

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

Invasion und Dissemination von
***Yersinia enterocolitica* im Mausmodell**

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

vorgelegt von
Mark F. Oellerich

aus
Hannover

Jahr
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Konrad Trülzsch
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Eugen Faist
- Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Johannes Liese
Prof. Dr. med. Hans-Dieter Nothdurft
- Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
- Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.2009

Inhaltsverzeichnis

A.	Einleitung	1
1.	Die Gattung <i>Yersinia</i>	1
1.1	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1
1.1.1	Eigenschaften	1
1.1.2	Vorkommen und Verbreitung	2
1.1.3	Epidemiologie	2
1.1.4	Klinisches Bild der Yersiniose	3
1.1.5	Diagnostik und Therapie	4
1.2	Pathomechanismus der Infektion	5
1.2.1	Virulenzfaktoren	5
1.2.1.1	Invasin	5
1.2.1.2	YadA	6
1.2.1.3	<i>Yersinia outer proteins</i>	7
1.2.1.4	Ail	7
1.2.1.5	Enterotoxin <i>Yst</i>	8
1.2.2	Eisenaufnahme durch <i>Y. enterocolitica</i>	8
1.2.3	Invasion und Dissemination	9
1.2.4	Abszessbildung durch <i>Y. enterocolitica</i>	10
2.	Ziele der Arbeit	12
B.	Material und Methoden	13
1.	Material	13
1.1	Geräte	13
1.2	Sonstige Materialien	14
1.3	Chemikalien	14
1.4	Antikörper	14
1.5	Enzyme	14
1.6	Proteaseinhibitor	14
1.7	Elektrophorese-Marker	15
1.8	Kitsysteme	15
1.9	Medien und Lösungen	15
1.9.1	Medien und Agar für die Bakterienkultur	15
1.9.2	Medien und Lösungen für die Zellkultur	16
1.9.3	Puffer und Lösungen für die Elektrophorese	16
1.9.3.1	Agarose-Gelelektrophorese	16
1.9.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	17
1.9.4	Lösungen zur Herstellung elektrokompenter Bakterien	17
1.9.5	Lösungen für die Immunhistochemie	18
1.10	Plasmide	18
1.11	Bakterienstämme	18
1.12	Versuchstiere	19

2.	Methoden	19
2.1	Mikrobiologische Methoden	19
2.1.1	Kultivierung von Bakterien	19
2.1.2	Stammhaltung	19
2.1.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen	20
2.1.4	Nachweis von Yersinien in der Darmlavage infizierter Mäuse	20
2.1.5	Behandlung von Yersinien mit Darmflüssigkeit und Proteasen	20
2.2	Molekularbiologische Methoden	21
2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA	21
2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	22
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	22
2.2.4	Transformation von DNA	23
2.2.4.1	Herstellung elektrokompetenter Zellen	23
2.2.4.2	Elektroporation von <i>Y. enterocolitica</i>	23
2.3	Proteinchemische Methoden	24
2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.3.2	Herstellung von Polyacrylamid-Gelen	24
2.3.3	Aufbereitung der Proben und Elektrophorese	25
2.3.4	Immunoblot (Western Blot)	26
2.4	Zellkultur	27
2.4.1	Kultivierung von HeLa-Zellen für das Invasions-Assay	27
2.4.2	Zellzahlbestimmung	27
2.4.3	Invasions-Assay	28
2.5	Mausinfektionsversuche	28
2.5.1	Mauspassage	28
2.5.2	Infektion der Mäuse	29
2.5.3	Verwendete Bakterienstämme	29
2.5.4	Probengewinnung	30
2.5.5	Depletion neutrophiler Granulozyten	30
2.6	Histologische Methoden	31
2.6.1	Anfertigung von Kryoschnitten	31
2.6.2	Immunhistochemie	31
2.6.3	Fluoreszenzmikroskopie	32
2.7	Statistische Auswertung	32

C.	Ergebnisse	33
1.	Mausinfektionsversuche mit <i>Y. enterocolitica</i>	33
1.1	Konstruktion fluoreszierender Yersinien	33
1.2	Abszessbildung in Peyer-Plaques, Milz und Leber	35
1.3	Klonale Invasion in Peyer-Plaques	37
1.4	Abszessbildung in neutropenen Mäusen	41
1.5	Abszessbildung in p47 ^{phox-/-} - Mäusen	42
1.6	Darmbesiedlung durch <i>Y. enterocolitica</i>	43
1.7	Invasionskinetik von <i>Y. enterocolitica</i>	44
1.8	Einfluss der Wirtsantwort auf Invasion und Abszessbildung	46
2.	Untersuchungen zur <i>in vivo</i> - Expression von Invasin	51
2.1	Invasin-Expression im Dünndarm	51
2.2	Einfluss von Darmproteasen auf Invasin	54
3.	Untersuchungen zur Invasivität von <i>Y. enterocolitica</i> im Zellkulturmodell	57
3.1	Einfluss von Darmproteasen auf die Invasivität von <i>Y. enterocolitica</i>	57
D.	Diskussion	59
1.	Invasion und Abszessbildung	59
2.	Einfluss der Wirtsantwort auf Invasion und Abszessbildung	63
3.	Untersuchungen zur <i>in vivo</i> - Expression von Invasin	65
3.1	Invasin-Expression im Dünndarm	65
3.2	Degradierung von Invasin durch Darmproteasen	66
4.	Untersuchungen zur Invasivität von <i>Y. enterocolitica</i> im Zellkulturmodell	67
5.	Ausblick	67
E.	Zusammenfassung	70
F.	Literaturverzeichnis	73
G.	Anhang	84
1.	Abkürzungsverzeichnis	84
2.	Lebenslauf	86
3.	Publikationsverzeichnis	88
4.	Danksagung	89

A. Einleitung

1. Die Gattung *Yersinia*

Die Gattung *Yersinia* erhielt ihren Namen zu Ehren des Schweizer Bakteriologen Alexandre Yersin, dem es 1884 in Hongkong gelang, den Erreger der Beulenpest zu isolieren (19, 142). Seit 1964 wird sie der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet (47) und umfasst mittlerweile elf Arten, von denen drei humanpathogen sind: *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* (21).

Während *Yersinia pestis* in vergangenen Jahrhunderten eine wichtige Rolle als Auslöser verheerender Pandemien in Europa, Asien und Afrika spielte, sind es heutzutage vor allem die enteropathogenen Arten *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*, die in der westlichen Welt als Krankheitsverursacher in Erscheinung treten. Nach Salmonellen und *Campylobacter jejuni* gehören sie mittlerweile zu den dritthäufigsten bakteriellen Enteritisserregern (62).

1.1 *Yersinia enterocolitica*

1.1.1 Eigenschaften

Yersinia enterocolitica ist ein gramnegatives, sporenloses Stäbchenbakterium, das bei Temperaturen zwischen 0° und 45°C sowohl aerob als auch fakultativ anaerob wächst. Das Wachstumsoptimum liegt bei 28°C, im Unterschied zu *Yersinia pestis* ist *Yersinia enterocolitica* bei Temperaturen zwischen 22° und 28°C mono- bis peritrich begeißelt und damit beweglich (17, 19). Die Pathogenität des Erregers ist an ein 70 kb großes Virulenz-Plasmid (pYV) gebunden, auf dem unter anderem ein Typ-3-Sekretionssystem und verschiedene Effektorproteine, sogenannte Yops (*Yersinia outer proteins*) kodiert sind (33).

Anhand biochemischer und serologischer Eigenschaften kann die Art weiter differenziert werden. Es sind sechs Biovarietäten definiert (140), wobei die Biovare 1B, 2 und 4 humanpathogen und somit medizinisch relevant sind. Geographisch findet man Biovar 1B-Isolate vorwiegend in Nordamerika, die Biovare 2 und 4 in Europa. Die Biovare 3 und 5 sind hauptsächlich tierpathogen. Biovar 1A gilt allgemein als apathogen, wurde aber mittlerweile auch schon mit vereinzelt nosokomialen Krankheitsausbrüchen in Verbindung gebracht (18, 130).

Serologisch wird *Yersinia enterocolitica* anhand verschiedener O-Antigene (Lipopolysaccharid) differenziert. Mittlerweile sind mehr als 60 O-Antigene bekannt (139), von denen allerdings nur elf eine humanpathogene Bedeutung haben. In Europa sind die Serovarietäten O:3, O:9, O:5,27 medizinisch relevant, in Nordamerika vor allem die Serogruppen O:8, O:13, O:20 und O:21.

1.1.2 Vorkommen und Verbreitung

Yersinia enterocolitica ist weltweit verbreitet, kommt aber hauptsächlich in gemäßigten und subtropischen Klimazonen vor. In den tropischen Regionen Afrikas und Südostasiens sind Infektionen eher selten.

In der Umwelt findet man *Yersinia enterocolitica* im Oberflächenwasser und Erdboden sowie auf Pflanzenoberflächen. Daneben kommen praktisch alle warmblütigen Wild-, Nutz- und Heimtiere als Wirtsorganismen in Frage. Aber auch aus Reptilien, Fischen und Insekten konnte der Erreger bereits isoliert werden (14).

1.1.3 Epidemiologie

Die Übertragung von *Yersinia enterocolitica* auf den Menschen erfolgt in aller Regel über kontaminierte Nahrungsmittel tierischer Herkunft. Schweine stellen hierbei das wichtigste Erregerreservoir dar (129). Bei einer Untersuchung von Metzgereien im Großraum München konnte der Erreger in 8 - 25 % der Proben rohen Schweinefleischs nachgewiesen werden (48). Aber auch Milchprodukte und durch Ausscheidungen kontaminiertes Trinkwasser kommen als Ursache für Krankheitsausbrüche in Frage. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch durch Schmierinfektion ist ebenfalls möglich aber selten (14).

In der Bundesrepublik Deutschland lag die Inzidenz der Yersiniose im Jahr 2005 bei 6,8 Erkrankungen pro 100000 Einwohner. Am stärksten betroffen sind Kleinkinder zwischen ein und drei Jahren, mit zunehmendem Alter geht die Zahl der Infektionen zurück und verbleibt im Erwachsenenalter auf niedrigem Niveau. Wesentliche geschlechtsspezifische Unterschiede gibt es nicht (108).

1.1.4 Klinisches Bild der Yersiniose

Die klinische Symptomatik und Ausprägung der Yersinieninfektion ist sehr variabel und von verschiedenen Faktoren wie dem Alter, Abwehrzustand und Histokompatibilitätstyp des Patienten abhängig.

Nach einer Inkubationszeit von vier bis sieben Tagen kommt es zu einer intestinalen Infektion, die sich in drei klinischen Formen manifestieren kann: als Enteritis, terminale Ileitis oder mesenteriale Lymphadenitis, u. U. mit Symptomen einer Pseudoappendizitis, und bei schwerwiegenden Verläufen als Septikämie mit fokalen Abszedierungen in Milz, Leber oder Lunge.

Bei Säuglingen und Kleinkindern stehen die Symptome einer akuten Gastroenteritis mit Fieber, wässrigen oder blutigen Durchfällen und Erbrechen im Vordergrund (81). Die Infektion verläuft hierbei in den meisten Fällen selbstlimitierend und klingt nach ein bis zwei Wochen ab.

Bei Schulkindern und Jugendlichen hingegen kommt es im Rahmen der Yersiniose eher zu einer akuten mesenterialen Lymphadenitis im Bereich des Ileozökalwinkels mit Fieber und abdominellen Schmerzen im rechten Unterbauch. Diese Symptomatik führt nicht selten zur Fehldiagnose einer Appendizitis bei den betroffenen Patienten (26). Durchfälle sind in dieser Altersgruppe selten.

Die Yersiniose bei Erwachsenen zeigt ein breites Spektrum an Symptomen. Häufig kommt es zu blutigen Diarrhöen mit Fieber, Erbrechen und abdominellen Schmerzen. Aber auch Myalgien, Pharyngitiden oder chronisch rezidivierende Ileokolitiden werden beobachtet.

Septische Verläufe der Yersiniose sind generell möglich, betreffen aber vor allem abwehrgeschwächte Individuen mit schweren Grunderkrankungen wie zum Beispiel Diabetes mellitus, Leberzirrhose und neoplastischen Prozessen (14). Auch Erkrankungen, die mit erhöhten Bluteisenspiegeln einhergehen - wie z.B. die Thalassämie (66) oder Sichelzellanämie (125) - oder eine therapeutische Eisensubstitution und die Gabe des Eisenkomplexons Desferrioxamin bei Dialysepatienten prädisponieren für einen septischen Verlauf der Yersiniose, da in diesen Fällen die lebenswichtige Eisenversorgung der Erreger und damit ihre Ausbreitung im Wirtsorganismus begünstigt wird (15, 88).

Im Rahmen einer Septikämie kann es zur Abszessbildung in Leber und Milz oder auch zur Entstehung einer Pneumonie, Meningitis, Endokarditis, septischen Arthritis, Osteomyelitis oder eines mykotischen Aneurysmas kommen (18).

Septische Verläufe wurden auch als Komplikation nach Bluttransfusionen beobachtet. Ursache hierfür sind Spender, bei denen es während oder nach einer intestinalen *Yersinia enterocolitica* - Infektion zu einer asymptomatischen Bakteriämie gekommen ist und deren Blut zu diesem Zeitpunkt zur Herstellung von Konserven verwendet wurde. Da sich Yersinien auch noch bei 4°C vermehren können, ist diesem Umstand in der Transfusionsmedizin besondere Beachtung zu schenken (18, 92, 128).

Bei einem Teil der Patienten kommt es nach einem akuten mesenterialen oder extramesenterialen Verlauf der Yersiniose zu aseptischen Folgeerkrankungen, die sich vor allem als reaktive Arthritis, seltener als Myokarditis, Glomerulonephritis, Thyreoiditis und Erythema nodosum manifestieren können (18). In den meisten Fällen ist die Prognose hierbei günstig, aber auch monate- und jahrelange Verläufe wurden beschrieben. Die reaktive Arthritis tritt insbesondere bei Patienten mit dem Histokompatibilitätsantigen HLA-B27 auf und zeigt sich klinisch in Form einer Mono- oder Oligoarthritis der großen Gelenke, vor allem des Kniegelenks. Bei den betroffenen Patienten können *Yersinia*-Antigene wie das Lipopolysaccharid und „*Yersinia heat shock antigen*“, nicht aber lebende Erreger in der Synovia entzündeter Gelenke nachgewiesen werden (51, 80, 132). Gleichzeitig findet man im Blut häufig erhöhte IgA-Titer. Man geht davon aus, dass Yersinien bei Patienten mit Folgeerkrankungen nicht vollständig durch die körpereigene Immunabwehr eliminiert werden und in der Darmmukosa oder in mesenterialen Lymphknoten persistieren (37). Von dort aus kommt es auf dem Blutweg zur Verschleppung von Erregerbestandteilen in die verschiedenen Organe und Gelenke, wo dann die oben beschriebenen Entzündungsreaktionen auftreten (52). Auch Kreuzreaktionen zwischen Anti-*Yersinia*-Antikörpern und körpereigenen Geweben scheinen bei der Pathogenese der diversen Folgeerkrankungen eine Rolle zu spielen (18).

1.1.5 Diagnostik und Therapie

Der Nachweis von *Yersinia enterocolitica* bei akuten Enteritisfällen gelingt am häufigsten aus Stuhlproben. Diese werden auf einem Selektivmedium, vorzugsweise auf Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar (CIN) ausgestrichen und bei 28°C 24 - 48 Stunden lang bebrütet. Bei symptomlosen Ausscheidern und Patienten mit terminaler Ileitis, Lymphadenitis, Pseudoappendizitis oder postinfektiöser Arthritis gelingt der Erregernachweis meist erst nach Kälteanreicherung. Hierbei wird das Patientenmaterial in Phosphatpuffer aufgenommen, zwei

bis fünf Wochen lang bei 4°C inkubiert und in wöchentlichen Abständen auf Selektiv-Agar ausgestrichen. Neben der Anzucht der Erreger kommen auch serologische Nachweisverfahren wie Immunoblot und ELISA sowie die PCR als molekularbiologische Methode in Betracht (14).

Intestinale Infektionen mit *Yersinia enterocolitica* sind in aller Regel selbstlimitierend und müssen nicht antibiotisch behandelt werden. Bei septischen Verläufen und extramesenterialen Manifestationen hingegen sollte immer eine Antibiose erfolgen (36). Als Therapeutika kommen hierbei Cephalosporine der dritten Generation, Cotrimoxazol, Tetrazykline, Aminoglykoside und Gyrasehemmer in Betracht (69, 115). Der therapeutische Nutzen einer Antibiotikatherapie bei immunologischen Folgeerkrankungen nach einer Yersinieninfektion ist bislang nicht erwiesen.

1.2 Pathomechanismus der Infektion

1.2.1 Virulenzfaktoren

Yersinia enterocolitica verfügt über eine Reihe von chromosomal und plasmidkodierten Virulenzfaktoren, die dem Erreger das Eindringen und Überleben im Wirtsorganismus ermöglichen (32, 33, 107). Zu den wichtigsten Virulenzfaktoren zählen die Oberflächenproteine Invasin (Inv) und *Yersinia*-Adhäsion A (YadA) sowie die über einen Typ-3-Sekretionsapparat in die Wirtszellen sezernierten *Yersinia outer proteins* (Yops).

1.2.1.1 Invasin

Das chromosomal kodierte Invasin gilt als der bedeutendste Invasionsfaktor der Yersinien und spielt eine entscheidende Rolle bei der Translokation der Erreger vom Darmlumen in die subepitheliale Gewebe in der Frühphase der Infektion (87, 100). Das Protein hat bei *Y. enterocolitica* eine Größe von 91 kDa (99) und ist mit seinem N-terminalen Ende in der Außenmembran der Bakterien verankert. Der C-terminale extrazelluläre Anteil überragt die Bakterienoberfläche und besteht aus vier Domänen, von denen die beiden äußeren eine Superdomäne bilden (57). Diese vermittelt die Bindung an β 1-Integrine auf M-Zellen der Peyer-Plaques der Darmwand und induziert damit eine effektive Internalisierung und Translokation der Yersinien (28, 55, 71, 83, 119, 143). Daneben führt die Bindung von Invasin an Enterozyten zur Aktivierung von NF- κ B und zur Produktion der

proinflammatorischen Zytokine IL-8, IL-1 α , IL-1 β und MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) sowie von GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (75, 118). Die Expression von Invasin ist abhängig von der Temperatur und dem pH-Wert der Umgebung. *In vitro* finden sich die höchsten Expressionsraten bei einer Temperatur von 26°C und einem pH-Wert von 8,0 (72). Bei 37°C wird Invasin deutlich schwächer exprimiert. Geht die Temperaturerhöhung jedoch mit einer Erniedrigung des pH-Wertes auf 5,5 einher, werden ähnlich hohe Expressionsraten wie bei 26°C erreicht (98). In Peyer-Plaques konnte Invasin 48 Stunden nach einer Infektion nachgewiesen werden (98); die Expression des Proteins im Darmlumen ist bislang nicht untersucht worden.

1.2.1.2 YadA

Das plasmidkodierte YadA ist ein membranständiges Protein mit einem Expressionsmaximum bei 37°C. Es hat eine Größe von 41 - 44 kDa (124) und ist mit seinem C-Terminus in der Außenmembran der Yersinien verankert. Elektronenmikroskopische Untersuchungen und Sequenzanalysen haben gezeigt, dass die einzelnen YadA-Moleküle an der Zelloberfläche der Yersinien Oligomere mit „lollipop“-artiger Struktur bilden (67). YadA ist für das Überleben und die Proliferation von *Y. enterocolitica* in den Peyer-Plaques von großer Bedeutung (101, 110). Das Protein ermöglicht den Yersinien die Autoagglutination in infizierten Geweben (123) sowie die Adhäsion an Epithelzellen (63), Phagozyten (111) und Proteine der Extrazellulärmatrix wie Kollagen (42, 120), Fibronectin (131) und Laminin (45). Des Weiteren ist es für die Serumresistenz der Yersinien verantwortlich (6), indem es die Opsonisierung durch den Komplementfaktor C3b verhindert und die Erreger damit vor einer Lyse durch das Komplementsystem des Wirtes schützt (27, 103). Auch die Resistenz gegenüber antimikrobiellen Polypeptiden aus neutrophilen Granulozyten wird durch YadA vermittelt (137). Im Zellkulturmodell konnte weiterhin gezeigt werden, dass YadA ebenso wie Invasin in der Lage ist, in Epithelzellen die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-8 zu induzieren (117). Das von *Yersinia pseudotuberculosis* exprimierte YadA führt durch Bindung an β_1 -Integrine zu einer effektiven Aufnahme der Bakterien in eukaryotische Zellen (41). Den YadA-Molekülen von *Yersinia enterocolitica* fehlt diese Eigenschaft. Kürzlich konnte als Ursache für dieses Phänomen eine spezifische N-terminale Aminosäuresequenz ermittelt werden, die ausschließlich bei *Y. pseudotuberculosis* vorkommt (65).

1.2.1.3 *Yersinia outer proteins*

Ebenfalls plasmidkodiert sind die *Yersinia outer proteins* (Yops), die bei 37°C von den Bakterien gebildet werden. Sie schützen die Yersinien nach deren Translokation in die subepitheliale Gewebe des Darmtraktes vor Angriffen des Immunsystems und ermöglichen damit die Proliferation und Dissemination der Erreger. Anhand ihrer Funktion werden die Yops unterteilt in Translokatoren, Regulatoren und Effektorproteine (35).

Zu letzteren zählen die Proteine YopE, YopH, YopM, YopO, YopP und YopT. Sie werden bei Kontakt der Yersinien mit Wirtszellen über eine Pore des sogenannten Ysc-Sekretionsapparates in das Zytosol der eukaryotischen Zellen injiziert und führen dort zur Beeinflussung von Signalkaskaden und Veränderungen des Zytoskeletts (34). Folge ist eine Blockade der wirtseigenen Immunantwort: YopE, YopO, YopH und YopT hemmen die Phagozytose durch Makrophagen (12, 43, 54, 112) und neutrophile Granulozyten (1, 136), YopM führt zur Suppression natürlicher Killerzellen (76). YopP induziert die Apoptose von Makrophagen (90, 91) und hat immunmodulatorische Effekte, indem es die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-8 und TNF- α unterdrückt (16, 39, 116).

Als Translokatoren bezeichnet man die Proteine YopB, YopD und LcrV (V-Antigen). Sie sind an der Bildung des Sekretionsapparates beteiligt und damit essentiell für eine erfolgreiche Translokation der oben genannten Effektorproteine (35). Daneben hat LcrV eine immunsuppressive Wirkung, da es durch Induktion der IL-10-Produktion in Makrophagen die Synthese von TNF- α und Interferon- γ hemmt (93, 122).

Zu den Regulatoren zählt YopQ (YopK bei *Y. pseudotuberculosis*), welches die Translokation der Effektorproteine kontrolliert (46, 68).

1.2.1.4 Ail

Das 17 kDa große Protein Ail wird von *Yersinia enterocolitica* bei einer Temperatur von 37°C und unter aeroben Bedingungen an der Membranoberfläche exprimiert (102). Es trägt ebenso wie YadA zur Serumresistenz der Yersinien bei (13, 102). Die Klonierung des Ail-Gens in nicht-invasive *E.coli*-Stämme befähigt diese zur Adhäsion und nachfolgenden Invasion in Epithelzellen (89). Während *in vitro* gezeigt werden konnte, dass Ail-negative Yersinien deutlich weniger invasiv sind als Wildtyp-Yersinien, konnte diese Beobachtung im Mausmodell nicht bestätigt werden. Hier scheint das Protein weder bei der Invasion der

Erreger in den Wirtsorganismus noch bei der anschließenden systemischen Dissemination eine entscheidende Rolle zu spielen (101, 138).

1.2.1.5 Enterotoxin *Yst*

Pathogene Yersinien produzieren im Darmlumen das hitzestabile Enterotoxin *Yst*. Es handelt sich dabei um ein chromosomal kodiertes Protein, das über eine Stimulation der cGMP-Synthese im intestinalen Bürstensaum zu wässrigen Diarrhöen führt (38, 70, 105, 109).

1.2.2 Eisenaufnahme durch *Y. enterocolitica*

Eisen ist als essentieller Bestandteil zahlreicher Stoffwechselprozesse für das Überleben und die Proliferation von Bakterien im Wirtsorganismus von entscheidender Bedeutung. In Säugetieren liegt der größte Teil des Eisens an Transport- und Speicherproteine gebunden vor und kann somit von den Erregern nicht verwertet werden. Um trotzdem eine ausreichende Eisenversorgung zu gewährleisten, sezernieren die Bakterien ihrerseits niedermolekulare Komplexbildner, sogenannte Siderophore, die im Wirtsorganismus vorhandenes dreiwertiges Eisen mit hoher Affinität binden. Die Siderophore werden dann über Rezeptoren auf der äußeren Bakterienmembran aufgenommen und ins Zytosol transportiert, wo es zur Freisetzung und anschließenden Reduktion des gebundenen Eisens kommt (5, 20, 44).

Yersinia enterocolitica produziert das Siderophor Yersiniabaktin (56), kann aber auch exogene Komplexbildner wie das therapeutisch zugeführte Desferrioxamin (9) oder Siderophore anderer Mikroorganismen wie *E.coli* (8) und Hämverbindungen (126, 127) zur Eisenaufnahme verwerten. Auf der äußeren Membran befindet sich der Yersiniabaktin-Rezeptor FyuA (*ferric yersiniabactin uptake*) (104). Die Synthesegene für Yersiniabaktin und FyuA sind auf einer 45 kDa großen Region des Chromosoms lokalisiert, die als *high pathogenicity island* (HPI) bezeichnet wird (22). Diese Region mit den Genen für das Eisenaufnahmesystem kommt nur bei den für Mäuse hochpathogenen Yersinien der Serogruppen O:8, O:13, O:20 und O:40 vor und kann daher als Virulenzfaktor gewertet werden (25, 64).

1.2.3 Invasion und Dissemination

Nach oraler Aufnahme gelangen die Yersinien zunächst in den Magen und von dort weiter in den Dünndarm. Dabei exprimieren sie eine Urease, die ihnen das Überleben im sauren Milieu des Magens ermöglicht (53, 77). Im Dünndarm spielt das darmassoziierte lymphatische Gewebe (GALT) eine entscheidende Rolle bei der weiteren Pathogenese der Infektion.

In der Lamina propria und Submukosa der Darmwand befinden sich Lymphfollikel, die singular oder als Follikelaggregate vorkommen. Letztere werden als sogenannte Peyer-Plaques bezeichnet und sind vor allem im terminalen Ileum lokalisiert. Bedeckt werden die Peyer-Plaques vom follikelassoziierten Epithel (FAE), das sich morphologisch und funktionell vom restlichen Darmepithel unterscheidet. Es finden sich hier nur wenige schleimproduzierende Zellen und auch der Anteil der Defensin- und Lysozym-produzierenden Paneth'schen Körnerzellen ist deutlich geringer als in anderen Darmregionen (49). Hauptmerkmal des FAE sind jedoch die sogenannten M-Zellen (membranöse Zellen) (78, 95). Diese haben im Vergleich zu anderen Enterozyten einen nur schwach ausgeprägten Bürstensaum und eine dünne Glycocalix. Auf ihrer apikalen Oberfläche exprimieren die M-Zellen β_1 -Integrine (28), basal zeigen sie tiefe zytoplasmatische Invaginationen, in denen sich Lymphozyten und Makrophagen sammeln. Aufgabe der M-Zellen ist die Aufnahme und Translokation intestinaler Antigene in die subepitheliale Domregion der Peyer-Plaques (94). Dort befinden sich dendritische Zellen, die durch den Antigenkontakt einen Reifungsprozess vollziehen und anschließend in der interfollikulären T-Zellzone der Lymphfollikel eine Immunantwort induzieren (40). Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Erreger, so auch *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* die M-Zellen als Eintrittspforte in den Wirtsorganismus nutzen (2, 55, 114).

Nach Erreichen des Dünndarms adhäreren die Yersinien an die Darmwand (86, 97) und binden mit dem an ihrer Oberfläche exprimierten Invasin an β_1 -Integrine der M-Zellen (71). Dadurch wird die Transzytose der Erreger vom Darmlumen ins submuköse Gewebe und die Lymphfollikel der Peyer-Plaques induziert. Experimente mit Invasin-negativen Mutanten haben gezeigt, dass diese ebenfalls Peyer-Plaques besiedeln können, allerdings mit einigen Tagen Verzögerung im Vergleich zu Wildtyp-Yersinien. Die LD₅₀ ist für Invasin-Mutanten und Wildtyp-Yersinien gleich (100). Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass neben der beschriebenen Invasin-vermittelten Transzytose in die Peyer-Plaques auch Invasin-unabhängige Invasionsmechanismen existieren. In der subepithelialen Domregion der Peyer-

Plaques und in den Lymphfollikeln sezernieren die Yersinien ihre Yops und inhibieren damit die Phagozytose durch Immunzellen (34). Es kommt zur extrazellulären Vermehrung der Bakterien (121) und nach Einstrom neutrophiler Granulozyten in die infizierten Peyer-Plaques zur Ausbildung von Mikroabszessen. Gelegentlich führen die durch die Yersinien ausgelösten inflammatorischen Prozesse in den Peyer-Plaques zur kompletten Zerstörung der Zellarchitektur (2, 60). Von den Peyer-Plaques ausgehend disseminieren die Erreger in die mesenterialen Lymphknoten. Im oralen Mausinfektionsmodell ist typischerweise eine weitere Ausbreitung in Milz und Leber sowie eine Abszessbildung in diesen Organen zu beobachten (23). Diese Dissemination scheint jedoch nicht wie oben beschrieben über die Peyer-Plaques und mesenterialen Lymphknoten zu verlaufen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass intestinales lymphatisches Gewebe für die systemische Ausbreitung entbehrlich ist (59), und dass Yersinien, die in Leber und Milz Abszesse bilden, nicht aus zuvor befallenen mesenterialen Lymphknoten stammen sondern über einen weiteren, bislang unbekanntem Weg direkt aus dem Darmlumen in diese Organe gelangen (7). Ursprünglich ging man davon aus, dass M-Zellen nur im FAE der Peyer-Plaques vorkommen. Jetzt konnten diese Zellen auch außerhalb der Peyer-Plaques in den Villi der Darmmukosa nachgewiesen werden und man nimmt an, dass sie dort eine alternative Invasionsmöglichkeit für die Yersinien darstellen (74). Auch die Beteiligung subepithelial lokalisierter CD18+-Phagozyten an der Translokation der Bakterien vom Darmlumen in die Submukosa wird diskutiert. Diese Zellen besitzen ins Darmlumen ragende Dendriten, mit denen sie antigene Strukturen aufnehmen können. In Versuchen mit *Salmonella typhimurium* konnte bereits gezeigt werden, dass die Phagozyten eine entscheidende Rolle bei der extraintestinalen Dissemination dieser Bakterien spielen (106, 135).

1.2.4 Abszessbildung durch *Y. enterocolitica*

Wie oben beschrieben kommt es nach Invasion der Yersinien in die Peyer-Plaques zur lokalen Proliferation der Erreger und Ausbildung von Mikroabszessen. Diese enthalten zunächst hauptsächlich neutrophile Granulozyten, später wandern mononukleäre Zellen ein und die Abszesse bekommen einen granulomatösen Charakter (3). Gleiches passiert in Leber und Milz (23). Bislang glaubte man, dass nach einer oralen Infektion mit Yersinien sehr viele Bakterien über die M-Zellen in die einzelnen Peyer-Plaques invadieren und dort zur Abszessbildung führen. Experimente im murinen *ligated loop*-Modell schienen dies zu bestätigen (28). Orale Infektionsversuche mit GFP (*green fluorescent protein*)- und RFP (*red*

fluorescent protein)-markierten Yersinien unter natürlichen Bedingungen (d.h. ohne Unterbrechung der Darmkontinuität wie im *ligated loop*-Modell) zeigten jedoch ein vollkommen anderes Bild (4). Die Verwendung fluoreszenzmarkierter Yersinien ermöglicht die genaue mikroskopische Lokalisierung der Bakterien in den Peyer-Plaques und Organen infizierter Mäuse und erlaubt Aussagen zur Klonalität der dort gebildeten bakteriellen Mikrokolonien und Abszesse. In Infektionsversuchen mit einem Gemisch rot und grün fluoreszierender Yersinien im Verhältnis 1:1 konnten sowohl in den Peyer-Plaques als auch in den Milzen und Lebern nur einfarbige, das heißt entweder rote oder grüne Mikrokolonien und Abszesse nachgewiesen werden. Dies legt den Schluss nahe, dass ein *Yersinia*-Abszess durch die Replikation einer einzigen Yersinie entsteht (monoklonale Abszessbildung). Würde die Bildung eines einzelnen Abszesses wie bislang vermutet von vielen *Yersinia*-Bakterien ausgehen (polyklonale Abszessbildung), müsste der Abszess bei einer Infektion mit rot und grün fluoreszierenden Yersinien im Verhältnis 1:1 gemischtfarbig sein. Solche gemischtfarbigen Abszesse konnten jedoch weder in den untersuchten Peyer-Plaques noch in den Milzen und Lebern der infizierten Mäuse gefunden werden.

2. Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Infektionsversuche mit fluoreszenzmarkierten Yersinien neue Erkenntnisse zum Invasionsprozess, zur Abszessbildung und zur Erregerdissemination im Mausmodell zu erlangen und in einem weiteren Schritt die im Rahmen einer Yersinieninfektion ablaufenden Pathogen-Wirts-Interaktionen näher zu analysieren.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Wie viele Yersinien invadieren nach oralen Infektionen mit Infektionsdosen zwischen 10^6 KBE (unterhalb der LD_{50}) und 10^9 KBE (oberhalb der LD_{50}) in die einzelnen Peyer-Plaques und bilden dort Mikroabszesse? Wie viele Abszesse entstehen in Leber und Milz? Sind die Abszesse in den Peyer-Plaques und inneren Organen unabhängig von der Infektionsdosis monoklonal oder kommt es bei sehr hohen Infektionsdosen zur Entstehung polyklonaler Abszesse?
2. Invadieren die Yersinien kontinuierlich im Infektionsverlauf vom Darmlumen in die Peyer-Plaques oder ist der Invasionsvorgang zeitlich limitiert?
3. Welchen Einfluss haben Wirtsfaktoren (insbesondere das Immunsystem) auf die Invasion und Abszessbildung?
4. Wird das Oberflächenprotein Invasin als wichtigster Invasionsfaktor der Yersinien während der Kolonisation des Dünndarmes - wie bislang vermutet - permanent exprimiert oder ist die Expression unter den im Dünndarm herrschenden Wachstumsbedingungen zeitlich limitiert?

B. Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

Gerät	Modell	Firma
Analysenwaagen	1801 510	Sartorius, Göttingen Gottl.Kern&Sohn, Albstadt
Brutschränke	Typ B 20	Heraeus, Hanau
Bunsenbrenner	Flammy S	Schütt, Göttingen
CO ₂ -Inkubator	BBD 6220	Heraeus, Hanau
Elektroblot-Apparatur	Mini Trans Blot Cell	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammern	Flachbett-Kammern Mini-Protean 3 System	Keutz, Reiskirchen Bio-Rad, München
Elektroporationsgerät	Gene-Pulser II, Pulse Controller Plus	Bio-Rad, München
Elektroporationsküvetten		Eurogentech, Köln
Filmentwickler	FPM-100A	Fuji, Tokio
Fluoreszenz-Mikroskop	Leica DM RBE	Leica, Wetzlar
Inverses Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Jena
Homogenisatoren	HOG2 (2 ml), HOG3 (5 ml)	Hartenstein, Würzburg
Immunoblot-Apparatur	Mini-Protean Gelelektrophorese Kammer	Bio-Rad, München
Kryomikrotom	CM 3050	Leica, Wetzlar
Magnetrührer	IKAMAG RH	Janke&Kunkel, Staufen
pH-Meter	320 pH-Meter	Mettler, Toledo
Photometer	Ultraspec 3000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipetten	Eppendorf Research P10-P1000	Eppendorf, Hamburg
Photomodul (Fluoreszenzmikroskop)	Leitz DMRD	Leica, Wetzlar
Schüttelinkubator	Certomat BS-1	Braun, Melsungen
Schüttler	Mini Rocker MR-1	Bio-San, Riga, Lettland
Spannungsquellen	Power Pac 200	Bio-Rad, München
Sterilwerkbank	Herasafe HS 12	Heraeus, Hanau
Tischinkubator	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator		Bachofer, Reutlingen
Videophotoanlage	E.A.S.Y. RH	Herolab, Wiesloch
Video-Printer		Mitsubishi, Tokio
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad	WB/OB7-45	Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Eppendorf 5417R 3K30 mit Rotor Nr. 19776 RC5C	Eppendorf, Hamburg Sigma, Deisenhofen Sorvall Instruments, DuPont, Newtown, USA

1.2 Sonstige Materialien

Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Brand (Wertheim), B. Braun (Melsungen), Eppendorf (Hamburg), Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich), Hartenstein (Würzburg), Kimberly-Clark (Zaventem, Belgien), Menzel GmbH & Co KG (Braunschweig), Millipore (Eschborn), Nunc (Roskilde, Dänemark), Schleicher & Schüll (Dassel)

1.3 Chemikalien

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien und Antibiotika von den Firmen Biomol (Hamburg), Invitrogen (Karlsruhe), E. Merck (Darmstadt), National Diagnostics (Atlanta, USA), Roth (Karlsruhe), Sakura (Zoeterwoude, Niederlande), Sigma (Deisenhofen) und Medien für die Bakterienkultur von der Firma MP Biomedicals (Eschwege) und Becton Dickinson (Heidelberg) bezogen.

1.4 Antikörper

Esel-anti-Kaninchen-IgG, HRP konjugiert	Amersham Biosciences, Freiburg
Ziege-anti-Ratte-IgG, Cy3 konjugiert	Dianova, Hamburg
Ratte-anti-Maus RB6-8C5	Becton Dickinson, Heidelberg
Kaninchen-anti-Invasin (polyklonal)	Labor I. Autenrieth, Tübingen
Kaninchen-anti-HSP60 (polyklonal)	Labor I. Autenrieth, Tübingen

1.5 Enzyme

Trypsin (flüssig, 0,25 %)	Invitrogen, Karlsruhe
Chymotrypsin	Sigma, Taufkirchen
Elastase	Sigma, Taufkirchen
Carboxypeptidase	Roche Diagnostics, Mannheim

1.6 Proteaseinhibitor

α 1-Antitrypsin	Sigma, Taufkirchen
------------------------	--------------------

1.9.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Medium zur Kultivierung der Zellen:	RPMI 1640 (Invitrogen) 10 % (v/v) FCS (Invitrogen) 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)
Medium für das Invasions-Assay:	RPMI 1640 (Invitrogen) 20 mM Hepes (Invitrogen) 0,4 % BSA (Roth) 50 µg/ml Tetrazyklin (Sigma)
Trypanblau-Lösung:	0,4 % (m/v) Trypanblau in 0,81 % (m/v) NaCl-Lösung (Sigma)
Trypsin (flüssig, 0,25 %)	Invitrogen, Karlsruhe
Triton® X-100	E. Merck, Darmstadt
Gentamicin (Endkonzentration 100 µg/ml)	Roth, Karlsruhe

1.9.3 Puffer und Lösungen für die Elektrophorese

1.9.3.1 Agarose-Gelelektrophorese:

10 x TAE-Puffer:	0,4 M Tris-HCl (Invitrogen) 50 mM Natriumacetat (E. Merck) 10 mM EDTA (E. Merck), pH 7,6
10 x Probenpuffer:	0,25 % (m/v) Bromphenolblau (Sigma) 25 % (v/v) Ficoll 400 (Biomol)
Agarosegel:	0,8 - 1,2 % (m/v) Agarose (Roth) in 1 x TAE
Ethidiumbromidlösung:	2 µg Ethidiumbromid (Sigma) pro ml H ₂ O _{bidest}

1.9.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE):

10 % Ammoniumpersulfat (E. Merck):	10 % (m/v) in H ₂ O _{bidest}
10 % Sodiumdodecylsulfat (Biomol):	10 % (m/v) in H ₂ O _{bidest}
Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8):	30 % Acrylamid; 0,8% Bisacrylamid
TEMED (Biomol)	
Sammelpuffer:	0,5 M Tris-HCl (Invitrogen), pH 6,8
Trennpuffer:	1,5 M Tris-HCl (Invitrogen), pH 8,6
10 x SDS Laufpuffer:	30 g Tris-HCl (Invitrogen) 144,4 g Glycin (Biomol) 100 ml 10 % SDS (Biomol) ad 1L H ₂ O _{bidest}
2 x Laemmli-Probenpuffer:	125 mM Tris-HCl (Invitrogen), pH 6,8 20 % Glycerin (E. Merck) 4 % SDS (Biomol) 10 % Mercaptoethanol (E. Merck) 0,002 % Bromphenolblau (Sigma)
1 x Western Blot-Puffer:	3 g Tris-HCl (Invitrogen) 14,4 g Glycin (Biomol) ad 1 L H ₂ O _{bidest}
Blockierungspuffer:	2 % (m/v) BSA (Roth) in PBS (Invitrogen)
Waschpuffer:	0,05 % (v/v) Tween 20 (Sigma) in PBS (Invitrogen)

1.9.4 Lösungen zur Herstellung elektrokompenter Bakterien

Waschpuffer:	steriles H ₂ O _{bidest}
Einfrierpuffer:	10 % (v/v) Glycerin (Roth) in H ₂ O _{bidest}

1.9.5 Lösungen für die Immunhistochemie

Fixierlösung:	Aceton (Sigma)
Blockierungspuffer:	5 % (m/v) bzw. 2 % (m/v) humanes Serumalbumin (Sigma) in TBS (Invitrogen)
Waschpuffer:	0,05 % (v/v) Tween 20 (Sigma) in TBS (Invitrogen)

1.10 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pLacGFP	<i>Bam</i> HI- <i>Sal</i> I GFP Fragment (aus pGFPmut2 (31)) hinter Lac-Promotor (<i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI) in pACYC184, Cm ^R	(96)
pLacRFP	<i>Bam</i> HI- <i>Sal</i> I RFP Fragment (aus pDSRed-Express (10)) hinter Lac-Promotor (<i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI) in pACYC184, Cm ^R	(96)

1.11 Bakterienstämme

Stammbezeichnung	Beschreibung	Referenz
<u>E. coli</u>		
DH5α[pLacGFP]	<i>E. coli</i> DH 5α (58) mit Plasmid LacGFP, Cm ^R	(96)
DH5α[pLacRFP]	<i>E. coli</i> DH 5α (58) mit Plasmid LacRFP, Cm ^R	(96)
<u>Y. enterocolitica</u>		
WA-314[pLacGFP]	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:8, Biogruppe 1B, klinisches Isolat mit Virulenzplasmid YV 08 und Plasmid LacGFP, Cm ^R	(4)
WA-314[pLacRFP]	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:8, Biogruppe 1B, klinisches Isolat mit Virulenzplasmid YV 08 und Plasmid LacRFP, Cm ^R	(4)
WA-C(pYV)::Kan	WA-C (plasmidloses Derivat von Stamm WA-314) mit Virulenzplasmid pYV::Kan, Kan ^R	(96)
WA-C(pYV)::Kan[pLacGFP]	WA-C mit Virulenzplasmid pYV::Kan und Plasmid LacGFP, Kan ^R , Cm ^R	(96)
WA-C(pYV)::Kan[pLacRFP]	WA-C mit Virulenzplasmid pYV::Kan und Plasmid LacRFP, Kan ^R , Cm ^R	(96)
WA-C(pYV)- <i>inv</i>	Invasin-negative Mutante von WA-C(pYV)	(113)

1.12 Versuchstiere

Für Mausinfektionsversuche wurden weibliche BALB/c-Mäuse (Harlan Winkelmann, Borcheln) und C57BL/6 p47^{phox^{-/-}} - Mäuse (Labor A. Gessner, Erlangen) im Alter von 6 - 8 Wochen verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte unter speziellen pathogenfreien Bedingungen in einer Überdruckkammer. Steriles Trinkwasser und Mäuse-Zuchtfutter wurden *ad libidum* bereitgestellt.

2. Methoden

Alle Arbeiten wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt.

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Kultivierung von Bakterien

Zur Kultivierung der Bakterien wurde ein Glaskolben oder Reagenzglas unter sterilen Bedingungen mit LB-Medium gefüllt. Dabei sollte das Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen möglichst groß sein, um eine optimale Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Zur Selektion der Stämme und zur Vermeidung von Kontaminationen wurden dem Medium entsprechende Antibiotika zugesetzt (20 µg/ml Chloramphenicol und 50 µg/ml Kanamycin für WAC(pYV)::Kan[pLacGFP/RFP]). Das Medium wurde dann mit einer Kolonie oder Vorkultur des gewünschten Stammes angeimpft und im Schüttelinkubator bei 27°C (*Y. enterocolitica*) oder 37°C (*E. coli*) über Nacht inkubiert.

Zur Isolierung einer einzelnen Kolonie für die Anzucht wurden antibiotikahaltige LB-Agarplatten mittels Dreiösenausstrich beimpft. Nach 12-18-stündiger Inkubation konnte ein Klon gepickt und zur Animpfung einer Flüssigkultur (wie oben beschrieben) verwendet werden.

2.1.2 Stammhaltung

Die über Nacht angezüchteten Bakterienkulturen wurden bei 1700 x g und 4°C 10 Minuten lang abzentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal mit sterilem PBS gewaschen, anschließend in 15 ml Einfriermedium resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren und gelagert.

Die Bakterienkonzentration der eingefrorenen Aliquots wurde durch Ausplattieren mehrerer Verdünnungsreihen der Bakteriensuspension auf Mueller-Hinton II-Agarplatten bestimmt und als Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro 100 µl erfasst.

2.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen

Die optische Dichte (OD) einer Bakterienkultur wurde durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Spektralphotometer bestimmt. In der exponentiellen Wachstumsphase liegt die optische Dichte einer Bakterienkultur zwischen 0,3 und 0,7. Dies entspricht einer Bakterienkonzentration von ungefähr $1 - 2,5 \times 10^8$ KBE/ml.

2.1.4 Nachweis von Yersinien in der Darmlavage infizierter Mäuse

Zum Nachweis von Yersinien in der Darmlavage infizierter Mäuse wurden 100 µl einer adäquat verdünnten Probe mit einem abgeflamten, sterilen Glasspatel auf CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin)-Agarplatten oder antibiotikahaltigen (Chloramphenicol, Kanamycin) LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 27°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die gewachsenen Einzelkolonien ausgezählt.

2.1.5 Behandlung von Yersinien mit Darmflüssigkeit und Proteasen

Zur proteolytischen Behandlung der Yersinien wurden verschiedene Proteasen und die Darmlavage nicht infizierter Mäuse eingesetzt. Letztere wurde durch Spülung der Dünndärme mit 5 ml PBS gewonnen. Feste Bestandteile (Kotreste etc.) wurden durch Zentrifugation aus der Darmlavage entfernt.

10^7 Yersinien wurden abzentrifugiert und das Pellet mit den jeweiligen Proteasen in einem geeigneten Puffer (in einem 100 µl Ansatz) bei 25°C oder 37°C (abhängig von der verwendeten Protease) eine Stunde lang inkubiert. Die Darmlavage wurde sowohl unverdünnt als auch in Verdünnungen (in PBS) von 1:10 bis 1:10000 eingesetzt und ebenfalls eine Stunde lang bei 37°C mit dem Bakterienpellet inkubiert.

Im folgenden sind die Konzentrationen der jeweiligen Proteasen, die verwendeten Verdaupuffer und die Inkubationstemperatur angegeben:

α -Chymotrypsin: 20 $\mu\text{g/ml}$ in 100 mM Tris-HCl, pH 7,8 + 10 mM CaCl_2 bei 37°C

Elastase: 10 $\mu\text{g/ml}$ in 200 mM Tris-HCl, pH 8,8 bei 37°C

Carboxypeptidase: 50 $\mu\text{g/ml}$ in 25 mM Tris-HCl, pH 7,65 + 100 mM NaCl bei 37°C

Trypsin: 25 $\mu\text{g/ml}$ in PBS bei 37°C

Nach der einstündigen Inkubation wurden die Bakterien abzentrifugiert und anschließend mittels Western Blot untersucht (s. 2.3) oder im Zellkultur-Invasions-Assay (s. 2.4.3) eingesetzt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Gewinnung kleiner Mengen (bis 20 μg) Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen (Hilden). Diese Methode der Plasmidisolierung beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterien (11) und der anschließenden Reinigung der Plasmid-DNA durch Adsorption an Silica-Gel in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen.

Zur Isolierung wurden zunächst 10 ml einer Übernachtskultur der Bakterien abzentrifugiert und die Bakterienzellwände durch Lysozym aufgelöst. Dann wurde die gesamte bakterielle DNA im alkalischen Milieu denaturiert. Nach Neutralisation der alkalischen Lösung renaturierte nur die kovalent geschlossene, zirkuläre Plasmid-DNA. Sie löste sich nach Zentrifugation im Überstand, während die chromosomale DNA pelletierte und somit entfernt werden konnte. Der plasmidhaltige Überstand wurde anschließend auf eine „Mini-prep“ Säule (Qiagen, Hilden) gegeben. Die Plasmid-DNA band dabei an das Silica-Gel der Säule und wurde wie vom Hersteller beschrieben durch Zentrifugation von Verunreinigungen gesäubert. Im letzten Präparationsschritt wurde die Plasmid-DNA mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aus der Gelmatrix eluiert. Der Erfolg der Plasmidpräparation wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung und Identifizierung von DNA-Molekülen. Dabei wandern negativ geladene DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld zur Anode und werden im Agarosegel aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist sowohl vom Molekulargewicht und der Konformation der DNA-Moleküle als auch von der Agarosekonzentration im Gel und der elektrischen Feldstärke abhängig. Mittels des interkalierenden Agens Ethidiumbromid können die DNA-Fragmente im Agarosegel unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Da die Wanderungsgeschwindigkeit linearer doppelsträngiger DNA im Agarosegel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes ist, können die Größen der einzelnen Fragmente durch Vergleiche mit Längenstandards bestimmt werden.

Zur gelelektrophoretischen Untersuchung von DNA-Fragmenten wurden je nach Größe der zu analysierenden DNA 0,8 - 1,2 % (m/v) Agarose in TAE-Puffer aufgeköcht bis eine klare homogene Lösung entstand, die nach Abkühlung auf 50°C in einen Gelschlitten gegossen wurde. Das erstarrte Gel wurde anschließend in eine Gelkammer eingelegt und mit 1 x TAE Puffer überschichtet. 10 - 20 µl der DNA-Proben wurden mit 1 - 2 µl 10 x Probenpuffer gemischt und neben dem Längenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit einer konstanten Spannung von 80 V. Danach wurde das Gel aus der Kammer genommen, eine halbe Stunde lang bei Raumtemperatur in einer Ethidiumbromidlösung inkubiert und anschließend 20 Minuten lang in H₂O_{bidest} entfärbt. Die Auswertung erfolgte durch Bestrahlung des Gels mit UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) im Transilluminator; das dabei sichtbare Bandenmuster wurde mit einer Photoanlage dokumentiert.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$. Dazu wurden DNA-Proben im Verhältnis 1:20, 1:50 und 1:100 mit H₂O_{bidest} verdünnt und die optische Dichte (OD₂₆₀) im Vergleich zu H₂O_{bidest} bestimmt. Eine Lösung, die 50 µg/ml doppelsträngige DNA enthält, hat bei einer Wellenlänge von 260 nm eine OD von 1. Daher ließ sich eine unbekannte DNA-Konzentration (C) bei bekannter OD₂₆₀ nach folgender Formel berechnen: $C (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

2.2.4 Transformation von DNA

Fremde DNA-Moleküle lassen sich mit Hilfe der Elektroporation in das Zytosol elektrokompenter Bakterienzellen transformieren.

2.2.4.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter Yersinien vom Stamm WAC(pYV)::Kan wurde 1 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes in 100 ml LB-Medium gegeben und bei 27°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann 10 - 15 Minuten lang auf Eis stengelassen, bevor die Zellen bei 2600 g und 4°C 10 Minuten lang abzentrifugiert wurden. Nach dreimaligem Waschen mit eiskaltem sterilem H₂O_{bidest} wurden die Bakterien in 10 %-igem (v/v) Glycerin/H₂O_{bidest} resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Abschließend wurden die Bakterien in 1 ml sterilem 10 %-igem (v/v) Glycerin/H₂O_{bidest} aufgenommen und in Aliquots von 100 µl bei -80°C eingefroren.

2.2.4.2 Elektroporation von *Y. enterocolitica*

Bei der Elektroporation wird eine Bakteriensuspension hoher Zelldichte mit Plasmid-DNA gemischt und anschließend einem starken elektrischen Feld ausgesetzt. Man geht davon aus, dass dabei Poren in der Bakterienzellwand geöffnet werden, durch die die zugegebene Plasmid-DNA ins Zellinnere diffundieren kann.

Für die Elektroporation wurden 50 µl elektrokompenter Yersinien vom Stamm WAC(pYV)::Kan langsam auf Eis aufgetaut und mit 0,1 - 1 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA gemischt. Dieser Ansatz wurde dann in eine vorgekühlte Transformationsküvette pipettiert. Die Elektroporation wurde mit dem Gene Pulser II der Firma Bio-Rad unter folgenden Elektroporationsbedingungen durchgeführt: Spannung 2,5 kV, Widerstand 200 Ω, Kapazität 25 µF bei einer Entladungszeit von 4 - 5 msec. Nach erfolgreicher Elektroporation wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium aufgenommen und eine Stunde lang bei 27°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Selektion der plasmidtragenden Bakterien erfolgte anschließend durch Anzucht auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika (Chloramphenicol bei Transformation von pLacGFP und pLacRFP in WAC(pYV)::Kan).

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden geladene Moleküle unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach aufgetrennt (79). Die zu untersuchenden Proteine werden zunächst in Gegenwart von β -Mercaptoethanol und Natriumdodecylsulfat (SDS) bei 95°C denaturiert. Das β -Mercaptoethanol reduziert dabei vorhandene Disulfidbrücken zwischen Cysteinen, das anionische Detergenz SDS bricht Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine auf und führt somit zur Entfaltung der Proteine. Außerdem entstehen durch die Bindung des negativ geladenen SDS an die Proteine negativ geladene SDS-Protein-Komplexe (die Eigenladungen der Proteine werden von SDS überdeckt) mit konstantem Ladungs-zu-Masse-Verhältnis (1,4 g SDS/g Protein in 1 % SDS-Lösungen). Dadurch unterscheiden sich die verschiedenen SDS-Proteinkomplexe nur noch in ihrer Größe. Durch die SDS-bedingte starke negative Ladung wandern die Proteine im elektrischen Feld zur Anode, wobei der Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix die Proteine nach ihrem Stokes-Radius und damit ihrem Molekulargewicht auftrennt. Mit Hilfe eines Proteinmarkers können die Molekulargewichte bestimmt werden.

2.3.2 Herstellung von Polyacrylamid-Gelen

In dieser Arbeit wurden entsprechend der Methode nach Laemmli diskontinuierliche Polyacrylamidgele mit Tris-Glycin-Puffern verwendet. Dabei wird das Trenngel von einem Sammelgel überlagert, in dem die Proteine vor ihrer Auftrennung zunächst „fokussiert“ werden.

Die Herstellung der Gele erfolgte in einer Mini Protean Gelelektrophoresekammer der Firma Bio-Rad.

Dazu wurden die für das Trenngel erforderlichen Substanzen (s.u.) zusammengegeben und in eine 10,5 cm x 7,5 cm x 1,0 mm große Vertikalkammer gefüllt (bis 1,5 cm unterhalb des oberen Randes der Kammer). Das Gel wurde dann mit 1 ml 2-Butanol überschichtet, um eine glatte Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel zu erhalten. Nach 30-minütiger Polymerisation des Trenngels wurde das Butanol entfernt, das Sammelgel (s.u.) in das verbleibende Volumen der Kammer gegossen und ein Kamm zur Bildung von Taschen

blasenfrei ins Sammelgel eingesetzt. Nach halbstündiger Polymerisation war auch das Sammelgel gehärtet und konnte für die Elektrophorese verwendet werden.

Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel:

Trenngel 11 %:	Acrylamid (Acrylamid 30 %,	
	Bisacrylamid 0,8 %)	3,7 ml
	1,5 M Tris-HCl (pH 8,6)	5 ml
	H ₂ O _{bidest}	1,1 ml
	10 % SDS	200 µl
	10 % APS	40 µl
	TEMED	20 µl
Sammelgel 4 %:	Acrylamid (Acrylamid 30 %,	
	Bisacrylamid 0,8 %)	0,35 ml
	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
	H ₂ O _{bidest}	0,85 ml
	10 % SDS	50 µl
	10 % APS	15 µl
	TEMED	15 µl

2.3.3 Aufbereitung der Proben und Elektrophorese

In dieser Arbeit wurden Bakterienlysate elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden 3×10^6 - 1×10^7 Bakterien bei 1700 x g und 4°C abzentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 10 - 15 µl Probenpuffer versetzt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben 10 Minuten lang bei 95°C aufgeköcht, dann kurz auf Eis gelagert und nochmals 5 Minuten lang mit hoher Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in die vorgesehenen Taschen des Sammelgels pipettiert und die Elektrophorese in 1 x SDS Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel durchgeführt.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Proteine wurde der Standard „BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder“ der Firma Invitrogen zusätzlich zu den Proben auf das Gel aufgetragen.

2.3.4 Immunoblot (Western Blot)

Der Western Blot ist eine Methode zur Detektion von Proteinen mittels einer Antikörper-Antigen-Reaktion (133). Dabei werden die zuvor im SDS-Gel aufgetrennten Proteine durch Wanderung in einem elektrischen Feld auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Nach dem Transfer werden zur Vermeidung unspezifischer Bindungen freie Proteinbindungsstellen auf der Blotmembran geblockt. Dann wird die Membran mit dem ersten Antikörper inkubiert, der gegen das gesuchte Protein gerichtet ist. Nach mehrmaligem Waschen der Membran wird der zweite Antikörper aufgetragen. Dieser bindet an den ersten Antikörper und ermöglicht durch Kopplung an ein Enzym nach Zugabe eines entsprechenden Substrates dessen Detektion.

In dieser Arbeit wurden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine aus den Bakterienlysaten in einer „Mini Trans Blot Cell“ der Firma Bio-Rad eine Stunde lang bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA in Western Blot-Puffer transferiert. Zum Blocken freier Valenzen wurde die Membran über Nacht mit einem Blockierungspuffer (BSA 2 % (m/v) in PBS) inkubiert. Anschließend wurde die Membran 10 Minuten lang mit einem Waschpuffer (0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS) gewaschen und mit einem gegen das gewünschte Protein gerichteten Antikörper (polyklonaler α -Inv-Antikörper, Verdünnung 1:2000 in PBS/Tween 0,05 % oder polyklonaler α -Hsp60-Antikörper, Verdünnung 1:2000 in PBS/Tween 0,05 %) eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran zur Entfernung nichtspezifisch gebundener Antikörper dreimal gewaschen. Es folgte die einstündige Inkubation mit dem zweiten Antikörper, der gegen den ersten gerichtet und mit einer Peroxidase konjugiert war (Esel-anti-Kaninchen-IgG, HRP konjugiert, Verdünnung 1:10000 in PBS/Tween 0,05 %). Die Membran wurde dann wiederum dreimal gewaschen und die Detektion der Proteinbanden mittels des ECL-Kits der Firma Amersham Pharmacia durchgeführt. Dazu wurde die Membran zunächst 60 Sekunden lang mit der mitgelieferten Detektionslösung inkubiert. Dann wurde ein Röntgenfilm (Fuji Medical X-ray Film, Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf) auf die Membran gelegt und nach Belichtungszeiten zwischen einer Sekunde und mehreren Minuten (je nach Intensität der Banden) entwickelt.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Kultivierung von HeLa-Zellen für das Invasions-Assay

Alle Arbeiten erfolgten unter einer Sterilbank. Die verwendeten Materialien und Lösungen wurden bereits steril vom Hersteller bezogen oder sterilfiltriert.

HeLa-Zellen wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte in RPMI-Medium kultiviert. Das Medium enthielt zusätzlich 10 % (v/v) FCS (fötales Kälberserum) und 1 % (v/v) einer Mischung aus Penicillin und Streptomycin. Eine konfluent gewachsene Kultur wurde mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend 5 Minuten lang mit 1 ml einer 1 x Trypsin-EDTA-Lösung versetzt, um die Zellen vom Boden der Kulturflaschen abzulösen. Durch Zusatz von 9 ml RPMI wurde das Trypsin inaktiviert. Dann wurden die abgelösten Zellen abzentrifugiert und der Überstand aus RPMI und Trypsin entfernt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 10 ml frisches RPMI-Medium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl in der Suspension wurden die Zellen für das Invasions-Assay über Nacht in einer 24-well-Platte subkultiviert (1 x 10⁵ Zellen pro *well* in RPMI 1640 mit FCS und Penicillin/Streptomycin).

2.4.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellkonzentrationen erfolgte mittels Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer). Dazu wurden zunächst 90 µl der nach Ablösung durch Trypsin-EDTA mit PBS gewaschenen und in 10 ml RPMI resuspendierten Zellen (s. 2.4.1) mit 10 µl Trypanblau-Lösung (0,4 % (m/v) Trypanblau in 0,81 (m/v) NaCl-Lösung) gemischt. Von dieser Suspension wurden dann 10 µl in die Zählkammer pipettiert und die Anzahl der vitalen Zellen pro Quadrat bestimmt. Trypanblau dringt nur in tote Zellen mit defekter Membran ein und erlaubt somit die Differenzierung zwischen toten und vitalen Zellen. Die Zellkonzentration wurde nach folgender Formel errechnet:

Ausgezählte Zellzahl x 10 x 10⁴ = Anzahl der Zellen/ml

2.4.3 Invasions-Assay

Zur Durchführung des Invasions-Assays wurden wie oben beschrieben HeLa-Zellen in einer 24-well-Platte über Nacht subkultiviert (1×10^5 Zellen/well). Am nächsten Tag wurde das antibiotikahaltige Medium abgesaugt und nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS durch frisches RPMI 1640-Medium mit 20 mM Hepes, 0,4 % BSA und 50 µg/ml Tetrazyklin ersetzt. Durch das Tetrazyklin sollte bei einer Infektion der Zellen mit Yersinien die Yop-Produktion durch die Bakterien verhindert werden. Anschließend wurden pro well 1×10^7 Yersinien auf die Zellen gegeben, was einer MOI von 100 entspricht (MOI = *multiplicity of infection*, Verhältnis der Anzahl der Bakterien zur Anzahl der eukaryotischen Zellen). Die Platte wurde bei 260 g und Raumtemperatur 10 Minuten lang zentrifugiert (um die Bakterien mit den Zellen in Kontakt zu bringen) und anschließend 90 Minuten lang bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit konnten die Yersinien in die HeLa-Zellen invadieren. Nach der Inkubation wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um durch Zugabe eines gentamicinhaltigen Mediums (100 µg/ml in RPMI 1640) alle extrazellulär verbliebenen Bakterien abzutöten. Die Platte wurde dann wiederum eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde jedes well dreimal mit PBS gewaschen, durch Zugabe von 50 µl Trypsin-EDTA pro well wurden die Zellen abgelöst. Dann wurden in jedes well zur Lyse der Zellen und Freisetzung aller intrazellulären Yersinien 950 µl einer 0,1 %-igen (v/v) Triton X-100/PBS - Lösung gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden Verdünnungsreihen der Suspensionen zur Bestimmung der (intrazellulären) Bakterienzahl auf CIN-Agarplatten ausgestrichen.

2.5 Mausinfektionsversuche

Für die Infektionsversuche wurden weibliche BALB/c-Mäuse und C57BL/6 p47^{phox-/-} - Mäuse im Alter von 6 - 8 Wochen verwendet (s. 1.12).

2.5.1 Mauspassage

Vor Durchführung der Infektionsversuche mit Yersinien wurden alle verwendeten Bakterienstämme „mauspassagiert“, um virulente Yersinien zu selektionieren. Dazu wurden 1×10^7 KBE des jeweiligen Stammes intraperitoneal in eine BALB/c-Maus gespritzt. Nach 24 Stunden wurden die Bakterien durch Spülung des Peritoneums mit 5 ml PBS rückisoliert und

auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen. Eine Kolonie wurde gepickt und über Nacht in antibiotikahaltigem LB-Medium angezüchtet. Dann wurden die Bakterien bei -80°C eingefroren (s. 2.1.2). Nach Bestimmung der Keimzahl in den weggefrorenen Aliquots konnten die Bakterien für Infektionsversuche verwendet werden.

2.5.2 Infektion der Mäuse

Zur Infektion der Mäuse wurden die jeweiligen Einfrierkulturen auf Eis aufgetaut und zweimal mit $1000\ \mu\text{l}$ sterilem PBS gewaschen. Die Bakterienkultur wurde dann durch Verdünnung mit PBS auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Zur Kontrolle der Infektionsdosis wurden nach einer Infektion der Mäuse Verdünnungsreihen der eingesetzten Bakterienkultur auf Mueller-Hinton II-Agarplatten ausplattiert.

Bei allen durchgeführten Versuchen wurden die Mäuse oral infiziert. Vor der Infektion wurden den Mäusen für 16 Stunden Wasser und Futter entzogen. Die Infektion erfolgte mit $15\ \mu\text{l}$ einer hochkonzentrierten Bakteriensuspension (je nach Versuch zwischen 10^6 und 10^9 KBE, Details s. Ergebnisteil), die mit Hilfe einer Pipette verabreicht wurde. Nach der Infektion wurden Wasser und Futter wieder bereitgestellt.

Die Versuchsdauer variierte je nach Versuch zwischen wenigen Minuten und fünf Tagen (Details s. Ergebnisteil).

2.5.3 Verwendete Bakterienstämme

Für die Mausinfektionsversuche wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

WA-314[pLacGFP] / WA-314[pLacRFP]

WA-C(pYV)::Kan[pLacGFP] / WA-C(pYV)::Kan[pLacRFP]

WA-C(pYV)::Kan

WA-C(pYV)-*inv*

2.5.4 Probengewinnung

Am Versuchsende wurden die Mäuse durch CO₂-Vergasung getötet. Die Bauchhöhle wurde unter sterilen Bedingungen eröffnet. Der Darm wurde distal des Pylorus und proximal des Caecums durchtrennt. Die dazwischenliegenden Darmabschnitte wurden entnommen und zur Gewinnung einer Darmlavage mit 5 ml eiskaltem PBS gespült. Die Darmlavage wurde anschließend auf Eis gelagert und zur Keimzahlbestimmung in verschiedenen Verdünnungen auf CIN-Agarplatten ausgestrichen (s. 2.1.4). Zur Gewinnung von Yersinien aus dem Darmlumen für Western Blot-Analysen wurden die Dünndärme mit 5 ml PBS + Proteaseinhibitor gespült. Anschließend wurde die gewonnene Darmlavage auf Eis zuerst mit einem 70 µm *cell strainer* (Becton Dickinson) und dann mit einem 5 µm Filter (Millex-SV 5,0 µm, Millipore, Eschborn) aufgereinigt. Die Suspension wurde bei 1700 x g und 4°C 10 Minuten lang zentrifugiert und das Bakterienpellet nach Resuspension in Einfriermedium weggefroren.

Die Peyer-Plaques des Dünndarms wurden mit einer Schere abgetrennt, in Probenbehälter mit Tissue-Tek® (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Einigen Mäusen wurden zusätzlich die Milzen und Lebern entnommen. Auch diese Organe wurden in Tissue-Tek® eingebettet und anschließend schockgefroren.

Zur Gewinnung von Blut wurden bei lebenden Mäusen die Schwanzvenen punktiert; bei toten Mäusen wurde Blut aus dem Herz entnommen.

2.5.5 Depletion neutrophiler Granulozyten

Zur Untersuchung des Infektionsverlaufs in neutropenen Mäusen wurden BALB/c-Mäuse einen Tag vor der geplanten Infektion mit dem Neutrophilen-depletierenden monoklonalen Antikörper RB6-8C5 behandelt (30). Dieser wurde den Mäusen intraperitoneal gespritzt (0,25 mg pro Maus). Zur Kontrolle der Neutropenie wurde den Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten im Infektionsverlauf Blut abgenommen (s. 2.5.4). Die Differentialblutbilder wurden im Labor der 1. Medizinischen Tierklinik der Universität München (Vorstand: Prof. Dr. K. Hartmann) angefertigt. Um die Depletion der neutrophilen Granulozyten in den Peyer-Plaques zu verifizieren, wurden die Kryoschnitte der Peyer-Plaques der neutropenen Mäuse und der Kontrollmäuse mit dem Ratte-anti-Maus-Antikörper RB6-8C5 immungefärbt (s. 2.6.2) und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.6 Histologische Methoden

2.6.1 Anfertigung von Kryoschnitten

Die Peyer-Plaques sowie die Milzen und Lebern infizierter Mäuse wurden wie oben beschrieben aus den Mäusen entnommen, in Tissue-Tek® zunächst schockgefroren und dann bei -20°C gelagert. Zur Anfertigung der Kryoschnitte wurden die Proben aus den Probenbehältern entnommen und mittels Tissue-Tek® auf dem Schneidetisch des Kryotoms (Leica) befestigt. Die Peyer-Plaques wurden komplett in 10 µm dicke Schnitte zerlegt. Alle 50 µm wurde ein Schnitt auf einen speziellen Kryobjektträger (SuperFrost®Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgebracht. Vorversuche hatten gezeigt, dass durch Analyse der Schnitte in 50 µm - Abständen eine zuverlässige Quantifizierung der Mikroabszesse in den Peyer-Plaques möglich war. Auch die Milzen und Lebern wurden in 10 µm dicke Schnitte zerlegt. Von diesen Organen wurde alle 100 µm ein Schnitt auf einen Kryobjektträger aufgebracht. Die Gewebe auf den Objektträgern wurden anschließend luftgetrocknet und nach Überschichtung mit Fluoprep (bioMérieux®, Marcy l'Etoile, Frankreich) eingedeckelt. Einige Kryoschnitte wurden vor der Eindeckelung mit 1 µg/ml DAPI (Sigma-Aldrich) gefärbt.

2.6.2 Immunhistochemie

Die 10 µm dicken Kryoschnitte der Peyer-Plaques wurden 10 Minuten lang bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend mit 150 µl eiskaltem Aceton (Sigma) 10 Minuten lang auf Eis fixiert. Nach drei Waschgängen mit einem Waschpuffer (0,05 % Tween (v/v) in TBS) wurden die Schnitte zum Blockieren freier Valenzen 20 Minuten lang bei 37°C mit dem Blockierungspuffer (5 % (m/v) humanes Serumalbumin in TBS) inkubiert. Dann wurden 150 µl der Primärantikörperverdünnung (monoklonaler anti-RB6-8C5-Antikörper, Verdünnung 1:100 in TBS mit 2 % (m/v) humanem Serumalbumin) auf die Schnitte gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden sechs Waschgänge mit dem Waschpuffer (s.o.) durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit 150 µl der Sekundärantikörperverdünnung (Ziege-anti-Ratte-IgG, Cy3 konjugiert, Verdünnung 1:200 in TBS/Tween 0,05 %) inkubiert, nach erneutem sechsmaligem Waschen mit 1 µg/ml DAPI (Sigma-Aldrich) gegengefärbt, mit Fluoprep (bioMérieux®, Marcy l'Etoile, Frankreich) überschichtet und eingedeckelt.

2.6.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Kryoschnitte der Peyer-Plaques (insgesamt mehr als 6500 Schnitte) wurden unter einem motorisierten Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX61 mit Analyse-Software *Olympus Soft Imaging System*) bei 100- bis 400-facher Vergrößerung untersucht. Dabei wurden die von den rot und grün fluoreszierenden Yersinien gebildeten Mikrokolonien/Mikroabszesse in jedem Peyer-Plaques ausgezählt und dokumentiert. Ein Mikroabszess bzw. eine Mikrokolonie war dabei definiert als eine Ansammlung fluoreszierender Yersinien im untersuchten Gewebe. Die Begriffe Mikroabszess und Mikrokolonie werden in dieser Arbeit gleichbedeutend verwendet, wobei der Begriff „Mikrokolonie“ am ehesten in der Frühphase der Infektion, der Begriff „Mikroabszess“ zu späteren Zeitpunkten im Infektionsverlauf (nach Einwanderung neutrophiler Granulozyten und mononukleärer Zellen in die infizierte Gewebsregion) zutreffend ist. Ein Cluster von Yersinien gleicher Farbe zusammen mit in der direkten Umgebung liegenden Satelliten-Clustern derselben Farbe wurde als monoklonale Mikrokolonie/monoklonaler Mikroabszess gewertet. Die Kryoschnitte der Milzen und Lebern wurden ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch untersucht, allerdings wurden die Mikroabszesse in diesen Organen nicht quantifiziert.

2.7 Statistische Auswertung

Sofern nicht anders angegeben sind jeweils Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung der quantitativen Daten zur Mikroabszess/Mikrokolonie-Bildung erfolgte mit einem zweiseitigen ungepaarten t-Test. Die Auswertung der Kolonisierungsdaten (KBE) erfolgte mit einem zweiseitigen Mann-Whitney-Test. P-Werte $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

C. Ergebnisse

1. Mausinfektionsversuche mit *Y. enterocolitica*

1.1 Konstruktion fluoreszierender Yersinien

Grün und rot fluoreszierende Yersinien vom Stamm WA-314 (*Y. enterocolitica*, Serotyp O:8 mit pLacGFP/pLacRFP) waren bereits zur Untersuchung der Klonalität von *Yersinia*-Abszessen im Mausmodell eingesetzt worden (4). In diesen Versuchen hatten sich Hinweise darauf ergeben, dass Yersinien in den Peyer-Plaques und inneren Organen infizierter Mäuse monoklonale Abszesse bilden. Zur weiterführenden Analyse des Invasionsprozesses, der Abszessbildung und Dissemination mussten zunächst neue fluoreszierende Yersinien konstruiert werden, da die zuvor verwendeten Bakterien im Laufe der zahlreichen Anzüchtungen ihre Virulenz eingebüßt hatten. Sie konnten nach einer oralen Infektion der Mäuse auch mit sehr hohen Infektionsdosen nicht mehr in den Peyer-Plaques nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache könnte der Verlust des Virulenzplasmides gewesen sein. Daher wurden die bereits vorhandenen GFP- und RFP- enthaltenden Plasmide pLacRFP und pLacGFP aus DH5 α *E. coli* isoliert und in einen anderen *Yersinia enterocolitica*-Stamm (WA-C(pYV)::Kan) transformiert. Bei diesem Stamm ist eine Kanamycin-Kassette in das Virulenzplasmid integriert, so dass die plasmidtragenden Erreger gegen das Antibiotikum Kanamycin resistent sind. Zur Anzucht kann kanamycinhaltiges Medium verwendet werden, wodurch gewährleistet wird, dass sich nur Bakterien vermehren, die tatsächlich das Virulenzplasmid enthalten. Die rekombinanten GFP- und RFP-exprimierenden Yersinien vom Stamm WA-C(pYV)::Kan zeigten in Infektionsversuchen eine mit Wildtyp-Yersinien vergleichbare Virulenz und Invasivität (Abb. 1).

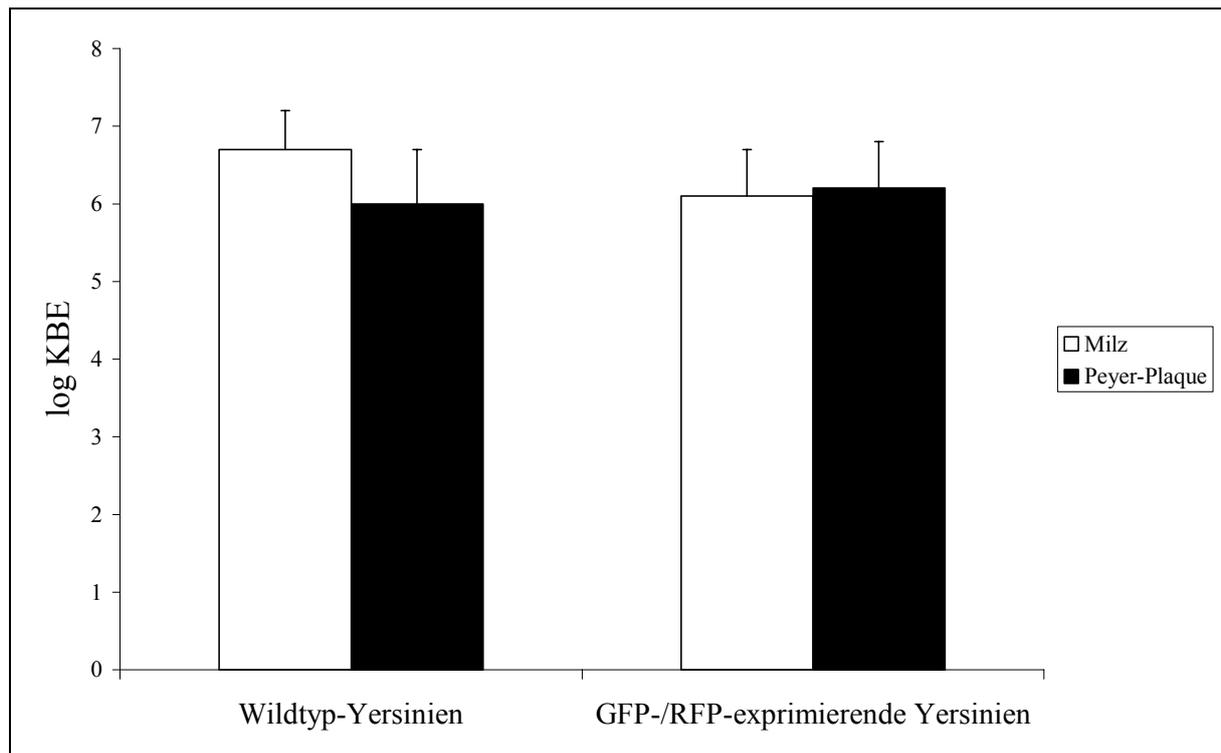


Abb. 1: Anzahl der Wildtyp-Yersinien und rekombinanten GFP- und RFP-exprimierenden Yersinien pro Milz bzw. Peyer-Plaue fünf Tage nach einer oralen Infektion mit 10^9 Bakterien. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (jeweils 5 Mäuse pro Gruppe).

Auch die Stabilität der Expression von GFP und RFP *in vivo* wurde überprüft. Dazu wurden 8 Mäuse mit einer Dosis von 10^9 fluoreszierenden Yersinien des oben genannten Stammes oral infiziert. Nach fünf Tagen wurden die Milzen und Peyer-Plaques entnommen, homogenisiert und auf Kulturplatten ausgestrichen. Dabei zeigte sich eine Fluoreszenz bei 99,9 % der ausgestrichenen Klone, so dass von einer ausreichenden Stabilität der Plasmide und damit der Expression von GFP und RFP *in vivo* ausgegangen werden konnte.

Diese Untersuchungen bestätigten, dass die rekombinanten fluoreszierenden Yersinien vom Stamm WAC(pYV)::Kan hinsichtlich ihrer Virulenz für einen Einsatz im Mausmodell geeignet waren und durch die stabile Expression von GFP und RFP zuverlässig in den Geweben des Wirtes visualisiert werden konnten. Daher wurden diese Bakterien bei allen nachfolgend beschriebenen Versuchen eingesetzt.

1.2 Abszessbildung in Peyer-Plaques, Milz und Leber

Um zu überprüfen, ob die neu konstruierten grün und rot fluoreszierenden Yersinien vom Stamm WAC(pYV)::Kan mono- oder polyklonale Mikroabszesse bildeten, wurden 10 Mäuse mit einem Gemisch 10^9 KBE rot und grün fluoreszierender Yersinien (im Verhältnis 1:1) infiziert. Vier Tage nach der Infektion wurden Gefrierschnitte der Peyer-Plaques, Milzen und Lebern angefertigt und unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Es zeigte sich, dass der *Yersinia enterocolitica*-Stamm WAC(pYV)::Kan zur Entstehung ausschließlich monoklonaler roter und grüner Mikroabszesse in den Peyer-Plaques sowie in den Milzen und Lebern führte. Auffällig war, dass sich in den einzelnen Peyer-Plaques jeweils nur einige wenige (1 - 4) Abszesse bildeten, während in den Milzen und Lebern der einzelnen Mäuse zahlreiche rote und grüne Mikroabszesse zu finden waren.

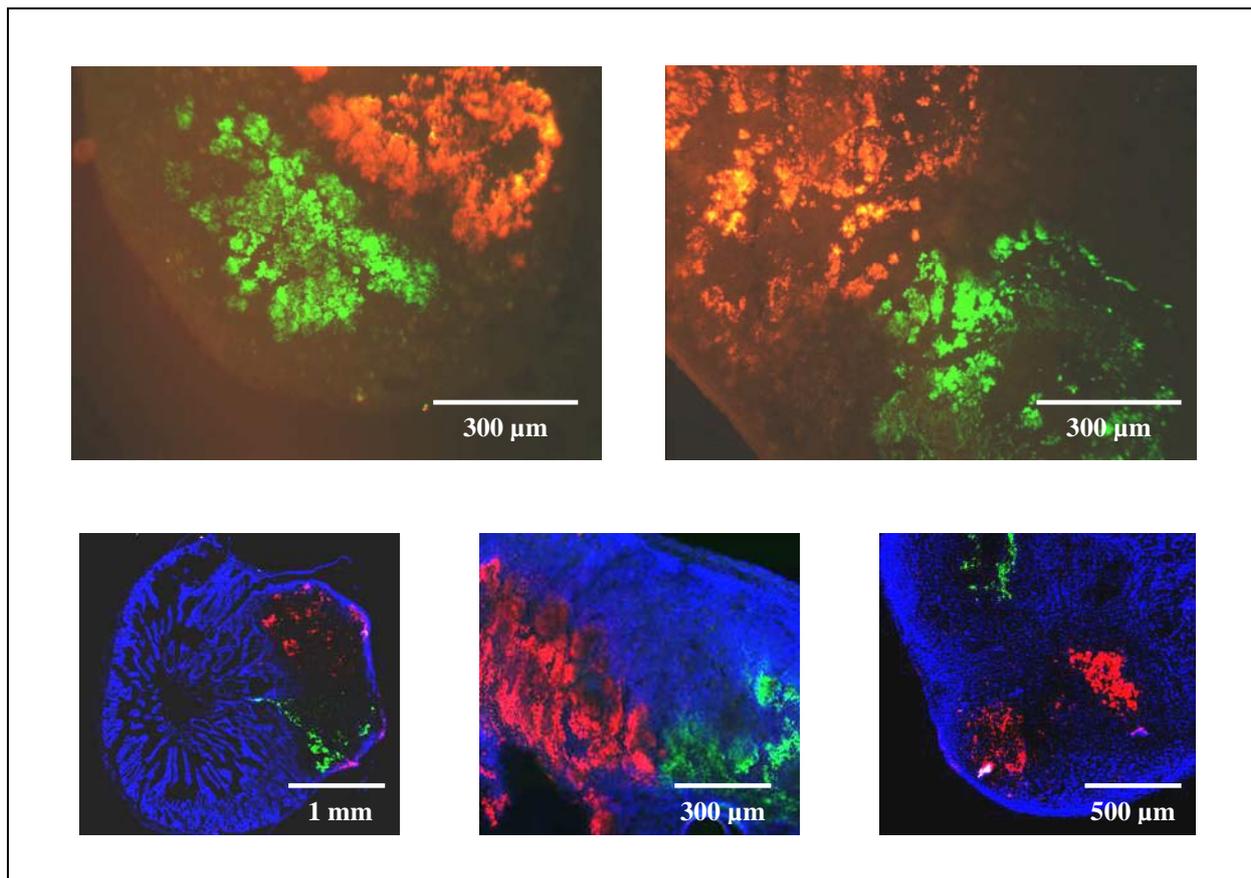


Abb. 2: Gefrierschnitte (10 μm) von Peyer-Plaques mehrerer BALB/c-Mäuse vier Tage nach einer oralen Infektion mit 10^9 KBE GFP- und RFP-markierter Yersinien vom Stamm WAC(pYV)::Kan. Es sind pro dargestelltem Peyer-Plaques zwei bis drei Mikrokolonien/-abszesse zu erkennen, die dicht beieinander liegen, sich jedoch nicht vermischen.

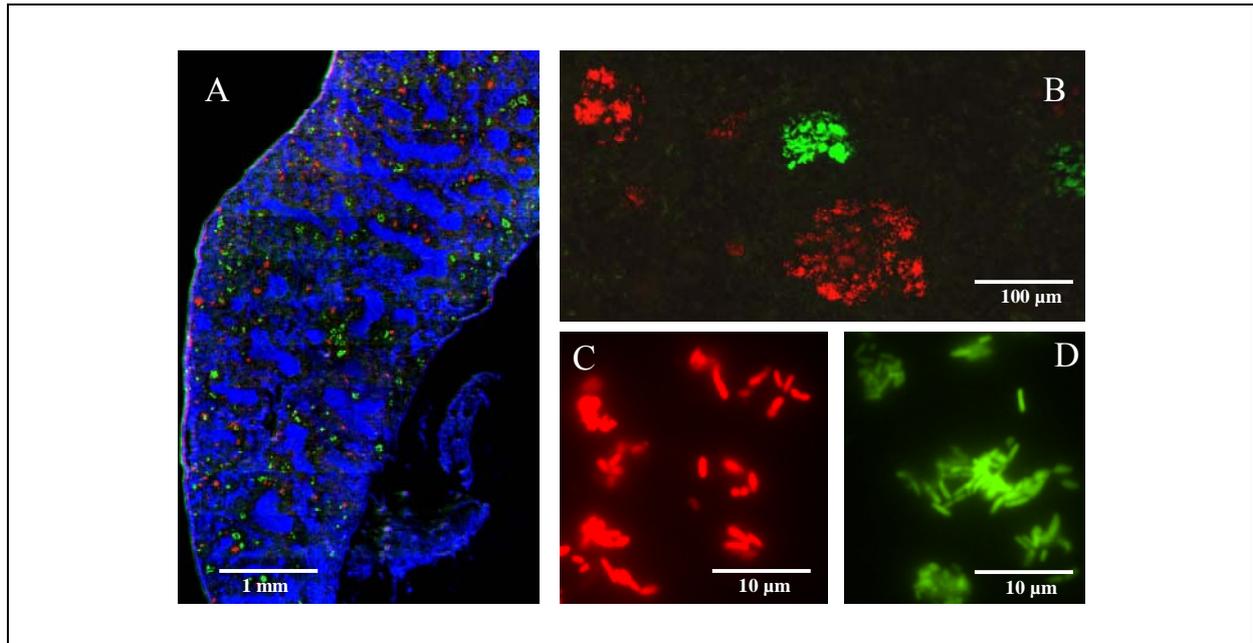


Abb. 3: A: Gefrierschnitt (10 µm) der Milz einer BALB/c-Maus vier Tage nach einer oralen Infektion mit 10^9 KBE GFP- und RFP-markierter Yersinien vom Stamm WAC(pYV)::Kan. B: Vergrößerte Darstellung monoklonaler Mikrokolonien/-abszesse. C und D: Einzelne rot und grün fluoreszierende Yersinien innerhalb eines Mikroabszesses.

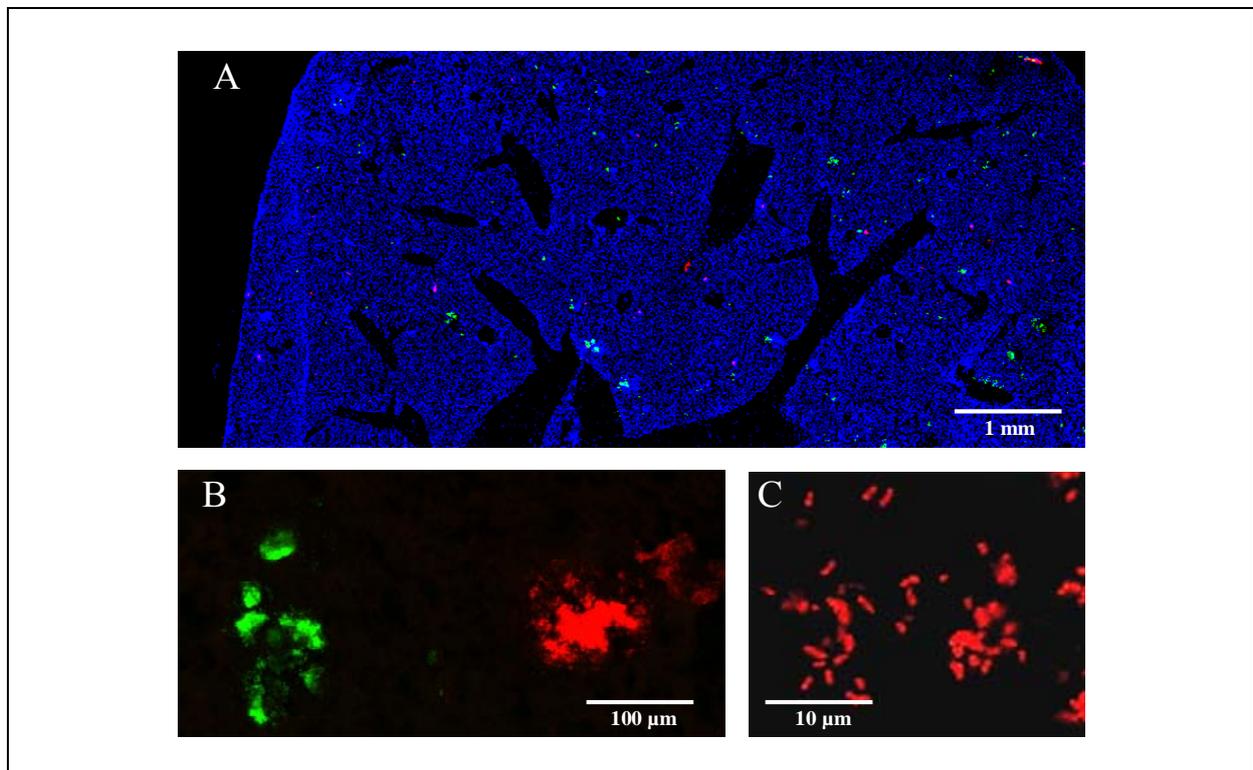


Abb. 4: A: Gefrierschnitt (10 µm) der Leber einer BALB/c-Maus vier Tage nach einer oralen Infektion mit 10^9 KBE GFP- und RFP-markierter Yersinien vom Stamm WAC(pYV)::Kan. B: Vergrößerte Darstellung monoklonaler Mikrokolonien/-abszesse. C: Einzelne rot fluoreszierende Yersinien innerhalb eines Mikroabszesses.

1.3 Klonale Invasion in Peyer-Plaques

Die Beobachtung, dass in den einzelnen Peyer-Plaques nach einer oralen Infektion nur ein bis vier monoklonale Abszesse entstanden, legte die Vermutung nahe, dass im Verlauf einer Infektion nur sehr wenige Yersinien vom Darmlumen in die Peyer-Plaques invadieren (klonale Invasion) und dort Mikroabszesse bilden. Um diese Vermutung näher zu untersuchen, wurden im folgenden Versuch je fünf Mäuse mit steigenden Infektionsdosen von 10^6 bis 10^9 KBE rot und grün fluoreszierender Yersinien (im Verhältnis 1:1) infiziert. Vier Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und alle makroskopisch sichtbaren Peyer-Plaques entnommen, um die entstandenen Mikroabszesse mittels Fluoreszenzmikroskopie zu quantifizieren. Dazu wurden die einzelnen Peyer-Plaques in 10 μm dicke Gefrierschnitte zerlegt und alle 50 μm ein Schnitt unter dem Mikroskop analysiert. Um zusätzlich die Keimzahlen in den Dünndärmen der Mäuse zu bestimmen, wurden Darmspülungen der einzelnen Mäuse auf Kulturplatten ausgestrichen.

Abb. 5 zeigt, dass eine Erhöhung der Infektionsdosis von 10^7 auf 10^8 KBE und von 10^8 auf 10^9 KBE zu einem signifikanten Anstieg der Keimzahlen in den Dünndärmen der infizierten Mäuse 4 Tage nach der Infektion führte ($p < 0,01$).

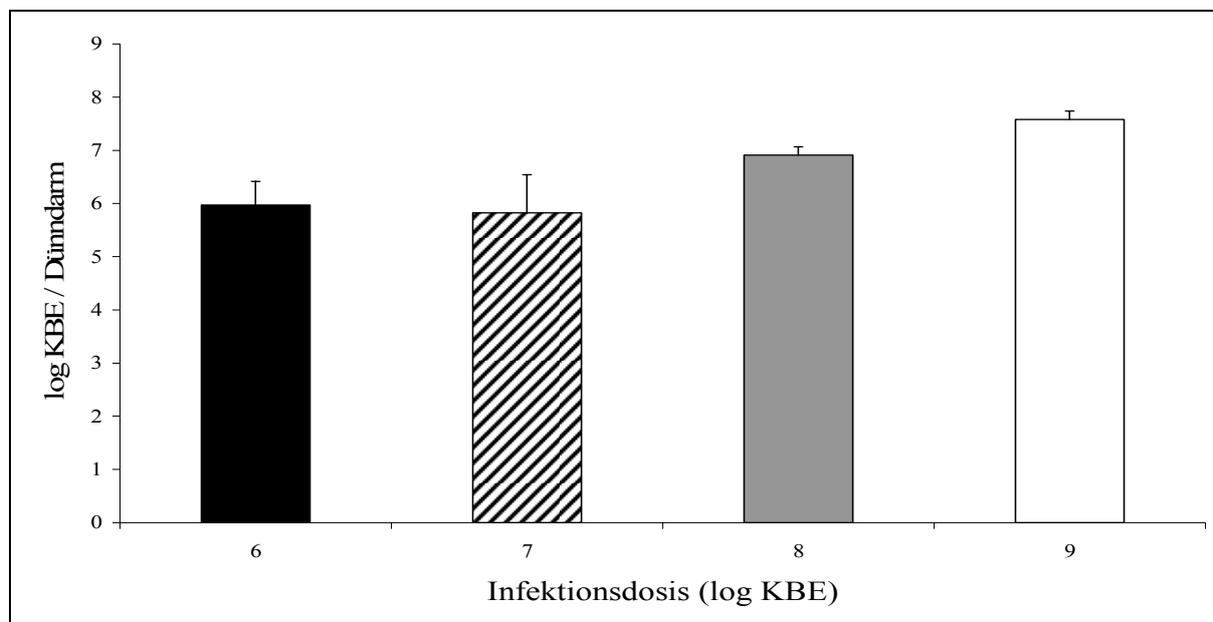
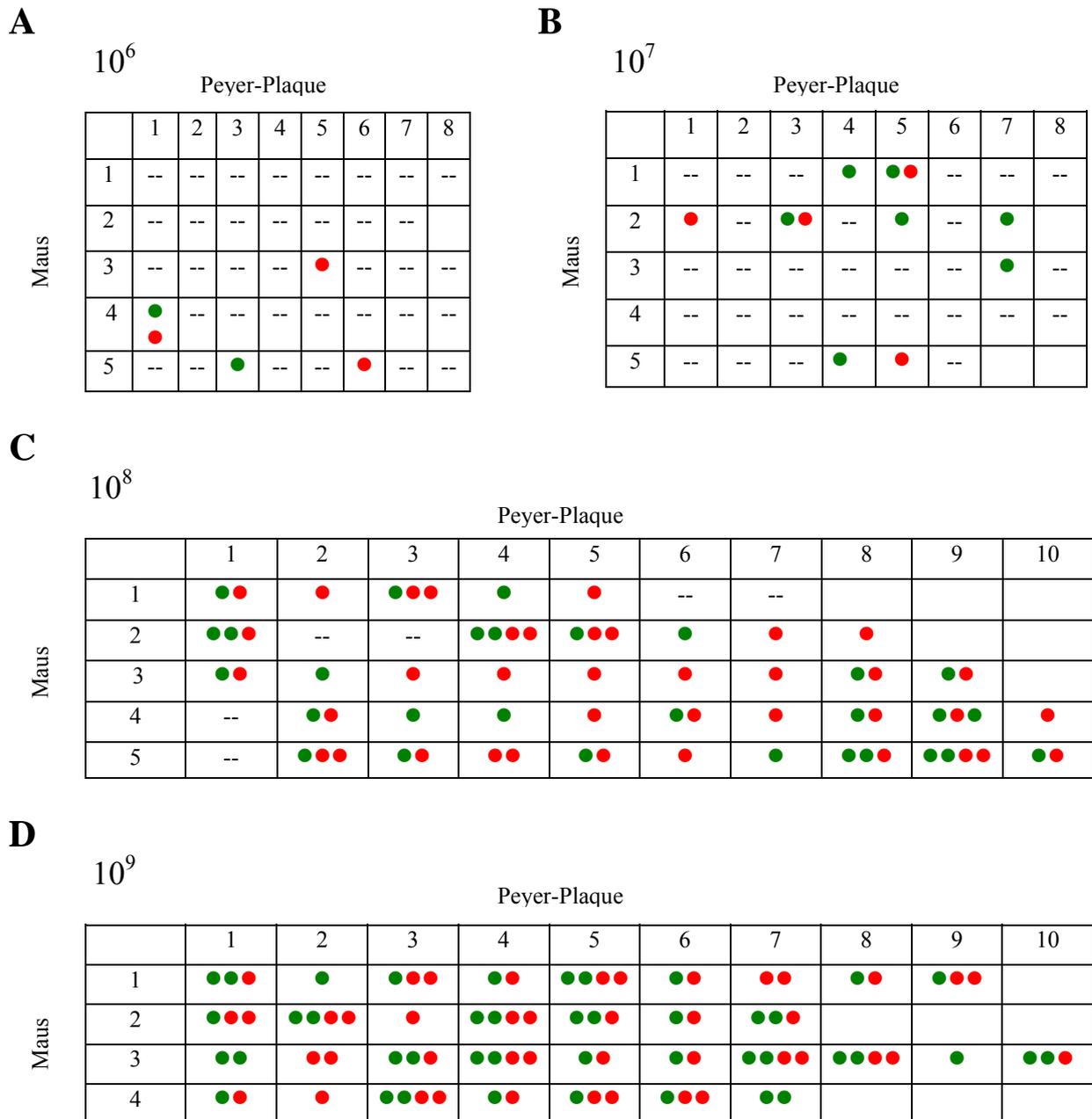


Abb. 5: Anzahl der aus den Dünndärmen rückisolierten Yersinien (vier Tage nach einer oralen Infektion mit Infektionsdosen zwischen 10^6 und 10^9 KBE). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (Infektionsdosis 10^6 - 10^8 : jeweils 5 Mäuse pro Gruppe, Infektionsdosis 10^9 : 4 Mäuse). Eine Erhöhung der Infektionsdosis von 10^7 auf 10^8 KBE und von 10^8 auf 10^9 KBE führte zu einem signifikanten Anstieg der Keimzahlen im Dünndarm ($p < 0,01$), eine Erhöhung von 10^6 auf 10^7 KBE hingegen nicht ($p = 0,75$).

Bei einer Infektionsdosis von 10^6 KBE (unterhalb der LD_{50}) waren die meisten Peyer-Plaques nicht kolonisiert (Tab. 1 A). Von 39 untersuchten Peyer-Plaques zeigten lediglich vier monoklonale Mikroabszesse. Mit zunehmender Infektionsdosis stieg die Anzahl der infizierten Peyer-Plaques an, wobei erst die hohe Dosis von 10^9 KBE (oberhalb der LD_{50}) zur Kolonisierung aller Peyer-Plaques führte (Tab. 1 B - D). Unabhängig von der Infektionsdosis waren alle entstehenden Mikroabszesse monoklonal.



Tab. 1 A-D: Anzahl monoklonaler roter (●) und grüner (●) Mikroabszesse in den Peyer-Plaques vier Tage nach einer oralen Infektion mit Infektionsdosen zwischen 10^6 und 10^9 KBE. Die Peyer-Plaques sind entsprechend ihrer räumlichen Lage zwischen der postpylorischen Duodenalregion (1) und dem Caecum (10) nummeriert. Bei Infektionsdosen zwischen 10^6 und 10^8 KBE konnten in einigen Peyer-Plaques keine Mikroabszesse nachgewiesen werden (--).

Wie aus obiger Tabelle abzuleiten ist, nahm der Anteil der infizierten Peyer-Plaques pro Maus bei einer Erhöhung der Infektionsdosis von 10^6 auf 10^8 von $10\% \pm 10,4\%$ auf $85\% \pm 11,9\%$ zu. Steigerte man die Dosis auf 10^9 KBE, waren die Peyer-Plaques zu 100% kolonisiert (Abb. 6). Dies lässt erkennen, dass sehr hohe Infektionsdosen notwendig sind, um eine reproduzierbare Infektion der Peyer-Plaques im Mausmodell zu etablieren.

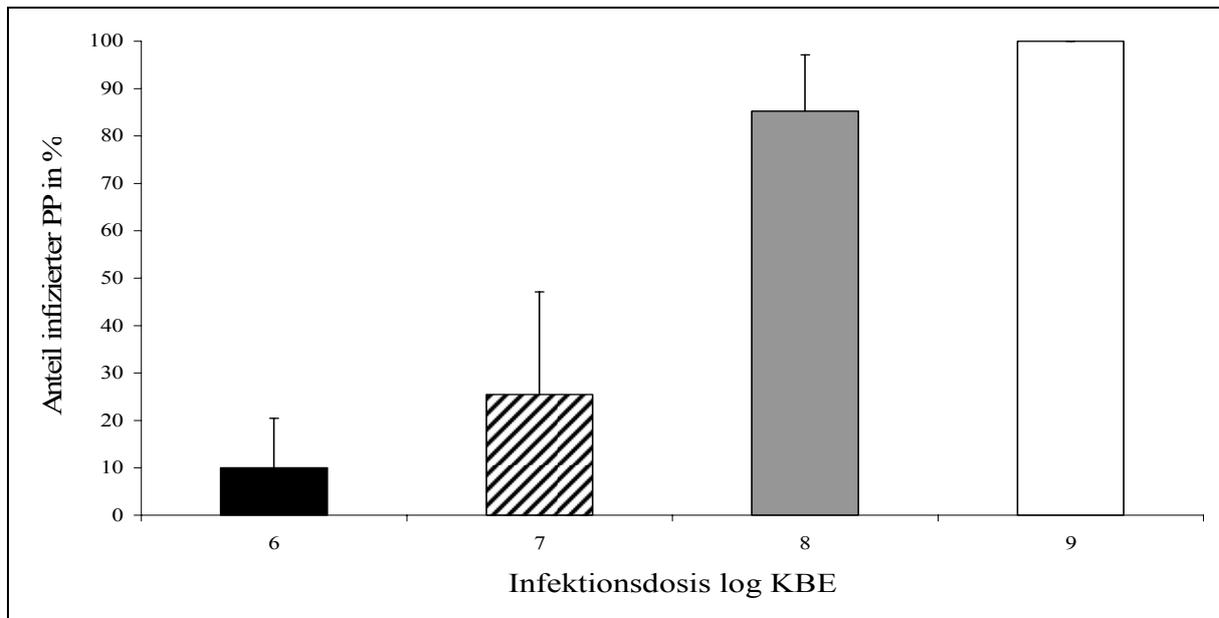


Abb. 6: Anteil infizierter Peyer-Plaques pro Maus. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (Infektionsdosis 10^6 - 10^8 : jeweils 5 Mäuse pro Gruppe, Infektionsdosis 10^9 : 4 Mäuse). Eine Erhöhung der Infektionsdosis von 10^7 auf 10^8 und von 10^8 auf 10^9 KBE führte jeweils zu einem signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils infizierter Peyer-Plaques ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$), eine Erhöhung der Infektionsdosis von 10^6 auf 10^7 KBE hingegen nicht ($p = 0,21$).

Die logarithmische Erhöhung der Infektionsdosis von 10^6 auf 10^9 KBE führte lediglich zu einem linearen Anstieg der Abszesszahl in den Peyer-Plaques der einzelnen Mäuse (Abb. 7). Die Anzahl der Mikroabszesse pro infiziertem Peyer-Plaques stieg dabei nur leicht an von $1,3 \pm 0,5$ Mikroabszessen nach einer Infektion mit 10^6 KBE auf $2,6 \pm 1$ Mikroabszesse nach einer Infektion mit 10^9 KBE (Abb. 8). Selbst bei der hohen Infektionsdosis von 10^9 KBE entstanden in den meisten Peyer-Plaques lediglich 1 - 4 Mikroabszesse (Tab. 1 D), was aufgrund der Monoklonalität der Abszesse einer Etablierung von 1 - 4 einzelnen Yersinien pro Peyer-Plaques entsprach. Ursächlich für diese Beobachtung könnte einerseits eine klonale Invasion der Yersinien sein (d.h. aufgrund limitierender Faktoren werden nur sehr wenige Yersinien vom Darmlumen in die Peyer-Plaques transloziert), andererseits wäre es möglich, dass zunächst viele Yersinien in die einzelnen Peyer-Plaques invadieren, ein Großteil dieser Erreger jedoch durch einströmende Immunzellen eliminiert wird. Die monoklonale

Abszessbildung in den Peyer-Plaques ginge dann von einigen wenigen überlebenden Yersinien aus. Allerdings wäre in diesem Fall bei einer logarithmischen Erhöhung der Infektionsdosis auch ein logarithmischer Anstieg der Abszesszahl zu erwarten.

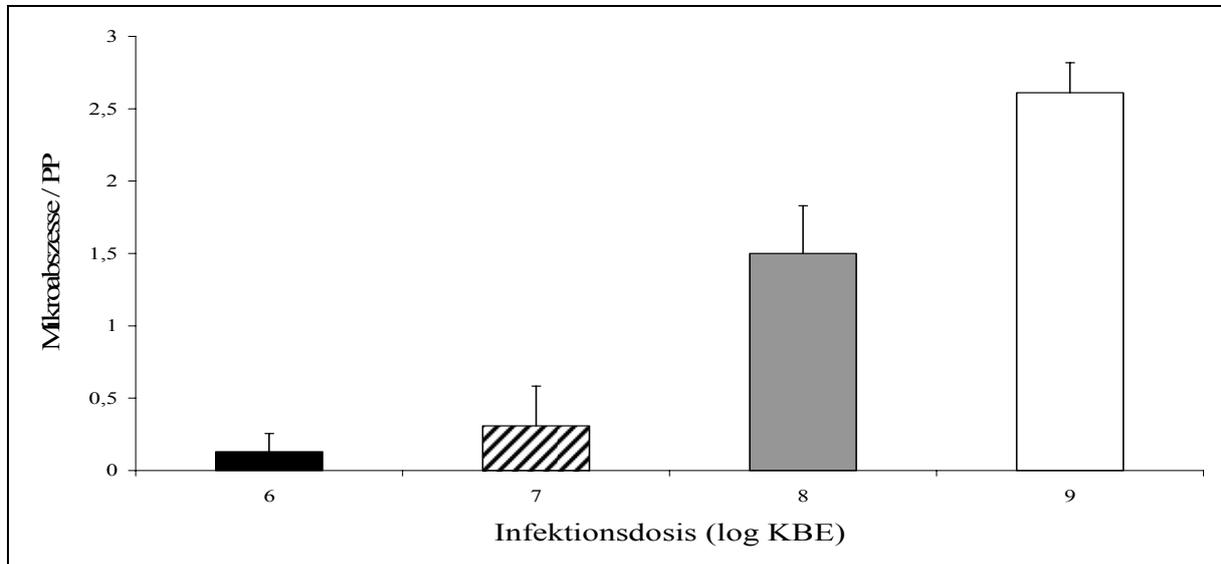


Abb. 7: Anzahl der Mikroabszesse pro Peyer-Plaques (Gesamt-Abszesszahl bezogen auf die Anzahl aller PPs einer Maus (infizierte und nicht infizierte PPs)). Eine logarithmische Steigerung der Infektionsdosis führte zu einem linearen Anstieg der Abszesszahl. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (Infektionsdosis 10^6 - 10^8 : jeweils 5 Mäuse pro Gruppe, Infektionsdosis 10^9 : 4 Mäuse). Eine Erhöhung der Infektionsdosis von 10^7 auf 10^8 und von 10^8 auf 10^9 KBE führte zu einem signifikanten Anstieg der Abszesszahl pro Peyer-Plaques ($p < 0,01$), eine Erhöhung der Infektionsdosis von 10^6 auf 10^7 KBE hingegen nicht ($p = 0,21$).

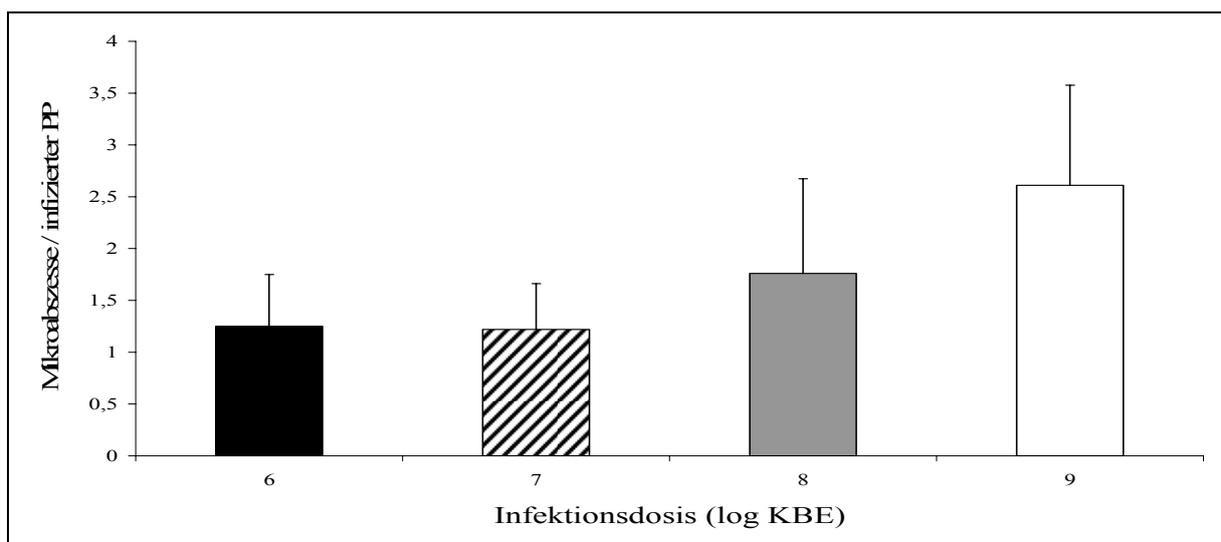


Abb. 8: Anzahl der Mikroabszesse pro infiziertem Peyer-Plaques (Gesamt-Abszesszahl bezogen auf die Anzahl infizierter PPs einer Maus). Die logarithmische Steigerung der Infektionsdosis führte zu einer nur geringfügig höheren Abszesszahl in den einzelnen infizierten Peyer-Plaques. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (Infektionsdosis 10^6 - 10^8 : jeweils 5 Mäuse pro Gruppe, Infektionsdosis 10^9 : 4 Mäuse).

1.4 Abszessbildung in neutropenen Mäusen

Die zuvor beschriebenen Versuche legen den Schluss nahe, dass im Rahmen einer Yersinieninfektion nur sehr wenige Yersinien vom Darmlumen in die Peyer-Plaques transloziert werden (klonale Invasion) und dort zur Abszessbildung führen. Möglich wäre aber auch, dass initial viele Yersinien in die Peyer-Plaques invadieren, jedoch nur wenige den Angriff einströmender Immunzellen überleben. In diesem Fall würden als Resultat ebenfalls lediglich einzelne monoklonale Mikroabszesse in den Peyer-Plaques entstehen. Es ist bekannt, dass neutrophile Granulozyten eine entscheidende Rolle bei der Elimination von Yersinien in der Frühphase einer Infektion spielen (30). Zur Untersuchung des Einflusses dieser Immunzellen auf die Abszessbildung wurden drei Mäuse einen Tag vor der geplanten Yersinieninfektion mit dem Granulozyten-depletierenden monoklonalen Antikörper RB6-8C5 behandelt. Die intraperitoneale Gabe dieses Antikörpers in einer Dosis von 0,25 mg führt bei Mäusen zu einer mindestens dreitägigen Neutropenie (30). Anschließend wurden die Mäuse mit 10^9 KBE rot und grün fluoreszierender Yersinien infiziert und die Anzahl der Mikroabszesse in den einzelnen Peyer-Plaques zwei Tage nach der Infektion bestimmt. Als Kontrolle wurden drei immunkompetente Mäuse mit derselben Dosis infiziert. Die Neutropenie der mit dem o.g. Antikörper behandelten Mäuse wurde durch Anfertigung eines Differentialblutbildes und durch immunhistochemische Färbungen der Peyer-Plaques verifiziert. Die neutropenen und immunkompetenten Mäuse zeigten vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Abszessbildung:

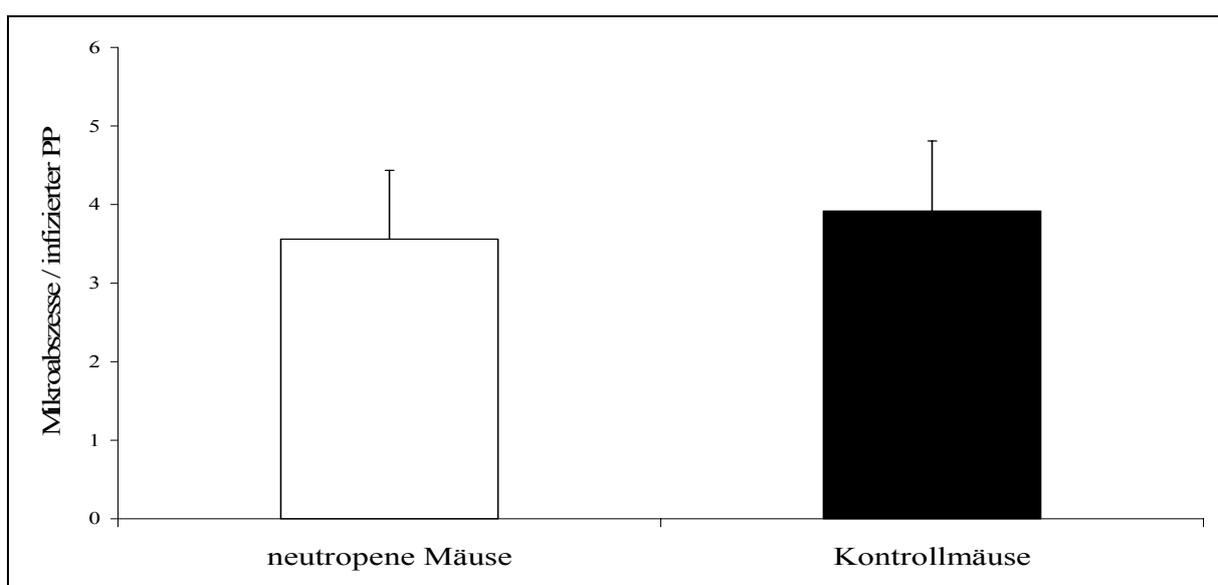


Abb. 9: Anzahl der Mikroabszesse pro infiziertem Peyer-Plaques zwei Tage nach einer Infektion mit einer Dosis von 10^9 KBE. Links ist das Ergebnis für die neutropenen Mäuse, rechts für die immunkompetenten Kontrollmäuse gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (jeweils 3 Mäuse pro Gruppe).

Aus den drei neutropenen Mäusen konnten 31 infizierte Peyer-Plaques isoliert werden. Dabei fanden sich im Durchschnitt $3,5 \pm 0,9$ Mikroabszesse pro Peyer-Plaques. In der immunkompetenten Kontrollgruppe waren insgesamt 26 Peyer-Plaques infiziert, wobei in jedem Peyer-Plaques durchschnittlich $3,9 \pm 0,9$ Mikroabszesse vorhanden waren.

Würden zunächst viele Yersinien in die Peyer-Plaques invadieren und anschließend durch einströmende neutrophile Granulozyten eliminiert werden, müssten die Abszesszahlen in den Peyer-Plaques neutropener Mäuse deutlich höher sein als die Abszesszahlen in den Peyer-Plaques immunkompetenter Mäuse. Dies war jedoch nicht der Fall. Somit unterstützte dieser Versuch die Hypothese, dass tatsächlich nur sehr wenige Yersinien vom Darmlumen in die Peyer-Plaques transloziert werden (klonale Invasion).

1.5 Abszessbildung in $p47^{\text{phox-/-}}$ - Mäusen

Um die obige Hypothese weiter zu stützen wurde ein Infektionsversuch mit drei $p47^{\text{phox-/-}}$ - Mäusen durchgeführt. Diese Mäuse haben eine Genmutation, die dazu führt, dass die neutrophilen Granulozyten der Mäuse keine Sauerstoffradikale produzieren und freisetzen können. Durch das Fehlen dieses für die Immunantwort wichtigen „oxidativen *bursts*“ ist die Erregerabwehr durch neutrophile Granulozyten in diesen Mäusen massiv beeinträchtigt (73).

Drei $p47^{\text{phox-/-}}$ - Mäuse wurden genauso wie die neutropenen Mäuse des oben beschriebenen Versuches mit einer Dosis von 10^9 KBE rot und grün fluoreszierender Yersinien infiziert. Vier Tage nach der Infektion wurden die Peyer-Plaques isoliert und die Abszesse mikroskopisch quantifiziert.

		Peyer-Plaques								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Maus	1	●	●	●	--	●●				
	2	●●●	●	●●●●●	●●●●●	●●	●●●	●●●●		
	3	●●●	●●●	●●	●●	●	●	--	--	--

Tab. 2: Anzahl monoklonaler (●) Mikroabszesse in den Peyer-Plaques der $p47^{\text{phox-/-}}$ - Mäuse vier Tage nach einer oralen Infektion mit 10^9 KBE fluoreszierender Yersinien.

Insgesamt konnten aus den drei Mäusen 21 Peyer-Plaques isoliert werden. 17 davon waren infiziert, wobei die durchschnittliche Anzahl der Mikroabszesse pro infiziertem Peyer-Plaque $2,1 \pm 0,9$ betrug. Dies ist ein Wert in der gleichen Größenordnung wie bei Wildtyp-Mäusen, so dass man davon ausgehen kann, dass der „oxidative burst“ neutrophiler Granulozyten keinen Einfluss auf das Phänomen der klonalen Abszessbildung hat.

1.6 Darmbesiedlung durch *Y. enterocolitica*

Zur Charakterisierung der Kinetik der Darmbesiedlung im Infektionsverlauf wurden zwei Mäusegruppen mit unterschiedlichen Infektionsdosen (10^7 und 10^9 KBE) infiziert. Die Anzahl der KBE im Dünndarm wurde zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen fünf Minuten und fünf Tagen nach der Infektion bestimmt (Abb. 10). Pro Zeitpunkt wurden in jeder Gruppe fünf Mäuse untersucht.

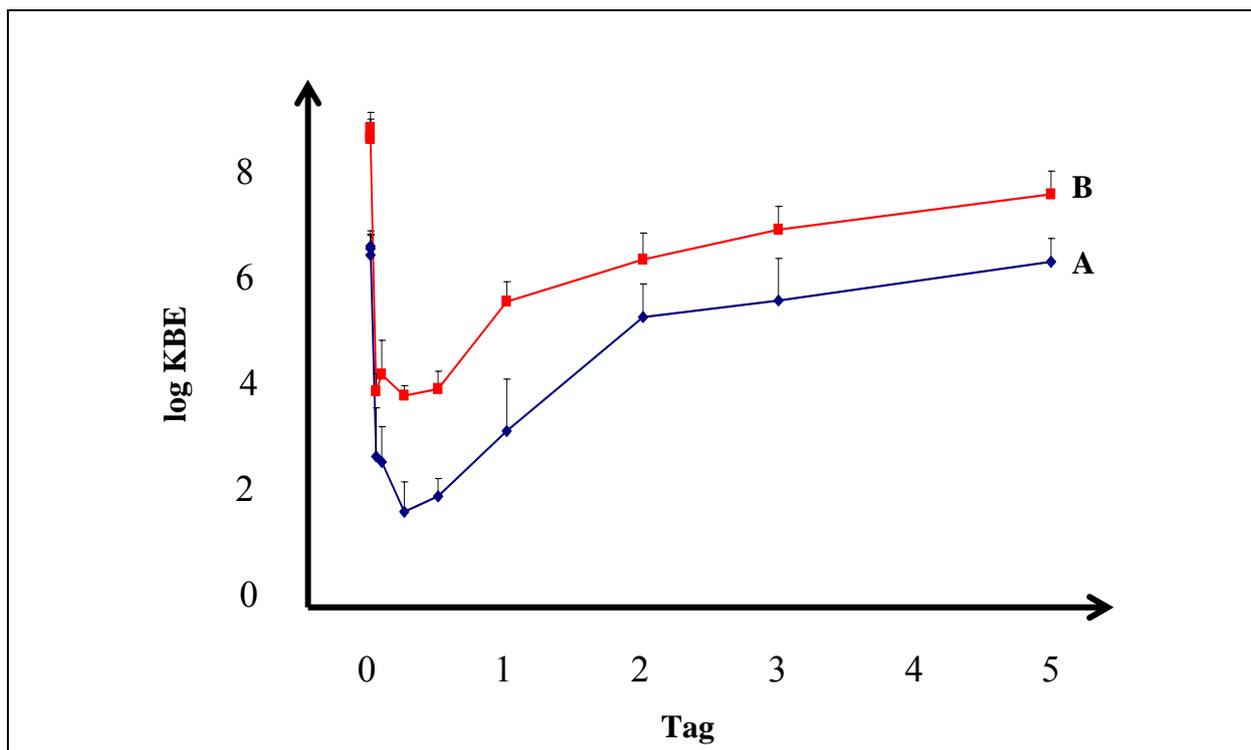


Abb. 10: Keimzahlen im Dünndarm (log KBE) im Verlauf von 5 Tagen nach einer oralen Infektion mit zwei unterschiedlichen Infektionsdosen (10^7 (A) und 10^9 (B) KBE). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (jeweils 5 Mäuse pro Gruppe und Zeitpunkt). Die Anzahl der Yersinien im Dünndarm war nach einer Infektion mit 10^9 KBE zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant höher als nach einer Infektion mit 10^7 KBE ($p \leq 0,01$).

Schon wenige Minuten nach der Infektion erreichte ein Großteil der aufgenommenen Bakterien den Dünndarm. In den folgenden sechs Stunden fiel die Keimzahl dann rasch ab. Die meisten Yersinien passierten offenbar in dieser Zeit den Dünndarm und wurden ausgeschieden. Nur einem kleinen Teil gelang es, sich im Darm zu etablieren. Von diesen Bakterien ging im weiteren Verlauf die Kolonisierung des Darmes aus. Sie replizierten sich und die Keimzahlen stiegen bis zum dritten Tag schnell an. Danach wurde der Zuwachs geringer. Keimzahlen in Größenordnungen wie sie kurz nach der Infektion im Darmlumen vorzufinden waren, wurden bis zum 5. Tag p.i. nicht mehr erreicht. Eine Erhöhung der Infektionsdosis um 2 Logstufen führte in der Frühphase der Infektion (bis 24 Stunden p.i.) zu einer um 2 Logstufen höheren Keimzahl im Dünndarm. Im Verlauf der Infektion (zwischen Tag 2 und 5 p.i.) sank der Unterschied der Keimzahlen im Dünndarm zwischen den beiden Mäusegruppen auf eine Logstufe ab.

1.7 Invasionskinetik von *Y. enterocolitica*

Die Ergebnisse der vorhergehenden Versuche zeigten, dass hohe Infektionsdosen und damit hohe Keimzahlen im Dünndarm für eine effektive Besiedlung der Peyer-Plaques durch Yersinien notwendig sind (Tab. 1). Diese hohen Keimzahlen liegen im Dünndarm zu verschiedenen Zeitpunkten vor: zum einen unmittelbar nach der oralen Aufnahme der Erreger und zum anderen einige Tage später, nachdem sich die im Darm adhärenen Bakterien repliziert haben (Abb. 10). Da insgesamt nur sehr wenige Yersinien in die Peyer-Plaques gelangen, stellte sich die Frage, ob Yersinien kontinuierlich im Infektionsverlauf, also auch zu späteren Zeitpunkten (wenn erneut hohe Keimzahlen im Dünndarm erreicht werden) in die Peyer-Plaques invadieren können oder ob der Invasionsprozess auf ein bestimmtes Zeitfenster beschränkt ist.

Um diese Fragestellung zu untersuchen wurden zehn Mäuse mit einer Dosis von 10^9 KBE rot und grün fluoreszierender Yersinien infiziert. Fünf dieser Mäuse wurden am zweiten Tag nach der Infektion, die restlichen fünf am fünften Tag getötet. Die Peyer-Plaques wurden entnommen und die Mikroabszesse fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert.

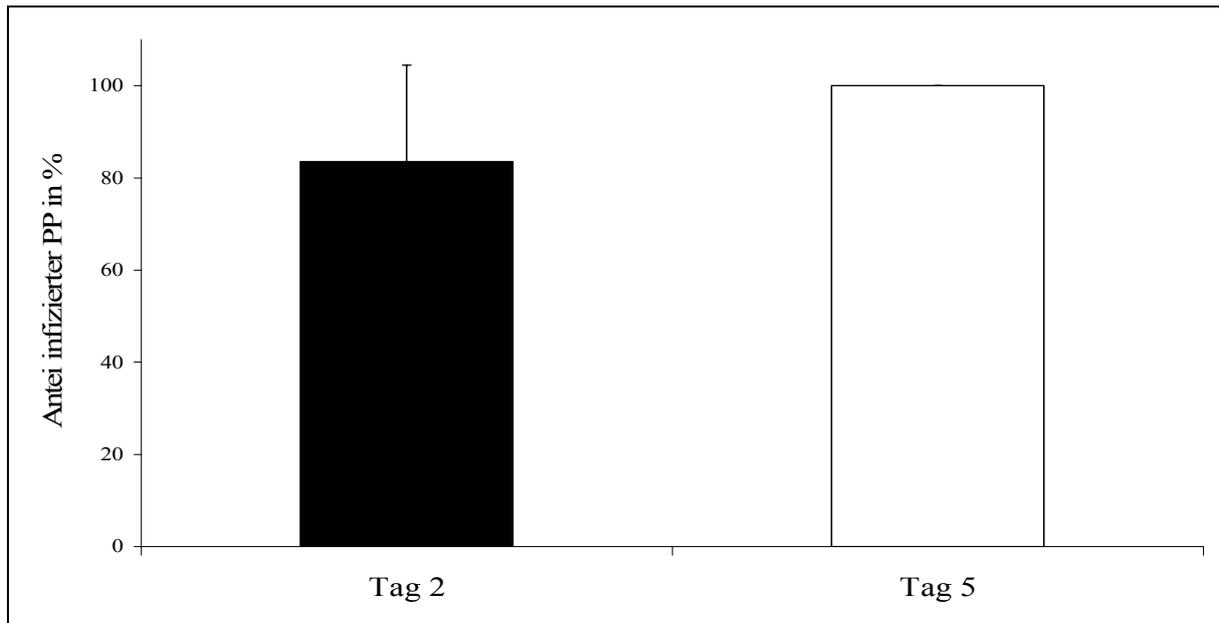


Abb. 11: Anteil infizierter Peyer-Plaques zwei und fünf Tage nach einer Infektion mit 10^9 KBE. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (jeweils 5 Mäuse pro Gruppe). Es besteht kein signifikanter Unterschied ($p=0,12$).

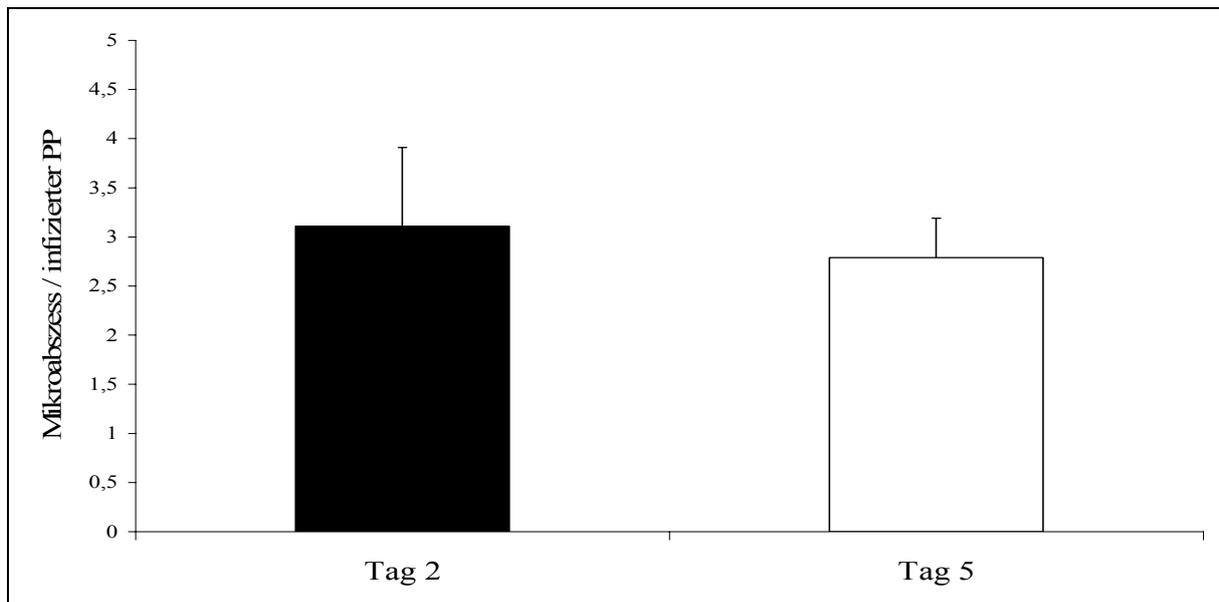


Abb. 12: Anzahl der Mikroabszesse pro infiziertem Peyer-Plaques nach einer Infektion mit 10^9 KBE. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (jeweils 5 Mäuse pro Gruppe). Es besteht kein signifikanter Unterschied ($p=0,38$).

Es zeigte sich, dass bereits am zweiten Tag 84 % \pm 21 % aller entnommenen Peyer-Plaques besiedelt waren (Abb. 11), wobei die Abszesszahl pro infiziertem Peyer-Plaques bei 3,1 \pm 0,8 lag (Abb. 12). Am fünften Tag waren alle isolierten Peyer-Plaques infiziert, die durchschnittliche Anzahl der Mikroabszesse blieb mit 2,8 \pm 0,4 pro Peyer-Plaques konstant.

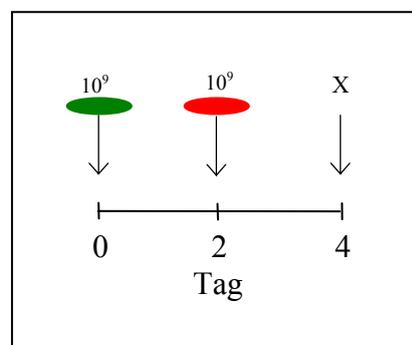
Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass sich der Invasionsprozess hauptsächlich zu Beginn der Infektion (innerhalb von zwei Tagen) abspielt. Im weiteren Verlauf ist eine Invasion der Yersinien trotz eines erneuten Anstiegs der Keimzahlen im Dünndarm offenbar nur noch eingeschränkt möglich.

1.8 Einfluss der Wirtsantwort auf Invasion und Abszessbildung

Die Limitierung der Translokation der Yersinien vom Darmlumen in die Peyer-Plaques im Verlauf der Infektion könnte einerseits bedingt sein durch bakterienspezifische Faktoren und Veränderungen der Erreger unter den im Dünndarm herrschenden Wachstumsbedingungen oder durch Reaktionen des Wirtes auf die Infektion. Um letzteres näher zu untersuchen, wurde eine sequentielle Infektion durchgeführt. Hierbei sollte überprüft werden, ob bereits mit Yersinien infizierte Peyer-Plaques zu späteren Zeitpunkten durch frisch inokulierte Yersinien besiedelt werden können oder ob die Vorinfektion zu einer Inhibition einer weiteren Erregerinvasion und Abszessbildung führt.

Am ersten Versuchstag wurden zehn Mäuse mit einer Dosis von 10^9 KBE grün fluoreszierender Yersinien infiziert, zwei Tage später bekamen dieselben Mäuse eine zweite Dosis von 10^9 KBE rot fluoreszierender Yersinien verabreicht. Vier Tage nach der Infektion wurden die Peyer-Plaques entnommen und die Mikroabszesse gezählt. Auch die Anzahl der KBE im Dünndarm wurde bestimmt. Als Kontrolle wurden drei Mäuse nur mit roten Yersinien am zweiten Tag infiziert.

Versuchsaufbau:



x: Versuchsende

Ergebnis:

Peyer-Plaque

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Maus	1	●	●●	●	●●	●	●●	●			
	2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	4	●	●●	●●	●●●	●	●●	●	●●	●	
	5	●●	●	●●	●●	●	●●	●●	●●	●●	
	6	●	●●	●●	●	●●	●●	●●	●	●	
	7	●●	●	●●	●●	●	●	●	●	●	●
	8	●●	●	●●	●	●	●	●			
	9	●●●	●	●●	●	●	●				
	10	●	●	●	●●	●	●	●			

Tab. 3: Anzahl monoklonaler roter (●) und grüner (●) Mikroabszesse in den Peyer-Plaques vier Tage nach einer sequentiellen oralen Infektion mit einer Dosis von jeweils 10^9 KBE rot und grün fluoreszierender Yersinien. Am ersten Tag wurde mit grünen Yersinien, zwei Tage später mit roten Yersinien infiziert.

Kontrollgruppe:

Peyer-Plaque

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Maus	1	●●	●	●	●●●	●●	●●●	●	●		
	2	●●	●●	●●	●●●	●	●●	●	●●		
	3	●●●	●●	●●●	●	●●●	●●●	●●	●	●●●	

Tab. 4: Anzahl monoklonaler roter (●) Mikroabszesse in den Peyer-Plaques der Kontrollmäuse zwei Tage nach einer oralen Infektion mit 10^9 KBE rot fluoreszierender Yersinien.

Die Quantifizierung der Mikroabszesse in den Peyer-Plaques zeigte, dass die grünen Yersinien der ersten Infektion in 79 der 86 aus 10 Mäusen isolierten Peyer-Plaques zur Entstehung monoklonaler Abszesse führten. Die darauffolgende Infektion mit roten Yersinien zwei Tage später bewirkte eine Abszessbildung in nur 11 der 86 Peyer-Plaques (Tab. 3). In der Kontrollgruppe waren die roten Yersinien in der Lage, alle Peyer-Plaques zu besiedeln (Tab. 4), so dass eine Attenuierung dieses Stammes als Ursache für die eingeschränkte Invasion nach einer sequentiellen Infektion ausgeschlossen werden konnte. Bei näherer Betrachtung der Tab. 3 erkennt man, dass die wenigen invadierten roten Yersinien hauptsächlich Peyer-Plaques besiedelten, die zuvor nicht bereits von grünen Yersinien infiziert worden waren. 100 % (7/7) der initial nicht infizierten Peyer-Plaques wurden von den roten Bakterien der zweiten Infektion befallen und in nur 5,1 % (4/79) der bereits im Rahmen

der ersten Infektion mit grünen Yersinien infizierten Peyer-Plaques konnten sich auch die roten Yersinien etablieren und Mikroabszesse bilden ($P < 0,01$).

Die Analyse der Dünndarmbesiedlung vier Tage nach der ersten Infektion zeigte, dass die am ersten Tag zugeführten grünen Yersinien höhere Keimzahlen erreichten als die zwei Tage später zugeführten roten Yersinien (Abb. 13). Dies könnte mit der längeren Wachstumszeit der grünen Yersinien im Darm zusammenhängen, was jedoch unwahrscheinlich ist, da die roten Yersinien in der Kontrollgruppe nach zwei Tagen ähnlich hohe Keimzahlen im Dünndarm erreichten wie die grünen Yersinien der sequentiellen Infektion nach vier Tagen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre eine Belegung von Kolonisierungsnischen durch die Yersinien der ersten Infektion, die zu einer langsameren Proliferation der Bakterien der zweiten Infektion geführt haben könnte.

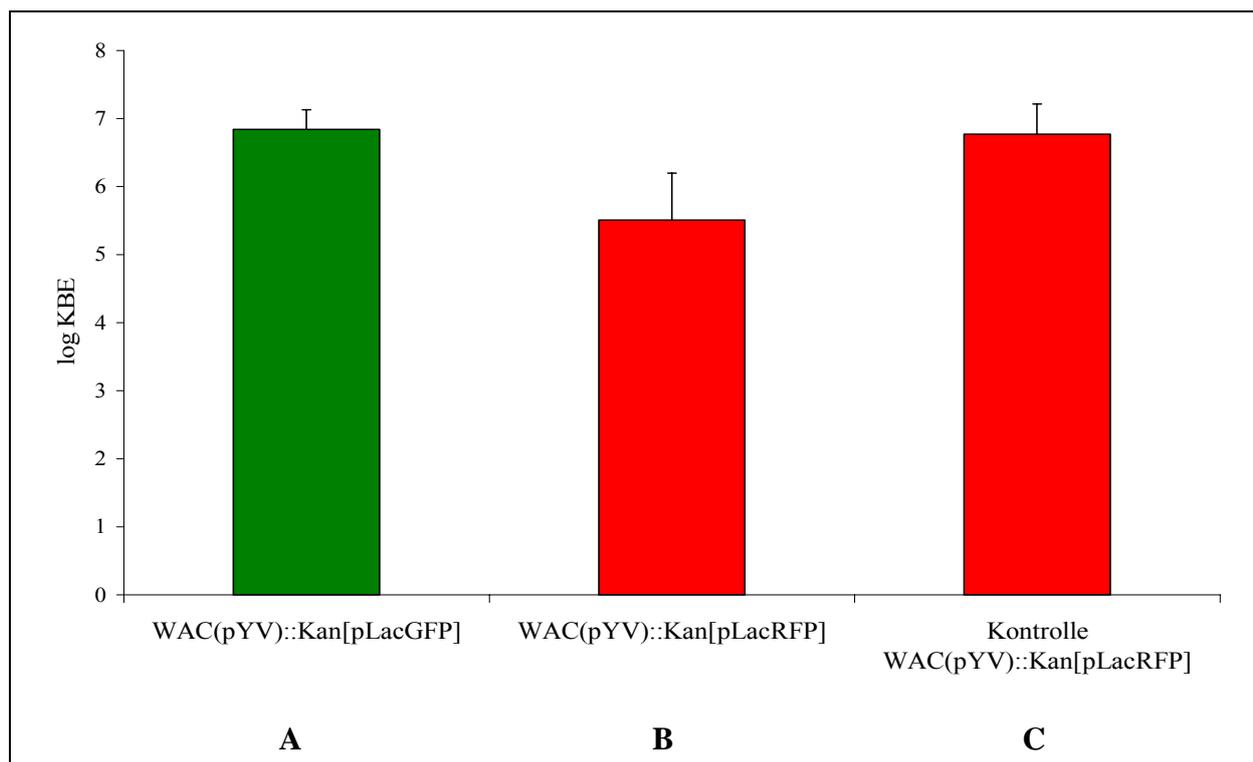
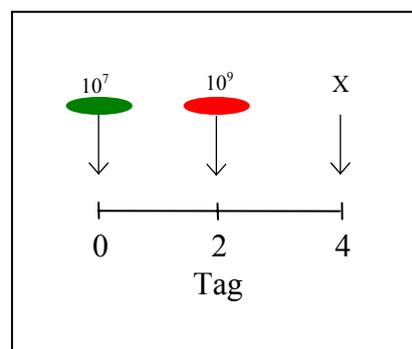


Abb. 13: Keimzahlen der rot und grün fluoreszierenden Yersinien im Dünndarm vier Tage nach einer sequentiellen Infektion (A und B) und zwei Tage nach einer Infektion mit ausschließlich rot fluoreszierenden Yersinien (C). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Um auszuschließen, dass die oben beschriebenen Beobachtungen durch eine verminderte Virulenz der RFP-markierten Yersinien oder durch eine eingeschränkte Darmkolonisierung bedingt waren, wurde die sequentielle Infektion wiederholt, diesmal allerdings mit einem niedrigeren initialen Inokulum von 10^7 KBE grün fluoreszierender Yersinien (viele Peyer-Plaques werden nicht befallen), gefolgt von einer Infektion mit 10^9 KBE rot fluoreszierender Yersinien zwei Tage später.

Versuchsaufbau:



x: Versuchsende

Ergebnis:

Peyer-Plaque

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	●	--	●●●	●	●	●	●●			
2	●	●	●●	●●	●	●	●	●●		
3	●●	●	●	--	●●	●	●	●		
4	●	--	●	●	●	●	--	--	--	
5	●	●	●	●	--	--	●			
6	●	●●	●	●	●	●	●	●●	●●	●●
7	●●	●	●	●	●	●●●	●	●●	●	
8	●	●●	●	●	--	--	●	●	--	●
9	●●	●●	●●	●●	●●	●	●●●	●●	●●	
10	●	●●●	●	●	●	●	--	●	●●	

Tab. 5: Anzahl monoklonaler roter (●) und grüner (●) Mikroabszesse in den Peyer-Plaques vier Tage nach einer sequentiellen oralen Infektion mit unterschiedlichen Infektionsdosen. Am ersten Tag wurde mit 10^7 KBE grün fluoreszierender Yersinien infiziert, zwei Tage später mit 10^9 KBE rot fluoreszierender Yersinien. In einigen Peyer-Plaques konnten keine Mikroabszesse nachgewiesen werden (--).

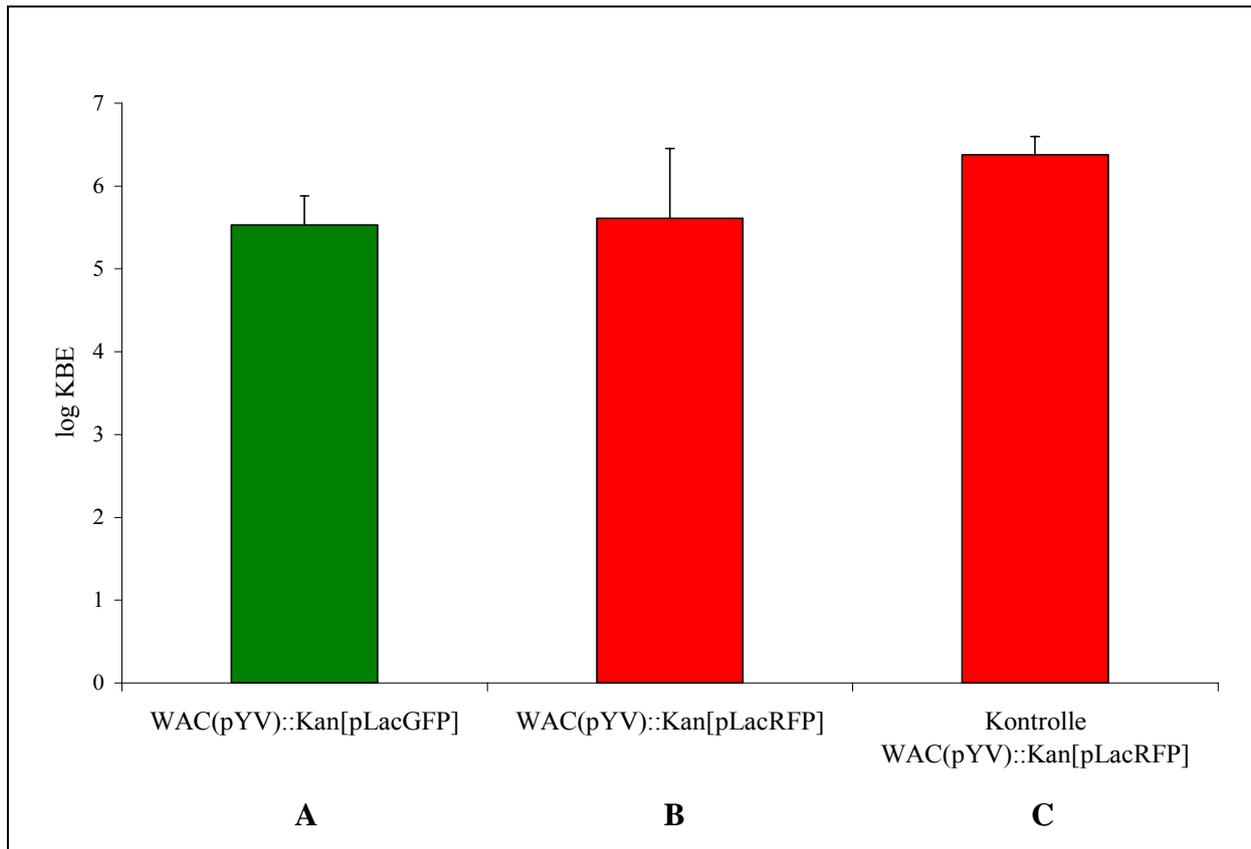


Abb. 14: Keimzahlen der rot und grün fluoreszierenden Yersinien im Dünndarm vier Tage nach einer sequentiellen Infektion (A und B) und zwei Tage nach einer Infektion mit ausschließlich rot fluoreszierenden Yersinien (C). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

In diesem Experiment zeigten sich in 23 der 86 aus 10 Mäusen isolierten Peyer-Plaques grüne Mikroabszesse. Die Infektion mit rot fluoreszierenden Yersinien zwei Tage später führte in 53 der 86 Peyer-Plaques zur Bildung monoklonaler roter Mikroabszesse (Tab. 5). 81 % (51/63) der Peyer-Plaques, die nicht von grünen Yersinien besiedelt worden waren, wiesen rote Mikroabszesse auf, jedoch nur 8,7 % (2/23) der mit grünen Yersinien vorinfizierten Peyer-Plaques wurden zusätzlich von rot fluoreszierenden Yersinien besiedelt ($P < 0,01$).

Somit deuteten auch diese Ergebnisse stark darauf hin, dass die kontinuierliche Invasion weiterer Yersinien in bereits infizierte Peyer-Plaques und die Abszessbildung in diesen Peyer-Plaques durch eine lokale Reaktion des Wirtes auf die Yersinieninfektion inhibiert werden.

2. Untersuchungen zur *in vivo* - Expression von Invasin

2.1 Invasin-Expression im Dünndarm

Aus den sequentiellen Infektionsversuchen ging hervor, dass durch Reaktionen des Wirtes auf eine Yersinieninfektion die kontinuierliche Invasion der Erreger in bereits infizierte Peyer-Plaques und die Abszessbildung in diesen Peyer-Plaques inhibiert wird.

Möglicherweise tragen zusätzlich Veränderungen der aufgenommenen Yersinien während ihrer Replikation im Dünndarm zum Phänomen der klonalen Invasion in die Peyer-Plaques bei. Es war naheliegend, sich bei der genaueren Untersuchung dieses Aspektes auf das Protein Invasin zu konzentrieren, da es als der wichtigste Invasionsfaktor in der Frühphase der Infektion gilt (100). Untersuchungen in der Vergangenheit hatten gezeigt, dass Invasin 48 Stunden nach einer Infektion in Peyer-Plaques nachgewiesen werden kann (98); ob und wie lange Yersinien das Protein im Darmlumen exprimieren ist bislang nicht untersucht worden.

Zur Analyse der Invasin-Expression durch *Y. enterocolitica* im Darmlumen wurden zehn Mäuse mit einer Dosis von 10^9 KBE infiziert. Jeweils fünf dieser Mäuse wurden am zweiten beziehungsweise fünften Tag nach der Infektion getötet. Die Bakterien wurden aus den Dünndärmen der Mäuse rückisoliert (s. Material und Methoden) und mittels Western Blot hinsichtlich ihrer Invasin-Expression untersucht.

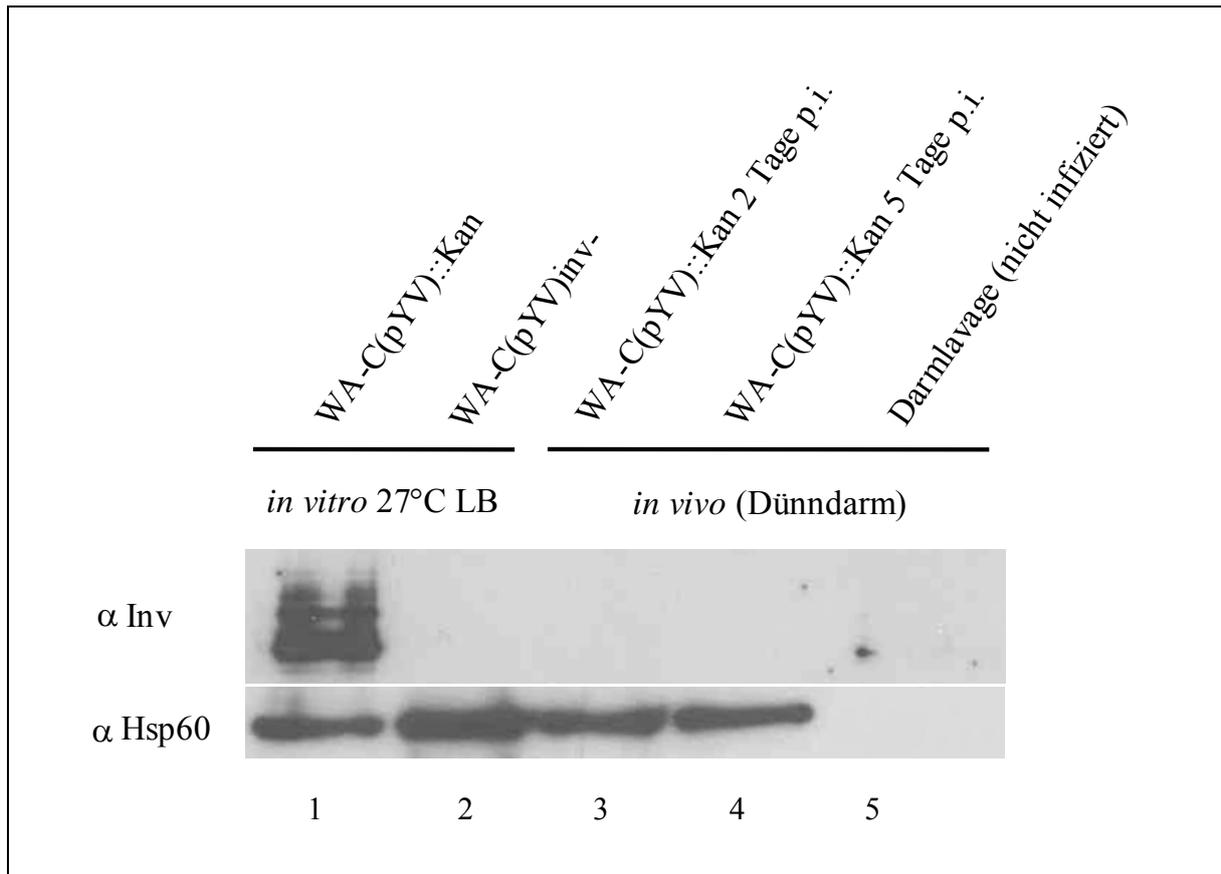


Abb. 15: Western Blot mit einem polyklonalen anti-Invasin-Antikörper (α -Inv) von *in vitro* in LB-Medium angezüchteten Yersinien (Spur 1) und von Yersinien, die am zweiten (Spur 3) bzw. fünften Tag (Spur 4) nach einer oralen Infektion aus den Dünndärmen mehrerer Mäuse rückisoliert worden waren. Es zeigte sich, dass Invasin *in vitro* bei 27°C stark exprimiert wurde (Spur 1). *In vivo* war das Protein zwei und fünf Tage nach der Infektion nicht mehr nachweisbar (Spur 3 und 4). Als Negativkontrollen wurden gleiche Mengen einer bei 27°C angezüchteten Invasin-negativen Mutante (Spur 2) sowie die Darmlavage nicht infizierter Mäuse (Spur 5) aufgetragen. Zum Beweis der identischen Menge Bakterienlysats auf allen Spuren wurde der Western Blot zusätzlich mit einem Antikörper gegen das “heat shock protein 60“ durchgeführt, das von *Y. enterocolitica* sowohl bei 27°C als auch bei 37°C exprimiert wird. Pro Spur wurde jeweils das Lysat von 3×10^6 Bakterien aufgetragen.

Der vorhergehende Western Blot zeigte, dass es im Darmlumen nach wenigen Tagen zu einer Herunterregulierung der Invasin-Expression durch die Yersinien kommt. In einem weiteren Versuch wurde die Expression des Proteins zu früheren Zeitpunkten (zwischen 30 Minuten und zweieinhalb Stunden nach oraler Aufnahme der Yersinien) untersucht:

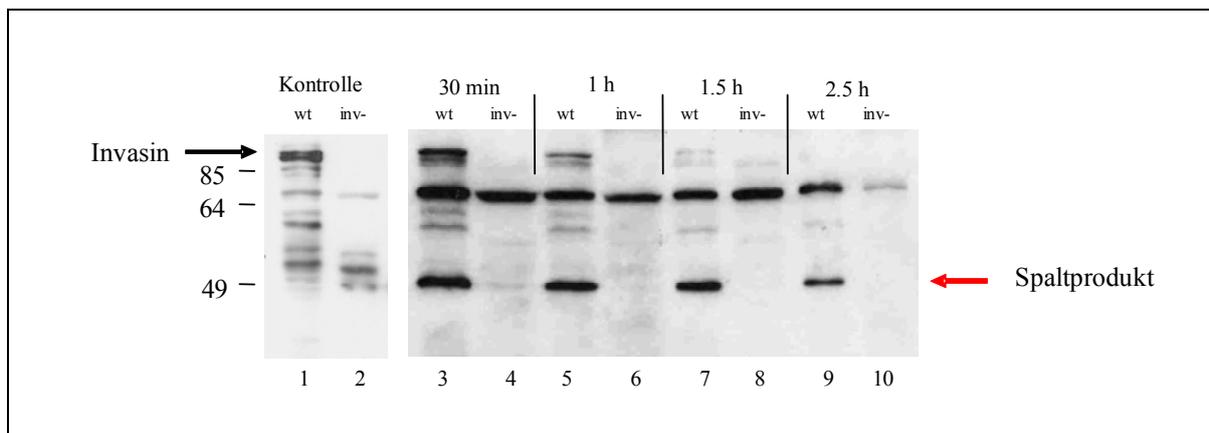


Abb. 16: Western Blot mit einem polyklonalen anti-Invasin-Antikörper von *in vitro* bei 37°C in LB-Medium angezüchteten Wildtyp-Yersinien (Spur 1) und von Yersinien, die 30 Minuten (Spur 3), eine Stunde (Spur 5), eineinhalb (Spur 7) und zweieinhalb Stunden (Spur 9) nach einer oralen Infektion aus den Dünndärmen mehrerer Mäuse rückisoliert worden waren. Es zeigte sich, dass Invasin *in vitro* bei 27°C stark exprimiert wurde (Spur 1). *In vivo* konnte das Protein nach 30 Minuten noch nachgewiesen werden (Spur 3). Im weiteren Zeitverlauf wurde die Expression deutlich schwächer und nach zweieinhalb Stunden war Invasin nicht mehr zu detektieren (Spur 9). Als Negativkontrollen wurden *in vitro* bei 27°C angezüchtete (Spur 2) und zu den jeweiligen Zeitpunkten aus den Dünndärmen mehrerer Mäuse rückisolierte (Spur 4, 6, 8 und 10) Invasin-negative Mutanten aufgetragen. Bei den aus den Därmen rückisolierten Wildtyp-Yersinien war bei 49 kDa eine weitere spezifische Bande zu erkennen (roter Pfeil), die bei den *in vitro* angezüchteten Yersinien und Invasin-negativen Mutanten fehlte. Hierbei handelte es sich offenbar um ein Invasin-Spaltprodukt, das im Dünndarm durch proteolytische Degradierung des Invasins entstanden war. Pro Spur wurde jeweils das Lysat von 3×10^6 Bakterien aufgetragen.

2.2 Einfluss von Darmproteasen auf Invasin

Die *in vivo* beobachtete Degradierung von Invasin könnte durch Bestandteile der Darmflüssigkeit bedingt sein. Um diese Vermutung zu bestätigen wurden Dünndärme gesunder Mäuse mit 2 ml PBS gespült. Die so gewonnene Darmlavage wurde zur Entfernung der korpuskulären Bestandteile zentrifugiert und der Überstand in verschiedenen Verdünnungen mit *in vitro* bei 27°C angezüchteten Bakterien gemischt. Nach einer einstündigen Inkubation der Yersinien mit der Darmflüssigkeit bei 37°C wurde die Expression von Invasin durch die Bakterien mittels Western Blot analysiert.

Es ist bekannt, dass die im Pankreas gebildete Serinprotease Trypsin maßgeblich an Verdauungsprozessen im Dünndarm beteiligt ist. Um zu untersuchen, ob Trypsin als wichtiger Bestandteil der Darmflüssigkeit an der *in vivo* beobachteten proteolytischen Spaltung von Invasin beteiligt ist, wurden Yersinien mit Trypsin (Konzentration: 2,5 mg/ml) gemischt und ebenfalls eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Auch bei diesen Bakterien wurde die Invasin-Expression mittels Western Blot überprüft. Das Ergebnis beider Versuche ist in Abbildung 17 dargestellt :

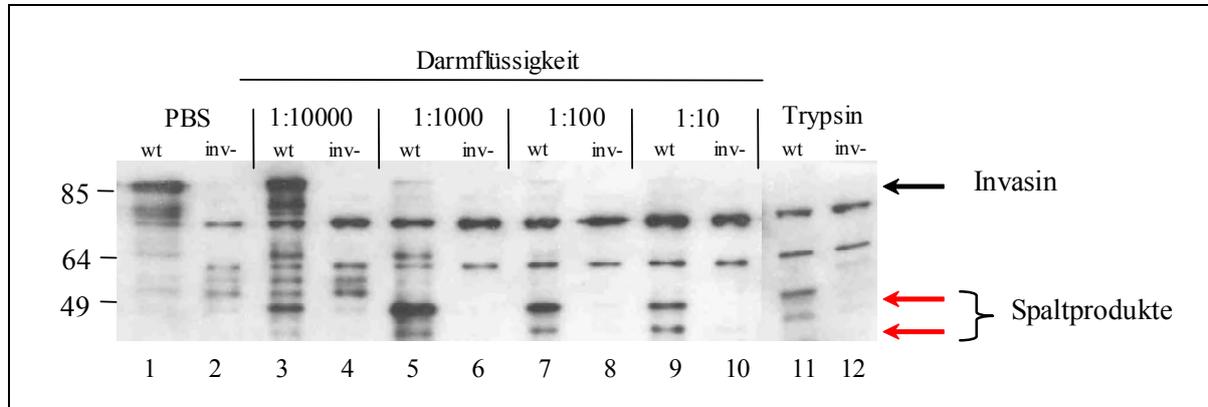


Abb. 17: Western Blot mit einem polyklonalen anti-Invasin-Antikörper von mit PBS (Spur 1), mit Darmflüssigkeit verschiedener Verdünnungen (Spur 3, 5, 7 und 9) und mit Trypsin (Spur 11) behandelten Wildtyp-Yersinien (wt) und Invasin-negativen Mutanten (Spur 2, 4, 6, 8, 10 und 12). Die Darmflüssigkeit führte bei den Wildtyp-Yersinien bis zu einer Verdünnung von 1:1000 zu einer proteolytischen Spaltung des Invasins. Dabei entstanden zwei im Western Blot nachweisbare Spaltprodukte (rote Pfeile). Die Behandlung mit Trypsin führte zum gleichen Bild (Spur 11). Eine Behandlung mit PBS führte nicht zum Entstehen dieser Abbaubanden (Spur 1). Die bei den Wildtyp-Yersinien sichtbaren Spaltprodukte fehlten bei den Invasin-negativen Mutanten, so dass sie als spezifische Invasin-Abbauprodukte angesehen werden konnten. Die meisten unspezifischen Banden sowohl der Wildtyp-Yersinien als auch der Invasin-negativen Mutanten verschwanden unter dem Einfluss der Darmflüssigkeit und des Trypsins.

Der in Abb. 17 dargestellte Western Blot bestätigte die Vermutung, dass Darmflüssigkeit zur Degradierung von Invasin führt. Unter *in vitro* - Bedingungen entstanden zwei Abbaubanden, wobei die auch *in vivo* (Abb. 16) nachgewiesene 49 kDa - Bande am stärksten ausgeprägt war. Die Behandlung der Bakterien mit Trypsin führte zu einem identischen Bandenmuster im Western Blot, was den Schluss nahelegt, dass diese Serinprotease an der *in vivo* ablaufenden proteolytischen Spaltung von Invasin beteiligt ist.

Um diese These zu untermauern, wurden in einem weiteren Versuch Wildtyp-Yersinien und Invasin-negative Mutanten mit verdünnter Darmflüssigkeit (1:100 in PBS) gemischt, die zuvor eine Stunde lang bei 37°C mit 200 µg des Proteaseinhibitors α 1-Antitrypsin (gelöst in H_2O_{bidest}) inkubiert worden war. Durch diese Vorinkubation sollte das in der Darmflüssigkeit enthaltene Trypsin inaktiviert werden. Nach einstündiger Inkubation der Bakterien mit der Darmflüssigkeit wurde ein Western Blot mit dem α -Inv Antikörper durchgeführt:

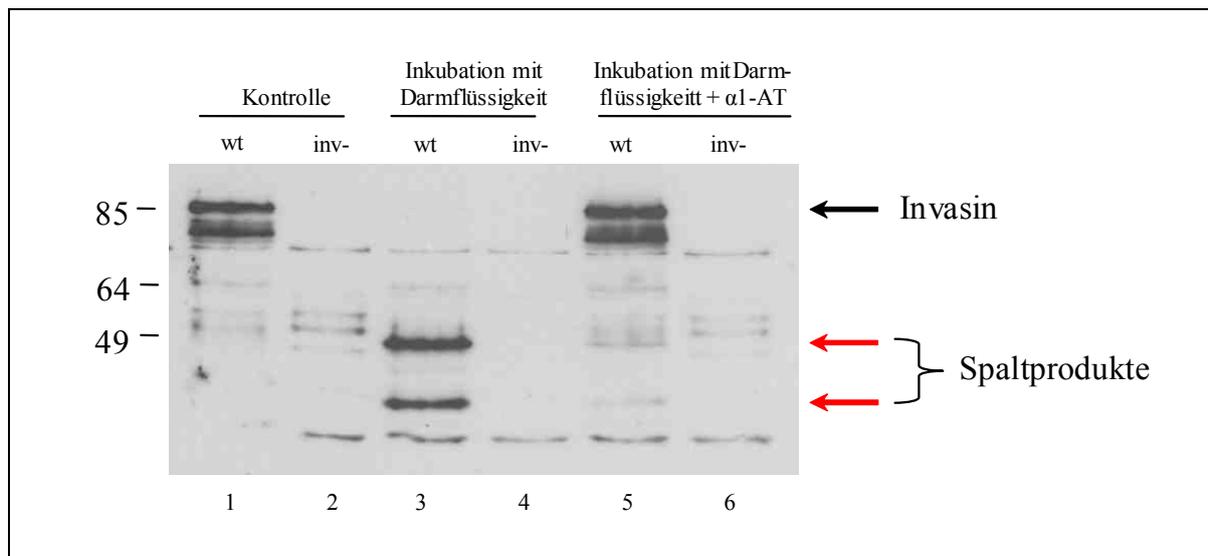


Abb. 18: Western Blot mit einem polyklonalen anti-Invasin-Antikörper von *in vitro* bei 27°C angezüchteten Wildtyp-Yersinien (Spur 1) und Invasin-negativen Mutanten (Spur 2), von mit Darmflüssigkeit inkubierten Wildtyp-Yersinien (Spur 3) und Invasin-negativen Mutanten (Spur 4) und von mit Darmflüssigkeit und α 1-Antitrypsin inkubierten Wildtyp-Yersinien (Spur 5) und Invasin-negativen Mutanten (Spur 6). Der proteolytische Abbau von Invasin durch Inkubation der Yersinien mit Darmflüssigkeit (Spur 3) konnte durch Inaktivierung des in der Darmflüssigkeit enthaltenen Trypsins durch α 1-Antitrypsin verhindert werden (Spur 5). Pro Spur wurde das Lysat von 1×10^7 Bakterien aufgetragen.

Das Ergebnis des in Abb. 18 dargestellten Western Blots sprach ebenso wie der vorhergehende Versuch für eine Degradierung des Invasins durch eine in der Darmflüssigkeit enthaltene Serinprotease.

In der Darmflüssigkeit befinden sich neben Trypsin auch noch weitere Serinproteasen wie Chymotrypsin und Elastase sowie das Enzym Carboxypeptidase. Alle werden vom Pankreas gebildet und sind an Verdauungsprozessen im Darm beteiligt.

Um zu untersuchen, ob neben Trypsin möglicherweise auch diese Proteasen einen proteolytischen Abbau des Invasins bewirken, wurden Wildtyp-Yersinien und Invasin-negative Mutanten eine Stunde lang bei 37°C mit den Proteasen inkubiert. Anschließend wurde ein Western Blot des Bakterienlysats zum Nachweis des Invasins durchgeführt. Abbildung 19 zeigt, dass auch die Proteasen Chymotrypsin und Elastase, nicht aber das Enzym Carboxypeptidase zu einer proteolytischen Degradierung des Invasins führen.

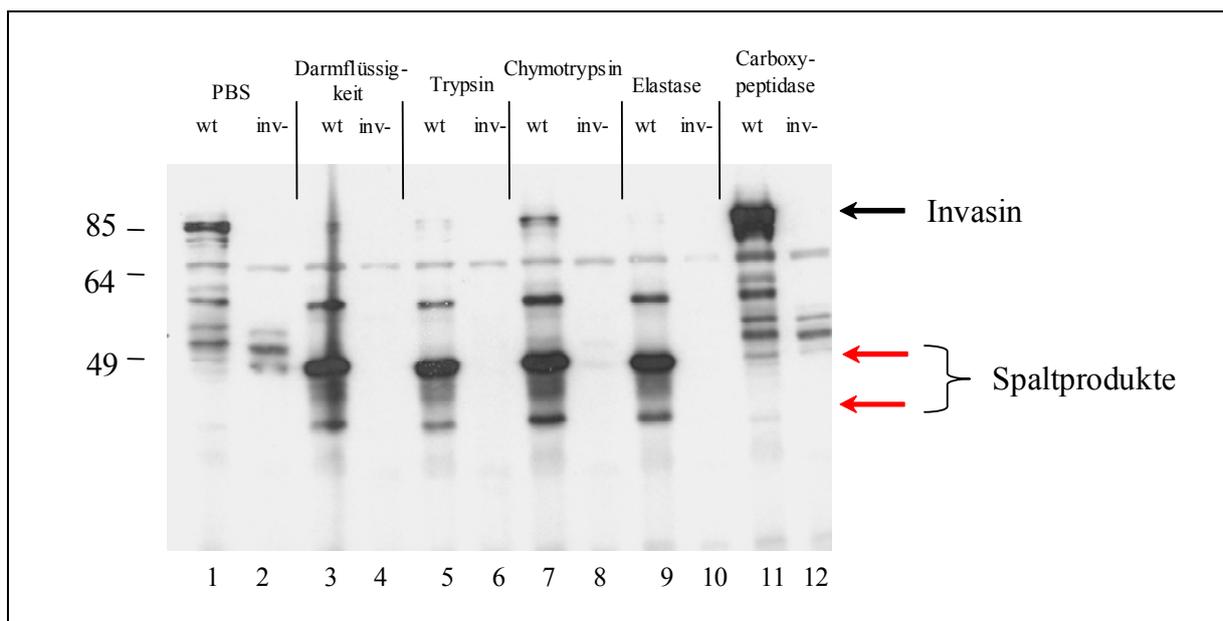


Abb. 19: Western Blot mit einem polyklonalen anti-Invasin-Antikörper von mit PBS (Spur 1), Darmflüssigkeit (Spur 3), Trypsin (Spur 5), Chymotrypsin (Spur 7), Elastase (Spur 9) und Carboxypeptidase (Spur 11) behandelten Wildtyp-Yersinien und Invasin-negativen Mutanten (Spur 2, 4, 6, 8, 10 und 12). Es ist zu erkennen, dass auch die Enzyme Chymotrypsin und Elastase zu einer proteolytischen Degradierung des Invasins unter Entstehung von zwei nachweisbaren Spaltprodukten (rote Pfeile) bei den Wildtyp-Yersinien führten (Spur 7 und 9). Das Bandenmuster war dabei identisch mit dem, welches nach Behandlung der Yersinien mit Darmflüssigkeit (Spur 3) und Trypsin (Spur 5) entstand. Das Enzym Carboxypeptidase führte nicht zu einer Spaltung des Invasins (Spur 11). Auch die Inkubation mit PBS (Spur 1) führte nicht zur Entstehung der Spaltprodukte. Pro Spur wurde das Lysat von 1×10^7 Bakterien aufgetragen.

3. Untersuchungen zur Invasivität von *Y. enterocolitica* im Zellkulturmodell

3.1 Einfluss von Darmproteasen auf die Invasivität von *Y. enterocolitica*

Die zuvor beschriebenen Versuche zeigten, dass Darmflüssigkeit mit den darin enthaltenen Proteasen zu einer proteolytischen Spaltung von Invasin führt. Es war naheliegend, hinter diesem Mechanismus einen weiteren Grund für das Phänomen der klonalen Invasion zu vermuten, da Invasin als der wichtigste Invasionsfaktor der Bakterien gilt. Um zu untersuchen, ob die Degradierung von Invasin durch Darmflüssigkeit oder Trypsin tatsächlich eine Attenuierung der Bakterien bewirkt, wurde ein Zellkultur-Invasions-Assay mit Wildtyp-Yersinien und proteolytisch vorbehandelten Yersinien durchgeführt.

Dazu wurden HeLa-Zellen 90 Minuten lang bei 37°C mit 10^7 KBE (MOI 100) Wildtyp-Yersinien vom Stamm WAC(pYV)::Kan sowie mit Invasin-negativen Mutanten und mit Darmflüssigkeit und 0,25 %-igem Trypsin behandelten Wildtyp-Yersinien inkubiert. Bei den mit Darmflüssigkeit und Trypsin vorbehandelten Bakterien wurde vor dem Zellkulturversuch ein Western Blot mit dem polyklonalen anti-Invasin-Antikörper durchgeführt, um sicherzustellen, dass das Invasin tatsächlich proteolytisch gespalten worden war. Zur Verhinderung der Yop-Produktion durch die Yersinien während des Invasionsversuches (die eine Invasion der Bakterien in die Zellen blockiert hätte) wurde den jeweiligen Ansätzen Tetrazyklin (hemmt die Proteinbiosynthese und ist bakteriostatisch) beigemischt. Nach 90-minütiger Infektion der Zellen wurde Gentamicin hinzugegeben, um alle extrazellulären Yersinien abzutöten. Dann wurden die Zellen zur Freisetzung aller invadierten Bakterien mit Triton X-100 lysiert und Verdünnungsreihen der jeweiligen Lysate zur Keimzahlbestimmung ausplattiert (Details s. Kap. Material und Methoden). Rechnerisch wurde bestimmt, wie viel Prozent der jeweiligen Yersinien (Wildtyp-Yersinien, Invasin-negative Mutanten und vorbehandelte Yersinien) in die HeLa-Zellen invadiert waren.

Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

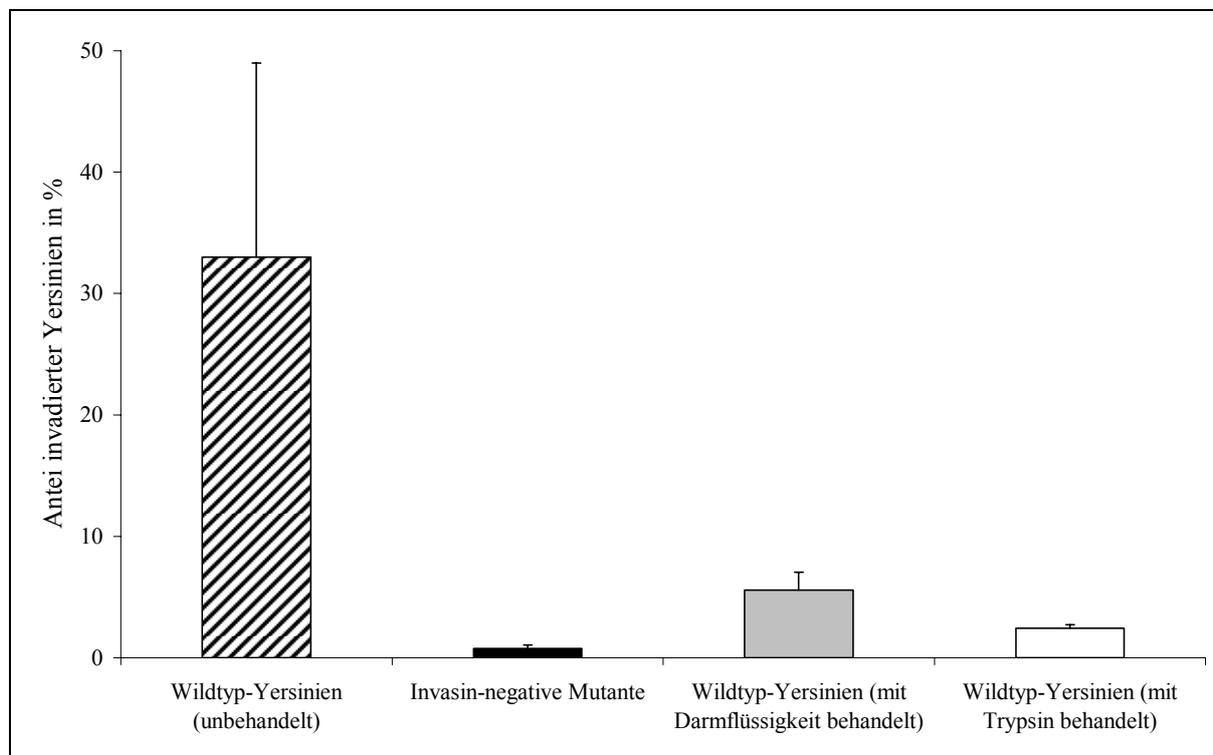


Abb. 20: Anteil invadierter Wildtyp-Yersinien, Invasin-negativer Mutanten und mit Darmflüssigkeit und Trypsin behandelter Wildtyp-Yersinien nach einer Infektion von HeLa-Zellen (MOI 100). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Es ist ersichtlich, dass 33 % \pm 16 % der eingesetzten 10^7 Wildtyp-Yersinien in die HeLa-Zellen invadiert waren. Die Invasivität der Invasin-negativen Mutante (0,74 % \pm 0,3 %) und der mit Darmflüssigkeit (5,56 % \pm 1,5 %) und mit Trypsin vorbehandelten Yersinien (2,43 % \pm 0,3 %) war signifikant schwächer ($p < 0,01$).

D. Diskussion

Yersinia enterocolitica ist ein enteropathogener Erreger, der oral über kontaminierte Nahrungsmittel aufgenommen wird und in der Folge zu einer Gastroenteritis oder mesenterialen Lymphadenitis bei den betroffenen Patienten führt (18). In seltenen Fällen, insbesondere bei abwehrgeschwächten Individuen oder Patienten mit erhöhten Eisenspiegeln im Blut, kann es auch zu einem septischen Verlauf der Yersiniose mit einer Abszessbildung in Leber und Milz kommen (14, 15, 88). Im oralen Mausinfektionsmodell zeigt sich ein ähnlicher Infektionsverlauf (23). Hier invadieren die Yersinien zunächst über M-Zellen in die Peyer-Plaques des terminalen Ileums und disseminieren von dort in die mesenterialen Lymphknoten. Über einen zweiten, bislang unbekanntem Weg disseminieren die Erreger vom Darmlumen in Leber und Milz (7). Sowohl in den Peyer-Plaques als auch in Milz und Leber kommt es zur Ausbildung von Mikroabszessen.

1. Invasion und Abszessbildung

Der Einsatz GFP- und RFP-markierter Yersinien in Infektionsversuchen ermöglicht die genaue mikroskopische Lokalisierung der Bakterien in den Geweben des Wirtes. In dieser Arbeit wurden die fluoreszierenden Yersinien zur näheren Untersuchung der Erregerinvasion vom Darmlumen in die Peyer-Plaques und der Abszessbildung in infizierten Peyer-Plaques verwendet. In der Vergangenheit waren GFP- und RFP-markierte Yersinien bereits zur Untersuchung der Klonalität von *Yersinia*-Abszessen im Mausmodell eingesetzt worden (4). Hierbei hatten sich Hinweise darauf ergeben, dass im Verlauf einer Yersinieninfektion sowohl in den Peyer-Plaques als auch in inneren Organen wie der Milz und Leber nur monoklonale *Yersinia*-Abszesse entstehen (d.h. ein Abszess entsteht durch die Proliferation einer einzelnen Yersinie). Zur Durchführung weiterer Infektionsversuche war es zunächst notwendig, neue GFP- und RFP-markierte Yersinien zu konstruieren, da die zuvor verwendeten Bakterien im Laufe zahlreicher Anzüchtungen ihre Virulenz eingebüßt hatten und nach oralen Infektionen weder in den Peyer-Plaques noch in den Milzen und Lebern der infizierten Mäuse nachgewiesen werden konnten. Durch Transformation der GFP- und RFP-enthaltenden Plasmide in den *Y. enterocolitica*-Stamm WA-C(pYV)::Kan gelang es, Yersinien mit stabiler Virulenz und Fluoreszenz zu generieren. In oralen Infektionsversuchen führten diese fluoreszenzmarkierten Yersinien unabhängig von der Infektionsdosis zur Entstehung

monoklonaler Mikroabszesse in den Peyer-Plaques sowie in den Milzen und Lebern der infizierten Mäuse (Abb. 2 - 4, S. 35/36; Tab. 1 A - D, S. 38). Auffällig war, dass in den einzelnen Peyer-Plaques nur einige wenige *Yersinia*-Abszesse entstanden, während in den Milzen und Lebern zahlreiche monoklonale Abszesse zu beobachten waren. Dies könnte bedeuten, dass die Dissemination von *Y. enterocolitica* vom Darmlumen in Milz und Leber deutlich effizienter ist als die Dissemination vom Darmlumen in die Peyer-Plaques. Andererseits wäre es möglich, dass auch in die Milz und Leber nur sehr wenige Bakterien gelangen, es jedoch aufgrund einer effizienten Replikation und Dissemination der Erreger innerhalb dieser Organe zur Ausbildung zahlreicher Abszesse kommt. Letzteres trifft beispielsweise für *Y. pseudotuberculosis* zu. Untersuchungen in der Vergangenheit hatten gezeigt, dass die Anzahl der *Y. pseudotuberculosis*-Klone in infizierten Lebern und Milzen sehr gering ist und im Verlauf der Infektion konstant bleibt (7). Durch eine effiziente Proliferation und Dissemination dieser wenigen Klone innerhalb der Organe kommt es zur Entstehung der zahlreichen Abszesse. Welches Szenario für *Y. enterocolitica* zutrifft, bleibt zu klären.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit *Y. enterocolitica* konnten in den Peyer-Plaques infizierter Mäuse im Gegensatz zu den Milzen und Lebern nur wenige Mikroabszesse nachgewiesen werden. Dies deutete darauf hin, dass nur sehr wenige Yersinien vom Darmlumen in die Peyer-Plaques invadierten. Um diese Vermutung näher zu untersuchen, wurden Mäuse mit unterschiedlichen Infektionsdosen zwischen 10^6 und 10^9 KBE infiziert und die in den Peyer-Plaques entstehenden monoklonalen Abszesse quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass erst die sehr hohe Infektionsdosis von 10^9 KBE zur Besiedlung aller Peyer-Plaques der infizierten Mäuse führte (Tab. 1 A - D, S. 38; Abb. 6, S. 39). Bei Infektionsdosen unter 10^8 KBE kam es nur sporadisch zur Invasion. Möglicherweise waren die resultierenden Keimzahlen im Darm hierbei zu gering, um einen ausreichenden Kontakt der Yersinien mit den translozierenden M-Zellen der Peyer-Plaques zu ermöglichen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung, dass erst eine Infektionsdosis von mindestens 5×10^8 KBE zu einer reproduzierbaren systemischen Infektion im Mausmodell führt (24). Trotz hoher Infektionsdosen (10^9 KBE) und einer mehrtägigen Infektionsdauer entstanden konstant nur sehr wenige (1 - 4) monoklonale Abszesse in den einzelnen Peyer-Plaques (Abb. 8, S. 40). Da ein monoklonaler Abszess durch die Proliferation einer einzelnen Yersinie entsteht, bedeutet dies, dass sich selbst bei Infektionsdosen von 10^9 KBE nur 1 - 4 Yersinien in den einzelnen Peyer-Plaques etablierten. Ursächlich für diese Beobachtung könnte zum einen eine klonale Invasion von *Y. enterocolitica* sein, d.h. aufgrund limitierender

Faktoren gelangen nur sehr wenige (1 - 4) *Yersinia*-Bakterien in die einzelnen Peyer-Plaques und führen dort zur Abszessbildung. Möglich wäre aber auch, dass zunächst viele Yersinien in die Peyer-Plaques invadieren, ein Großteil dieser Erreger jedoch durch eine Immunantwort des Wirtes abgetötet wird. Die Abszessbildung in den Peyer-Plaques ginge dann von einigen wenigen überlebenden Yersinien aus. Elektronenmikroskopische Untersuchungen hatten in der Vergangenheit Hinweise darauf ergeben, dass während einer Infektion viele *Yersinia*-Bakterien in die einzelnen M-Zellen der Peyer-Plaques gelangen (28, 29). Dies würde für das letztgenannte Szenario sprechen. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass diese Untersuchungen mit *Y. pseudotuberculosis* durchgeführt wurden, welche bekanntermaßen invasiver sind als *Y. enterocolitica* (zumindest in der Zellkultur). Zum andern wurde in den Versuchen ein artifizielles *ligated loop*-Modell eingesetzt, bei dem es durch Unterbrechung der Darmkontinuität bei lebenden Mäusen über einen bestimmten Zeitraum zu extrem hohen Keimzahlen in den entsprechenden Darmabschnitten nach einer Infektion kommt. Diese Ergebnisse sind somit nicht mit oralen Infektionsversuchen zu vergleichen, bei denen aufgrund der Darmmotorik und der damit verbundenen Propulsivperistaltik gänzlich andere Voraussetzungen für den Invasionsprozess bestehen.

Bei der mikroskopischen Quantifizierung der Abszesse in den Peyer-Plaques war zu erkennen, dass eine logarithmische Erhöhung der Infektionsdosis lediglich zu einem linearen Anstieg der Abszesszahl führte (Abb. 7, S. 40). Dies deutete auf limitierende Faktoren bei der Invasion und somit auf eine klonale Invasion als Ursache für die geringe Abszesszahl in den Peyer-Plaques hin. Wäre eine ungehinderte Invasion der Yersinien in die Peyer-Plaques möglich, würde man bei einer logarithmischen Erhöhung der Infektionsdosis auch einen logarithmischen Anstieg der Abszesszahl erwarten. Um auszuschließen, dass es im Rahmen einer Yersinieninfektion initial zu einer massiven Erregerinvasion in die Peyer-Plaques und anschließend zur Eliminierung eines Großteils der Bakterien durch das Immunsystem des Wirtes kommt, wurden Infektionsversuche mit neutropenen Mäusen und $p47^{phox^{-/-}}$ -Mäusen (Mäuse mit einer mutationsbedingten Störung des oxidativen *bursts* neutrophiler Granulozyten) durchgeführt. Es ist bekannt, dass neutrophile Granulozyten eine entscheidende Rolle bei der Eliminierung von Yersinien in der Frühphase einer Infektion spielen (30). Die Immunzellen akkumulieren nach einer Infektion mit *Y. enterocolitica* in Leber und Milz, wandern aber auch rasch in infizierte Peyer-Plaques ein (23). Würden initial viele Yersinien in die Peyer-Plaques invadieren, jedoch nur wenige einen Angriff des Immunsystems überleben, müssten die Abszesszahlen in den Peyer-Plaques neutropener und $p47^{phox^{-/-}}$ -Mäuse nach einer Infektion deutlich höher sein als die Abszesszahlen in den Peyer-

Plaques immunkompetenter Mäuse. Dies war aber nicht der Fall. Auch bei den neutropenen und p47^{phox}^{-/-} - Mäusen entstanden nur sehr wenige Abszesse in den einzelnen Peyer-Plaques (Abb. 9, S. 41 und Tab. 2, S. 42). Somit unterstützte dieser Versuch die Theorie der klonalen Invasion. Zur weiteren Bestätigung der These wurden Peyer-Plaques zu frühen Zeitpunkten im Infektionsverlauf (sechs und fünfzehn Stunden nach einer Infektion) mikroskopisch analysiert. Auch hierbei ergaben sich keinerlei Hinweise darauf, dass zu Beginn einer Infektion viele Yersinien in den Peyer-Plaques lokalisiert sind.

Die Analyse der Keimzahlen im Dünndarm nach oralen Infektionen zeigte, dass ein Teil der inokulierten Yersinien den Darm kolonisierte und sich dort im Verlauf der Infektion effizient replizierte (Abb. 10, S. 43). Da trotz dieser Darmkolonisierung und Replikation mit potentielltem Kontakt zu translozierenden M-Zellen nur sehr wenige Yersinien in die Peyer-Plaques eindringen, stellte sich die Frage, ob Yersinien kontinuierlich im Infektionsverlauf in die Peyer-Plaques invadieren können oder ob ihre Invasion auf ein bestimmtes Zeitfenster begrenzt ist. In dieser Arbeit konnte durch Infektionsversuche mit GFP- und RFP-markierten Yersinien erstmals mikroskopisch gezeigt werden, dass sich der Invasionsprozess vorwiegend in der Frühphase der Infektion (innerhalb der ersten zwei Tage) abspielt und im weiteren Verlauf trotz der Darmkolonisierung nur noch wenige Yersinien in die Peyer-Plaques invadieren. Nach einer oralen Infektion mit 10^9 Yersinien waren bereits 2 Tage nach der Infektion $84 \% \pm 21 \%$ aller Peyer-Plaques besiedelt und die Anzahl der Mikrokolonien/-abszesse in den einzelnen infizierten Peyer-Plaques blieb bis zum fünften Tag nach der Infektion konstant (Abb. 11 und 12, S. 45).

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit durch Infektionsversuche mit GFP- und RFP-markierten Yersinien folgende Erkenntnisse zur Invasion und Dissemination von *Yersinia enterocolitica* im Mausmodell gewonnen werden:

1. *Yersinia*-Abszesse in Peyer-Plaques, Milz und Leber sind unabhängig von der Infektionsdosis monoklonal (ein Abszess entsteht durch die Proliferation einer einzelnen Yersinie).
2. Selbst bei der hohen Infektionsdosis von 10^9 KBE entstehen in den einzelnen Peyer-Plaques nur sehr wenige (1 - 4) Abszesse, was aufgrund der Monoklonalität der Abszesse einer Etablierung von 1 - 4 einzelnen Yersinien pro Peyer-Plaque entspricht. Im Gegensatz

dazu entstehen in den Milzen und Lebern infizierter Mäuse zahlreiche monoklonale Mikroabszesse.

3. Ursächlich für die geringe Abzesszahl in den Peyer-Plaques scheint eine durch limitierende Faktoren bedingte klonale Invasion der Yersinien zu sein (nur sehr wenige Yersinien gelangen in die Peyer-Plaques).

4. Der Invasionsprozess spielt sich nicht kontinuierlich im Infektionsverlauf sondern hauptsächlich innerhalb der ersten zwei Tage nach Aufnahme der Erreger ab. Yersinien, die sich über mehrere Tage im Darm replizieren, können trotz der langen Verweildauer im Dünndarm nur noch eingeschränkt in Peyer-Plaques invadieren.

2. Einfluss der Wirtsantwort auf Invasion und Abszessbildung

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse der Infektionsversuche mit rot und grün fluoreszierenden Yersinien warfen die Frage auf, welche limitierenden Faktoren für das Phänomen der klonalen Invasion verantwortlich sind. Einerseits könnte eine lokale Reaktion des Wirtes auf die Infektion eine Rolle spielen, andererseits eine Veränderung der Yersinien während ihrer Replikation im Dünndarm. Möglich wäre auch eine Kombination beider Faktoren.

Um eine lokale Reaktion des Wirtes auf Ebene der Peyer-Plaques als invasionslimitierenden Faktor zu identifizieren, wurden sequentielle Infektionen der Mäuse mit GFP- und RFP-markierten Yersinien durchgeführt. Dabei wurden die Mäuse zunächst mit grünen Yersinien und zwei Tage später mit roten Yersinien infiziert. Ziel war es zu überprüfen, ob die Yersinien der zweiten Infektion in bereits vorinfizierte Peyer-Plaques invadieren und dort Abszesse bilden konnten oder ob die Vorinfektion zu einer Blockade der weiteren Bakterientranslokation vom Darmlumen in die Peyer-Plaques und der Abszessbildung führte. Es zeigte sich, dass die Yersinien der zweiten Infektion überwiegend naive (nicht infizierte) Peyer-Plaques besiedelten (Tab. 3, S. 47 und Tab. 5, S. 49). Nur in sehr seltenen Fällen entstanden rote Mikroabszesse in den mit grünen Yersinien der ersten Infektion besiedelten Peyer-Plaques. Dies legt den Schluss nahe, dass durch eine lokal induzierte Wirtsantwort in den Peyer-Plaques nach einer Besiedlung durch Yersinien eine weitere Erregerinvasion aus dem Darmlumen in diese infizierten Peyer-Plaques und damit eine Abszessbildung verhindert

wird. Welche Vorgänge im einzelnen zu dieser Blockade führen, darüber lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nur spekulieren.

Möglich wäre, dass es nach Invasion einer Yersinie in einen Peyer-Plaques über bestimmte Signalwege zu einer Hemmung der M-Zell-vermittelten Transzytose in diesem Peyer-Plaques kommt (Abb. 21 A). Dies könnte ein Schutzmechanismus des Wirtsorganismus sein, um nach einer Infektion der Peyer-Plaques das Eindringen weiterer Erreger zu verhindern.

Alternativ könnte eine Vorinfektion zu einer „immunologischen Aktivierung“ des jeweiligen Peyer-Plaques führen, so dass weitere Yersinien aus dem Darmlumen zwar invadieren können, im Peyer-Plaques aber durch das aktivierte Immunsystem eliminiert werden (Abb. 21 B). Dies ist zwar unwahrscheinlich, da gezeigt werden konnte, dass neutrophile Granulozyten als entscheidende Träger der frühen Immunantwort nicht ursächlich sind für das Phänomen der klonalen Invasion. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Immunzellen wie z.B. Makrophagen in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen, da auch diese in mit Yersinien infizierten Geweben nachzuweisen sind (3).

Wie oben erwähnt kam es bei den sequentiellen Infektionen in sehr seltenen Fällen zur Invasion von Yersinien in bereits infizierte Peyer-Plaques. Eine Ursache dafür könnten CD18+-Phagozyten sein, die mit ihren Dendriten ins Darmlumen ragen und so Bakterien unabhängig von blockierten M-Zellen in die Submukosa translozieren könnten (Abb. 21 C). Eine Beteiligung dieser Zellen bei der Aufnahme von Salmonellen aus dem Darmlumen wurde bereits beobachtet (106, 135). Möglich wäre auch, dass nur der Invasin-/ β -Integrin-abhängige Invasionsprozess durch den Wirt blockiert wird und eine Invasion der Yersinien - wenn auch weniger effektiv - über alternative Mechanismen (z.B. mittels YadA oder Ail) stattfindet (101).

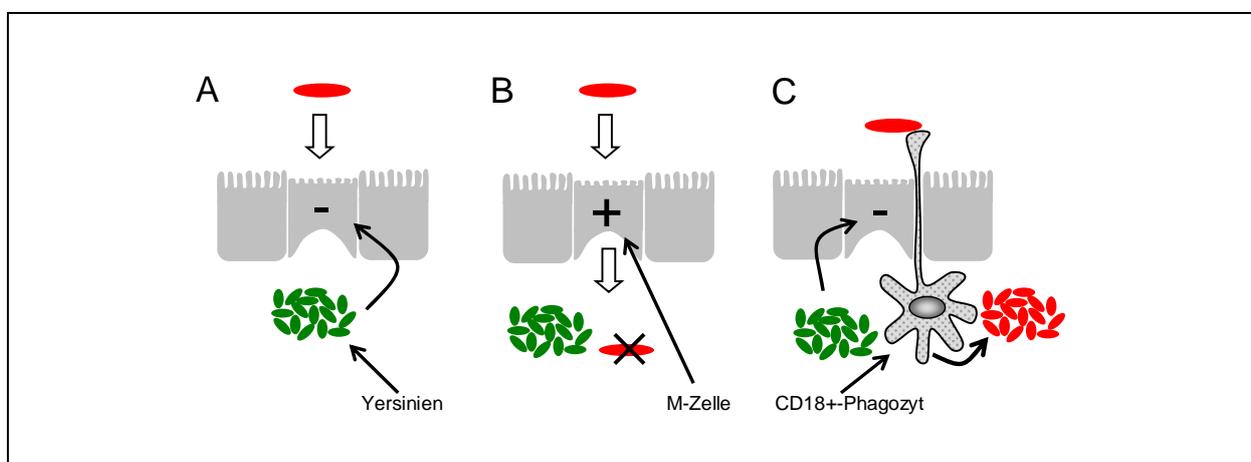


Abb. 21: Modellvorstellungen zum Invasionsprozess. Erläuterungen s. Text.

3. Untersuchungen zur *in vivo* - Expression von Invasin

Neben Reaktionen des Wirtes könnten auch Veränderungen der Yersinien während ihrer Replikation unter den im Dünndarm herrschenden Bedingungen zum Phänomen der klonalen Invasion beitragen.

3.1 Invasin-Expression im Dünndarm

Als wichtigster Invasionsfaktor der Yersinien in der Frühphase der Infektion gilt das 91 kDa große Protein Invasin (87, 100), das durch Bindung an β_1 -Integrine auf M-Zellen die Translokation der Bakterien vom Darmlumen in die Peyer-Plaques induziert (28). Invasin wird überwiegend bei 27° C exprimiert, bei 37° C ist die Expression deutlich schwächer (98). Daher lag die Vermutung nahe, dass eine mangelnde Expression von Invasin unter den im Darm herrschenden Bedingungen ein invasionslimitierender Faktor sein könnte. Bislang war die Invasin-Expression nur in Peyer-Plaques, nicht aber im Darmlumen untersucht worden (98). Die Western Blot-Analyse der Invasin-Expression im Darm infizierter Mäuse zwei und fünf Tage nach einer Infektion zeigte, dass die Yersinien die Invasin-Expression unter den im Darm herrschenden Wachstumsbedingungen herunterregulierten (Abb. 15, S. 52). Zu beiden Zeitpunkten war das Protein nicht mehr nachweisbar. 30 Minuten nach einer Infektion hingegen konnte Invasin noch detektiert werden (Abb. 16, S. 53). Es ist davon auszugehen, dass dieses Invasin von den Bakterien der Infektionsdosis stammte, da diese bei 27°C angezüchtet worden waren und somit vor der Infektion viel Invasin an ihrer Oberfläche exprimiert hatten. Zudem beträgt die Generationszeit der Yersinien mehr als 30 Minuten, so dass zu diesem Zeitpunkt noch keine wesentliche Replikation der Erreger stattgefunden haben konnte. Kurze Zeit später, nämlich schon nach zweieinhalb Stunden, konnte das Voll-Längen-Protein nicht mehr nachgewiesen werden. Stattdessen war im Western Blot eine 49 kDa große spezifische Abbaubande zu erkennen, die eine proteolytische Degradierung des Invasins anzeigte. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass der effektive Invasin-abhängige Invasionsmechanismus auf ein kurzes Zeitfenster unmittelbar nach der oralen Aufnahme der Yersinien beschränkt ist. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich das von den Yersinien außerhalb des Wirtsorganismus gebildete Invasin noch in intakter Form auf der Oberfläche der Bakterien und kann über β_1 -Integrine der M-Zellen eine effektive Translokation der Erreger in die Peyer-Plaques vermitteln. Aufgrund der Degradierung des initial vorhandenen Invasins und der Herunterregulierung der Invasin-Expression im Verlauf der Darmbesiedlung steht

dieser Invasionsmechanismus zu späteren Zeitpunkten nicht mehr zur Verfügung. Dieses Erkenntnis steht im Einklang mit den Ergebnissen der zuvor beschriebenen Infektionsversuche, die gezeigt hatten, dass Yersinien hauptsächlich in der Frühphase der Infektion in die Peyer-Plaques invadieren.

3.2 Degradierung von Invasin durch Darmproteasen

Es lag nahe, im Darm befindliche Proteasen für die *in vivo* beobachtete Degradierung des Invasins verantwortlich zu machen. Die *in vitro* - Inkubation von Yersinien mit Darmflüssigkeit nicht infizierter Mäuse bestätigte diese Vermutung. Hierbei kam es ebenfalls zu einer proteolytischen Spaltung des Invasins unter Entstehung einer 49 kDa großen Abbaubande (Abb. 17, S. 54). Zusätzlich war eine weitere spezifische Abbaubande zu erkennen, die im Western Blot mit den aus dem Darm rückisolierten Yersinien nicht zu sehen war (Abb. 16, S. 53). Für die im Darm ablaufenden Verdauungsprozesse sind vor allem die in den exokrinen Zellen des Pankreas gebildeten Proteasen Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und Carboxypeptidasen verantwortlich. Alle werden in Form inaktiver Vorstufen in den Dünndarm sezerniert, wo es durch Abspaltung von Teilsequenzen zur Aktivierung der Enzyme kommt (84). Um zu untersuchen, ob diese Proteasen für die im Darm beobachtete und *in vitro* reproduzierte Degradierung des Invasins ursächlich sind, wurden *in vitro* angezüchtete Yersinien mit den jeweiligen Proteasen inkubiert. Anschließend wurde ein Western Blot mit dem anti-Invasin Antikörper durchgeführt (Abb. 19, S. 56). Die Inkubation der Yersinien mit den Serinproteasen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase bewirkte ebenfalls eine proteolytische Degradierung des Invasins unter Entstehung des 49 kDa großen Spaltproduktes und eines kleineren Proteinfragmentes. Da die Behandlung der Yersinien mit den drei Serinproteasen zu exakt demselben Invasin-Spaltmuster führte wie die Behandlung mit Darmflüssigkeit (s.o.), konnte eine Beteiligung dieser Serinproteasen an der *in vivo* ablaufenden Degradierung von Invasin als sehr wahrscheinlich angenommen werden. Untermuert wurde die These zudem dadurch, dass durch die Zugabe von α 1-Antitrypsin zur Darmflüssigkeit deren oben beschriebene proteolytische Wirkung auf das Invasin vollständig unterdrückt werden konnte (Abb. 18, S. 55). Das Enzym Carboxypeptidase führte auch in hohen Konzentrationen nicht zu einer proteolytischen Spaltung des Invasins und scheint somit auch *in vivo* in diesem Zusammenhang keine Bedeutung zu haben.

4. Untersuchungen zur Invasivität von *Y. enterocolitica* im Zellkulturmodell

Es war naheliegend, hinter der proteolytischen Degradierung des wichtigsten Invasionsfaktors der Yersinien während der Darmkolonisierung einen weiteren Grund für das Phänomen der klonalen Invasion zu vermuten. Zur Stützung dieser These musste jedoch demonstriert werden, dass eine Degradierung von Invasin tatsächlich zu einer Attenuierung der Yersinien führt. Dies gelang mit Hilfe eines Zellkultur-Invasions-Assays. Es zeigte sich, dass die *in vitro* - Proteolyse von Invasin durch eine Behandlung der Yersinien mit Darmflüssigkeit oder auch Trypsin eine signifikante Reduktion der Erreger-Invasivität bewirkte (Abb. 20, S. 58). Die im Vergleich zu Invasin-negativen Mutanten noch leicht erhöhte Rest-Invasivität der *in vitro* mit Darmflüssigkeit behandelten Bakterien könnte mit einer möglicherweise nicht vollständigen Degradierung des Invasins durch die proteolytische Behandlung zusammenhängen. Das Ergebnis des Invasions-Assays deutete stark auf eine infektionsbiologische Relevanz der *in vivo* beobachteten Proteolyse hin. Allerdings muß berücksichtigt werden, dass es sich bei einem Invasions-Assay um ein *in vitro* durchgeführtes Experiment mit kontrollierbaren Einflussfaktoren und Variablen handelt. Die *in vivo* im Rahmen einer Yersinieninfektion ablaufenden Vorgänge sind deutlich komplexer. So existieren Invasin-unabhängige Invasionsmechanismen, die u. U. eine Inaktivierung des Invasins *in vivo* kompensieren könnten (59). Es wird daher nötig sein, weitere Untersuchungen zur Invasivität proteolytisch vorbehandelter Yersinien im Mausmodell durchzuführen, um einen Beweis für die Relevanz des beobachteten Phänomens auch unter *in vivo*-Bedingungen zu erbringen.

5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten mit Hilfe GFP- und RFP-markierter Yersinien wichtige neue Erkenntnisse zum Invasionsprozess und zur Dissemination des Erregers *Yersinia enterocolitica* im Mausmodell gewonnen werden. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass der Invasionsprozess charakterisiert ist durch eine klonale Invasion weniger Yersinien in die Peyer-Plaques und dass sowohl eine lokale Wirtsantwort als auch Veränderungen der Yersinien unter den im Darm herrschenden Wachstumsbedingungen als Ursache für dieses Phänomen in Frage kommen. Die vorgestellten Ergebnisse geben neue Einblicke in die im Rahmen der Yersinieninfektion ablaufenden infektionsbiologischen Vorgänge, werfen aber

gleichzeitig viele neue Fragen auf, so dass sie auch als Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen der Yersiniose im Mausmodell und insbesondere der *Yersinia*-Wirts-Interaktionen gewertet werden sollten.

Es wurde gezeigt, dass Reaktionen des Wirtes auf die Infektion eine kontinuierliche Invasion von Yersinien in bereits infizierte Peyer-Plaques und eine Abszessbildung in diesen Peyer-Plaques inhibieren. Neutrophile Granulozyten konnten als Ursache für dieses Phänomen ausgeschlossen werden. In weiteren Untersuchungen müsste jetzt geklärt werden, ob andere Immunzellen in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen oder ob möglicherweise eine Blockade der M-Zellen nach einer Infektion der Peyer-Plaques ursächlich in Frage kommt. Denkbar wäre auch, dass die Yersinien durch die Produktion von *Yersinia outer proteins* (Yops) nicht nur angreifende Immunzellen sondern auch M-Zellen in ihrer Phagozytoseaktivität hemmen. Es wurden bereits Infektionsversuche mit verschiedenen Yop-Deletionsmutanten (134) durchgeführt (unveröffentlichte Daten). Dabei zeigte sich jedoch kein Unterschied hinsichtlich der Invasion in die Peyer-Plaques und der Abszessbildung im Vergleich zu Wildtyp-Yersinien. Da bei den einzelnen Mutanten jeweils nur ein Yop ausgeschaltet war und möglicherweise nur das Zusammenspiel mehrerer Yops zur einer Inhibition der Erregeraufnahme durch die M-Zellen führt, wäre es sinnvoll, diese Versuche nochmals mit Mutanten durchzuführen, bei denen jeweils mehrere Yops deletiert sind.

Desweiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in der Darmflüssigkeit vorhandene Proteasen zur Degradierung des bakteriellen Virulenzfaktors Invasin führen. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* entstand dabei ein 49 kDa großes Abbauprodukt. Es wäre nun wichtig zu wissen, ob dieses Spaltprodukt das für die Invasion in die Peyer-Plaques essentielle 192 Aminosäuren lange C-terminale Ende des Invasins (82) enthält. Erste Versuche zur Identifizierung des Spaltproduktes mittels Massenspektrometrie (Q-TOF) wurden in dieser Arbeit durchgeführt, doch es gelang nicht, aus Bakterienlysaten ausreichende Mengen reinen Invasins und reiner Invasin-Spaltprodukte zu isolieren. Ein möglicher Lösungsansatz wäre hier die Konstruktion eines Invasin-Überexpressionsvektors, mit dessen Hilfe große Mengen von Invasin produziert und nach proteolytischer Behandlung mit Darmflüssigkeit oder Serinproteasen erneut massenspektrometrisch untersucht werden könnten. Außerdem müsste wie bereits erwähnt die Relevanz der proteolytischen Degradierung von Invasin für den Invasionsprozess auch unter *in vivo*-Bedingungen überprüft werden.

Das Phänomen des proteolytischen Abbaus eines Virulenzfaktors von *Y. enterocolitica* und die damit verbundene Attenuierung des Erregers durch in der Darmflüssigkeit vorhandene Proteasen war bislang nicht bekannt. Beschrieben wurde bisher lediglich der degradierende Einfluss der Neutrophilen-Elastase auf Virulenzfaktoren verschiedener Enterobakterien im Rahmen der Immunantwort (141). Möglicherweise handelt es sich bei der in dieser Arbeit vorgestellten proteolytischen Degradierung eines Virulenzfaktors durch Darmproteasen um einen Mechanismus zur unspezifischen Erregerabwehr durch den Wirtsorganismus, der nicht nur im Rahmen einer Yersinieninfektion sondern auch bei Infektionen mit anderen enteropathogenen Keimen eine Rolle spielt. Da im Darmlumen neben Pankreasproteasen auch viele von Bakterien der residenten Darmflora produzierte Proteasen vorhanden sind (50, 85), könnte die proteolytische Degradierung von Virulenzfaktoren außerdem bei Wechselwirkungen zwischen pathogenen Keimen und physiologischen Darmbakterien von Bedeutung sein.

E. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Invasion und Dissemination von *Yersinia enterocolitica* im Mausmodell durchgeführt und die im Rahmen des Invasionsprozesses ablaufenden Pathogen-Wirts-Interaktionen näher analysiert. Dabei konnten eine Reihe neuer relevanter Erkenntnisse gewonnen werden.

Yersinia enterocolitica ist ein enteropathogener Erreger, der über kontaminierte Nahrungsmittel übertragen wird. Klinisch äußert sich die Infektion in einer akuten Gastroenteritis oder mesenterialen Lymphadenitis, bei abwehrgeschwächten Individuen kann es zu septischen Verläufen mit einer Abszessbildung in Leber und Milz kommen. Im Mausmodell replizieren sich die Yersinien nach oraler Aufnahme im Dünndarm und invadieren in die Peyer-Plaques des terminalen Ileums. Zusätzlich kommt es zu einer Dissemination in Milz und Leber. Sowohl in den Peyer-Plaques als auch in Milz und Leber vermehren sich die Yersinien extrazellulär und bilden Mikroabszesse.

Zur Untersuchung des Invasionsprozesses, der Abszessbildung und Dissemination wurden Yersinien mit den Reportergenen GFP (*green fluorescent protein*) und RFP (*red fluorescent protein*) markiert und anschließend in Mausinfektionsversuchen eingesetzt. In der Vergangenheit hatten sich Hinweise darauf ergeben, dass die von *Y. enterocolitica* in den Peyer-Plaques, Milzen und Lebern gebildeten Abszesse jeweils durch Replikation einer einzelnen Yersinie entstehen. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Bei einer Infektion der Mäuse mit rot und grün fluoreszierenden Yersinien im Verhältnis 1:1 entstanden in den Peyer-Plaques und inneren Organen der Mäuse unabhängig von der Infektionsdosis stets nur einfarbige, also monoklonale Abszesse. Diese Beobachtung eröffnete die Möglichkeit, durch eine mikroskopische Quantifizierung der monoklonalen Mikroabszesse die Anzahl der in die einzelnen Peyer-Plaques invadierten abszessbildenden Yersinien genau zu bestimmen. Bei dieser Quantifizierung fiel zum einen auf, dass sehr hohe Infektionsdosen von mindestens 10^9 Bakterien notwendig waren, um eine reproduzierbare Besiedlung aller Peyer-Plaques einer Maus durch die Yersinien zu ermöglichen. Dies legt den Schluss nahe, dass der Kontakt der Yersinien mit den translozierenden M-Zellen der Peyer-Plaques *in vivo* ein sehr seltenes Ereignis ist. Weiterhin zeigte sich, dass selbst bei der hohen Infektionsdosis von 10^9 Yersinien nur durchschnittlich ein bis maximal vier Mikroabszesse in den einzelnen Peyer-Plaques entstanden, was aufgrund der Monoklonalität der Abszesse einer Etablierung von ein bis vier Yersinien pro Peyer-Plaque entsprach. Im Gegensatz zu den

Peyer-Plaques kam es in den Milzen und Lebern zur Ausbildung zahlreicher monoklonaler Mikroabszesse. Die auffällig niedrige Abszesszahl in den Peyer-Plaques könnte einerseits bedingt sein durch eine klonale Invasion von *Y. enterocolitica* (d.h. es gelangen nur wenige Yersinien vom Darmlumen in die Peyer-Plaques). Andererseits wäre es möglich, dass im Rahmen einer Infektion zunächst viele *Yersinia*-Bakterien in die einzelnen Peyer-Plaques invadieren, ein Großteil dieser Erreger jedoch rasch durch in die Peyer-Plaques einströmende Immunzellen eliminiert wird. Die Abszessbildung in den Peyer-Plaques ginge dann von einigen wenigen überlebenden Yersinien aus. Da bekannt ist, dass neutrophile Granulozyten eine entscheidende Rolle bei der Elimination von Yersinien in der Frühphase einer Infektion spielen, wurden zur weiteren Untersuchung dieser Fragestellung Infektionsversuche mit neutropenen und p47^{phox}^{-/-} - Mäusen (Mäuse mit einer mutationsbedingten Störung des oxidativen *bursts* neutrophiler Granulozyten) durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die Abszesszahlen in den Peyer-Plaques immunsupprimierter und immunkompetenter Mäuse identisch waren. Dies spricht gegen das Szenario einer massiven Yersinieninvasion in die Peyer-Plaques mit nachfolgender Elimination der Erreger durch einströmende Immunzellen. Vielmehr legen die vorliegenden Ergebnisse den Schluss nahe, dass trotz hoher Keimzahlen im Dünndarm tatsächlich nur sehr wenige (1 - 4) *Yersinia*-Bakterien in die einzelnen Peyer-Plaques gelangen und dort zur Entstehung von Mikroabszessen führen. Durch die Analyse der Abszesszahlen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Infektionsverlauf konnte zudem erstmals gezeigt werden, dass sich der Invasionsprozess nicht kontinuierlich im Infektionsverlauf sondern hauptsächlich in einem Zeitfenster zu Beginn der Infektion, wahrscheinlich innerhalb der ersten zwei Tage abspielt. Danach können sich die Yersinien zwar noch im Darm replizieren, aber offensichtlich nur noch sehr eingeschränkt in Peyer-Plaques invadieren.

Die o.g. Ergebnisse warfen die Frage auf, welche limitierenden Faktoren für das Phänomen der klonalen Invasion verantwortlich sind. In weiteren Versuchen stellte sich heraus, dass sowohl wirtsspezifische Faktoren als auch Veränderungen der Yersinien während ihrer Replikation im Dünndarm in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen.

Durch sequentielle Infektionen von Mäusen mit GFP- und RFP-markierten Yersinien konnte gezeigt werden, dass bereits abszedierte Peyer-Plaques in der Regel nicht von weiteren Yersinien besiedelt werden. Eine Wirtsreaktion in diesen Peyer-Plaques scheint eine weitere Invasion von Erregern aus dem Darmlumen oder auch ihre Etablierung in den Peyer-Plaques zu verhindern. Eine Beteiligung neutrophiler Granulozyten an diesen Vorgängen konnte ausgeschlossen werden. Ob andere Immunzellen oder Veränderungen der translozierenden M-Zellen nach einer Infektion ursächlich sind, bleibt zu klären.

Mittels Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass Yersinien entgegen bisheriger Annahmen die Invasin-Expression unter den im Dünndarm herrschenden Wachstumsbedingungen herunterregulieren und dass Serinproteasen im Darm innerhalb kurzer Zeit zu einer proteolytischen Degradierung des von den Yersinien außerhalb des Wirtsorganismus gebildeten Invasins führen. Weder für *Y. enterocolitica* noch für andere enteropathogene Bakterien ist bislang eine derartige Degradierung eines Virulenzfaktors durch Darmproteasen beschrieben worden. Invasin gilt als der wichtigste Invasionsfaktor der Yersinien, doch die Ergebnisse dieser Arbeit legen den Schluss nahe, dass der effektive Invasin-abhängige Invasionsmechanismus auf ein kurzes Zeitfenster von wenigen Stunden nach Aufnahme der Yersinien beschränkt ist, in dem sich das von den Erregern außerhalb des Wirtsorganismus gebildete Invasin noch in intakter Form auf der Bakterienoberfläche befindet. In einem Zellkultur-Invasions-Assay zeigte sich, dass die *in vitro* - Proteolyse von Invasin durch eine Behandlung von Yersinien mit Trypsin oder auch Darmflüssigkeit nicht infizierter Mäuse zu einer deutlichen Attenuierung der Erreger führte. Dies spricht stark für eine infektionsbiologische Relevanz der *in vivo* beobachteten Invasin-Degradierung.

Literaturverzeichnis

1. **Andersson, K., K. E. Magnusson, M. Majeed, O. Stendahl, and M. Fallman.** 1999. *Yersinia pseudotuberculosis*-induced calcium signaling in neutrophils is blocked by the virulence effector YopH. *Infect. Immun.* **67**:2567-2574.
2. **Autenrieth, I. B. and R. Firsching.** 1996. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J. Med. Microbiol.* **44**:285-294.
3. **Autenrieth, I. B., U. Vogel, S. Preger, B. Heymer, and J. Heesemann.** 1993. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in euthymic and T-cell-deficient athymic nude C57BL/6 mice: comparison of time course, histomorphology, and immune response. *Infect. Immun.* **61**:2585-2595.
4. **Bach, A.** 2007. Max-von-Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München. Dissertation: Analyse der *Yersinia*-Infektion im Mausmodell mittels Fluoreszenzproteinmarkierung.
5. **Bagg, A. and J. B. Neilands.** 1987. Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol. Rev.* **51**:509-518.
6. **Balligand, G., Y. Laroche, and G. Cornelis.** 1985. Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. *Infect. Immun.* **48**:782-786.
7. **Barnes, P. D., M. A. Bergman, J. Mecsas, and R. R. Isberg.** 2006. *Yersinia pseudotuberculosis* disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine. *J. Exp. Med.* **203**:1591-1601.
8. **Baumler, A., R. Koebnik, I. Stojiljkovic, J. Heesemann, V. Braun, and K. Hantke.** 1993. Survey on newly characterized iron uptake systems of *Yersinia enterocolitica*. *Zentralbl. Bakteriol.* **278**:416-424.
9. **Baumler, A. J. and K. Hantke.** 1992. Ferrioxamine uptake in *Yersinia enterocolitica*: characterization of the receptor protein FoxA. *Mol. Microbiol.* **6**:1309-1321.
10. **Bevis, B. J. and B. S. Glick.** 2002. Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). *Nat. Biotechnol.* **20**:83-87.
11. **Birnboim, H. C. and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.
12. **Bliska, J. B. and D. S. Black.** 1995. Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. *Infect. Immun.* **63**:681-685.

13. **Bliska, J. B. and S. Falkow.** 1992. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**:3561-3565.
14. **Bockemuhl, J. and P. Roggentin.** 2004. Intestinal yersiniosis. Clinical importance, epidemiology, diagnosis & prevention. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. **47**:685-691.
15. **Boelaert, J. R., H. W. van Landuyt, Y. J. Valcke, B. Cantinieaux, W. F. Lornoy, J. L. Vanherweghem, P. Moreillon, and J. M. Vandepitte.** 1987. The role of iron overload in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* bacteremia in hemodialysis patients. J. Infect. Dis. **156**:384-387.
16. **Boland, A. and G. R. Cornelis.** 1998. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. Infect. Immun. **66**:1878-1884.
17. **Bottone, E. J.** 1977. *Yersinia enterocolitica*: a panoramic view of a charismatic microorganism. CRC Crit. Rev. Microbiol. **5**:211-241.
18. **Bottone, E. J.** 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. Clin. Microbiol. Rev. **10**:257-276.
19. **Bottone, E. J.** 1999. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. Microbes. Infect. **1**:323-333.
20. **Braun, V., K. Hantke, and W. Koster.** 1998. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. Met. Ions. Biol. Syst. **35**:67-145.
21. **Brenner, D. J.** 1979. Speciation in *Yersinia*. Contrib. Microbiol. Immunol. **5**:33-43.
22. **Carniel, E., I. Guilvout, and M. Prentice.** 1996. Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. J. Bacteriol. **178**:6743-6751.
23. **Carter, P. B.** 1975. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice. Infect. Immun. **11**:164-170.
24. **Carter, P. B. and F. M. Collins.** 1974. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in mice: kinetics of growth. Infect. Immun. **9**:851-857.
25. **Chambers, C. E. and P. A. Sokol.** 1994. Comparison of siderophore production and utilization in pathogenic and environmental isolates of *Yersinia enterocolitica*. J. Clin. Microbiol. **32**:32-39.
26. **Chandler, N. D. and M. T. Parisi.** 1994. Radiological case of the month. *Yersinia enterocolitica* masquerading as appendicitis. Arch. Pediatr. Adolesc. Med. **148**:527-528.
27. **China, B., M. P. Sory, B. T. N'Guyen, M. de Bruyere, and G. R. Cornelis.** 1993. Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. Infect. Immun. **61**:3129-3136.

28. **Clark, M. A., B. H. Hirst, and M. A. Jepson.** 1998. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect. Immun.* **66**:1237-1243.
29. **Clark, M. A. and M. A. Jepson.** 2003. Intestinal M cells and their role in bacterial infection. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**:17-39.
30. **Conlan, J. W.** 1997. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **65**:630-635.
31. **Cormack, B. P., R. H. Valdivia, and S. Falkow.** 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**:33-38.
32. **Cornelis, G. R.** 1994. *Yersinia* pathogenicity factors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **192**:243-263.
33. **Cornelis, G. R.** 1998. The *Yersinia* deadly kiss. *J. Bacteriol.* **180**:5495-5504.
34. **Cornelis, G. R.** 2002. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:742-752.
35. **Cornelis, G. R. and H. Wolf-Watz.** 1997. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* **23**:861-867.
36. **Cover, T. L. and R. C. Aber.** 1989. *Yersinia enterocolitica*. *N. Engl. J. Med.* **321**:16-24.
37. **de Koning, J., J. Heesemann, J. A. Hoogkamp-Korstanje, J. J. Festen, P. M. Houtman, and P. L. van Oijen.** 1989. *Yersinia* in intestinal biopsy specimens from patients with seronegative spondyloarthropathy: correlation with specific serum IgA antibodies. *J. Infect. Dis.* **159**:109-112.
38. **Delor, I. and G. R. Cornelis.** 1992. Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect. Immun.* **60**:4269-4277.
39. **Denecker, G., S. Totemeyer, L. J. Mota, P. Troisfontaines, I. Lambermont, C. Youta, I. Stainier, M. Ackermann, and G. R. Cornelis.** 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.
40. **Didierlaurent, A., J. C. Sirard, J. P. Kraehenbuhl, and M. R. Neutra.** 2002. How the gut senses its content. *Cell. Microbiol.* **4**:61-72.
41. **Eitel, J. and P. Dersch.** 2002. The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasin is repressed. *Infect. Immun.* **70**:4880-4891.
42. **Emody, L., J. Heesemann, H. Wolf-Watz, M. Skurnik, G. Kapperud, P. O'Toole, and T. Wadstrom.** 1989. Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J. Bacteriol.* **171**:6674-6679.

43. **Fallman, M., K. Andersson, S. Hakansson, K. E. Magnusson, O. Stendahl, and H. Wolf-Watz.** 1995. *Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. *Infect. Immun.* **63**:3117-3124.
44. **Finkelstein, R. A., C. V. Sciortino, and M. A. McIntosh.** 1983. Role of iron in microbe-host interactions. *Rev. Infect. Dis.* **5 Suppl 4**:S759-S777.
45. **Flugel, A., H. Schulze-Koops, J. Heesemann, K. Kuhn, L. Sorokin, H. Burkhardt, M. K. von der, and F. Emmrich.** 1994. Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. *J. Biol. Chem.* **269**:29732-29738.
46. **Forsberg, A., A. M. Viitanen, M. Skurnik, and H. Wolf-Watz.** 1991. The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **5**:977-986.
47. **Frederiksen, W.** 1964. A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria ("Bacterium enterocoliticum" and Pasteurella X). *Proc. 14th Scand. Congr. Path. Microbiol., Oslo, Norway* 103-104.
48. **Fredriksson-Ahomaa, M., U. Koch, C. Klemm, M. Bucher, and A. Stolle.** 2004. Different genotypes of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 strains widely distributed in butcher shops in the Munich area. *Int. J. Food Microbiol.* **95**:89-94.
49. **Giannasca, P. J., K. T. Giannasca, P. Falk, J. I. Gordon, and M. R. Neutra.** 1994. Regional differences in glycoconjugates of intestinal M cells in mice: potential targets for mucosal vaccines. *Am. J. Physiol.* **267**:G1108-G1121.
50. **Gibson, S. A., C. McFarlan, S. Hay, and G. T. Macfarlane.** 1989. Significance of microflora in proteolysis in the colon. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:679-683.
51. **Granfors, K., S. Jalkanen, R. von Essen, R. Lahesmaa-Rantala, O. Isomaki, K. Pekkola-Heino, R. Merilahti-Palo, R. Saario, H. Isomaki, and A. Toivanen.** 1989. *Yersinia* antigens in synovial-fluid cells from patients with reactive arthritis. *N. Engl. J. Med.* **320**:216-221.
52. **Granfors, K., R. Merilahti-Palo, R. Luukkainen, T. Mottonen, R. Lahesmaa, P. Probst, E. Marker-Hermann, and P. Toivanen.** 1998. Persistence of *Yersinia* antigens in peripheral blood cells from patients with *Yersinia enterocolitica* O:3 infection with or without reactive arthritis. *Arthritis Rheum.* **41**:855-862.
53. **Gripenberg-Lerche, C., L. Zhang, P. Ahtonen, P. Toivanen, and M. Skurnik.** 2000. Construction of urease-negative mutants of *Yersinia enterocolitica* serotypes O:3 and O:8: role of urease in virulence and arthritogenicity. *Infect. Immun.* **68**:942-947.
54. **Grosdent, N., I. Maridonneau-Parini, M. P. Sory, and G. R. Cornelis.** 2002. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect. Immun.* **70**:4165-4176.

55. **Grutzkau, A., C. Hanski, H. Hahn, and E. O. Riecken.** 1990. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* **31**:1011-1015.
56. **Haag, H., K. Hantke, H. Drechsel, I. Stojiljkovic, G. Jung, and H. Zahner.** 1993. Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J. Gen. Microbiol.* **139**:2159-2165.
57. **Hamburger, Z. A., M. S. Brown, R. R. Isberg, and P. J. Bjorkman.** 1999. Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. *Science* **286**:291-295.
58. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
59. **Handley, S. A., R. D. Newberry, and V. L. Miller.** 2005. *Yersinia enterocolitica* invasin-dependent and invasin-independent mechanisms of systemic dissemination. *Infect. Immun.* **73**:8453-8455.
60. **Hanski, C., U. Kutschka, H. P. Schmoranzer, M. Naumann, A. Stallmach, H. Hahn, H. Menge, and E. O. Riecken.** 1989. Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect. Immun.* **57**:673-678.
61. **Hanski, C., M. Naumann, H. Hahn, and E. O. Riecken.** 1989. Determinants of invasion and survival of *Yersinia enterocolitica* in intestinal tissue. An *in vivo* study. *Med. Microbiol. Immunol.(Berl)* **178**:289-296.
62. **Heesemann J.** 2001. Die Gattung *Yersinia*, p. 315-328. In Köhler W., Eggers H.J., Fleischer B., Marre R., and P. G. Pfister H. (eds.), *Medizinische Mikrobiologie*. Urban&Fischer Verlag, München Jena.
63. **Heesemann, J. and L. Grüter.** 1987. Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **40**:37-41.
64. **Heesemann, J., K. Hantke, T. Vocke, E. Saken, A. Rakin, I. Stojiljkovic, and R. Berner.** 1993. Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity. *Mol. Microbiol.* **8**:397-408.
65. **Heise, T. and P. Dersch.** 2006. Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:3375-3380.
66. **Hewstone, A. S. and G. P. Davidson.** 1972. *Yersinia enterocolitica* septicaemia with arthritis in a thalassaemic child. *Med. J. Aust.* **1**:1035-1038.
67. **Hoiczky, E., A. Roggenkamp, M. Reichenbecher, A. Lupas, and J. Heesemann.** 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.* **19**:5989-5999.

68. **Holmstrom, A., J. Petterson, R. Rosqvist, S. Hakansson, F. Tafazoli, M. Fallman, K. E. Magnusson, H. Wolf-Watz, and A. Forsberg.** 1997. YopK of *Yersinia pseudotuberculosis* controls translocation of Yop effectors across the eukaryotic cell membrane. *Mol. Microbiol.* **24**:73-91.
69. **Hoogkamp-Korstanje, J. A.** 1987. Antibiotics in *Yersinia enterocolitica* infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **20**:123-131.
70. **Inoue, T., K. Okamoto, T. Moriyama, T. Takahashi, K. Shimizu, and A. Miyama.** 1983. Effect of *Yersinia enterocolitica* ST on cyclic guanosine 3',5'-monophosphate levels in mouse intestines and cultured cells. *Microbiol. Immunol.* **27**:159-166.
71. **Isberg, R. R. and J. M. Leong.** 1990. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* **60**:861-871.
72. **Isberg, R. R., A. Swain, and S. Falkow.** 1988. Analysis of expression and thermoregulation of the *Yersinia pseudotuberculosis* *inv* gene with hybrid proteins. *Infect. Immun.* **56**:2133-2138.
73. **Jackson, S. H., J. I. Gallin, and S. M. Holland.** 1995. The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *J. Exp. Med.* **182**:751-758.
74. **Jang, M. H., M. N. Kweon, K. Iwatani, M. Yamamoto, K. Terahara, C. Sasakawa, T. Suzuki, T. Nochi, Y. Yokota, P. D. Rennert, T. Hiroi, H. Tamagawa, H. Iijima, J. Kunisawa, Y. Yuki, and H. Kiyono.** 2004. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:6110-6115.
75. **Kampik, D., R. Schulte, and I. B. Autenrieth.** 2000. *Yersinia enterocolitica* invasins triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in *Yersinia* infections. *Infect. Immun.* **68**:2484-2492.
76. **Kerschen, E. J., D. A. Cohen, A. M. Kaplan, and S. C. Straley.** 2004. The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. *Infect. Immun.* **72**:4589-4602.
77. **Koning-Ward, T. F., A. C. Ward, E. L. Hartland, and R. M. Robins-Browne.** 1995. The urease complex gene of *Yersinia enterocolitica* and its role in virulence. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **13**:262-263.
78. **Kraehenbuhl, J. P. and M. R. Neutra.** 2000. Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**:301-332.
79. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
80. **Lahesmaa-Rantala, R., K. Granfors, H. Isomaki, and A. Toivanen.** 1987. *Yersinia* specific immune complexes in the synovial fluid of patients with *yersinia* triggered reactive arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **46**:510-514.

81. **Lee, L. A., A. R. Gerber, D. R. Lonsway, J. D. Smith, G. P. Carter, N. D. Puhr, C. M. Parrish, R. K. Sikes, R. J. Finton, and R. V. Tauxe.** 1990. *Yersinia enterocolitica* O:3 infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings. *N. Engl. J. Med.* **322**:984-987.
82. **Leong, J. M., R. S. Fournier, and R. R. Isberg.** 1990. Identification of the integrin binding domain of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. *EMBO J.* **9**:1979-1989.
83. **Leong, J. M., R. S. Fournier, and R. R. Isberg.** 1990. Identification of the integrin binding domain of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. *EMBO J.* **9**:1979-1989.
84. **Löffler, G.** 1998. Gastrointestinaltrakt, p. 995-1022. *In* G. Löffler and P. Petrides (eds.), *Biochemie und Pathobiochemie.* Berlin, Heidelberg, New York.
85. **Macfarlane, G. T., J. H. Cummings, and C. Allison.** 1986. Protein degradation by human intestinal bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **132**:1647-1656.
86. **Mantle, M., L. Basaraba, S. C. Peacock, and D. G. Gall.** 1989. Binding of *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus, and mucin. *Infect. Immun.* **57**:3292-3299.
87. **Marra, A. and R. R. Isberg.** 1996. Analysis of the role of invasin during *Yersinia pseudotuberculosis* infection of mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **797**:290-292.
88. **Melby, K., S. Slordahl, T. J. Gutteberg, and S. A. Nordbo.** 1982. Septicaemia due to *Yersinia enterocolitica* after oral overdoses of iron. *Br. Med. J. (Clin.Res.Ed)* **285**:467-468.
89. **Miller, V. L. and S. Falkow.** 1988. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.* **56**:1242-1248.
90. **Mills, S. D., A. Boland, M. P. Sory, S. P. van der, C. Kerbouch, B. B. Finlay, and G. R. Cornelis.** 1997. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:12638-12643.
91. **Monack, D. M., J. Meccas, N. Ghori, and S. Falkow.** 1997. *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:10385-10390.
92. **Myhre, B. A.** 1985. Bacterial contamination is still a hazard of blood transfusion. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **109**:982-983.
93. **Nakajima, R., V. L. Motin, and R. R. Brubaker.** 1995. Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. *Infect. Immun.* **63**:3021-3029.
94. **Neutra, M. R.** 1999. M cells in antigen sampling in mucosal tissues. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **236**:17-32.

95. **Neutra, M. R., A. Frey, and J. P. Kraehenbuhl.** 1996. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* **86**:345-348.
96. **Oellerich, M. F., Jacobi, C. A., Freund, S., Niedung, K., Bach, A., Heesemann J., and Truelzsch, K.** 2007. *Yersinia enterocolitica* infection of mice reveals clonal invasion and abscess formation. *Infect. Immun.* **75**:3802-3811.
97. **Paerregaard, A., F. Espersen, O. M. Jensen, and M. Skurnik.** 1991. Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. *Infect. Immun.* **59**:253-260.
98. **Pepe, J. C., J. L. Badger, and V. L. Miller.** 1994. Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* inv gene. *Mol. Microbiol.* **11**:123-135.
99. **Pepe, J. C. and V. L. Miller.** 1990. The *Yersinia enterocolitica* inv gene product is an outer membrane protein that shares epitopes with *Yersinia pseudotuberculosis* invasin. *J. Bacteriol.* **172**:3780-3789.
100. **Pepe, J. C. and V. L. Miller.** 1993. *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:6473-6477.
101. **Pepe, J. C., M. R. Wachtel, E. Wagar, and V. L. Miller.** 1995. Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infect. Immun.* **63**:4837-4848.
102. **Pierson, D. E. and S. Falkow.** 1993. The ail gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. *Infect. Immun.* **61**:1846-1852.
103. **Pilz, D., T. Vocke, J. Heesemann, and V. Brade.** 1992. Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect. Immun.* **60**:189-195.
104. **Rakin, A., E. Saken, D. Harmsen, and J. Heesemann.** 1994. The pesticin receptor of *Yersinia enterocolitica*: a novel virulence factor with dual function. *Mol. Microbiol.* **13**:253-263.
105. **Rao, M. C., S. Guandalini, W. J. Laird, and M. Field.** 1979. Effects of heat-stable enterotoxin of *Yersinia enterocolitica* on ion transport and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate metabolism in rabbit ileum. *Infect. Immun.* **26**:875-878.
106. **Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl, and P. Ricciardi-Castagnoli.** 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* **2**:361-367.
107. **Revell, P. A. and V. L. Miller.** 2001. *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**:159-164.
108. **Robert Koch-Institut.** 2006. Ausgewählte Zoonosen im Jahr 2005: Durch Lebensmittel übertragbare bakterielle gastrointestinale Infektionen. *Epid. Bull.* **41**:355.

109. **Robins-Browne, R. M., C. S. Still, M. D. Miliotis, and H. J. Koornhof.** 1979. Mechanism of action of *Yersinia enterocolitica* enterotoxin. *Infect. Immun.* **25**:680-684.
110. **Roggenkamp, A., H. R. Neuberger, A. Flugel, T. Schmoll, and J. Heesemann.** 1995. Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol. Microbiol.* **16**:1207-1219.
111. **Roggenkamp, A., K. Ruckdeschel, L. Leitritz, R. Schmitt, and J. Heesemann.** 1996. Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect. Immun.* **64**:2506-2514.
112. **Rosqvist, R., A. Forsberg, M. Rimpilainen, T. Bergman, and H. Wolf-Watz.** 1990. The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol. Microbiol.* **4**:657-667.
113. **Ruckdeschel, K., A. Roggenkamp, S. Schubert, and J. Heesemann.** 1996. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect. Immun.* **64**:724-733.
114. **Sansonetti, P. J. and A. Phalipon.** 1999. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin. Immunol.* **11**:193-203.
115. **Scavizzi, M. R., M. Gayraud, M. J. Hornstein, A. M. Jupeau-Vessieres, F. D. Bronner, and A. Elbhar.** 1996. *In vitro* and *in vivo* activities of antibiotics on *Yersinia enterocolitica*. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**:1108-1109.
116. **Schesser, K., A. K. Spiik, J. M. Dukuzumuremyi, M. F. Neurath, S. Pettersson, and H. Wolf-Watz.** 1998. The Yop J locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: Yop J contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol. Microbiol.* **28**:1067-1079.
117. **Schmid, Y., G. A. Grassl, O. T. Buhler, M. Skurnik, I. B. Autenrieth, and E. Bohn.** 2004. *Yersinia enterocolitica* adhesin A induces production of interleukin-8 in epithelial cells. *Infect. Immun.* **72**:6780-6789.
118. **Schulte, R., G. A. Grassl, S. Preger, S. Fessele, C. A. Jacobi, M. Schaller, P. J. Nelson, and I. B. Autenrieth.** 2000. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J.* **14**:1471-1484.
119. **Schulte, R., S. Kerneis, S. Klinke, H. Bartels, S. Preger, J. P. Kraehenbuhl, E. Pringault, and I. B. Autenrieth.** 2000. Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta1 integrins apically expressed on M-like cells. *Cell. Microbiol.* **2**:173-185.

120. **Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, J. Heesemann, M. K. von der, and F. Emmrich.** 1992. Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic yersiniae to various types of collagen. *Infect. Immun.* **60**:2153-2159.
121. **Simonet, M., S. Richard, and P. Berche.** 1990. Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. *Infect. Immun.* **58**:841-845.
122. **Sing, A., A. Roggenkamp, A. M. Geiger, and J. Heesemann.** 2002. *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J. Immunol.* **168**:1315-1321.
123. **Skurnik, M., I. Bolin, H. Heikkinen, S. Piha, and H. Wolf-Watz.** 1984. Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia spp.* *J. Bacteriol.* **158**:1033-1036.
124. **Skurnik, M. and H. Wolf-Watz.** 1989. Analysis of the yopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia spp.* *Mol. Microbiol.* **3**:517-529.
125. **Stoddard, J. J., D. S. Wechsler, J. P. Nataro, and J. F. Casella.** 1994. *Yersinia enterocolitica* infection in a patient with sickle cell disease after exposure to chitterlings. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **16**:153-155.
126. **Stojiljkovic, I. and K. Hantke.** 1992. Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria. *EMBO J.* **11**:4359-4367.
127. **Stojiljkovic, I. and K. Hantke.** 1994. Transport of haemin across the cytoplasmic membrane through a haemin-specific periplasmic binding-protein-dependent transport system in *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **13**:719-732.
128. **Strobel, E., J. Heesemann, G. Mayer, J. Peters, S. Muller-Wehrich, and P. Emmerling.** 2000. Bacteriological and serological findings in a further case of transfusion-mediated *Yersinia enterocolitica* sepsis. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2788-2790.
129. **Tauxe, R. V., J. Vandepitte, G. Wauters, S. M. Martin, V. Goossens, P. De Mol, R. Van Noyen, and G. Thiers.** 1987. *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. *Lancet* **1**:1129-1132.
130. **Tennant, S. M., T. H. Grant, and R. M. Robins-Browne.** 2003. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **38**:127-137.
131. **Tertti, R., M. Skurnik, T. Vartio, and P. Kuusela.** 1992. Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect. Immun.* **60**:3021-3024.
132. **Toivanen, A., R. Lahesmaa-Rantala, T. H. Stahlberg, R. Merilahti-Palo, and K. Granfors.** 1987. Do bacterial antigens persist in reactive arthritis? *Clin. Exp. Rheumatol.* **5 Suppl 1**:S25-S27.

133. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4350-4354.
134. **Trulzsch, K., T. Sporleder, E. I. Igwe, H. Russmann, and J. Heesemann.** 2004. Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect. Immun.* **72**:5227-5234.
135. **Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, A. J. Baumler, S. Falkow, R. Valdivia, W. Brown, M. Le, R. Berggren, W. T. Parks, and F. C. Fang.** 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* **401**:804-808.
136. **Visser, L. G., A. Annema, and R. van Furth.** 1995. Role of Yops in inhibition of phagocytosis and killing of opsonized *Yersinia enterocolitica* by human granulocytes. *Infect. Immun.* **63**:2570-2575.
137. **Visser, L. G., P. S. Hiemstra, M. T. van den Barselaar, P. A. Ballieux, and R. van Furth.** 1996. Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes. *Infect. Immun.* **64**:1653-1658.
138. **Wachtel, M. R. and V. L. Miller.** 1995. *In vitro* and *in vivo* characterization of an ail mutant of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **63**:2541-2548.
139. **Wauters, G., S. Aleksic, J. Charlier, and G. Schulze.** 1991. Somatic and flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related species. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **12**:239-243.
140. **Wauters, G., K. Kandolo, and M. Janssens.** 1987. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **9**:14-21.
141. **Weinrauch, Y., D. Drujan, S. D. Shapiro, J. Weiss, and A. Zychlinsky.** 2002. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* **417**:91-94.
142. **Yersin, A.** 1894. La boubonique peste a Hong Kong. *Ann. Inst. Pasteur Paris* **8**:662-667.
143. **Young, V. B., S. Falkow, and G. K. Schoolnik.** 1992. The invasin protein of *Yersinia enterocolitica*: internalization of invasin-bearing bacteria by eukaryotic cells is associated with reorganization of the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **116**:197-207.
144. **Young, V. B., V. L. Miller, S. Falkow, and G. K. Schoolnik.** 1990. Sequence, localization and function of the invasin protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **4**:1119-1128.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ail	“attachment invasion locus”
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AT	Antitrypsin
BSA	“bovine serum albumin”
bzw.	beziehungsweise
C	Konzentration
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
cm	Zentimeter
Cm	Chloramphenicol
CO ₂	Kohlendioxid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ECL	“enhanced chemoluminescence”
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N',- tetraessigsäure
FAE	Follikelassoziiertes Epithel
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm oder relative Zentrifugalbeschleunigung
GALT	“gut associated lymphoid tissue”
GFP	“green fluorescent protein”
GM-CSF	“granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
HCl	Hydrochlorid
HLA	“human leukocyte antigen”
HPI	“high pathogenicity island”
HRP	“horseradish peroxidase”
HSP	“heat shock protein“
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Inv	Invasin
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LcrV	“low calcium response V”
LD50	lethale Dosis 50
M	Molar
μF	Mikro-Faraday
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

M	molar
mM	millimolar
m/v	Masse/Volumen
mA	Milliampere
MCP-1	“monocyte chemoattractant protein 1”
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOI	“multiplicity of infection“
msec	Millisekunde
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt
Ω	Ohm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	“phosphate buffered saline”
pH	Potenz der Wasserstoffionenkonzentration
p.i.	nach Infektion
PP	Peyer-Plaques
PPs	Peyer-Plaques
pYV	<i>Yersinia</i> Virulenzplasmid
RFP	“red fluorescent protein”
s.	siehe
S.	Seite
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	“Tris buffered saline”
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethyldiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen (Vol %)
Y.	<i>Yersinia</i>
YadA	<i>Yersinia</i> -Adhäsion A
Yops	“ <i>Yersinia</i> outer proteins”
Ysc	“Yop secretion”
Yst	<i>Yersinia</i> Enterotoxin
z.B.	zum Beispiel

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Mark Friedrich Oellerich

Geburtsdatum: 22.05.1979

Geburtsort: Hannover

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Ausbildung

1985 - 1989: Grundschule Grimsehlweg, Hannover

1989 - 1991: Orientierungsstufe Schulzentrum Luerstraße, Hannover

1991: Kaiser-Wilhelms-Gymnasium, Hannover

1991 - 1998: Theodor-Heuss-Gymnasium, Göttingen
Abitur

1996: Philips-Exeter-Academy, Exeter (USA)

1998 - 1999: Wehrdienst: Schiffahrtsmedizinisches Institut der Marine,
Kronshagen

1999 - 2001: Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität,
Kiel

Physikum

ab 2002: Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität, München

2003: 1. Staatsexamen

2005: 2. Staatsexamen

2006: 3. Staatsexamen
Approbation als Arzt

seit Jan. 2007: Assistenzarzt an der 1. Med. Klinik des Klinikums rechts der Isar
der TU München (Direktor: Prof. Dr. A. Schömig)

Wissenschaftliche Tätigkeit

- 2002: Hämatologie/Onkologie, Medizinische Klinik Innenstadt, LMU München (Direktor: Prof. Dr. B. Emmerich)
- 2003 - 2006: Dissertation: „Invasion und Dissemination von *Yersinia enterocolitica* im Mausmodell“ am Max von Pettenkofer-Institut der LMU München (Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann)
- Stipendiat des DFG-Graduiertenkollegs „Infektion und Immunität“ (2003-2004)
- seit 2007: Molekulare Kardiologie - Kardiovaskuläre Stammzellbiologie (Prof. Dr. K.-L. Laugwitz),
1. Med. Klinik des Klinikums rechts der Isar der TU München

München, den 01.04.2008

Publikationsverzeichnis

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen:

1. **Oellerich MF.**, Jacobi CA., Freund S., Niedung K., Bach A., Heesemann J., Trülsch K., *Yersinia enterocolitica* infection of mice reveals clonal invasion and abscess formation. (Infect. Immun., 75(8):3802-3811, 2007)
2. Trülsch K., **Oellerich MF.**, Heesemann J., Invasion and dissemination of *Yersinia enterocolitica* in the mouse infection model. (Adv. Exp. Med. Biol., 603:279-285, 2007)

Weitere Publikationen:

3. Schmidmaier R., **Oellerich M.**, Baumgart J., Emmerich B., Meinhardt G., Treosulfan-induced apoptosis in acute myeloid leukemia cells is accompanied by translocation of protein kinase C delta and enhanced by bryostatin-1. (J. Exp. Hematol., 32(1):76-86, 2004)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs „Infektion und Immunität“ durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann und Herrn PD Dr. med. Konrad Trülsch für die exzellente Betreuung und kontinuierliche Förderung dieses Projektes.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Frau Katy Niedung für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor sowie allen anderen Menschen, insbesondere meiner Familie, die mich auf dem Weg vom Beginn bis zur Fertigstellung dieser Arbeit begleitet und fortwährend unterstützt haben.