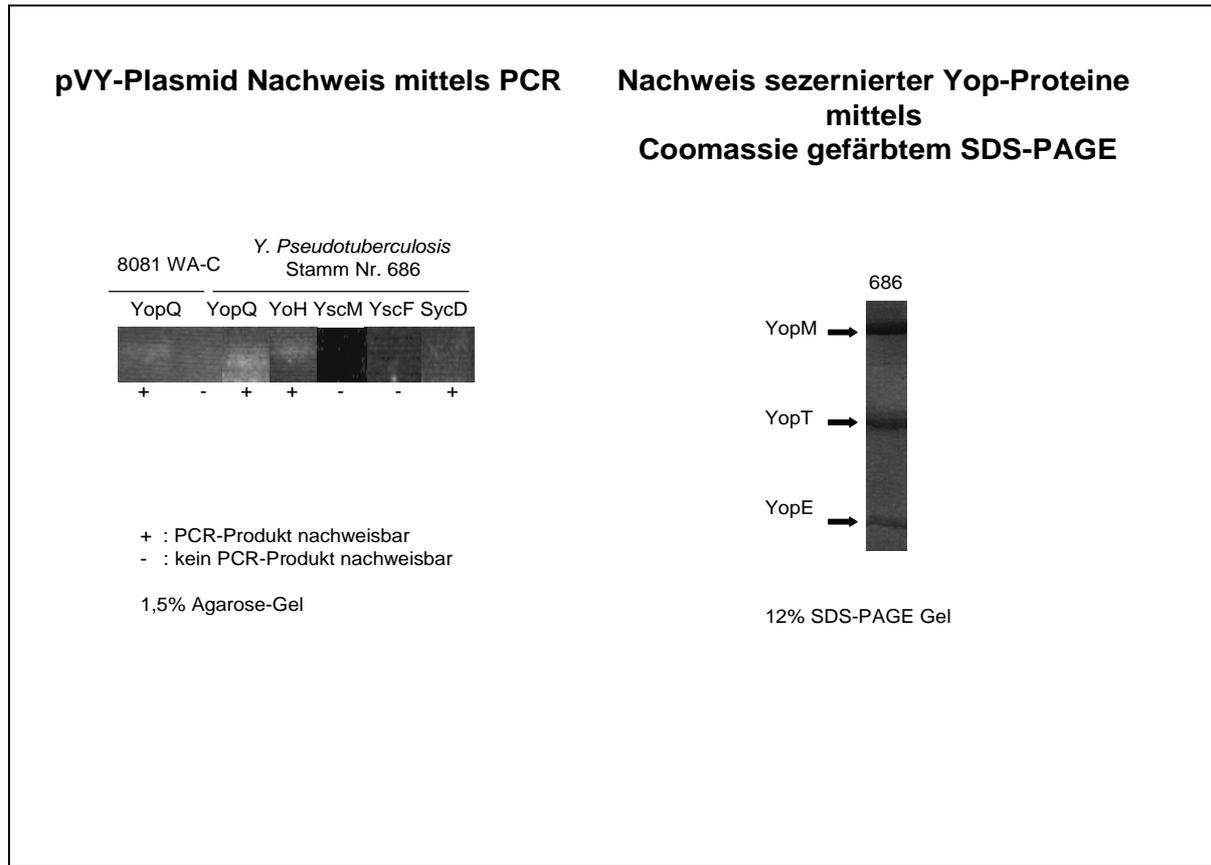
+ : PCR-Produkt nachweisbar
- : kein PCR-Produkt nachweisbar

1,5% Agarose-Gel



12% SDS-PAGE Gel

ANHANG (PCR- UND SDS-PAGE GELE)



Stamm-Nr. MvPI/ CDC und Plasmid	Phänotyp	pYV-Plasmid	Yop-Sekretion
5	IP 3295	Positiv	Positiv
531	146	Positiv	Fraglich Positiv
533	201	Positiv	Positiv
534	346	Positiv	Positiv
542	III, pl B1	Positiv	Positiv
589	Serotyp O1b	Positiv	Positiv
591	Serotyp O2a	Positiv	Positiv
593	Serotyp O2c	Positiv	Positiv
594	Serotyp O3	Positiv	Positiv
596	Serotyp O4b	Positiv	Positiv
598	Serotyp O5b	Positiv	Positiv
601	Serotyp O8	Positiv	Positiv
603	Serotyp O10	Positiv	Positiv
686	200	Positiv	Positiv

IX. Literaturverzeichnis

Verzeichnis wissenschaftlicher Artikel

1. Aepfelbacher,M., Essler,M., Huber,E., Sugai,M., and Weber,P.C. (1997). Bacterial toxins block endothelial wound repair. Evidence that Rho GTPases control cytoskeletal rearrangements in migrating endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1623-1629.
2. Aepfelbacher,M., Trasak,C., Wilharm,G., Wiedemann,A., Trulzsch,K., Krauss,K., Gierschik,P., and Heesemann,J. (2003). Characterization of YopT effects on Rho GTPases in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. *J. Biol. Chem.* 278, 33217-33223.
3. Ahmad,N. and Lingrel,J.B. (2005). Kruppel-like factor 2 transcriptional regulation involves heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and acetyltransferases. *Biochemistry* 44, 6276-6285.
4. Aktories,K, Wilde,C, Vogelsgesang,M, (2004). Rho-modifying C3-like ADP-ribosyltransferases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.*, 15,1-22.
5. Anderson,K.P., Kern,C.B., Crable,S.C., and 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.
6. Andor,A., Trulzsch,K., Essler,M., Roggenkamp,A., Wiedemann,A., Heesemann,J., and 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.
7. Bakshi,C.S., Singh,V.P., Wood,M.W., Jones,P.W., Wallis,T.S., and Galyov,E.E. (2000). Identification of SopE2, a *Salmonella* secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells. *J. Bacteriol.* 182, 2341-2344.
8. Banerjee,S.S., Feinberg,M.W., Watanabe,M., Gray,S., Haspel,R.L., Denking,D.J., Kawahara,R., Hauner,H., and Jain,M.K. (2003). The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 2581-2584.
9. Barbieri,J.T., Riese,M.J., and Aktories,K. (2002). Bacterial toxins that modify the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 315-344.
10. Barbieri,J.T. and Sun,J. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* 152, 79-92.
11. Bayles,K.W., Wesson,C.A., Liou,L.E., Fox,L.K., Bohach,G.A., and Trumble,W.R. (1998). Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* 66, 336-342.
12. Bliska,J.B. and Black,D.S. (1995). Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. *Infect Immun* 63, 681-5.
13. Blocker,A., Jouihri,N., Larquet,E., Gounon,P., Ebel,F., Parsot,C., Sansonetti,P., and Allaoui,A. (2001). Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretin. *Mol. Microbiol.* 39, 652-663.
14. Bohn,E., Muller,S., Lauber,J., Geffers,R., Speer,N., Spieth,C., Krejci,J., Manncke,B., Buer,J., Zell,A., and Autenrieth,I.B. (2004). Gene expression patterns of epithelial cells modulated by pathogenicity factors of *Yersinia enterocolitica*. *Cell Microbiol* 6, 129-41.

LITERATURVERZEICHNIS

15. Boland,A. and Cornelis,G.R. (1998). Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during Yersinia infection. *Infect. Immun.* 66, 1878-1884.
16. Bouche,G., Caizergues-Ferrer,M., Bugler,B., and Amalric,F. (1984). Interrelations between the maturation of a 100 kDa nucleolar protein and pre rRNA synthesis in CHO cells. *Nucleic Acids Res.* 12, 3025-3035.
17. Buckley,A.F., Kuo,C.T., and 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.
18. Chen,C.Y., Gherzi,R., Andersen,J.S., Gaietta,G., Jurchott,K., Royer,H.D., Mann,M., and Karin,M. (2000). Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev.* 14, 1236-1248.
19. Cook,T., Gebelein,B., Belal,M., Mesa,K., and Urrutia,R. (1999). Three conserved transcriptional repressor domains are a defining feature of the TIEG subfamily of Sp1-like zinc finger proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 29500-29504.
20. Cook,T., Gebelein,B., Mesa,K., Mladek,A., and Urrutia,R. (1998). Molecular cloning and characterization of TIEG2 reveals a new subfamily of transforming growth factor-beta-inducible Sp1-like zinc finger-encoding genes involved in the regulation of cell growth. *J. Biol. Chem.* 273, 25929-25936.
21. Cox,G.W., Mathieson,B.J., Gandino,L., Blasi,E., Radzioch,D., and Varesio,L. (1989). Heterogeneity of hematopoietic cells immortalized by v-myc/v-raf recombinant retrovirus infection of bone marrow or fetal liver. *J Natl Cancer Inst* 81, 1492-6.
22. Croft,D.R. and Olson,M.F. (2006). The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and p27Kip1 levels by distinct mechanisms. *Mol. Cell Biol.* 26, 4612-4627.
23. Das,H., Kumar,A., Lin,Z., Patino,W.D., Hwang,P.M., Feinberg,M.W., Majumder,P.K., and Jain,M.K. (2006). Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates proinflammatory activation of monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 6653-6658.
24. Denecker,G., Totemeyer,S., Mota,L.J., Troisfontaines,P., Lambermont,I., Youta,C., Stainier,I., Ackermann,M., and Cornelis,G.R. (2002). Effect of low- and high-virulence Yersinia enterocolitica strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells. *Infect. Immun.* 70, 3510-3520.
25. Dekker,R.J., van Soest,S., Fontijn,R.D., Salamanca,S., de Groot,P.G., VanBavel,E., Pannekoek,H., and 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.
26. Dukuzumuremyi,J.M., Rosqvist,R., Hallberg,B., Akerstrom,B., Wolf-Watz,H., and Schesser,K. (2000). The Yersinia protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J. Biol. Chem.* 275, 35281-35290.
27. Erard,M., Lakhdar-Ghazal,F., and Amalric,F. (1990). Repeat peptide motifs which contain beta-turns and modulate DNA condensation in chromatin. *Eur. J. Biochem.* 191, 19-26.
28. Fallman,M., Andersson,K., Hakansson,S., Magnusson,K.E., Stendahl,O., and Wolf-Watz,H. (1995). Yersinia pseudotuberculosis inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. *Infect. Immun.* 63, 3117-3124.
29. Foster KW, Frost AR, McKie-Bell P, Lin CY, Engler JA, Grizzle WE, Ruppert JM. (2000). Increase of GSK3 messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer. *Cancer Res*, 60, 6488-95.

LITERATURVERZEICHNIS

30. Foster KW, Ren S, Louro ID, Lobo-Ruppert SM, McKie-Bell P, Grizzle W, Hayes MR, Broker TR, Chow LT, Ruppert JM. (1999). Oncogene expression cloning by retroviral transduction of adenovirus E1A-immortalized rat kidney RK3E cells: transformation of a host with epithelial features by c-MYC and the zinc finger protein GKLf. *Cell Growth Differ*; 10, 423-34.
31. Foutier, B. and Cornelis, G.R. (2003). DNA sequence and analysis of the pYV(a127/90) virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* strain A127/90. *Res Microbiol* 154, 553-7.
32. Frank, D.W., Nair, G., and Schweizer, H.P. (1994). Construction and characterization of chromosomal insertional mutations of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S trans-regulatory locus. *Infect. Immun.* 62, 554-563.
33. Frankel, G., Phillips, A.D., Novakova, M., Field, H., Candy, D.C., Schauer, D.B., Douce, G., and Dougan, G. (1996). Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* restores murine virulence to a *Citrobacter rodentium* eaeA mutant: induction of an immunoglobulin A response to intimin and EspB. *Infect. Immun.* 64, 5315-5325.
34. Fraylick, J.E., La Rocque, J.R., Vincent, T.S., and Olson, J.C. (2001). Independent and coordinate effects of ADP-ribosyltransferase and GTPase-activating activities of exoenzyme S on HT-29 epithelial cell function. *Infect. Immun.* 69, 5318-5328.
35. Friebel, A., Ilchmann, H., Aepfelbacher, M., Ehrbar, K., Machleidt, W., and Hardt, W.D. (2001). SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J. Biol. Chem.* 276, 34035-34040.
36. Frithz-Lindsten, E., Du, Y., Rosqvist, R., and Forsberg, A. (1997). Intracellular targeting of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* via type III-dependent translocation induces phagocytosis resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments. *Mol. Microbiol.* 25, 1125-1139.
37. Fu, Y. and Galan, J.E. (1999). A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 401, 293-297.
38. Galan, J.E. (1999). Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 46-50.
39. Galan, J.E. (2001). *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 53-86.
40. Galan, J.E., Ginocchio, C., and Costeas, P. (1992). Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene invA: homology of InvA to members of a new protein family. *J. Bacteriol.* 174, 4338-4349.
41. Galyov, E.E., Hakansson, S., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H. (1993). A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* 361, 730-732.
42. Galyov, E.E., Wood, M.W., Rosqvist, R., Mullan, P.B., Watson, P.R., Hedges, S., and Wallis, T.S. (1997). A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol. Microbiol.* 25, 903-912.
43. Gansheroff, L.J., Wachtel, M.R., and O'Brien, A.D. (1999). Decreased adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to HEp-2 cells in the presence of antibodies that recognize the C-terminal region of intimin. *Infect. Immun.* 67, 6409-6417.
44. Garcia-Palma, L., Horn, S., Haag, F., Diessenbacher, P., Streichert, T., Mayr, G.W., and Jucker, M. (2005). Up-regulation of the T cell quiescence factor KLF2 in a leukaemic T-cell line after expression of the inositol 5'-phosphatase SHIP-1. *Br. J. Haematol.* 131, 628-631.

LITERATURVERZEICHNIS

45. Garrity-Ryan,L., Kazmierczak,B., Kowal,R., Comolli,J., Hauser,A., and Engel,J.N. (2000). The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages. *Infect. Immun.* *68*, 7100-7113.
46. Gebert,B., Fischer,W., Weiss,E., Hoffmann,R., and Haas,R. (2003). *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin Inhibits T Lymphocyte Activation. *Science* *301*, 1099-102.
47. Gibson,T.J., Postma,J.P., Brown,R.S., and Argos,P. (1988). A model for the tertiary structure of the 28 residue DNA-binding motif ('zinc finger') common to many eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Protein Eng* *2*, 209-218.
48. Ginocchio,C.C., Rahn,K., Clarke,R.C., and Galan,J.E. (1997). Naturally occurring deletions in the centisome 63 pathogenicity island of environmental isolates of *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* *65*, 1267-1272.
49. Goehring,U.M., Schmidt,G., Pederson,K.J., Aktories,K., and 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.
50. Grosdent,N., Maridonneau-Parini,I., Sory,M.P., and Cornelis,G.R. (2002). Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect. Immun.* *70*, 4165-4176.
51. Guan,K.L. and Dixon,J.E. (1990). Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* *249*, 553-556.
52. Hakansson,S., Galyov,E.E., Rosqvist,R., and Wolf-Watz,H. (1996a). The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol Microbiol* *20*, 593-603.
53. Hakansson,S., Schesser,K., Persson,C., Galyov,E.E., Rosqvist,R., Hombler,F., and Wolf-Watz,H. (1996b). The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J.* *15*, 5812-5823.
54. Hamon,M.A., Batsche,E., Regnault,B., Tham,T.N., Seveau,S., Muchardt,C., and Cossart,P. (2007). Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
55. Han,S., Sidell,N., Roman,J., (2005) Fibronectin stimulates human lung carcinoma cell proliferation by suppressing p21 gene expression via signals involving Erk and Rho kinase. *Cancer Lett.*;219, 71-81.
56. Han,T. and Minowada,J. (1978). Use of stimulating capacity of mixed lymphocyte reaction (MLR-S) as a possible marker for the cell-origin of null-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Immunology* *35*, 333-339.
57. Hardt,W.D., Chen,L.M., Schuebel,K.E., Bustelo,X.R., and Galan,J.E. (1998a). *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* *93*, 815-826
58. Hardt,W.D., Urlaub,H., and Galan,J.E. (1998b). A substrate of the centisome 63 type III protein secretion system of *Salmonella typhimurium* is encoded by a cryptic bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 2574-2579.
59. Heesemann,J. and Laufs,R. (1983). Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J Bacteriol* *155*, 761-7.

LITERATURVERZEICHNIS

60. Henriksson,M.L., Sundin,C., Jansson,A.L., Forsberg,A., Palmer,R.H., and Hallberg,B. (2002). Exoenzyme S shows selective ADP-ribosylation and GTPase-activating protein (GAP) activities towards small GTPases in vivo. *Biochem. J.* 367, 617-628.
61. Henriksson,M.L., Troller,U., and Hallberg,B. (2000). 14-3-3 proteins are required for the inhibition of Ras by exoenzyme S. *Biochem. J.* 349 Pt 3, 697-701.
62. Hensel,M. (2000). Salmonella pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 36, 1015-1023.
63. Hobbie,S., Chen,L.M., Davis,R.J., and Galan,J.E. (1997). Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by Salmonella typhimurium in cultured intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 159, 5550-5559.
64. Hoffmann,R., Van Erp,K., Trulzsch,K., and Heesemann,J. (2004). Transcriptional responses of murine macrophages to infection with Yersinia enterocolitica. *Cell Microbiol* 6, 377-90.
65. Hoiczky,E. and Blobel,G. (2001). Polymerization of a single protein of the pathogen Yersinia enterocolitica into needles punctures eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 4669-4674.
66. Hoiseth,S.K. and Stocker,B.A. (1981). Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291, 238-239.
67. Hong,K.H. and Miller,V.L. (1998). Identification of a novel Salmonella invasion locus homologous to Shigella ipgDE. *J. Bacteriol.* 180, 1793-1802.
68. Hornef,M.W., Roggenkamp,A., Geiger,A.M., Hogardt,M., Jacobi,C.A., and Heesemann,J. (2000). Triggering the ExoS regulon of Pseudomonas aeruginosa: A GFP-reporter analysis of exoenzyme (Exo) S, ExoT and ExoU synthesis. *Microb. Pathog.* 29, 329-343.
69. Huddleson,J.P., Ahmad,N., and Lingrel,J.B. (2006). Up-regulation of the KLF2 transcription factor by fluid shear stress requires nucleolin. *J. Biol. Chem.* 281, 15121-15128.
70. Huddleson,J.P., Ahmad,N., Srinivasan,S., and 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.
71. Huddleson,J.P., Srinivasan,S., Ahmad,N., and Lingrel,J.B. (2004). Fluid shear stress induces endothelial KLF2 gene expression through a defined promoter region. *Biol. Chem.* 385, 723-729.
72. Iglewski,B.H., Sadoff,J., Bjorn,M.J., and Maxwell,E.S. (1978). Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 75, 3211-3215.
73. Imanishi,K., Yamaguchi,K., Suzuki,M., Honda,S., Yanaihara,N., and Abe,K. (1989). Production of transforming growth factor-alpha in human tumour cell lines. *Br. J. Cancer* 59, 761-765.
74. Inoue,S., Sugai,M., Murooka,Y., Paik,S.Y., Hong,Y.M., Ohgai,H., and Suginaka,H. (1991). Molecular cloning and sequencing of the epidermal cell differentiation inhibitor gene from Staphylococcus aureus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 459-464.
75. Iriarte,M. and Cornelis,G.R. (1998). YopT, a new Yersinia Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol. Microbiol.* 29, 915-929.
76. Janda,J.M., Abbott,S.L., and Albert,M.J. (1999). Prototypal diarrheagenic strains of Hafnia alvei are actually members of the genus Escherichia. *J Clin. Microbiol.* 37, 2399-2401.

LITERATURVERZEICHNIS

77. Jansson,A.L., Yasmin,L., Warne,P., Downward,J., Palmer,R.H., and Hallberg,B. (2006). Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is not able to induce apoptosis when cells express activated proteins, such as Ras or protein kinase B/Akt. *Cell Microbiol.* 8, 815-822.
78. Juris,S.J., Rudolph,A.E., Huddler,D., Orth,K., and 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.
79. Juris,S.,J., Shao,F., Dixon,J.,E., (2002). *Yersinia* effectors target mammalian signalling pathways. *Cell Microbiol*, 4, 201-11. Review.
80. Kaczynski,J., Cook,T., and Urrutia,R. (2003). Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol.* 4, 206.
81. Kaniga,K., Uralil,J., Bliska,J.B., and Galan,J.E. (1996). A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 21, 633-641.
82. Kazmierczak,B.I. and Engel,J.N. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT acts in vivo as a GTPase-activating protein for RhoA, Rac1, and Cdc42. *Infect. Immun.* 70, 2198-2205.
83. Kimbrough,T.G. and Miller,S.I. (2000). Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 11008-11013.
84. Klevit,R.E. (1991). Recognition of DNA by Cys2,His2 zinc fingers. *Science* 253, 1367, 1393.
85. Knight,D.A., Finck-Barbancon,V., Kulich,S.M., and Barbieri,J.T. (1995). Functional domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect. Immun.* 63, 3182-3186.
86. Kodama,H.A., Amagai,Y., Koyama,H., and Kasai,S. (1982). Hormonal responsiveness of a preadipose cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Physiol* 112, 83-88.
87. Krall,R., Schmidt,G , Aktories,K , and Barbieri,J.T. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein. *Infect. Immun.* 68, 6066-6068
88. Krall,R., Sun,J., Pederson,K.J., and Barbieri,J.T. (2002). In vivo rho GTPase-activating protein activity of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoS. *Infect. Immun.* 70, 360-367.
89. Kubori,T., Matsushima,Y., Nakamura,D., Uralil,J., Lara-Tejero,M., Sukhan,A., Galan,J.E., and Aizawa,S.I. (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 280, 602-605.
90. Kubori,T., Sukhan,A., Aizawa,S.I., and Galan,J.E. (2000). Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 10225-10230.
91. Kumar,A., Lin,Z., SenBanerjee,S., and Jain,M.K. (2005). Tumor necrosis factor alpha-mediated reduction of KLF2 is due to inhibition of MEF2 by NF-kappaB and histone deacetylases. *Mol. Cell Biol.* 25, 5893-5903.
92. Kuo,C.T., Veselits,M.L., Barton,K.P., Lu,M.M., Clendenin,C., and 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.
93. Kuo,C.T., Veselits,M.L., and Leiden,J.M. (1997b). LKLF: A transcriptional regulator of single-positive T cell quiescence and survival. *Science* 277, 1986-1990.

LITERATURVERZEICHNIS

94. Lee,M.,H., Mori,S, Raychaudhuri,P, (1996). trans-Activation by the hnRNP K protein involves an increase in RNA synthesis from the reporter genes. *J Biol Chem.* 271, 3420-7
95. Leung,K.Y. and Straley,S.C. (1989). The yopM gene of *Yersinia pestis* encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPIb alpha. *J. Bacteriol.* 171, 4623-4632.
96. Lin,Y., Ryan,J., Lewis,J., Wani,M.A., Lingrel,J.B., and Liu,Z.G. (2003). TRAF2 exerts its antiapoptotic effect by regulating the expression of Kruppel-like factor LKLF. *Mol Cell Biol* 23, 5849-56.
97. Lin,Z., Hamik,A., Jain,R., Kumar,A., and 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.
98. Liu,S., Kulich,S.M., and Barbieri,J.T. (1996). Identification of glutamic acid 381 as a candidate active site residue of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Biochemistry* 35, 2754-2758.
99. Marcus,S.,L., Brumell,J.,H., Pfeifer,C.,G., Finlay,B.,B., (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.*, 2, 145-56. Review.
100. Maresso,A.W., Baldwin,M.R., and Barbieri,J.T. (2004). Ezrin/radixin/moesin proteins are high affinity targets for ADP-ribosylation by *Pseudomonas aeruginosa* ExoS. *J Biol. Chem.* 279, 38402-38408.
101. Marinissen,M.,J., Chiariello,M., Tanos,T., Bernard,O., Narumiya,S., Gutkind,J.,S., (2004). The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis. *Mol Cell.*;14, 29-41.
102. Matozaki,T., Nakanishi,H., and Takai,Y. (2000). Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades. *Cell Signal.* 12, 515-524.
103. McDonald,C., Vacratsis,P.,O., Bliska,J.,B., and Dixon,J.,E., (2003). The yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol. Chem.* 278, 18514-18523.
104. Meirhaeghe,A., Cottel,D., and Amouyel,P. (2006). A study of the relationships between KLF2 polymorphisms and body weight control in a French population. *BMC. Med. Genet.* 7, 26.
105. Menard,R., Sansonetti,P., Parsot,C., and Vasselon,T. (1994). Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell* 79, 515-525.
106. Menzies,B.E. and Kourteva,I. (1998). Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect. Immun.* 66, 5994-5998.
107. Michiels,T. and Cornelis,G. (1988). Nucleotide sequence and transcription analysis of yop51 from *Yersinia enterocolitica* W22703. *Microb. Pathog.* 5, 449-459.
108. Miralles,F., Posern,G., Zaromytidou,A.I., and Treisman,R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113, 329-42.
109. Mittal,R., Peak-Chew, S.,Y., McMahon, H.,T., (2006). Acetylation of MEK2 and I kappa B kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103, 18574-9.
110. Monack,D.M., Meccas,J., Ghori,N., and Falkow,S. (1997). *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 10385-10390.

LITERATURVERZEICHNIS

111. 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*,3 12, 1211-4.
112. Murli,S., Watson,R.O., and Galan,J.E. (2001). Role of tyrosine kinases and the tyrosine phosphatase SptP in the interaction of Salmonella with host cells. *Cell Microbiol.* 3, 795-810.
113. Navarro,L , Koller,A , Nordfelth,R , Wolf-Watz,H , Taylor,S , and Dixon,J.E. (2007). Identification of a molecular target for the Yersinia protein kinase A. *Mol. Cell* 26, 465-477
114. Neyt,C. and 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.
115. O'Grady,E., Mulcahy,H., Adams,C., Morrissey,J.P., and O'Gara,F. (2007). Manipulation of host Kruppel-like factor (KLF) function by exotoxins from diverse bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 337-341.
116. Olson,J.C., Fraylick,J.E., McGuffie,E.M., Dolan,K.M., Yahr,T.L., Frank,D.W., and Vincent,T.S. (1999). Interruption of multiple cellular processes in HT-29 epithelial cells by Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S. *Infect. Immun.* 67, 2847-2854.
117. Olson,J.C., McGuffie,E.M., and Frank,D.W. (1997). Effects of differential expression of the 49-kilodalton exoenzyme S by Pseudomonas aeruginosa on cultured eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 65, 248-256.
118. Olson,M.F., Paterson,H.F., and Marshall,C.J. (1998). Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature* 394, 295-299.
119. Orth,K., Palmer,L.,E., Bao,Z.,Q., Stewart,S., Rudolph,A.,E., Bliska,J.,B., and Dixon,J.E. (1999). Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector. *Science* 285, 1920-3.
120. Palmer,L.E., Hobbie,S., Galan,J.E., and Bliska,J.B. (1998). YopJ of Yersinia pseudotuberculosis is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol. Microbiol.* 27, 953-965.
121. Parashuraman,S. and Mukhopadhyay,A. (2005). Assay and functional properties of SopE in the recruitment of Rab5 on Salmonella-containing phagosomes. *Methods Enzymol.* 403, 295-309.
122. Parmar,K.,M., Nambudiri,V., Dai,G., Barman,H.,B., Gimbrone,M.,A.,Jr., and Garcia-Cardena,G., (2005). Statins exert endothelial atheroprotective effects via the KLF2 transcription factor. *J Biol Chem.* 280, 26714-26719
123. Pelludat,C., Hogardt,M., and Heesemann,J. (2002). Transfer of the core region genes of the Yersinia enterocolitica WA-C serotype O:8 high-pathogenicity island to Y. enterocolitica MRS40, a strain with low levels of pathogenicity, confers a yersiniabactin biosynthesis phenotype and enhanced mouse virulence. *Infect. Immun.* 70, 1832-1841.
124. Persson,C., Carballeira,N., Wolf-Watz,H., and Fallman,M. (1997). The PTPase YopH inhibits uptake of Yersinia, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J.* 16, 2307-2318.
125. Radke,J., Pederson,K.J., and Barbieri,J.T. (1999). Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S is a glutamic acid ADP-ribosyltransferase. *Infect. Immun.* 67, 1508-1510.

LITERATURVERZEICHNIS

126. Rocha,C.L., Coburn,J., Rucks,E.A., and Olson,J.C. (2003). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S as a bifunctional enzyme in J774A.1 macrophages. *Infect. Immun.* 71, 5296-5305.
127. Rocha,C.L., Rucks,E.A., Vincent,D.M., and Olson,J.C. (2005). Examination of the coordinate effects of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS on Rac1. *Infect. Immun.* 73, 5458-5467.
128. Rosqvist,R., Forsberg,A., Rimpilainen,M., Bergman,T., and Wolf-Watz,H. (1990). The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol. Microbiol.* 4, 657-667.
129. Rosqvist,R., Forsberg,A., and Wolf-Watz,H. (1991). Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect. Immun.* 59, 4562-4569.
130. Ruckdeschel,K., Harb,S., Roggenkamp,A., Hornef,M., Zumbihl,R., Kohler,S., Heesemann,J., and Rouot,B. (1998). *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 187, 1069-79.
131. Ruckdeschel,K., Roggenkamp,A., Schubert,S., and Heesemann,J. (1996). Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect. Immun.* 64, 724-733.
132. Sansonetti,P.J., Kopecko,D.J., and Formal,S.B. (1982). Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 35, 852-860.
133. Sauvonnet,N., Pradet-Balade,B., Garcia-Sanz,J.A., and Cornelis,G.R. (2002b). Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors. *J Biol Chem* 277, 25133-42.
134. Schesser,K., Spiik,A.K., Dukuzumuremyi,J.M., Neurath,M.F., Pettersson,S., and Wolf-Watz,H. (1998). The *yopJ* locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol. Microbiol.* 28, 1067-1079.
135. Schmitt,W. and Haas,R. (1994). Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol.* 12, 307-319.
136. Schneider,U., Schwenk,H.U., and Bornkamm,G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* 19, 621-626.
137. Schober,S.L., Kuo,C.T., Schluns,K.S., Lefrancois,L., Leiden,J.M., and 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.
138. Schotte,P., Denecker,G., Van Den,B.A., Vandenaabeele,P., Cornelis,G.R., and Beyaert,R. (2004). Targeting Rac1 by the *Yersinia* effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta. *J Biol Chem.* 279, 25134-25142.
139. Schrick,J.J., Hughes,M.J., Anderson,K.P., Croyle,M.L., and Lingrel,J.B. (1999). Characterization of the lung Kruppel-like transcription factor gene and upstream regulatory elements. *Gene* 236, 185-95.
140. Schulte,R., Wattiau,P., Hartland,E.L., Robins-Browne,R.M., and Cornelis,G.R. (1996). Differential secretion of interleukin-8 by human epithelial cell lines upon entry of virulent or nonvirulent *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 64, 2106-2113.

LITERATURVERZEICHNIS

141. SenBanerjee,S., Lin,Z., Atkins,G.B., Greif,D.M., Rao,R.M., Kumar,A., Feinberg,M.W., Chen,Z., Simon,D.I., Luscinskas,F.W., Michel,T.M., Gimbrone,M.A., Jr., Garcia-Cardena,G., and Jain,M.K. (2004). KLF2 Is a Novel Transcriptional Regulator of Endothelial Proinflammatory Activation. *J Exp Med* 10, 10.
142. Shao,F., Merritt,P.M., Bao,Z., Innes,R.W., and Dixon,J.E. (2002). A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 109, 575-88.
143. Shaver,C.M. and Hauser,A.R. (2004). Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect. Immun.* 72, 6969-6977.
144. Skrzypek,E., Cowan,C., and Straley,S.C. (1998). Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol Microbiol* 30, 1051-65.
145. Snellings,N.J., Popek,M., and Lindler,L.E. (2001). Complete DNA sequence of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:8 low-calcium-response plasmid reveals a new virulence plasmid-associated replicon. *Infect Immun* 69, 4627-38.
146. Sohn, S..J., Li D., Lee, L.,K., Winoto, A (2005). Transcriptional regulation of tissue-specific genes by the ERK5 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 25, 8553-8566.
147. Song,A., Patel,A., Thamatrakoln,K., Liu,C., Feng,D., Clayberger,C., and Krensky,A.M. (2002). Functional domains and DNA-binding sequences of RFLAT-1/KLF13, a Kruppel-like transcription factor of activated T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 30055-30065.
148. Sorg,I., Goehring,U.M., Aktories,K., and Schmidt,G. (2001). Recombinant *Yersinia* YopT leads to uncoupling of RhoA-effector interaction. *Infect. Immun.* 69, 7535-7543.
149. Sorg,I., Hoffmann,C., Dumbach,J., Aktories,K., and Schmidt,G. (2003). The C terminus of YopT is crucial for activity and the N terminus is crucial for substrate binding. *Infect. Immun.* 71, 4623-4632.
150. Sory,M.P. and Cornelis,G.R. (1994). Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol. Microbiol.* 14, 583-594.
151. Stebbins,C.E. and Galan,J.E. (2000). Modulation of host signaling by a bacterial mimic: structure of the *Salmonella* effector SptP bound to Rac1. *Mol. Cell* 6, 1449-1460.
152. Stender,S., Friebel,A., Linder,S., Rohde,M., Miold,S., and Hardt,W.D. (2000). Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol. Microbiol.* 36, 1206-1221.
153. Stover,C.K., Pham,X.Q., Erwin,A.L., Mizoguchi,S.D., Warrenner,P., Hickey,M.J., Brinkman,F.S., Hufnagle,W.O., Kowalik,D.J., Lagrou,M., Garber,R.L., Goltry,L., Tolentino,E., Westbrook-Wadman,S., Yuan,Y., Brody,L.L., Coulter,S.N., Folger,K.R., Kas,A., Larbig,K., Lim,R., Smith,K., Spencer,D., Wong,G.K., Wu,Z., Paulsen,I.T., Reizer,J., Saier,M.H., Hancock,R.E., Lory,S., and Olson,M.V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959-964.
154. Sugai,M., Enomoto,T., Hashimoto,K., Matsumoto,K., Matsuo,Y., Ohgai,H., Hong,Y.M., Inoue,S., Yoshikawa,K., and Suginaka,H. (1990). A novel epidermal cell differentiation inhibitor (EDIN): purification and characterization from *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 92-98.
155. Sugai,M., Hashimoto,K., Kikuchi,A., Inoue,S., Okumura,H., Matsumoto,K., Goto,Y., Ohgai,H., Moriishi,K., Syuto,B., and . (1992). Epidermal cell differentiation inhibitor ADP-ribosylates small GTP-binding proteins and induces hyperplasia of epidermis. *J. Biol. Chem.* 267, 2600-2604.

LITERATURVERZEICHNIS

156. Sun,J. and 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.
157. Sundin,C., Henriksson,M.L., Hallberg,B., Forsberg,A., and Frithz-Lindsten,E. (2001). Exoenzyme T of *Pseudomonas aeruginosa* elicits cytotoxicity without interfering with Ras signal transduction. *Cell Microbiol.* 3, 237-246.
158. Suzuki,T., Aizawa,K., Matsumura,T., and Nagai,R. (2005). Vascular implications of the Kruppel-like family of transcription factors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1135-1141.
159. Takai,Y., Sasaki,T., and Matozaki,T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 81, 153-208.
160. Tomb,J.F., White,O., Kerlavage,A.R., Clayton,R.A., Sutton,G.G., Fleischmann,R.D., Ketchum,K.A., Klenk,H.P., Gill,S., Dougherty,B.A., Nelson,K., Quackenbush,J., Zhou,L., Kirkness,E.F., Peterson,S., Loftus,B., Richardson,D., Dodson,R., Khalak,H.G., Glodek,A., McKenney,K., Fitzgerald,L.M., Lee,N., Adams,M.D., Venter,J.C., and . (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388, 539-547.
161. Tomonaga,T., Levens,D., (1996). Activating transcription from single stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93, 5830-5.
162. Trulzsch,K., Roggenkamp,A., Aepfelbacher,M., Wilharm,G., Ruckdeschel,K., and Heesemann,J. (2003b). Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*. *Int J Med Microbiol* 293, 167-77.
163. Trulzsch,K., Sporleder,T., Igwe,E.I., Russmann,H., and 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.
164. Tung, W. L. and Chow K.A (1995) Modified medium for efficient electrotransformation of *E.coli*. *Trends Genet* 11: 128-129.
165. Van Aelst,L. and D'Souza-Schorey,C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11, 2295-2322.
166. Viboud,G., and Bliska,J.,B. (2005). *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 69-89.
167. Visser,L.G., Annema,A., and van Furth,R. (1995). Role of Yops in inhibition of phagocytosis and killing of opsonized *Yersinia enterocolitica* by human granulocytes. *Infect. Immun.* 63, 2570-2575.
168. Von Pawel-Rammingen,U., Telepnev,M.V., Schmidt,G., Aktories,K., Wolf-Watz,H., and 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.
169. Wani,M.A., Means,R.T., Jr., and Lingrel,J.B. (1998). Loss of LKLF function results in embryonic lethality in mice. *Transgenic Res.* 7, 229-238.
170. Wani,M.A., Wert,S.E., and Lingrel,J.B. (1999). Lung Kruppel-like factor, a zinc finger transcription factor, is essential for normal lung development. *J Biol. Chem.* 274, 21180-21185.
171. Wattiau,P., Bernier,B., Deslee,P., Michiels,T., and Cornelis,G.R. (1994). Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 10493-10497.

LITERATURVERZEICHNIS

172. Wattiau, P. and Cornelis, G.R. (1993). SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in Ome secretion of YopE. *Mol. Microbiol.* 8, 123-131.
173. Wilde, C., Chhatwal, G.S., Schmalzing, G., Aktories, K., and Just, I. (2001). A novel C3-like ADP-ribosyltransferase from *Staphylococcus aureus* modifying RhoE and Rnd3. *J. Biol. Chem.* 276, 9537-9542.
174. Woestyn, S., Allaoui, A., Wattiau, P., and Cornelis, G.R. (1994). YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J. Bacteriol.* 176, 1561-1569.
175. Wong, K.W. and Isberg, R.R. (2005). *Yersinia pseudotuberculosis* spatially controls activation and misregulation of host cell Rac1. *PLoS. Pathog.* 1, e16.
176. Worby, C.A. and Dixon, J.E. (2006). Microbiology. Bacteria seize control by acetylating host proteins. *Science* 312, 1150-1151.
177. Wu, J. and Lingrel, J.B. (2004). KLF2 inhibits Jurkat T leukemia cell growth via upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1. *Oncogene* 23, 8088-8096.
178. Wu, J., Srinivasan, S.V., Neumann, J.C., and Lingrel, J.B. (2005). The KLF2 transcription factor does not affect the formation of preadipocytes but inhibits their differentiation into adipocytes. *Biochemistry* 44, 11098-11105.
179. Yahr, T.L., Barbieri, J.T., and Frank, D.W. (1996). Genetic relationship between the 53- and 49-kilodalton forms of exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 178, 1412-1419.
180. Yamada, Y., Sugai, M., Woo, M., Nishida, N., Sugimoto, T., (2001). Acquired subglottic stenosis caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus* that produce epidermal cell differentiation inhibitor. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*; 84, F38-9.
181. Zaidi, S.H. and Malter, J.S. (1994). Amyloid precursor protein mRNA stability is controlled by a 29-base element in the 3'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* 269, 24007-24013.
182. Zhang, Y., Deng, Q., Porath, J., A., Williams, C., L., Pederson-Gulrud, K., J., Barbieri, J., T., (2007). Plasma membrane localization affects the RhoGAP specificity of *Pseudomonas* ExoS. *Cell Microbiol.*, 9, 2192-201.
183. Zhang, X., Srinivasan, S.V., and Lingrel, J.B. (2004). WWP1-dependent ubiquitination and degradation of the lung Kruppel-like factor, KLF2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 139-148.
184. Zhou, D., Chen, L.M., Hernandez, L., Shears, S.B., and Galan, J.E. (2001). A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol. Microbiol.* 39, 248-259.
185. Zhu, C., Agin, T.S., Elliott, S.J., Johnson, L.A., Thate, T.E., Kaper, J.B., and Boedeker, E.C. (2001). Complete nucleotide sequence and analysis of the locus of enterocyte Effacement from rabbit diarrheagenic *Escherichia coli* RDEC-1. *Infect. Immun.* 69, 2107-2115.
186. Zhou, H., Monack, D., M., Kayagaki, N., Wertz, I., Yin, J., Wolf, B., and Dixit, V.M. (2005). *Yersinia* virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF-kappa B activation. *J Exp. Med.* 202, 1327-1332.
187. Zumbihl, R., Aepfelbacher, M., Andor, A., Jacobi, C.A., Ruckdeschel, K., Rouot, B., and Heesemann, J. (1999). The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J Biol Chem* 274, 29289-93.

Sonstige Quellenangaben

1. Cellular and Molecular Immunology, Fifth Edition, Updated Edition, Abdul K. Abbas; Andrew H. Lichtmann, 2005 Elsevier Saunders
2. Medizinische Mikrobiologie, 8. Auflage, Köhler, Eggers, Fleischer, Marre, Pfister, Pulverer, 2001, Urban & Fischer

X. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Heesemann für die freundliche Aufnahme am Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie sowie die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl die Doktorarbeit anfertigen zu können.

Darüber hinaus danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. Frank Ebel für die Überlassung zahlreicher Bakterienstämme, ohne die die Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Insbesondere gilt mein Dank Herrn Priv. Doz. Dr. Reinhard Hoffmann für die Überlassung des Themas, sowie die intensive Betreuung. Seine Anregungen und Einführungen in das strukturierte wissenschaftliche Arbeiten, waren für das Erstellen der Arbeit und deren Fortschritt von außerordentlicher Bedeutung.

XI. Lebenslauf

Abgaben zur Person:

Name: Josip Zovko
Wohnort: Untere Heerbergstraße 49
97078 Würzburg
Geburtsdatum: 7.09.1977
Geburtsort: München

Schulbildung:

1994 Mittlere Reife
1998 Abitur

Grundwehrdienst:

1998-1999 Wehrdienst bei der Bundeswehr in München und Regensburg

Hochschulbildung:

2000 Beginn des Medizinstudiums an der LMU München
03/2002 Ärztliche Vorprüfung
03/2003 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/2005 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
21.11.2006 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktika:

01/00-03/00 Krankenpflegepraktikum auf der Strahlentherapeutischen Station des Klinikums Großhadern
08/02-10/02 Famulatur in der Hämatologie/ Onkologie des Krankenhauses München Schwabing
08/03-10/09/03 Famulatur in der Anästhesiologischen Klinik Innenstadt der Universität München
09/03-10/03 Famulatur in der Radiologie am Laimer Platz
10/05-02/06 Beginn des Praktischen Jahres: 1. Tertial: Pathologie am Pathologischen Institut der Universität München Innenstadt und Großhadern unter Prof. Dr. med. Thomas Kirchner
02/06-05/06 2. Tertial: Chirurgie am Klinikum Großhadern (Schwerpunkte Viszeralchirurgie und Thoraxchirurgie) unter Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. W. Jauch
05/06-09/06 3. Tertial: Innere Medizin am Städtischen Krankenhaus Neuperlach (Schwerpunkt Kardiologie) unter Prof. Dr. med. Harald Mudra