Einfluss des p38/MK2-Signalweges auf die Zytotoxizität von RIP1 bei Yersinien-infizierten Makrophagen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

> Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

> > vorgelegt von

Julia Gropengießer, geb. Nawrodt

Hamburg, 2017

Dissertationsgutachter:	Prof. Dr. med. Klaus Ruckdeschel
	Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Streit

Datum der Disputation:23.02.2018

Vorsitzende der Disputation: Prof. Dr. Julia Kehr

Disputationsgutachter:PD Dr. Andreas Pommerening-RöserProf. Dr. med. Klaus Ruckdeschel

Inhaltsverzeichnis

A	bkürzun	gsverzeichnis	V
A	bbildung	sverzeichnis	X
Т	abellenve	erzeichnis	XII
1	Zusam	nmenfassung	1
2	Einleit	ung	5
	2.1 Di	e Gattung Yersinia	5
	2.2 Ye	ersinia enterocolitica	6
	2.3 Cl	nromosomal kodierte Virulenzfaktoren	8
	2.4 Pl	asmid kodierte Virulenzfaktoren	10
	2.4.1	YadA	10
	2.4.2	Das Typ-III-Sekretionssystem	11
	2.4.3	YopH - eine Tyrosin-Phosphatase	13
	2.4.4	YopE - ein GTPase-aktivierendes Protein	14
	2.4.5	YopT - eine Cysteinprotease	14
	2.4.6	YopO/YpkA - eine Serin/Threonin-Proteinkinase	14
	2.4.7	YopM - ein Protein mit Leucin-reichen Sequenzen	15
	2.4.8	YopP/YopJ - eine Acetyltransferase	16
	2.5 Ye	opP und der apoptotische Zelltod	
	2.6 W	eitere Arten des programmierten Zelltodes	
	2.7 Di	e angeborene Immunität	23
	2.7.1	Toll-like Rezeptoren (TLR)	
	2.7.2	Die Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase-(MAPK)-Signalwege	
	2.7.	2.1Der p38α-Signalweg	
	2.7.	2.2 Die MAPK-aktivierte Protein Kinase-2 (MAPKAPK, MK2)	
	2.7.3	Die RIP1-Kinase	
3	Zielset	zung	
4	Mater	ial und Methoden	
	4.1 M	aterialien	
	4.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	
	4.1.2	Chemikalien	
	4.1.3	Labormaterial und Zellkulturmaterial	
	4.1.4	Reagenzien und Kits	
	4.1.5	Antibiotika	

4.1.6	Enz	zyme	39
4.1.7	Inhibitoren und Stimulatoren		39
4.1.8	Antikörper		
4.1.9	Oli	gonukleotide	41
4.1.10	Pla	smide und Vektoren	41
4.1.11	Bal	cterienstämme	43
4.1.12	Zel	llinien und Zellkulturmedien	43
4.1.13	Lös	sungen und Puffer	46
4.1.1	3.1	Allgemeine Lösungen und Puffer	46
4.1.1	3.2	Puffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) un Western-Blot	id den 46
4.1.1	3.3	Puffer für die Immunpräzipitation bzw. Ko-Immunpräzipitation von Proteinen aus Zellen	47
4.1.1	3.4	Puffer für in vitro Kinase-Assay	48
4.1.1	3.5	Puffer für Ac-DEVD-AMC-Assay	49
4.1.1	3.6	Puffer für die Herstellung kompetenter Bakterien	49
4.1.14	Me	dien für die Bakterienkultur	50
4.1.15	Vei	wendete Software	50
4.2 Me	ethod	en	50
4.2.1	Mo	lekularbiologische Methoden	50
4.2.1	.1	Plasmidpräparation	50
4.2.1	.2	Konzentrationsbestimmung von DNA	51
4.2.1	.3	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	51
4.2.1	.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
4.2.1			50
	.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	52
4.2.1	5 6	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen oder aus Agarose-Gelen	52 52
4.2.1 4.2.1	5 6 7	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen oder aus Agarose-Gelen Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	52 52 52
4.2.1 4.2.1 4.2.1	5 6 7 8	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen oder aus Agarose-Gelen Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten Ligation von DNA-Fragmenten	52 52 52 53
4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1	.5 .6 .7 .8 .9	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen oder aus Agarose-Gelen Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten Ligation von DNA-Fragmenten DNA-Sequenzierung	52 52 52 53 53
4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1	5 6 7 8 9 10	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen oder aus Agarose-Gelen Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten Ligation von DNA-Fragmenten DNA-Sequenzierung Mutagenese von Plasmiden mit Hilfe des Q5® Site-Directed Mutagen Kits	52 52 52 53 53 esis 53
4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1	.5 .6 .7 .8 .9 .10	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen oder aus Agarose-Gelen Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten Ligation von DNA-Fragmenten DNA-Sequenzierung Mutagenese von Plasmiden mit Hilfe des Q5® Site-Directed Mutagen Kits Klonierung mit Hilfe des In-Fusion® HD Cloning Kits	52 52 52 53 53 esis 53
4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1	5 6 7 8 9 10 11 Mil	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen oder aus Agarose-Gelen Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten Ligation von DNA-Fragmenten DNA-Sequenzierung Mutagenese von Plasmiden mit Hilfe des Q5® Site-Directed Mutagen Kits Klonierung mit Hilfe des In-Fusion® HD Cloning Kits crobiologische und zellbiologische Methoden	52 52 52 53 53 esis 53 54 56
4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.1 4.2.2 4.2.2	5 6 7 8 9 10 11 Mil	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen oder aus Agarose-Gelen Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten Ligation von DNA-Fragmenten DNA-Sequenzierung Mutagenese von Plasmiden mit Hilfe des Q5® Site-Directed Mutagen Kits Klonierung mit Hilfe des In-Fusion® HD Cloning Kits crobiologische und zellbiologische Methoden Kultivierung von Bakterien	52 52 52 53 53 esis 53 54 56

4.2.2.3	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	. 56
4.2.2.4	Hitzeschock-Transformation von chemisch kompetenten Bakterien	. 57
4.2.2.5	Kultivierung von Säugerzellen	. 57
4.2.2.6	Kryokonservierung von Zellen und Reaktivierung von Kryokulturen	. 57
4.2.2.7	Zellzahlbestimmung	. 58
4.2.2.8	Isolierung und Kultivierung von primären Knochenmarks-Makrophagen	. 58
4.2.2.9	Transfektion von Zellen mit Polyethylenimin (PEI)	. 59
4.2.2.10	Infektion und Stimulation von Zellen	. 59
4.2.2.11	Herstellung von lentiviralen Partikeln aus HEK293 Zellen	. 60
4.2.2.12	Transduktion von Zellen mit lentiviralen Partikeln	. 61
4.2.2.13	Bestimmung des Zelltodes mittels SYTOX® Green Färbung	. 61
4.2.3 Pro	oteinbiochemische Methoden	62
4.2.3.1	Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen	62
4.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	62
4.2.3.3	Bestimmung der Caspase-3-Aktivität mittels Ac-DEVD-AMC-Assay	. 63
4.2.3.4	Immunpräzipitation von ubiquitiniertem RIP1	. 64
4.2.3.5	Ko-Immunpräzipitation von Proteinen aus Zellen	. 64
4.2.3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	. 65
4.2.3.7	Western-Blot Analysen und Immundetektion	. 66
4.2.3.8	In vitro Kinase-Assay	. 67
4.2.3.9	Anfertigung eines Autoradiogramms	. 68
Ergebnisse		. 69
5.1 Die Rol	lle von RIP1 bei Yersinia-induziertem Zelltod von Makrophagen	. 69
5.1.1 Y.	enterocolitica vermittelt RIP1-abhängigen Zelltod bei Makrophagen	. 69
5.1.2 Yo	pP löst RIP1-abhängige Apoptose aus	.71
5.1.3 Be	i RIP1-negativen Zellen führt eine Yersinien-Infektion zu Nekroptose	73
5.1.4 Die RI	e Inhibition von TAK1 oder IKKβ induziert bei stimulierten Makrophagen P1-abhängigen Zelltod	75
5.1.5 TA	K1- oder IKKβ-Hemmung vermittelt Apoptose bei infizierten Makrophag	gen
		.77
5.2 YopP in	nhibiert die RIP1-Phosphorylierung bei Makrophagen	. 79
5.2.1 Yo	pP unterdrückt die p38/MK2-induzierte RIP1-Phosphorylierung bei	70
522 D:	a Aktivianung das zutotovischen DID1 Signalwages verläuft hei Versinien	. 17
J.2.2 Die Inf	ektion TNFR1-unabhängig	. 81

5

5.3 p38	3/MK2 haben einen hemmenden Effekt auf die zytotoxische RIP1-Aktivität83
5.3.1	Die alleinige Inhibition des p38/MK2-Signalweges hat keine signifikante Zelltod fördernde Wirkung
5.3.2	p38/MK2 und IKKβ üben gemeinsam einen inhibitorischen Effekt auf RIP1- abhängigen Zelltod aus
5.3.3	Die Inhibition von IKKβ und MK2 verhindert die Bildung eines proapoptotischen RIP1-Komplexes
5.4 S32	21 und S336: Zwei potentielle MK2 Phosphorylierungsstellen in RIP1
5.4.1	Phosphorylierung an S321 und S336 inhibieren das zytotoxische Potential von RIP1
5.4.2	Die RIP1-Kinaseaktivität ist notwendig für RIP1-abhängigen Zelltod94
5.4.3	Die MK2-abhängige RIP1-Phosphorylierung nimmt Einfluss auf die Autophosphorylierung und Ubiquitinierung von RIP196
6 Diskuss	sion101
6.1 Die	Rolle von RIP1 beim Yersinien-vermittelten Zelltod101
6.2 De	r Einfluss von p38/MK2 auf RIP1-abhängigen Zelltod104
6.3 Ye	rsinien-induzierte Apoptose: Virulenzmechanismus oder Immunantwort? 111
Literaturve	rzeichnis113
Danksagun	g134
Vorveröffei	ntlichungen
Eidesstattli	che Versicherung136

Abkürzungsverzeichnis

А	Adenin oder Alanin
Ac-DEVD-AMC	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-Methylcoumarin
Ail	attachment invasion locus
Amp	Ampicillin
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
ATF1	activating transcription factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
A20	TNFα-induced protein 3
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
С	Cytosin
ca.	circa
CARD	caspase recruitment domain
Caspase	cysteinyl-aspartate specific protease
CD	cluster of differentiation
Cdc42	cell division cycle 42
(c)FLIP	(cellular) Fas-associated death domain-like IL-1-converting
	enzyme-inhibitory protein
(c)GMP	(cyclisches) Guanosinmonophosphat
(c)IAP	(cellular) inhibitor of apoptosis
CREB	cAMP response element-binding protein
CrmA	cytokine response modifier A
CYLD	cylindromatosis
D	Asparaginsäure
DAMP	damage-associated molecular patterns
DD	Todesdomäne, death domain
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEAD-Box	Asp-Glu-Ala-Asp-Box
DED	death effector domain
DISC	death-inducing signalling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholat
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	extracellular signal related kinase

FADDFas-associated protein with death domainFAKfocal adhesion kinaseFBSfetal bovine serumFBSfetal bovine serumFyuAferric yersiniabactin uptakeGGuaninGAPGTPase-aktivierendes ProteinGDIGDP dissociation inhibitorGDPGuanosindiphosphatGFPGrün fluoreszierendes ProteinGluGlutaminsäureGTPGuanosintiphosphatHEX293human embryonic kidney 293HEPESN-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethanolsulfonsäureHLA-B27Human Leukocyte Antigen-B27HMGB1high-pathogenicity islandHRPhorseradish peroxidaseHSPHitzeschockproteinICAM1intercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1IQ motif-containing GTPase activating proteinIKKIkB-KinaseIkBinhibitor of kBILInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanKanamycinKBLuria-BertaniLBPLPS-bindendes ProteinLBRLuria-BertaniLBRLuria-BertaniLBRLipopolysaccharidLRRLipopolysaccharidLRRLipopolysaccharidLRRLipopolysaccharidLRRLysinNamoSanamycinLRRLipopolysaccharidLRRLipopolysaccharid </th <th>et al.</th> <th>et altera (und andere)</th>	et al.	et altera (und andere)
FAKfocal adhesion kinaseFBSfetal bovine serumFBSfetric versiniabactin uptakeGGuaninGGuaninGAPGTPasc-aktivierendes ProteinGDIGDP dissociation inhibitorGDPGuanosindiphosphatGFPGrtin fluoreszierendes ProteinGluGlutaminsäureGTPGuanosintiphosphatHEK293human embryonic kidney 293HEEESN-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfonsäureHLA-B27Human Leukocyte Antigen-B27HMGB1high-pathogenicity islandHPIhigh-pathogenicity islandHRPhorseradish peroxidaseHSPHitzeschockproteinICAMIintercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1IQ motif-containing GTPase activating proteinIKKIRS*KinaseIkKInterleukinInvInvasinIPInmunoglobulinIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKLLysinKanamycinKDKinasedomäneKMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLPSLipopolysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysinnurin	FADD	Fas-associated protein with death domain
FBSfetal bovine serumFyuAferric yersiniabactin uptakeGGuaninGAPGTPase-aktivierendes ProteinGDIGDP dissociation inhibitorGDPGuanosindiphosphatGFPGrün fluoreszierendes ProteinGluGlutaminsäureGTPGuanosintiphosphatHEK293human embryonic kidney 293HEPESN-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfonsäureHLA-B27Human Leukocyte Antigen-B27HMGB1high mobility group protein1HPIhigh-pathogenicity islandHRPhorseradish peroxidaseHSPHitzeschockproteinICAM1intercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1IQ motif-containing GTPase activating proteinIKKIKB-KinaseIkAinterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanamycinKonchenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLBPLipopolysaccharidLRRlucime-rich repeatsLysinnurin	FAK	focal adhesion kinase
FyuAferric yersiniabactin uptakeGGuaninGAPGTPase-aktivierendes ProteinGDIGDP dissociation inhibitorGDPGuanosindiphosphatGFPGrün fluoreszierendes ProteinGluGlutaminsäureGTPGuanosintiphosphatHEK293human embryonic kidney 293HEPESN-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfonsäureHLA-B27Human Leukocyte Antigen-B27HMGB1high mobility group protein1HPIhigh-pathogenicity islandHRPhorseradish peroxidaseHSPHitzeschockproteinICAM1intercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1IQ motif-containing GTPase activating proteinIKKIKB-KinaseIRSinterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanamycinKochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLBPLipopolysaccharidLRRlipoplysaccharidLRRlipoplysaccharidLRRlipoplysaccharidLRRlipoplysaccharidLRRlipositaLRNlipoplysaccharidLRRlipoplysaccharidLRRliponitale repeatsLysinmutin	FBS	fetal bovine serum
GGuaninGAPGTPase-aktivierendes ProteinGDIGDP dissociation inhibitorGDPGuanosindiphosphatGFPGrün fluoreszierendes ProteinGluGlutaminsäureGTPGuanosintriphosphatHEK293human embryonic kidney 293HEPESN-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfonsäureHLA-B27Human Leukocyte Antigen-B27HMGB1high mobility group protein1HPIhigh-pathogenicity islandHRPhorseradish peroxidaseHSPHitzeschockproteinICAM1intercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1IQ motif-containing GTPase activating proteinIKKInterleukin1InvInterleukin2IRSinterferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKanKanamycinKanKinasedomäneKMMEysinKanKinasedomäneKMMLysinLBLuria-BertaniLBPLysinKanKinasedomäneKMMLysinLRFLipoplysaccharidLRRLucine-rich repeatsLysinLysinRALucine-rich repeatsLysinLysinRALysinRALysinRALysinRALysinRALysinRALysinRALysinRALysinRALysinRALysin	FyuA	ferric yersiniabactin uptake
GAPGTPase-aktivierendes ProteinGDIGDP dissociation inhibitorGDPGuanosindiphosphatGFPGrün fluoreszierendes ProteinGluGlutaminsäureGTPGuanosintriphosphatHEK293human embryonic kidney 293HEPESN-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfonsäureHLA-B27Human Leukocyte Antigen-B27HMGB1high nobility group protein1HPIhorseradish peroxidaseHSPHitzeschockproteinICAM1intercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1IQ motif-containing GTPase activating proteinIKKIkB-KinaseIkBinhibitor of xBILInterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationRAKLysinKanKanamycinKDKinasedomäneKAM1Lochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLBPLPS-bindendes ProteinLRRLuria-BertaniLBPLysin	G	Guanin
GDIGDP dissociation inhibitorGDPGuanosindiphosphatGFPGrün fluoreszierendes ProteinGluGlutaminsäureGTPGuanosintriphosphatHEK293human embryonic kidney 293HEEPESN-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfonsäureHLA-B27Human Leukocyte Antigen-B27HMGB1high-pathogenicity islandHPIhigh-pathogenicity islandHRPhorseradish peroxidaseHSPHitzeschockproteinICAMIintercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1IQ motif-containing GTPase activating proteinIKKIkB-KinaseIkBinhibitor of xBILInterleukinInvInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanKonchenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLPS-bindendes ProteinLSLPSLipopolysaccharidLRRLucia-erich repeatsLysinLipopolysaccharid	GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDPGuanosindiphosphatGFPGrün fluoreszierendes ProteinGluGlutaminsäureGTPGuanosintriphosphatHEK293human embryonic kidney 293HEPESN-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfonsäureHLA-B27Human Leukocyte Antigen-B27HMGB1high-pathogenicity islandHRPhorseradish peroxidaseHSPHitzeschockproteinICAM1intercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1 <i>Q motif-containing GTPase activating protein</i> IKKInFelexinaInvInterleukinInvInterleukinIRAKInterleukinIRAKLinterleukinIRAKLysinKALysinKALysinKanKanamycinKALysinKanKonchenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLPS-bindendes ProteinLipopolysaccharidLRRLipopolysaccharidLRRLysinRAKLipopolysaccharid	GDI	GDP dissociation inhibitor
GFPGrün fluoreszierendes ProteinGluGlutaminsäureGTPGuanosintriphosphatHEK293human embryonic kidney 293HEPESN-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfonsäureHLA-B27Human Leukocyte Antigen-B27HMGB1high mobility group protein1HPIhigh-pathogenicity islandHRPhorseradish peroxidaseHSPHitzeschockproteinICAM1intercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1IQ motif-containing GTPase activating proteinIKKIkB-KinaseIkBinhibitor of κBILInterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanKanamycinKDKinasechomäneKMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLBPPLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysinLipopolysaccharidLRRLeysin	GDP	Guanosindiphosphat
GluGlutaminsäureGTPGuanosintriphosphatHEK293human embryonic kidney 293HEPESN-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfonsäureHLA-B27Human Leukocyte Antigen-B27HMGB1high mobility group protein1HPIhigh-pathogenicity islandHRPhorseradish peroxidaseHSPHitzeschockproteinICAM1intercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1 <i>Q motif-containing GTPase activating protein</i> IKKIkB-KinaseILInterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanKanamycinKDKinasedomäneKMMKochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLBPLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysLysin	GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTPGuanosintriphosphatHEK293human embryonic kidney 293HEPESN-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfonsäureHLA-B27Human Leukocyte Antigen-B27HMGB1high mobility group protein1HPIhigh-pathogenicity islandHRPhorseradish peroxidaseHSPHitzeschockproteinICAM1intercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1IQ motif-containing GTPase activating proteinIKKIKB-KinaseILInterleukinInvInterleukinInvInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKanKanamycinKDKinasedomäneKMMLuria-BertaniLBPLuria-BertaniLBPLuria-BertaniLBPLysinKARKinasedomäneKMMKonchenmarks-MakrophagenLBLysinLRRLeucine-rich repeatsLysinLysinIRRLysinIRRLuria-BertaniLBPLipopolysaccharidLRRLysinInterleukin-RepeatsLysinLysin	Glu	Glutaminsäure
HEK293human embryonic kidney 293HEPESN-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfonsäureHLA-B27Human Leukocyte Antigen-B27HMGB1high mobility group protein1HPIhigh-pathogenicity islandHRPhorseradish peroxidaseHSPHitzeschockproteinICAM1intercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1IQ motif-containing GTPase activating proteinIKKIKB-KinaseIkBinhibitor of κBILInterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKAnKanamycinKDKinasedomäneKMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLBPLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysLysin	GTP	Guanosintriphosphat
HEPESN-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfonsäureHLA-B27Human Leukocyte Antigen-B27HMGB1high mobility group protein1HPIhigh-pathogenicity islandHRPhorseradish peroxidaseHSPHitzeschockproteinICAM1intercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1IQ motif-containing GTPase activating proteinIKKIKB-KinaseIkBinhibitor of κBILInterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKanKanamycinKDKinasedomäneKMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLBPLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLRRLeucine-rich repeatsLysinMurin	HEK293	human embryonic kidney 293
HLA-B27Human Leukocyte Antigen-B27HMGB1high mobility group protein1HMGB1high mobility group protein1HPIhigh-pathogenicity islandHRPhorseradish peroxidaseHSPHitzeschockproteinICAM1intercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1IQ motif-containing GTPase activating proteinIKKIKB-KinaseIkBinhibitor of κB ILInterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanKanamycinKDKinasedomäneKMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLSPLipopolysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysLysinmmurin	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfonsäure
HMGB1high mobility group protein1HPIhigh-pathogenicity islandHPIhigh-pathogenicity islandHRPhorseradish peroxidaseHSPHitzeschockproteinICAM1intercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1 <i>IQ motif-containing GTPase activating protein</i> IKKIxB-KinaseIkBinhibitor of κBILInterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanKanamycinKDKinasedomäneKMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLSPLipopolysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysLysin	HLA-B27	Human Leukocyte Antigen-B27
HPIhigh-pathogenicity islandHRPhorseradish peroxidaseHRPhorseradish peroxidaseHSPHitzeschockproteinICAM1intercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1IQ motif-containing GTPase activating proteinIKKixB-KinaseIkBinhibitor of κBILInterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKanKanamycinKDKinasedomäneKMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLPSLipopolysaccharidLPSLipopolysaccharidLPSLysinMathematicaStroneresonseLPSLysin	HMGB1	high mobility group protein1
HRPhorseradish peroxidaseHSPhorseradish peroxidaseHSPHitzeschockproteinICAM1intercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1IQ motif-containing GTPase activating proteinIKKikB-KinaseIkBinhibitor of kBILInterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKKanamycinKanKanamycinKDKinasedomäneKMMLuria-BertaniLBPLUria-BertaniLPSLipopolysaccharidLPSLipopolysaccharidLPSLysinmmurin	HPI	high-pathogenicity island
HSPHitzeschokyroteinICAMIintercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAPI <i>IQ motif-containing GTPase activating protein</i> IKKIkB-KinaseIkKinhibitor of κBILInterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanKanamycinKMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLPSLipopolysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysLysin	HRP	horseradish peroxidase
ICAM1intercellular adhesion molecule-1IgImmunoglobulinIQGAP1IQ motif-containing GTPase activating proteinIKKIKB-KinaseIKBinhibitor of κBILInterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKC-Jun N-terminale KinaseKanKanamycinKDKinasedomäneKMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLPSLipoplysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysLysin	HSP	Hitzeschockprotein
IgImmunoglobulinIQGAP1IQ motif-containing GTPase activating proteinIKKIKB-KinaseIKBinhibitor of KBILInterleukinInvInterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKanKanamycinKADKinasedomäneKMMKnochenmarks-MakrophagenLBPLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysLysin	ICAM1	intercellular adhesion molecule-1
IQGAP1IQ motif-containing GTPase activating proteinIKKIkB-KinaseIkBinhibitor of kBILInterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3 <i>interferon resonse factor 3</i> JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanKinasedomäneKMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLBPLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLysinLysin	Ig	Immunoglobulin
IKKIkB-KinaseIkBinhibitor of kBILInterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanKanamycinKDKinasedomäneKMMLuria-BertaniLBPLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLRRLysinmmurin	IQGAP1	<i>IQ</i> motif-containing GTPase activating protein
IxBinhibitor of xBILInterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanKanamycinKDKinasedomäneLBLuria-BertaniLBPLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLRRLysinInterleukin ProteinLysLysin	IKK	IkB-Kinase
ILInterleukinInvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3 <i>interferon resonse factor 3</i> JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanKanamycinKDKinasedomäneLBLuria-BertaniLBPLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLRR <i>eucine-rich repeats</i> Lysinmurin	ΙκΒ	inhibitor of <i>kB</i>
InvInvasinIPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanKanamycinKMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLPSLipopolysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysLysinmmurin	IL	Interleukin
IPImmunopräzipitationIRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanKanamycinKDKinasedomäneKMMLuria-BertaniLBPLPS-bindendes ProteinLPSLipoplysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysLysinmmurin	Inv	Invasin
IRAKInterleukin-1 Rezeptor-assoziierte KinaseIRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanKanamycinKDKinasedomäneKMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLBPLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysLysinmmurin	IP	Immunopräzipitation
IRF3interferon resonse factor 3JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanKanamycinKDKinasedomäneKMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLBPLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysMurin	IRAK	Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase
JNKc-Jun N-terminale KinaseKLysinKanKanamycinKDKinasedomäneKMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLBPLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLRR <i>leucine-rich repeats</i> LysLysinmmurin	IRF3	interferon resonse factor 3
KLysinKanKanamycinKDKinasedomäneKMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLPSLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLysLysinmmurin	JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KanKanamycinKDKinasedomäneKMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLBPLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysLysinmmurin	К	Lysin
KDKinasedomäneKMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLBPLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysLysinmmurin	Kan	Kanamycin
KMMKnochenmarks-MakrophagenLBLuria-BertaniLBPLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysLysinmmurin	KD	Kinasedomäne
LBLuria-BertaniLBPLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysLysinmmurin	KMM	Knochenmarks-Makrophagen
LBPLPS-bindendes ProteinLPSLipopolysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysLysinmmurin	LB	Luria-Bertani
LPSLipopolysaccharidLRRleucine-rich repeatsLysLysinmmurin	LBP	LPS-bindendes Protein
LRRleucine-rich repeatsLysLysinmmurin	LPS	Lipopolysaccharid
Lys Lysin m murin	LRR	leucine-rich repeats
m murin	Lys	Lysin
	m	murin
MAPK mitogen-activated protein kinase	МАРК	mitogen-activated protein kinase
MAPKAPK2/MK2 mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2	MAPKAPK2/MK2	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2
MEF mouse embryonic fibroblasts	MEF	mouse embryonic fibroblasts
MEK mitogen-activated protein kinase bzw. extracellular signal-	MEK	mitogen-activated protein kinase bzw. extracellular signal-
regulated kinase kinase		regulated kinase kinase

mind.	mindestens
MLKL	mixed lineage kinase domain like pseudokinase
MOI	multiplicity of infection
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
mRNA	messenger RNA
MSK	mitogen- and stress-activated protein kinase
MyD88	myeloid differentiation factor 88
M-Zelle	microfold-Zelle
NEAA	Non-Essential-Aminoacids
Nec-1s	Necrostatin-1s
NEMO	NFκB essential modulator
NES	nuclear export signal
ΝΓκΒ	nuclear factor kappa B
NLS	nuclear localization signal
NP-40	nichtionisches Detergenz P40
NS-1	Necrostatin-1
OD	optische Dichte
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenimin
Pen	Penicillin
PFD	pore-forming domain
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRK2	protein kinase C-like 2
PRR	pattern recognition receptor
Puro	Puromycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pYV	plasmid of Yersinia virulence
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RHIM	RIP homotypic interaction motif
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RIP	receptor interacting protein kinase
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSK1	ribosomal S6 protein kinase 1
S	Serin
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	standard error of the mean
Ser	Serin
spp	species pluralis
STAT	signal transducers and activators of transcription
Strep	Streptomycin
SUMO	small Ubiquitin-related Modifier

Т	Thymin
TAB	TAK1-binding protein
TAK1	TGF-β-activated kinase 1
TANK	TRAF family member-associated NFĸB activator
TBK1	TANK-binding kinase 1
TBS	tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF-β	transforming growth factor β
T _H	T-Helfer Zelle
Thr	Threonin
TIR	Toll/IL-1 Rezeptordomäne
TLR	Toll-like Rezeptoren
ΤΝΓα	Tumornekrosefaktor α
TNFR	TNF-Rezeptor
TRADD	TNFR-associated death domain
TRAF	TNF-receptor-associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing-ligand
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TTP	Tristetraprolin
TTSS	Typ-III-Sekretionssystem
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolet
Val	Valin
vir	virulence
\mathbf{V}/\mathbf{V}	volume/volume
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome protein
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
w/v	weight/volume
YadA	Yersinia Adhesin A
Үор	Yersinia outer protein
Ysc	Yersinia secretion system
Yst	Yersinia stable toxin

Abkürzungen für Bakterien und andere Organismen

CMV	Cytomegalievirus
E. coli	Escherichia coli
HIV	Human immunodeficiency virus
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
Y. enterocolitica	Yersinia enterocolitica
Y. pestis	Yersinia pestis
Y. pseudotuberculosis	Yersinia pseudotuberculosis

Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	gramm bzw. Schwerebeschleunigung
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
1	Liter
М	Mol
mA	Milliampere
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μCi	Microcurie
μg	Microgramm
μl	Microliter
μΜ	Micromolar
μm	Micrometer
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
S	Sekunde
U	Units
V	Volt

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Pathogenese von <i>Y. enterocolitica</i> (modifiziert nach Fäbrega und Vila, 2012)
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Injektisoms von <i>Yersinia</i> spp. (modifiziert nach Dewoodv <i>et al.</i> 2013)
Abbildung 3: Modulation von Wirtszell-Signalwegen durch <i>Yersinia</i> Effektorproteine (modifiziert nach Pha und Navarro, 2016)
Abbildung 4: Schematische Darstellung der verschiedenen programmierten Zelltod-Arten (modifiziert nach Lamkanfi und Divit 2010)
Abbildung 5: Schematische Darstellung des TI R4-abbängigen Signalweges
Abbildung 6: Schematische Darstellung der RIP1-Proteinstruktur (modifiziert nach Ofengeim und Yuan, 2013)
Abbildung 7: Schematische Darstellung der TNFR1-vermittelten Komplexbildung und
Signal-weiterleitung (modifiziert nach Zhou und Yuan, 2014)
Abbildung 8: Kontroll-Western-Blot über den erfolgreichen RIP1-Knockout (modifiziert nach Menon, Gropengießer <i>et al.</i> , 2017)
Abbildung 9: RIP1-Knockout schützt Makrophagen vor Y. enterocolitica-induziertem Zelltod (modifiziert nach Menon, Gropengießer et al., 2017)
Abbildung 10: Inhibition der RIP1-Kinaseaktivität reduziert den <i>Y. enterocolitica</i> -induzierten Zelltod
Abbildung 11: Caspase-3-Aktivierung spielt eine Rolle bei Yersinien-induziertem Zelltod (modifiziert nach Menon, Gropengießer <i>et al.</i> , 2017)72
Abbildung 12: Caspase-8 Prozessierung ist in Yersinien-induzierten Zelltod involviert (modifiziert nach Menon, Gropengießer <i>et al.</i> , 2017)
Abbildung 13: RIP1-Knockout führt zu nekroptotischem Zelltod nach Yersinien-Infektion (modifiziert nach Menon, Gropengießer <i>et al.</i> , 2017)
Abbildung 14: Inhibition von Apoptose führt bei Yersinien-infizierten Zellen zu Nekroptose (modifiziert nach Menon, Gropengießer <i>et al.</i> , 2017)
Abbildung 15: Inhibition von TAK1 oder des IKK-Komplexes führt bei stimulierten Makrophagen zu RIP1-abhängigem Zelltod (modifiziert nach Menon,
 Gropengießer <i>et al.</i>, 2017)
Abbildung 17: Inhibition der TAK1-Kinase mit anschließender Stimulation führt bei RIP1 ^{+/+} Makrophagen zu Caspase-3-Aktivierung (modifiziert nach Menon,
Gropengießer <i>et al.</i> , 2017)
Abbildung 19: YopP inhibiert die RIP1-Phosphorylierung bei infizierten Wildtyp- Makrophagen

Abbildung 20:	Effekt verschiedener Kinase-Inhibitoren auf die RIP1-Phosphorylierung bei
	stimulierten Makrophagen (modifiziert nach Menon, Gropengießer et al.,
	2017)
Abbildung 21:	TNFR1-unabhängiger Zelltod nach Yersinien-Infektion bei Makrophagen
	(modifiziert nach Menon, Gropengießer et al., 2017)
Abbildung 22:	RIP1-Phosphorylierung nach Stimulation ist TNFR1-unabhängig (modifiziert
	nach Menon, Gropengießer et al., 2017)
Abbildung 23:	Inhibition von p38 bzw. MK2 oder das Fehlen von MK2 haben keinen
	wesentlichen Zelltod auslösenden Effekt
Abbildung 24:	Gleichzeitige Inhibition von IKKβ und MK2 fördert RIP1-abhängigen Zelltod
	(modifiziert nach Menon, Gropengießer et al., 2017)
Abbildung 25:	Inhibition von MK2 verstärkt die Interaktion zwischen RIP1, FADD und
	Casp-8 (modifiziert nach Menon, Gropengießer et al., 2017)
Abbildung 26:	Schematische Darstellung der RIP1-Domänen, sowie ein Ausschnitt der
	Aminosäuresequenz der Intermediärdomäne (modifiziert nach Vandenabeele et
	<i>al.</i> , 2010)
Abbildung 27:	Auswirkungen der Mutationen von S321 und S336 auf den Migrations- und
	damit Phosphorylierungsstatus von RIP190
Abbildung 28:	Nachweis über erfolgreiche Rekomplementierung der RIP1 ^{-/-} Fibroblasten 91
Abbildung 29:	Überprüfung der Funktionalität der hergestellten rekomplementierten
	Fibroblasten
Abbildung 30:	RIP1-SSDD Zellen weisen Schutz vor RIP1-abhängigem Zelltod auf
	(modifiziert nach Menon, Gropengießer et al., 2017)
Abbildung 31:	RIP1-SSAA Zellen zeigen verstärkten Zelltod (modifiziert nach Menon,
	Gropengießer <i>et al.</i> , 2017)
Abbildung 32:	RIP1-Kinaseaktivität ist essentiell für RIP1-abhängigen Zelltod (modifiziert
	nach Menon, Gropengießer et al., 2017)95
Abbildung 33:	RIP1-SSAA führt zu einer verstärkten RIP1-Kinaseaktivität (modifiziert nach
	Menon, Gropengießer et al., 2017)
Abbildung 34:	Eine erhöhte RIP1-Kinaseaktivität bei RIP1-SSAA führt zu einer verstärkten
	RIP1-S166-Autophosphorylierung (modifiziert nach Menon, Gropengießer et
	<i>al.</i> , 2017)
Abbildung 35:	Inhibition von MK2 und IKK β führt zu einer verstärkten RIP1-
	Autophosphorylierung
Abbildung 36:	RIP1-SSAA weist vermehrte RIP1-Ubiquitinierung auf (modifiziert nach
	Menon, Gropengießer et al., 2017)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien	36
Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und Kits	38
Tabelle 3: Verwendete Antibiotika	39
Tabelle 4: Verwendete Enzyme	39
Tabelle 5: Verwendete Inhibitoren und Stimulatoren	39
Tabelle 6: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper	40
Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide	41
Tabelle 8: Verwendete prokaryotische und eukarytoische Expressionsplasmide	41
Tabelle 9: Verwendete Bakterienstämme	43
Tabelle 10: Verwendete Säugerzellen	43
Tabelle 11: Verwendete Zellkulturmedien und -zusätze	45
Tabelle 12: Zusammensetzung allgemein verwendeter Lösungen und Puffer	46
Tabelle 13: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für SDS-PAGE und Western-Blot.	46
Tabelle 14: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für Immunpräzipitation bzw. Ko-	
Immunpräzipitation	47
Tabelle 15: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für einen in vitro Kinase-Assay	48
Tabelle 16: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für einen Ac-DEVD-AMC-Assay	49
Tabelle 17: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für die Herstellung kompetenter	
Bakterien	49
Tabelle 18: Hersteller/Zusammensetzung der verwendeten Medien für Bakterienkulturen	50

1 Zusammenfassung

Das enteropathogene Bakterium *Yersinia enterocolitica* hat verschiedene Virulenzstrategien entwickelt, um die Immunantwort des Wirtes zu manipulieren und um so im Wirt überleben zu können. Mittels eines Typ-III-Sekretionssystems schleust *Y. enterocolitica* verschiedene Virulenzproteine in die Wirtszelle ein. Die sogenannten Yops (*Yersinia outer proteins*) modulieren in der eukaryotischen Wirtszelle verschiedene Vorgänge, wie Phagozytose, die Freisetzung von Zytokinen und zelluläres Überleben. Dadurch wird die Entwicklung einer effektiven Immunabwehr des Wirtes beeinträchtigt.

Eines der translozierten Virulenzproteine ist YopP. YopP inhibiert verschiedene zentrale Wirtszell-Kinasen und blockiert dadurch essentielle proinflammatorische Signalwege. Durch die Inhibition von TAK1, IKKβ und von verschiedenen Kinasen der MAPKK-Familie blockiert YopP sowohl den NFκB-als auch die MAPK-Signalwege. YopP acetyliert Serinoder Threonin-Reste im *activation loop* dieser Kinasen und verhindert so eine für deren Aktivierung notwendige Phosphorylierung. Eine Blockade ebendieser Signalwege führt zu einer Inhibition der Produktion verschiedener Zytokine und auch zu einer Unterdrückung der Expression von antiapoptotisch wirkenden Proteinen. Durch die YopP-vermittelte Blockade dieser Signalwege und die gleichzeitige Aktivierung des TLR4-Rezeptors durch Lipopolysaccharid von gramnegativen Bakterien, kommt es zu Apoptose bei Yersinien-infizierten Makrophagen. Die genauen zellulären Prozesse, die zum Zelltod bei infizierten Makrophagen führen, sind jedoch bisher noch nicht bekannt.

Der Yersinien-vermittelte Zelltod ist RIP1-Kinase-abhängig. RIP1 ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Zelltod und Zellüberleben einnimmt. Mit Hilfe von RIP1-Knockout Makrophagen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass RIP1 und dessen Kinaseaktivität benötigt werden, um effizient Apoptose bei Yersinien-infizierten Makrophagen auszulösen. RIP1-Knockout Makrophagen waren signifikant geschützt vor Yersinien-vermittelter Apoptose. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren von TAK1 oder IKKβ konnten die durch Wildtyp-Yersinien-Infektion ausgelösten Effekte simuliert werden. Dies legt nahe, dass die YopP-vermittelte Inhibition der IKK- und der MAPK-Signalwege Einfluss auf das Zellschicksal nimmt und RIP1-abhängige Apoptose bei Makrophagen einleitet. Des Weiteren wurde eine RIP1-Phosphorylierung nach **TLR-Stimulation** charakterisiert. welche Die von YopP gehemmt wird. RIP1-Phosphorylierung war nicht auf eine Autophosphorylierung zurückzuführen, sondern beruhte auf der Aktivität externer Kinasen. Durch pharmakologische Inhibition verschiedener Kinasen konnte ermittelt werden, dass die MK2-Kinase für die beobachtete

1

RIP1-Phosphorylierung verantwortlich ist. YopP inhibiert somit durch die Blockade des p38/MK2-Signalweges die RIP1-Phosphorylierung.

Im Folgenden wurde untersucht, ob der Einfluss von YopP auf die Zytotoxizität von RIP1 mit der Hemmung der p38/MK2-abhängigen RIP1-Phosphorylierung in Zusammenhang steht. Zelltod-Analysen ergaben, dass die alleinige Inhibition des p38/MK2-Signalweges keine signifikante Zelltod-fördernde Wirkung hat. Die gleichzeitige Inhibition des p38/MK2- und des IKKβ/NFkB-Signalweges, was der physiologischen Situation einer Yersinien-Infektion entspricht, war jedoch in der Lage, eine vollständige Aktivierung des zytotoxischen Potentials von RIP1 herbeizuführen. Unsere Versuche decken daher eine bisher unbekannte MK2-vermittelte RIP1-Phosphorylierung auf, welche einen inhibitorischen Einfluss auf die proapoptotische Aktivität von RIP1 ausübt, wenn der IKK-Signalweg inhibiert ist. Die p38/MK2- und die IKK-Komplex-vermittelte RIP1-Phosphorylierung hemmen demnach gemeinsam das zytotoxische Potential von RIP1. YopP blockiert während einer Yersinien-Infektion effektiv beide protektiven RIP1-Phosphorylierungen und ermöglicht so RIP1-abhängige Apoptose bei Makrophagen.

Als MK2-abhängige Phosphorylierungsstellen in RIP1 wurden Serin 321 und Serin 336 in dieser Arbeit identifiziert. Eine Phosphorylierung an ebendiesen Stellen inhibierte effektiv das zytotoxische Potential von RIP1 bei TNFα-stimulierten Fibroblasten. Kam es durch YopP bei Makrophagen zu einer Blockade des p38/MK2-Signalweges und lag RIP1 folglich an diesen Aminosäuren unphosphoryliert vor, wies RIP1 eine deutlich stärkere Kinaseaktivität auf, was zu einer verstärkten Autophosphorylierung an S166 führte. Die Autophosphorylierung von RIP1 an S166 wird auch als Marker für die Aktivität von RIP1 betrachtet, da eine verstärkte RIP1-S166-Autophosphorylierung mit einer Zunahme des zytotoxischen Potentials von RIP1 korreliert. Es besteht also ein Zusammenhang zwischen der p38/MK2-abhängigen Phosphorylierung von RIP1 und der inhibitorischen Wirkung auf die RIP1-Kinaseaktivität, die RIP1-Autophosphorylierung und dessen zytotoxischem Verhalten. Diese Ergebnisse weisen auf einen bisher unbekannten Rückkopplungsmechanismus zwischen dem p38/MK2-Signalweg und RIP1 hin.

Summary

The enteropathogenic bacterium *Yersinia enterocolitica* developed a variety of virulence mechanisms to manipulate the host immune defense and to colonize the host. *Y. enterocolitica* utilizes a type-III-protein secretion system that injects virulence proteins into infected host cells. The virulence proteins, called Yops (*Yersinia outer proteins*), modulate different host cell functions such as phagocytosis, cytokine release and cell survival. Thereby, *Y. enterocolitica* impairs the development of an effective host immune response.

One of the translocated virulence proteins is YopP. YopP is a potent inhibitor of multiple central host cell kinases and blocks crucial proinflammatory signaling pathways. It inhibits the NF κ B- (nuclear factor kappa B) and MAPK- (mitogen-activated protein kinase) signaling pathways by targeting TAK1, IKK β and MAPKK family kinases. YopP acetylates serine or threonine residues in the activation loop of these kinases thus preventing their phosphorylation and activation. Blocking these pathways impairs the production of cytokines and suppress the expression of antiapoptotic proteins. Through the YopP-mediated inhibition of these pathways by YopP and the simultaneous activation of TLR4 by LPS triggers apoptosis of *Yersinia*-infected macrophages. The cellular processes leading to macrophage cell death, however, are not yet clearly defined.

Yersinia-mediated cell death is RIP1-dependent. RIP1 is a serine/threonine kinase that acts as a central regulator of cell death and survival. Analysis of cell death in RIP1-knockout macrophages showed that the RIP1 kinase activity is required for efficient induction of apoptosis by *Yersinia*. RIP1-knockout macrophages were substantially protected against *Yersinia*-induced apoptosis. The application of inhibitors for TAK1 or IKKβ mimicked the effect of wildtype *Yersinia* infection. This provides evidence for the involvement of YopP-mediated inhibition of the IKK and MAPK signaling pathways in cell fate decisions and in the induction of RIP1-dependent apoptosis. Furthermore, it was shown that RIP1-phosphorylation after TLR4 activation was inhibited by YopP. The RIP1-phosphorylation did not arise through autophosphorylation but depended on the activity of external kinases. Pharmacological inhibition of different kinases revealed MK2-dependent RIP1-phosphorylation. Hence, YopP inhibits the phosphorylation of RIP1 through blockade of the p38/MK2 signaling pathway.

It was further examined whether there is a coherence between YopP-induced RIP1 cytotoxicity and YopP-mediated inhibition of the p38/MK2-dependent RIP1-phosphorylation. Cell death analysis revealed no significant increase in cell death when only p38/MK2 signaling was blocked. However, the simultaneous inhibition of the p38/MK2 and the

3

IKKβ/NFκB signaling pathways, which resembles more closely the action of YopP, was able to activate the entire cytotoxic potential of RIP1. Therefore, our studies revealed a so far unknown MK2-dependent RIP1-phosphorylation loop, with an inhibitory influence on the cytotoxic activity of RIP1 when the IKKβ/NFκB signaling pathway is blocked at the same time. Thus, p38/MK2- and IKK-mediated RIP1-phosphorylation events together inhibit the cytotoxic potential of RIP1. In *Yersinia*-infection, YopP is able to induce RIP1-dependent cell death in macrophages through the efficient blockade of both protective signaling pathways. Serine-321 and serine-336 were furthermore identified as MK2-dependent RIP1phosphorylation sites in this work. Phosphorylation on these two sites efficiently inhibits the cytotoxic potential of RIP1 in TNFα-stimulated fibroblasts. Macrophages infected with wildtype *Yersinia*, where the p38/MK2 signaling pathway is blocked by YopP and RIP1 is

thus unphosphorylated at serine-321 and serine-336, exhibited increased RIP1 kinase activity. This led to increased RIP1-autophosphorylation at serine-166. Because strong RIP1-phosphorylation at serine-166 correlates with the cytotoxic activity of RIP1, RIP1-S166-autophosphorylation may be used as a marker for RIP1 cytotoxicity. Thus, there is a connection between p38/MK2-dependent RIP1-phosphorylation and an inhibitory effect on the RIP1 kinase activity, RIP1-autophosphorylation and the cytotoxic potential of RIP1. These results identified a novel feedback phosphorylation loop between the p38/MK2 signaling pathway and RIP1.

2 Einleitung

2.1 Die Gattung Yersinia

Bakterien der Gattung Yersinia gehören zu der Familie der Enterobacteriaceae. Sie wurden nach dem Schweizer Arzt und Bakteriologen Alexandre Émile Jean Yersin benannt, der während der dritten Pestpandemie 1894 in Hong Kong als Erster Yersinia pestis als Erreger der Pest entdeckte und isolierte (Perry und Fetherston, 1997). Yersinien sind nicht-sporenbildende, psychrophile, gramnegative Stäbchen mit einer Breite von 0,5-0,8 µm und einer Länge von 1-3 µm. Alle Yersinia-Arten, bis auf Y. pestis, sind bei einer Temperatur zwischen 22-30 °C peritrich begeißelt und beweglich, nicht jedoch ab einer Temperatur von 37 °C. Eine Vermehrung der Bakterien findet sowohl aerob als auch anaerob zwischen 0-45 °C statt, mit einem Temperaturoptimum zwischen 25-28 °C (Fàbrega und Vila, 2012). Des Weiteren sind Yersinien Katalase-positiv, Oxidase-negativ, produzieren Urease und fermentieren Glucose (Dekker und Frank, 2015; Fàbrega und Vila, 2012). Von den bisher 18 beschriebenen Yersinien-Arten, sind nur drei Arten für Nagetiere und Menschen pathogen (McNally et al., 2016). Die wahrscheinlich bekannteste Art ist Yersinia pestis, des Weiteren gehören die beiden enteropathogenen Arten Yersinia pseudotuberculosis und Yersinia enterocolitica dazu. Alle drei Arten zeigen einen Tropismus gegenüber Lymphgewebe, sowie eine Resistenz gegen die angeborene Immunantwort des Wirtes (Cornelis et al., 1998). Y. pestis hat sich aus Y. pseudotuberculosis entwickelt. In der Evolution haben sich Y. pestis und Y. pseudotuberculosis erst vor etwa 1.500-20.000 Jahren voneinander getrennt (Achtman et al., 1999). Studien zeigten, dass beide Arten noch eine vollständig identische 16S rRNA Sequenz besitzen (Trebesius et al., 1998). Trotz ihrer sehr nahen Verwandtschaft unterscheiden sie sich bezüglich ihres Übertragungsweges und den von ihnen verursachten Erkrankungen stark. Dies kann auf zwei zusätzliche Virulenzplasmide, welche einzigartig in Y. pestis sind, zurückgeführt werden (Ferber und Brubaker, 1981). Diese spielen eine Rolle bei der Invasion von Y. pestis in Gewebe (Brubaker et al., 1965; Lahteenmaki et al., 1998), bei der Bildung einer Proteinschutzkapsel (Kutyrev et al., 1986) und bei der Infektion des Rattenflohs (Hinnebusch et al., 2002; Hinnebusch, 2003), welcher der Hauptübertragungsvektor von Y. pestis ist (Burroughs, 1947; Engelthaler et al., 2000). Durch den Biss des Rattenflohs Xenopsylla cheopis wird Y. pestis auf den Menschen übertragen und löst dort die Beulen- bzw. Lungenpest aus. Im Laufe der Geschichte kam es zu drei Pestpandemien, welche jeweils einer der drei vorkommenden Biogruppen/Biovare von Y. pestis als Erreger zugeordnet werden können (Achtman et al., 1999). Auch in der heutigen Zeit treten noch vereinzelt Pest-Infektionen auf (Bertherat, 2016). *Y. pseudotuberculosis* ist hingegen ein darmpathogenes Bakterium und wird meist über kontaminiertes Fleisch von infizierten Tieren und seltener über kontaminiertes Wasser übertragen (Fukushima *et al.*, 2011). Beim Menschen löst es eine enterale Yersiniose aus, welche sich durch den Befall der mesenterialen Lymphknoten kennzeichnet und mit einer Appendizitis verwechselt werden kann (Tertti *et al.*, 1989). Meist verläuft sie selbstlimitierend. Eine systemische Infektion ist bei *Y. pseudotuberculosis* sehr selten (Dekker und Frank, 2016).

2.2 Yersinia enterocolitica

Yersinia enterocolitica wurde erstmals 1939 von Schleifstein und Coleman aus menschlichen Proben isoliert (Schleifstein und Coleman, 1939). Damals noch mit dem Namen Bacterium enterocoliticum bezeichnet, bekam 1964 seinen heutigen es Namen Yersinia enterocolitica (Frederiksen, 1964). Auch bei Y. enterocolitica handelt es sich, wie bei Y. pseudotuberculosis, um einen enteropathogenen Erreger, welcher beim Menschen eine Yersiniose auslöst. Trotz dieser Gemeinsamkeit ist Y. enterocolitica entfernter verwandt mit Y. pseudotuberculosis, als es Y. pestis ist (Wren, 2003). Y. enterocolitica stellt eine sehr heterogene Spezies dar, welche traditionell auf Grund der biochemischen Eigenschaften in sechs Biotypen/Biovare eingeteilt wird (1A, 1B, 2-5) (Wauters et al., 1987). Von diesen wird Biotyp 1A als einziges als apathogen angenommen, was auf das Fehlen des pYV-Virulenzplasmides zurückzuführen sein könnte (Gensberger und Kostic, 2016; Tennant et al., 2003). Weiterhin werden zahlreiche Serogruppen/Serovare auf Basis der verschiedenen O-Oberflächenantigene (Lipopolysaccharid) unterschieden. Aleksic und Bockemühl haben hierfür ein vereinfachtes System zur Unterscheidung von 20 Antigen-Faktoren eingeführt (Aleksic und Bockemühl, 1984). Dabei stellen die Serotypen O:3, O:5, 27, O:8 und O:9 weltweit die häufigsten Isolate aus Menschen dar (Asplund et al., 1998). Generell kann eine spezifische geographische Verbreitung beobachtet werden. Beispielsweise ist in Europa O:3 die am häufigsten isolierte Serogruppe, gefolgt von O:9. In den USA hingegen ist O:8 die am häufigsten gefundene Serogruppe (Bottone, 1997). Y. enterocolitica kommt in der Natur weitverbreitet in aquatischen, terrestrischen und tierischen Reservoiren vor. Der häufigste Übertragungsweg erfolgt, wie bei Y. pseudotuberculosis, durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel (Schweinefleisch, Milch), jedoch ist eine Übertragung auch über kontaminiertes Wasser möglich (Black et al., 1978; Keet, 1974). So gelangen die Bakterien über fäkal-orale Aufnahme in den Menschen und besiedeln das terminale Ileum sowie das proximale Kolon. Dort adhärieren die Bakterien an Epithelzellen und durchqueren das Darmepithel vorzugsweise durch die sogenannten M-(microfold)-Zellen des Follikelassoziierten Epithels der Peyer'schen Plaques (Grützkau *et al.*, 1990) (Abbildung 1). Es gibt Hinweise, dass in frühen Stadien der Infektion die Bakterien durch Phagozyten aufgenommen werden. Diese internalisierten Bakterien werden mit Hilfe der Phagozyten innerhalb der abfließenden lymphatischen Gefäße zu den mesenterialen Lymphknoten transportiert. Dort bewirken sie durch eine hervorgerufene Entzündungsreaktion abdominale Schmerzen. Die Phagozyten können über die Blutbahn die Bakterien ebenfalls zur Milz und Leber disseminieren. Sowohl in den Peyer'schen Plaques, in den mesenterialen Lymphknoten, als auch in der Milz und in der Leber vermehren sich die Yersinien extrazellulär und können Abszesse ausbilden. Dies kann zur vollständigen Zerstörung der Zellstruktur in den Peyer'schen Plaques führen. Innerhalb der Abszesse bilden die Bakterien Mikrokolonien aus und scheinen somit resistent gegen Phagozytose durch Makrophagen oder Neutrophile zu sein (Autenrieth und Firsching, 1996; Fàbrega und Vila, 2012: Sansonetti, 2004; Trülzsch *et al.*, 2007).



Abbildung 1: Schematische Darstellung der Pathogenese von *Y. enterocolitica* (modifiziert nach Fàbrega und Vila, 2012)

(1) Yersinien durchqueren das intestinale Epithelium durch Epithelzellen (2) Makrophagen der Submukosa phagozytieren die Bakterien und transportieren sie so über das lymphatische System zu den mesenterialen Lymphknoten (3) Bakterien können auch über M-Zellen das Darmepithel durchdringen (4) In den Peyer'schen Plaques bilden Yersinien Mikrokolonien und vermehren sich (5) Auch in den mesenterialen Lymphknoten können Yersinien Mikrokolonien bilden und sich replizieren. PP = Peyer'sche Plaques; MLN = mesenteriale Lymphknoten

Die durch *Y. enterocolitica* ausgelöste Yersiniose kann im klinischen Verlauf sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. Das Erscheinungsbild reicht von milder, selbstlimitierender Diarrhö, bis hin zu akuter Mesenteriallymphadenitis, welche als Appendizitis imponieren kann (Bottone, 1997). Übelkeit, Erbrechen und Fieber können ebenfalls begleitende Symptome sein. Der Verlauf einer Erkrankung hängt teilweise vom Alter und der physischen Verfassung des Patienten ab. Sepsis oder reaktive Arthritis sind seltene Komplikationsfälle einer Y. enterocolitica-Infektion, welche beispielsweise bei immunsupprimierten Patienten, Patienten mit noch anderen zugrundeliegenden Erkrankungen oder im Falle einer reaktiven HLA-B27 bei Patienten mit Allel Arthritis dem gehäuft vorkommen (Dekker und Frank, 2015; Fredriksson-Ahomaa et al., 2006). Für eine Infektion des Wirtes haben alle pathogenen Yersinien-Arten verschiedene Virulenzmechanismen entwickelt. Diese Virulenzfaktoren sind bei Yersinien sowohl chromosomal als auch auf einem Plasmid kodiert und befähigen Yersinien dazu das Immunsystem des Wirtes für ihre Zwecke zu modulieren, um so im Wirt überleben und sich vermehren zu können (Fàbrega und Vila, 2012). Die Genexpression dieser Virulenzfaktoren ist sehr genau reguliert und an ihre Umgebung angepasst.

2.3 Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren

Für den ersten Schritt der Invasion der intestinalen Mukosa spielt das chromosomal kodierte Protein Invasin eine wesentliche Rolle (Isberg et al., 1987; Miller und Falkow, 1988). Bei Invasin handelt es sich um ein 103 kDa großes, äußeres Membranprotein, welches bei Y. pestis als inaktives Pseudogen vorliegt, weshalb Y. pestis keine Darminvasivität zeigt (Rosqvist *et al.*, 1988; Simonet *et al.*, 1996). Durch Bindung an β 1-Integrine, welche sich auf der Oberfläche der Wirtszellen befinden, fördert Invasin die Internalisierung der Bakterien in die M-Zellen des Dünndarms (Clark et al., 1998). Auf die Bindung des Invasins folgt eine Bildung von Integrin-Clustern, was eine Neugestaltung des Wirtszellen-Zytoskeletts zur Folge hat. Dies fördert die Phagozytose und somit die Internalisierung der Bakterien in die Epithelzellen. Hierbei zeigt Invasin eine etwa 100-fach höhere Affinität an Integrine als der natürliche Ligand Fibronektin (Atkinson und Williams, 2016; Hamburger et al., 1999). Die Genexpression von Invasin in Y. enterocolitica wird sowohl über die Temperatur als auch über den pH-Wert reguliert. Es wird bei einer Temperatur von 25-28 °C maximal exprimiert und zeigt bei 37 °C eine geringere Expression. Bei 37 °C unter sauren Bedingungen steigt die Expression jedoch wieder auf ein Maximum an (Pepe et al., 1994). Es wird angenommen, dass die Expression von Invasin bei Umgebungstemperaturen die Bakterien auf die Infektion vorbereitet und zu einer schnelleren Transzytose durch das Epithel führt (Grassl et al., 2003; Uliczka et al., 2011). Des Weiteren führt die Bindung von Invasin an Epithelzellen zur Produktion von chemotaktisch wirkenden Zytokinen (Grassl et al., 2003).

Ein weiterer chromosomal kodierter Virulenzfaktor ist Ail (*attachement invasion locus*). Es ist ein 17 kDa großes Oberflächenprotein, welches bei 37 °C maximal exprimiert wird (Miller und Falkow, 1988). Ail ist wie Invasin an der Adhäsion und Invasion von Epithelzellen beteiligt. Zusätzlich ist Ail der wichtigste Faktor für die Vermittlung der Serum-Resistenz aller drei humanpathogenen Yersinien-Arten, was durch die Bindung und Inaktivierung verschiedener Komplement-Faktoren zustande kommt (Kirjavainen *et al.*, 2008; Miller und Falkow, 1988; Pierson und Falkow, 1993).

Spezifisch für Y. enterocolitica ist das chromosomal kodierte, hitzestabile Enterotoxin Yst (Yersinia stable toxin). Dieses ähnelt stark dem hitzestabilen Enterotoxin von enterotoxischen Escherichia coli Stämmen (Fredriksson-Ahomaa, 2007). Für beide Toxine ist bekannt, dass sie die Guanylatzyklase aktivieren, wodurch sich die intrazelluläre cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) Konzentration in Darmepithelzellen erhöht und wässrigen Durchfall bei einer Infektion auslöst (Guarino et al., 1987; SO Delor und Cornelis, 1992). Jedoch wird die genaue Rolle des Yst-Toxins bei einer Y. enterocolitica-Infektion kontrovers diskutiert, da das Toxin nicht in Stuhlproben von infizierten und erkrankten Tieren gefunden werden kann. Weiterhin tragen manche Y. enterocolitica Stämme das yst-Gen, produzieren jedoch kein Toxin und es wurden gleiche Verhältnisse von enterotoxigenen Bakterien sowohl unter klinischen als auch nicht-klinischen Isolaten gefunden (Fàbrega und Vila, 2012).

LPS (Lipopolysaccharid) ist der Hauptbestandteil der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien, es ist ebenfalls chromosomal kodiert und setzt sich aus drei Teilen zusammen: Lipid A, der Kernregion und der O-spezifischen Seitenkette. Lipid A ist in der Membran verankert und ist als Endotoxin mit der Toxizität der Bakterien assoziiert. Die Kernregion setzt sich aus verschiedenen Oligosacchariden zusammen und die O-spezifische Seitenkette ist ebenfalls ein Polysaccharid. Sie ist auch an der Kolonisierung und Invasion des Wirtes beteiligt, weswegen O-Antigen-defiziente Stämme eine abgeschwächte Infektion zeigen. Des Weiteren zeigen diese Mutanten eine ineffiziente Kolonisierung der Peyer'schen Plaques und können sich weder in der Milz, der Leber noch in den mesenterialen Lymphknoten vermehren. In Abwesenheit des O-Antigens ist zusätzlich die Funktion des Adhäsins YadA (*Yersinia adhesin A*) gestört, Ail wird nicht exprimiert und die Inv-Genexpression ist herunterreguliert. Daraus kann geschlossen werden, dass die Expression des O-Antigens notwendig ist für die korrekte Expression und Funktionalität von anderen Virulenzfaktoren (Bengoechea *et al.*, 2004; Fàbrega und Vila, 2012; Skurnik *et al.*, 1999).

Virulenzfaktor Als letzter chromosomal kodierter ist das Yersiniabaktin-Eisenaufnahmesystem zu erwähnen. Die Fähigkeit Eisen einzufangen, ist ein Hauptmerkmal von pathogenen Bakterien. Alle drei humanpathogenen Yersinien-Arten besitzen ein konserviertes Yersiniabaktin-Siderophorsystem, mit dem sie sich mit Eisenionen aus der Umgebung versorgen können. Die Gene für dieses Yersiniabaktin-Siderophorsystem, dessen Biosynthese, Transport und Aufnahme sind alle auf einer 45 kBp großen Pathogenitätsinsel, der sogenannten high-pathogenicity island (HPI) kodiert. Die HPI kann demnach als "Eisen-Auffang-Insel" bezeichnet werden (Carniel et al., 1996; Heesemann et al., 1993; Schubert et al., 2004). In der Wirtszelle werden Eisenionen von Yersiniabaktin komplexiert und über das Membranprotein FyuA (ferric yersiniabactin uptake) von den Yersinien wieder aufgenommen. Ohne HPI können Yersinien nur abgeschwächte Symptome hervorrufen, weswegen der HPI eine wichtige Rolle bei der Virulenz zukommt (Schubert et al., 2004).

2.4 Plasmid kodierte Virulenzfaktoren

2.4.1 YadA

Alle drei pathogenen Yersinien-Arten besitzen zusätzlich zu den chromosomal kodierten Virulenzfaktoren ein 70 kBp großes Virulenzplasmid, welches als plasmid of Yersinia virulence bezeichnet wird (pYV). Auf dem Virulenzplasmid ist das Adhäsin YadA kodiert, sowie die Proteine für das Typ-III-Sekretionssystem und die durch dieses System sezernierten Yersinia outer proteins (Yops). Da die Yops einen Hauptteil der Pathogenität von Yersinien ausmachen, sind Yersinien ohne das pYV-Plasmid apathogen (Atkinson und Williams, 2016; Cornelis, 2002). Bei YadA (Yersinia adhesion A) handelt es sich um ein äußeres Membranprotein, welches als wichtiges Adhäsionsprotein für den Kontakt von Yersinien mit Wirtszellen in der Submukosa verantwortlich ist (Atkinson und Williams, 2016). Die YadA Expression wird bei 37 °C induziert und wird vom temperaturempfindlichen Aktivator LcrV reguliert. Bei 37 °C Bedingungen liegt YadA in so großer Menge vor, dass es die gesamte Bakterienoberfläche bedeckt (Hoiczyk et al., 2000). Im Gegensatz zur Yop-Expression ist die YadA Genexpression Ca²⁺-unabhängig. (Skurnik und Toivanen, 1992). Für die Virulenz von Y. enterocolitica ist die Adhäsionsfähigkeit von YadA essentiell, wohingegen es bei der Pathogenität von Y. pseudotuberculosis keine allzu große Rolle spielt (Cornelis et al., 1998; Han und Miller, 1997; Pepe et al., 1995; Roggenkamp et al, 1995). Aufgrund einer einzelnen Nukleotid-Deletion und der daraus resultierenden frame-shift Mutation liegt yadA bei Y. pestis sogar als inaktives Pseudogen vor (Skurnik und Wolf-Watz, 1989). YadA ist ein nicht-fimbrien-ähnliches Adhäsin und gehört zu der Familie der trimeren Autotransporter-Adhäsine (Mikula et al., 2013). Es hat die Form eines "Lollipops" mit einer N-terminalen Kopfdomäne, welche über eine superspiralisierte Region mit der C-terminalen Ankerdomäne verbunden ist. Über die Ankerdomäne ist es in der äußeren Membran verankert (Hoiczyk *et al.*, 2000). YadA bindet an verschiedene extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen, Fibronektin und Laminin (Tahir und Skurnik, 2001). Dies bringt das Bakterium über β 1-Integrine in engen Kontakt mit der Wirtszelle und ermöglicht so die erfolgreiche Translokation der Yop-Effektorproteine mittels des Typ-III-Sekretionssystems in die Wirtszelle (Visser *et al.*, 1995). Des Weiteren spielt YadA eine Rolle bei der Autoagglutination der Yersinien, was die Bildung von Mikrokolonien und Abszessen in lymphatischen Geweben und Organen fördert (Hoiczyk *et al.*, 2000). YadA ist auch in der Lage Yersinien vor dem Angriff des Komplementsystems zu schützen, indem es den Komplementfaktor H bindet, so die Aktivierung des Komplementsystems blockiert und die Opsonierung von Yersinien verhindert (Dhar und Virdi, 2013; Pilz *et al.*, 1992).

2.4.2 Das Typ-III-Sekretionssystem

Alle Gene für das Typ-III-Sekretionssystem (TTSS) und die dazugehörigen Effektorproteine (Yops) sind auf dem 70 kBp großen Virulenzplasmid lokalisiert und werden bei 37 °C und niedriger Ca²⁺-Konzentration exprimiert. TTSS machen es pathogenen Erregern möglich, Effektorproteine direkt in das Zytosol der Wirtszelle zu injizieren. Dort manipulieren die Effektorproteine spezielle Signalkaskaden, um so der angeborenen Immunantwort des Wirtes zu entgehen, im Wirt zu überleben und sich replizieren zu können (Atkinson und Williams, 2016). Ein solches System wird von vielen gramnegativen human-, zoo- und phytopathogenen Bakterien verwendet. Human- und zoopathogene Erreger mit einem TTSS sind beispielweise: Escherichia coli, Shigella, Salmonella, Pseudomonas, Bordetella und die drei humanpathogenen Yersinia-Arten. Zu den pflanzenpathogenen Bakterien mit TTSS gehören unter anderem: Erwinia spp., Xanthomonas spp., Pseudomonas syringae und Ralstonia solanacearum (Cornelis, 2006; Nazir et al., 2017). Bei allen Gattungen sind das TTSS und der Translokationsmechanismus stark konserviert. Erst durch die Diversität der Effektorproteine kommt es bei den verschiedenen Erregern zu ihren ganz unterschiedlichen, speziellen Infektionsstrategien (Cornelis, 2006, Deng et al., 2017). Ein vollständiges Injektisom, mittels dem die Effektorproteine in die Zielzelle injiziert werden, wird bei Y. enterocolitica von rund 25 Ysc-Proteinen (Yersinia secretion proteins) gebildet und besteht aus einem basalen Teil, einer nadelähnlichen Struktur und einer Translokationspore innerhalb der Wirtszellmembran (Cornelis, 2006; Deng et al., 2017) (Abbildung 2).

Der basale Teil durchspannt das Peptidoglycan sowie die innere und äußere Membran der Bakterien (Kubori *et al.*, 1998). Dieser innere bzw. äußere Membranring des Injektisoms wird aus YscC-Proteinen bzw. YscD- und YscJ-Proteinen gebildet (Cornelis, 2006; Dewoody *et al.*, 2013). Auf der zytosolischen Seite befinden sich ein ATPase-Komplex, welcher das hoch konservierte Protein YscN und weitere strukturgebende und regulierende Ysc-Proteine enthält (YscK und YscL), sowie der Export-Apparat mit den Proteinen YscRSTUV (Dewoody *et al.*, 2013). Als ATPase sorgt YscN mit der protonenmotorischen Kraft für den Export der Effektorproteine (Woestyn *et al.*, 1994).



Abbildung 2: Schematische Darstellung des Injektisoms von *Yersinia* spp. (modifiziert nach Dewoody *et al.*, 2013)

Gerüstproteine (lila): YscC, YscD, YscJ; Export-Apparat (orange): YscR, YscS, YscT, YscV, YscU; zytoplasmatische Komponenten (blau): YscQ (C-Ring), YscN, YscL, YscK (ATPase-Komplex); Nadelkomplex (grün): YscI (Stamm), YscF (Nadel); Translokationspore (rot): LcrV (Nadelspitzenprotein), YopB, YopD (Pore)

Auf den basalen Teil folgt die nadelähnliche Struktur. Diese extrazelluläre Hohlnadel wird aus YscF-Proteinen gebildet, welche durch den Ysc-Apparat selbst sekretiert werden. Sie ist 60 nm und hat einen Durchmesser 6-7 nm etwa lang von etwa (Hoiczyk und Blobel, 2001; Cornelis, 2006). Die Länge dieser Nadelstruktur wird von YscP reguliert (Journet et al., 2003). Dieser Basalkörper inklusive Nadelstruktur weist Ähnlichkeit mit dem Basalkörper der Flagellen auf, was auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung hinweist (Cornelis, 2002). Beide Organellen besitzen einen Basalkörper, welcher beide Bakterienmembranen durchspannt, und ein Hohlfilament, welches ein Polymer aus einem Protein ist (Cornelis, 2006). Auch die hochkonservierte ATPase YscN des Injektisoms ähnelt der F_0F_1 -ATPase der Flagellen (Woestyn *et al.*, 1994; Aizawa, 2001). Ein aktives Injektisom, welches in Kontakt mit der Wirtszelle steht, endet mit der Translokationspore innerhalb der

Plasmamembran der Wirtszelle (Blocker et al., 1999; Hakansson et al., 1996: Neyt und Cornelis, 1999). Diese Pore besteht aus den beiden hydrophoben Proteinen YopB und YopD und dem hydrophilen Nadelspitzen-Protein LcrV, welche miteinander interagieren und eine Pore in der Wirtsmembran bilden, durch die die Effektorproteine in die Wirtszelle transloziert werden (Atkinson und Williams, 2016; Cornelis, 2006). Wichtig für den korrekten Aufbau des Injektisoms, sowie für die erfolgreiche Translokation der Effektorproteine, sind zahlreiche Chaperone. Sie unterstützen sowohl die Effektorproteine bei der korrekten Faltung und der Translokation durch die Nadelstruktur, als auch die Porenproteine, indem sie die hydrophoben Proteine YopB und YopD neutralisieren und diese so weniger toxisch für das Bakterium selbst sind (Cornelis, 2006). Studien zeigten, dass vollständig assemblierte Injektisome in Clustern auf der Bakterienoberfläche lokalisiert sind und neu geformte Nadeln verteilt diese Cluster integriert werden, als willkürlich eher in zu werden (Kudryashev et al., 2015). Mit Hilfe dieses Systems werden sechs verschiedene Effektorproteine in die Wirtszelle transloziert: YopE, YopH, YopT, YpkA/YopP, YopJ/YopP und YopM. In der Zelle angekommen, behindern diese Effektoren die korrekte Immunantwort der Zelle, indem sie beispielweise durch Veränderungen des Aktinzytoskeletts die Phagozytose verhindern, Zelltod auslösen oder die proinflammatorische Antwort herunterregulieren (Pha und Navarro, 2016). Im Folgenden sollen die einzelnen Effektorproteine und ihre Funktionen kurz erläutert und ihre Wirkweise in Abbildung 3 graphisch dargestellt werden.

2.4.3 YopH - eine Tyrosin-Phosphatase

YopH ist ein 51 kDa großes Effektorprotein, welches eine Tyrosin-Phosphatase-Aktivität besitzt und hauptverantwortlich für die Yersinien-vermittelte Inhibition der Phagozytose ist (Bliska et al., 1991). Maus-Infektionen zeigten, dass YopH besonders in den frühen Stadien der Infektion essentiell für die Yersinia-Virulenz und die Modulation der angeborenen Immunantwort ist (Logsdon und Mecsas, 2003; Trülzsch et al., 2004). YopH dephosphoryliert wie $p130^{Cas}$. verschiedene Proteine der fokalen Adhäsionskomplexe, Paxillin, FAK (focal adhesion kinase), und zerstört so die Verbindung zwischen fokalen Adhäsionskomplexen und dem Aktinzytoskelett. Dies führt zur Inhibition der Phagozytose von verschiedenen Immunzellen (Bliska et al., 1991; Black und Bliska, 1997; Black et al., 1998; Hamid et al., 1999; Persson et al., 1997). Des Weiteren blockiert YopH die Ca²⁺-vermittelte Signaltransduktion von Neutrophilen und die Produktion bakterizider reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten (Andersson et al., 1999; Bliska und Black, 1995; Ruckdeschel et al., 1996). Innerhalb der adaptiven Immunantwort ist YopH in der Lage, die Aktivierung von B- und T-Lymphozyten zu blockieren (Alonso *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 1999).

2.4.4 YopE - ein GTPase-aktivierendes Protein

Bei YopE handelt es sich um ein 23 kDa großes GTPase-aktivierendes Protein (GAP) (Pha und Navarro, 2016). Diese GAP-Aktivität von YopE katalysiert die Hydrolyse von GTP und inaktiviert so GTPasen. GTPasen sind sogenannte molekulare Schalter, da sie zwischen einem aktiven (GTP-gebundenem) Zustand und einem inaktiven (GDP-gebundenem) Zustand hin und her wechseln (Donovan et al., 2002). Hauptsächliches Ziel der GAP-Aktivität von YopE sind die GTPasen der Rho-Familie: RhoA, Cdc42 (cell division cycle 42) und Rac1. Hierbei handelt es sich um Regulatoren des Aktinzytoskeletts, die eine wichtige Rolle bei der Regulation der Phagozytose spielen (Chimini und Chavrier, 2000; May und Machesky, 2001). Durch die Inaktivierung dieser GTPasen kommt es zur Zerstörung des Aktinzytoskeletts und zur Inhibition der Aktinmikrofilamentbildung, was die Phagozytoseresistenz der Yersinien und Heesemann. 2001; Black begünstigt (Aepfelbacher und Bliska. 2000: Rosqvist et al., 1990; Von Pawel-Rammingen et al., 2000). Darüber hinaus scheint YopE eine Rolle bei der Inhibition der Inflammasom-Aktivierung bei Makrophagen zu spielen. YopE inhibiert offenbar hierbei die Caspase-1-vermittelte IL-1β-Produktion (Schotte et al., 2004).

2.4.5 YopT - eine Cysteinprotease

YopT ist eine 35,5 kDa große Cysteinprotease, dessen Substrate ebenfalls GTPasen aus der Rho-Familie sind. YopT spaltet den C-terminalen Geranylgeranyl-Cystein-Rest von RhoA, Rac1 sowie Cdc42 ab, mit dem diese GTPasen in der Zellmembran verankert sind. Dadurch werden diese aus der Membran abgelöst und inaktiviert, was ähnlich wie bei YopE, eine Zerstörung des Aktinzytoskeletts und eine Inhibition der Phagozytose bewirkt (Fueller und Schmidt, 2008; Iriarte und Cornelis, 1998; Shao *et al.*, 2002; Zumbihl *et al.*, 1999).

2.4.6 YopO/YpkA - eine Serin/Threonin-Proteinkinase

YopO von Y. enterocolitica bzw. YpkA (Yersinia protein kinase A) von Y. pestis und Y. pseudotuberculosis ist eine 82 kDa große Serin/Threonin-Proteinkinase, welche nach der Translokation in die Wirtszelle ebenfalls zur Zerstörung des Aktinzytoskeletts beiträgt (Håkansson et al., 1996). YopO wird in einer inaktiven Konformation in die Wirtszelle transloziert und bindet dort mit der N-terminalen Domäne an die Plasmamembran. Die dortige Interaktion mit einem Aktin-Monomer führt zu einer Autophosphorylierung und der Aktivierung der Kinase-Domäne von YopO (Håkansson et al., 1996; Juris et al., 2000;

Lee *et al.*, 2015). Als direkte Substrate der Kinaseaktivität von YopO sind inzwischen verschiedene Regulatoren der Aktin-Polymerisation bekannt, unter anderem: VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*), WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrome protein*) und EVL (*Ena/VASP-like protein*) (Lee *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2011). Durch die Modulation dieser Regulatoren der Aktin-Polymerisation bewirkt YopO, wie auch schon YopE und YopT, eine Zerstörung des Aktinzytoskeletts und somit eine Inhibition der Phagozytose (Juris *et al.*, 2000). Untersuchungen zeigen, dass eine Kinase-inaktive Form von YopO weiterhin einen zytotoxischen Einfluss auf die Wirtszelle hat, so dass die YopO-vermittelte Pathogenität nicht allein von der Kinaseaktivität stammen kann (Nejedlik *et al.*, 2004). Der Grund hierfür ist eine zweite funktionelle Domäne in YopO, welche einer eukaryotischen GDI (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) Domäne ähnelt. Diese GDI-Domäne von YopO interagiert erneut mit RhoA und Rac1 und hält diese in einem inaktiven Zustand (Dukuzumuremyi *et al.*, 2000; Grabowski *et al.*, 2017).

2.4.7 YopM - ein Protein mit Leucin-reichen Sequenzen

YopM ist ein Effektorprotein mit variabler Größe, das innerhalb der verschiedenen Yersinia-Arten um die 40 kDa liegt. Die variierende Größe kommt durch eine variable Anzahl (13-20) Leucin-reicher Sequenzen (leucin-rich repeats, LRR) zustande (Leung und Straley, 1989). Obwohl es ein Effektorprotein ohne enzymatische Aktivität ist, ist es unentbehrlich für die Virulenz in Mäusen (Leung et al., 1990). Im Zytoplasma interagiert YopM mit den beiden Kinasen RSK1 (ribosomal S6 protein kinase 1) und PRK2 (protein kinase C-like 2) und aktiviert diese. RSK1 und PRK2 sind für die Regulation von Zellwachstum und Zellzyklus von Bedeutung (McDonald et al., 2003). Die ersten drei LRRs und die 32 C-terminalen Aminosäuren von YopM bilden zusammen ein Kernlokalisationssignal (NLS) (Benabdillah et al., 2004). Über dieses Signal kann YopM Vesikel-assoziiert in den Zellkern gelangen (Skrzypek et al., 2003). Im Zellkern bildet es einen heterotrimeren Komplex mit RSK1 und der DEAD-Box Helikase DDX3. DDX3 ist für den Export von YopM aus dem Kern verantwortlich und kontrolliert somit die Menge von YopM im Kern. Für YopM konnte ein Einfluss auf die Produktion des Zytokins IL-10 nachgewiesen werden, welcher durch die DDX3-vermittelte Regulation von YopM und der YopM-vermittelten RSK1-Aktivierung zustande kommen könnte (Berneking et al., 2016; Grabowski et al., 2017). Des Weiteren konnte eine YopM-vermittelte Inhibition von Caspase-1 gezeigt werden, welche direkt oder über IQGAP1 (IQ motif-containing GTPase activating protein) verläuft (Chung et al., 2014; LaRock und Cookson, 2012).

2.4.8 YopP/YopJ - eine Acetyltransferase

Das 33 kDa große Effektorprotein YopP von Y. enterocolitica ist homolog zu dem zuvor entdeckten YopJ von Y. pestis und Y. pseudotuberculosis (Straley und Bowmer, 1986). Maus-Infektionsversuche zeigten, dass YopP bzw. YopJ die Virulenz der beiden pathogenen Yersinien-Arten *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* essentiell unterstützt (Monack et al., 1998; Trülzsch et al., 2004). Aufgrund von Homologien in der Sekundärstruktur von YopP mit Säugetier-Proteasen, wurde für YopP zunächst eine Cysteinprotease-Aktivität angenommen, welche Ubiquitin oder das ubiquitin-ähnliche Protein SUMO-1 von zellulären Signalproteinen abspaltet (Cornelis und Denecker, 2001; Orth et al., 2000; Orth, 2002). Es wurde angenommen, dass YopP/YopJ durch das Abspalten von Ubiquitin Signalkomplexe proteolytisch inaktiviert, welche mit dem NFkB- oder MAPK-Signalweg assoziiert sind (Orth et al., 2000). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Zellen, welche YopJ exprimieren, geringere Mengen an ubiquitiniertem TRAF2, TRAF6 (TNF receptor-associated factor 2/6) und IkBa (inhibitor of kB α) aufweisen, was einen Einfluss von YopJ auf den NFkB-Signalweg zeigen und so die Virulenz von YopJ erklären könnte (Zhou et al., 2005). Dieser beobachtete Effekt ist jedoch höchstwahrscheinlich nur auf unspezifische Effekte zurückzuführen, welche durch Überexpression von YopJ entstanden sind (Haase et al., 2005). Eine direkte Deubiquitinierung von zellulären Proteinen durch YopP/YopJ konnte bislang nicht gezeigt werden. Stattdessen zeigten neuere biochemische Untersuchungen, dass YopP/YopJ als Acetyltransferase fungiert (Mukherjee et al., 2006). Zunächst konnte eine direkte Interaktion von YopP/YopJ mit dem NFkB-aktivierenden IKK-Komplex (IkB kinase) und verschiedenen MAPK-Kinasen der MAPK-Signalwege gezeigt werden (Mittal et al., 2006; Mukherjee et al., 2006; Orth et al., 1999). Darauffolgend wurde eine YopP/YopJ-vermittelte Acetylierung spezieller Serin- oder Threonin-Reste im activation loop ebendieser Proteine ermittelt, was eine Aktivierung der Kinasen durch Phosphorylierung diesen Resten verhindert (Mittal et al., 2006; Mukherjee et al., 2006; an Paquette et al., 2012). Diese YopP/YopJ-vermittelte Inhibition der Kinasen führt zu einer Blockade des NFkB- sowie der MAPK-Signalwege, was wiederum eine Inhibition der Produktion verschiedener Zytokine, wie TNFa (Tumornekrosefaktor a), IL-6 und IL-8, und eine verminderte Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM1 (intercellular adhesion molecule-1), zur Folge hat (Boland und Cornelis, 1998; Cornelis, 1998; Schesser et al., 1998). Mit TAK1 (TGF- β -activated kinase-1) konnte auch ein weiter upstream liegendes Substrat von YopP/YopJ gefunden werden. YopP acetyliert und inaktiviert TAK1, was zu einer verminderten Aktivität der NFkB- und MAPK-Signalwege führt (Haase et al., 2005; Meinzer et al., 2012; Paquette et al., 2012). Bei Makrophagen und dendritischen Zellen ist YopP/YopJ darüber hinaus in der Lage, Zelltod auszulösen. Unter Stress-induzierten Bedingungen bieten die NFKB- und MAPK-Signalwege normalerweise einen Schutz vor Zelltod. Durch die YopP/YopJ-vermittelte Inhibition dieser Signalwege werden jedoch auch antiapoptotische Proteine, wie FLIP (Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme-inhibitory protein), TRAF1/2 (TNF-receptor-associated factor 1/2), Bcl-x_L und cIAP 1/2 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2) nicht mehr exprimiert, was Apoptose bei Makrophagen führt (Mills et al., 1997; Monack et al., 1997, zu Ruckdeschel et al., 1998). Die Induktion der Apoptose hängt von der Deregulation TLR4-abhängiger Signalwege ab, nicht aber von der Aktivierung von Todesrezeptoren wie TNFR1 (TNF-Rezeptor1) (Haase et al., 2003). Die genauen zellulären Signale, welche die Aktivierung der Apoptose regulieren, sind hingegen bisher kaum bekannt. Weitere Studien konnten zeigen, dass eine Induktion der Apoptose-Signalwege zusätzlich zu einer Aktivierung von Caspase-1 führt, welche die Reifung der Zytokine IL-1β und IL-18 zur Folge hat. Diese Zytokine sind an einer proinflammatorischen Reaktion beteiligt und werden auch bei speziellen proinflammatorischen Pyroptose, einer Art des Zelltodes, gebildet (Philip et al., 2014; Weng et al., 2014).



Abbildung 3: Modulation von Wirtszell-Signalwegen durch *Yersinia* Effektorproteine (modifiziert nach Pha und Navarro, 2016) Wirkweise der Effektorproteine YopP/J, YopO, YopM, YopE, YopH, und YopT. Details siehe Text.

17

2.5 YopP und der apoptotische Zelltod

Wie in Abschnitt 2.4.8 beschrieben, löst YopP/YopJ bei Makrophagen Apoptose aus (Monack et al., 1997, Ruckdeschel et al., 1997). Bei Apoptose handelt es sich um eine Form des aktiven, programmierten, nicht-lytischen Zelltodes. Es ist ein streng regulierter, hoch konservierter Prozess, der dazu dient, entartete oder beschädigte Zellen im Organismus zu beseitigen. Apoptose ist essentiell für eine normale Embryonalentwicklung und die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase bei adulten Organismen. Charakteristisch für Apoptose ist, dass es keinerlei Anzeichen einer Entzündungsreaktion gibt und so umliegendes Gewebe nicht beeinträchtigt wird (Kerr et al., 1972). Durch diese Art von programmiertem Zelltod kann die intrazelluläre Vermehrung und Freisetzung intrazellulärer Erreger verhindert werden ohne eine Entzündung hervorzurufen (DeLeo, 2004; Muller und Rudel, 2001; Navarre und Zychlinsky, 2000). Ein apoptotischer Zelltod zeichnet sich morphologisch durch Zellschrumpfen, Abrunden der Zellen, Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung, Ausstülpungen der Plasmamembran (membrane blebbing) und einen Umbau des Zytoskeletts aus. Dadurch entstehen kleine Zellvesikel (apoptotic bodies) mit Zellmembranbestandteilen und DNA-Fragmenten, welche von professionellen Phagozyten aufgenommen und abgebaut werden (Abbildung 4). Diese Aufnahme erlaubt eine Wiederverwendung der Zellkomponenten (Hengartner, 2000; Jorgensen et al., 2017). Geschieht diese Aufnahme der apoptotic bodies nicht, können sie in sekundäre Nekrose übergehen, was ein Aufbrechen der Vesikel und das Freisetzen von DAMPs (damage-associated molecular patterns) beinhaltet (Poon *et al.*, 2014).

Apoptose ist das Ergebnis einer Aktivierung von Procaspasen, zugehörig zur Familie der Cysteinproteasen, welche ihre Substrate nach einem Asparaginsäurerest prozessieren (Cohen, 1997). Caspasen existieren zunächst als inaktive Zymogene (Procaspasen) und werden durch Autoproteolyse oder durch von anderen Caspasen vermittelte Spaltung aktiviert. Sie besitzen eine N-terminale Prodomäne und zwei C-terminale Untereinheiten (p20 etwa 20 kDa und p10 etwa 10 kDa), welche nach der Prozessierung freigesetzt werden (Boatright und Salvesen, 2003; Thornberry und Lazebnik, 1998). Alle Caspasen sind in ihrer Aminosäuresequenz und ihrer Struktur ähnlich, unterscheiden sich jedoch in ihrer physiologischen Funktion und können dadurch in zwei Gruppen unterteilt werden: Die apoptotischen Caspasen (Caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 und -10), welche ihre Funktion in der Initiation und Ausführung der Apoptose haben; und die inflammatorischen Caspasen (Caspase-1, -4, -5 und -12 beim Menschen; bzw. Caspase-1, -11 und -12 bei Mäusen), welche durch das Prozessieren proinflammatorischer Zytokin-Vorläufer (IL-1β, IL-18) eine Rolle bei

der Aktivierung der angeborenen Immunantwort spielen (Chen et al., 2017; Man und Kanneganti, 2016). Die in Apoptose involvierten Caspasen können zusätzlich aufgrund ihrer Struktur und Funktion in zwei weitere Gruppen unterteilt werden: Die Initiator-Caspasen (Caspase-2, -8, -9 und -10) und die Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7). Die Initiator-Caspasen besitzen eine lange Prodomäne, werden zuerst aktiviert und aktivieren wiederum die Effektor-Caspasen. Die Effektor-Caspasen haben eine kleine Prodomäne, spalten verschiedene zelluläre Substrate und lösen dadurch Apoptose aus (Fink und Cookson, 2005; Li und Yuan, 2008). Für die Aktivierung der Initiator-Caspasen ist eine Dimerisierung notwendig, welche durch die Bindung der Prodomäne über die CARD (caspase recruitment domain) oder DED (death effector domain) Domäne an ein Adapter-Molekül vermittelt wird (Boatright und Salvesen, 2003). Aktivierte Initiator-Caspasen verbreiten daraufhin die Zelltod-Signale, indem sie Effektor-Caspasen kaskadenartig aktivieren und aktivierte Effektor-Caspasen daraufhin bestimmte zelluläre Substrate spalten, um die morphologischen und biochemischen Merkmale der Apoptose zu generieren (Fink und Cookson, 2005; Slee et al., 1999). Die Aktivierung der Caspase-Kaskade kann durch zwei verschiedene Signalwege erfolgen: Durch den extrinsischen Weg über Ligandenaktivierte Zytoplasmamembran-Rezeptoren, oder den intrinsischen Weg, also über Signale, die in der Zelle selbst generiert werden. Der extrinsische Weg beginnt mit der Bindung des jeweiligen Liganden an seinen in der Plasmamembran lokalisierten Todesrezeptor (DR, death-receptor). Zu der Familie der Todesrezeptoren gehören unter anderem: TNFR1, Fas, TRAIL-R1 und TRAIL-R2. Durch die Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Bildung des DISC-Komplexes (death-inducing signalling complex), indem sich zwei inaktive Procaspase-8 Moleküle gegenseitig autokatalytisch aktivieren. Aktive Caspase-8 kann nun die Caspase-Kaskade auslösen und sowohl weitere Caspase-8 Moleküle als auch Effektor-Caspasen aktivieren, was eine signalverstärkende Wirkung hat (Tummers und Green, 2017). Der intrinsische Signalweg wird bei Signalen wie zum Beispiel Nährstoffmangel, DNA-Schäden oder oxidativem Stress über die Mitochondrien vermittelt. Die Regulation dieses Signalweges beinhaltet MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization), welches die Freisetzung von Proteinen aus den Mitochondrien in das Zytoplasma bewirkt. Hierzu zählt beispielsweise Cytochrom c, welches wiederum das zytosolische Protein Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) binden kann und durch die darauffolgende Bildung des sogenannten Apoptosoms die Initiator-Caspase-9 aktiviert. Caspase-9 kann dann analog zu Caspase-8 die Caspase-Kaskade aktivieren. Der extrinsische Signalweg kann über den intrinsischen Weg ebenfalls verstärkt werden (Bao und Shi, 2007; Chen *et al.*, 2017; Tummers und Green, 2017).

Yersinien aktivieren die Caspase-Kaskade durch die Stimulation des LPS-Rezeptors TLR4 und vermitteln Apoptose über die Adaptermoleküle TRIF und FADD, welches dem extrinsischen Signalweg entsprechend die Effektor-Caspase-8 aktiviert (Festjens et al., 2006; Han et al., 2004; Ruckdeschel et al., 2004). TLR4-defiziente Makrophagen sind vor Yersinien-induzierter Apoptose teilweise geschützt (Haase et al., 2003; Zhang und Bliska, 2003). YopP vermittelt die Inhibition des NFkB-Signalweges, wodurch NFkB seine antiapoptotische Funktion durch die Synthese antiapoptotischer Proteine nicht mehr ausüben kann. Die Induktion des apoptotischen Zelltodes durch verschiedene extrazelluläre Stimuli kann somit nicht mehr verhindert werden und löst bei Makrophagen direkt Zelltod durch TLR4-Stimulation aus. Bei Epithelzellen wird hingegen zusätzlich zur Yersinien-Infektion eine Stimulation mit TNFa benötigt, um Zelltod auszulösen (Perkins, 2000; Ruckdeschel et al., 1998).

2.6 Weitere Arten des programmierten Zelltodes

Lange Zeit wurde der apoptotische Zelltod als der einzige programmierte Zelltod angenommen. Im Gegensatz dazu stand der nekrotische Zelltod, der als ein passiver, unregulierter Prozess angesehen wurde. Studien zeigten jedoch, dass es auch bei nekrotischem Zelltod eine zelleigene Regulation gibt und 2005 führten Degterev *et al.* für diese programmierte Form der Nekrose den Begriff der Nekroptose ein (Degterev *et al.*, 2005). Morphologisch ist der nekrotische Zelltod gut vom apoptotischen Zelltod zu unterscheiden: Die Zellorganellen schwellen an, das Zellvolumen steigt an (Oncosis), was daraufhin zu einem Aufplatzen der Plasmamembran führt (Vandenabeele *et al.*, 2010) (Abbildung 4). Nekroptose kann daher als lytischer Zelltod bezeichnet werden. Nekroptotische Zellen setzen verschiedene proinflammatorische Faktoren frei, wie zum Beispiel HSP-Proteine (*heat-shock protein*), HMGB1 (*high mobility group protein1*) und verschiedene nicht proteinartige Faktoren wie DNA oder RNA. All diese Faktoren aktivieren spezielle Rezeptoren (PRR: *pattern recognition* Rezeptoren) auf Immunzellen und lösen so eine Immunantwort aus. Deswegen ist der nekroptotische Zelltod im Gegensatz zum apoptotischen Zelltod primär proinflammatorisch (Vandenabeele *et al.*, 2010); Zitvogel *et al.*, 2010).

Nekroptose kann durch die Ligation des passenden Liganden an einen Todesrezeptor induziert werden, aber auch über die Aktivierung der *Toll-like* Rezeptoren. Normalerweise aktivieren diese Rezeptoren den apoptotischen Signalweg. In Anwesenheit von Caspase-Inhibitoren wird dieser Weg jedoch blockiert, was zur Ausführung des nekroptotischen Zelltods führt

(Chan et al., 2003; Fiers et al., 1995; Holler et al., 2000; Vercammen et al., 1998). Dies kann beispielsweise der Fall bei einer Virus-Infektion sein. Viren haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um Caspasen zu inhibieren und so Apoptose bei Zellen zu blockieren (Fliss und Brune, 2012). In diesem Fall ist Nekroptose ein Abwehrmechanismus des Immunsystems des Wirtes. Nekroptose ist nicht wie Apoptose Caspase-abhängig, sondern wird von der Kinaseaktivität von RIP1 und RIP3 bestimmt. Unter Apoptose-inhibierenden Bedingungen formt sich nach Aktivierung der genannten Rezeptoren ein Nekrosom. Dies ist ein Multi-Protein-Komplex, welcher unter anderem RIP1 und RIP3 beinhaltet und dessen Bildung durch posttranslationale Modifikationen der Proteine reguliert wird. Innerhalb dieses Komplexes kommt es zur Interaktion zwischen RIP1 und RIP3, was die RIP3 Kinaseaktivität stimuliert und dies wiederum zur Autophosphorylierung und Oligomerisierung von RIP3 führt (Cho et al., 2009; He et al., 2009; Zhang et al., 2009). Aktives RIP3 phosphoryliert und aktiviert darauffolgend das Nekroptose-Effektorprotein MLKL (mixed lineage kinase domainlike) (Sun et al., 2012). Dies bewirkt bei MLKL eine Konformationsänderung und einen Transport zur Plasmamembran, wo es ebenfalls oligomerisiert und eine nekroptotische Pore in der Membran bildet. Die Bildung dieser Pore führt dann zu der charakteristischen Morphologie von nekroptotischen Zellen und zum Zelltod (Cai et al., 2014; Dondelinger et al., 2014; Murphy et al., 2013; Wang et al., 2014). RIP1 und RIP3 haben beide ein oder mehrere Caspase-8 Schnittstellen und stellen unter apoptotischen Bedingungen Substrate der Caspase-8 dar. Durch diese Caspase-8-vermittelte Prozessierung von RIP1 und RIP3 kann Nekroptose inhibiert werden, so dass es zum apoptotischen Zelltod kommt. Bei Caspase-8-defizienten Zellen oder bei Inhibition von Caspase-8 fällt diese Blockade weg, so dass kein apoptotischer Zelltod, sondern der nekroptotische Zelltod ausgeführt wird (Feng et al., 2007; Lin et al., 1999; Tummers und Green, 2017). Nekrose spielt hauptsächlich unter pathologischen Bedingungen eine Rolle, beispielsweise bei neurodegenerativen Erkrankungen. Mit Hilfe von RIP3-defizienten Mäusen wurde Nekroptose auch als ein bedeutender antiviraler Mechanismus identifiziert (Cho et al., 2009).

Als eine dritte Form des programmierten Zelltodes soll hier auch die Pyroptose erläutert werden. Bei der Pyroptose handelt es sich, wie bei der Nekroptose, um eine Form des lytischen Zelltodes, welcher Caspase-1-abhängig ist. Induziert wird der pyroptotische Zelltod durch die Bildung eines Inflammasoms, welches sich als Antwort auf veränderte zytosolische Bedingungen oder eine zytosolische Kontamination bildet. Da Pyroptose ein proinflammatorischer Zelltod ist, wird zusätzlich eine Immunantwort ausgelöst (Kovacs und Miao, 2017). Die Bildung des Inflammasoms führt zur Aktivierung von

21
Caspase-1, welche wiederum Gasdermin D prozessiert (He et al., 2015; Shi et al., 2015). Gasdermin D gehört zur Familie der Gasdermin-Proteine (Saeki und Sasaki, 2012). Durch die Prozessierung von Gasdermin D entstehen ein N-terminales und ein C-terminales Fragment, wovon das N-terminale Fragment auch pore-forming domain (PFD) genannt wird. Dieses nun freigesetzte Fragment integriert in die Zellmembran, oligomerisiert dort und bildet so die pyroptotische Pore innerhalb der Plasmamembran (Ding et al., 2016; Liu et al., 2016). Aus diesem Grund wird Gasdermin D auch Pyroptose-Effektor genannt. Die so entstandene pyroptotische Pore ähnelt der nekroptotischen Pore, welche von MLKL gebildet wird und auch die Morphologie der toten Zellen ähnelt sich bei Pyroptose und Nekroptose. Jedoch kommt es bei der Pyroptose wie beim apoptotischen Zelltod zur Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung. Ein weiterer Unterschied zur Nekroptose ist, dass aktive Caspase-1 auch IL-1ß und IL-18 prozessiert, was zur Reifung dieser Zytokine führt. Durch die entstandene Gasdermin-Pore und die Zerstörung der Zellmembran werden diese Zytokine ein Charakteristikum des pyroptotischen Zelltodes ist und zur freigesetzt, was proinflammatorischen Reaktion führt (Brough und Rothwell. 2007; Martin-Sánchez et al., 2016). Für Gasdermin E, ein weiteres Mitglied der Gasdermin-Protein Familie, wurde gezeigt, dass es von aktiver Caspase-3 prozessiert wird und darauffolgend Poren in der Membran bildet und so zum lytischen Zelltod führt. Es wurde angenommen, dass dies der Effekt der sekundären Nekrose ist (Rogers et al., 2017). Eine andere Studie zeigte jedoch, dass nur spezielle Zellen Gasdermin E exprimieren, weswegen die Hypothese aufgestellt wurde, dass bei diesen Zellen Pyroptose anstatt Caspase-3-vermittelter Apoptose stattfindet (Wang et al., 2017).



Abbildung 4: Schematische Darstellung der verschiedenen programmierten Zelltod-Arten (modifiziert nach Lamkanfi und Dixit, 2010)

Zu sehen sind die morphologischen Unterschiede und die Charakteristika der Apoptose, welche als "stiller" Zelltod gilt, im Gegensatz zu den proinflammatorischen Zelltodarten der Nekroptose und der Pyroptose. Weitere Details der zugrundeliegenden Signalwege siehe Text.

2.7 Die angeborene Immunität

Das Immunsystem, welches Infektionen entgegenwirken und kontrollieren soll, kann in die angeborene und die erworbene Immunabwehr unterteilt werden. Die erworbene Immunabwehr wird von T-Zellen, B-Zellen und Antikörpern vermittelt. Sie ist an der Eliminierung der Krankheitserreger in der späteren Phase der Infektion beteiligt, sowie am Aufbau eines immunologischen Gedächtnisses, so dass sie vor allem vor Sekundärhier ein Abwehrsystem Infektionen schützt und effektives. adaptiertes bildet (Kawai und Akira, 2006). Die angeborene Immunabwehr ist die erste Verteidigungslinie des Körpers vor Krankheitserregern und ist evolutionär hoch konserviert. Als erstes treffen Mikroorganismen auf Epithelzellen und den Säuremantel der Haut, was eine unspezifische mechanische und chemische Barriere darstellt. Schafft es ein Erreger diese zu durchbrechen, trifft er in dem Organismus auf das Komplement-System, sowie auf Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Natürliche Killerzellen, welche alle Bestandteil der angeborenen Immunantwort sind und zur weiteren Aktivierung des Immunsystems beitragen. Makrophagen sind hierbei die Hauptquelle für synthetisiertes TNFa bei bakteriellen Infektionen und sind darüber hinaus in der Lage, Krankheitserreger zu phagozytieren und direkt eliminieren diese (Aderem und Underhill, 1999; Ernst, 2000; zu Guha und Mackmann, 2001). Die Zellen der angeborenen Immunantwort tragen spezielle sogenannte pattern recognition Rezeptoren, Rezeptoren (PRR), mit denen sie Mikroorganismen erkennen können. PRRs sind stark konservierte Rezeptoren, die konservierte mikrobielle Komponenten, die sogenannten PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), erkennen und diese als Infektionserreger identifizieren. So kann der Organismus zwischen "selbst" und "fremd" unterscheiden und bei pathogenen Mikroorganismen eine protektive Immunantwort auslösen. Die wohl bedeutendste Gruppe der PRRs stellen die toll-like Rezeptoren (TLR) dar (Janeway und Medzhitov, 2002).

2.7.1 Toll-like Rezeptoren (TLR)

Die *Toll-like* Rezeptoren gehören zu den am besten untersuchten und charakterisierten PRRs. Bisher sind zehn verschiedene TLRs beim Menschen und 13 bei Mäusen beschrieben. TLRs sind Transmembranrezeptoren. Sie können sowohl in der Plasmamembran liegen, um Krankheitserreger außerhalb der Zelle zu detektieren, als auch in der Membran von Endosomen, um so intrazelluläre Erreger zu erfassen. Jeder TLR erkennt spezifische konservierte Muster von Pathogenen (PAMPs), um Erreger wie Bakterien, Viren, Pilze oder Protozoen zu identifizieren und gezielt bekämpfen zu können (Akira *et al.*, 2006; Chandler und Ernst, 2017). Basierend auf diesen Erkennungsmotiven können TLRs in verschiedene Gruppen eingeteilt werden: TLR1/2/6 erkennen Lipide, TLR4 erkennt Lipopolysaccharid (LPS), TLR5 detektiert Flagellin und TLR10 erkennt parasitäre Proteine. Sie alle liegen innerhalb der Plasmamembran, so dass sie extrazelluläre Erreger detektieren können. TLR3/7/8/9 hingegen sind in der Membran von Endosomen lokalisiert und erkennen Nukleinsäuren (Takeuchi und Akira, 2010). Strukturell gehören alle TLRs zu den integralen Membranproteinen. Sie bestehen aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne, welche eine variierende Anzahl an LRR-Motiven enthält, die einerseits für die Rezeptordimerisierung, andererseits für die Erkennung der Liganden wichtig sind. Darauf folgt eine Transmembranregion und eine zytoplasmatische Toll/IL-1 Rezeptordomäne (TIR). Diese ist nach Ligandenbindung dafür verantwortlich, die TLR-abhängigen Signale ins Zellinnere weiterzuleiten (Brown et al., 2011; Triantafilou et al., 2006). LPS, welches die Hauptkomponente der Außenmembran von gramnegativen Bakterien darstellt, ist auf die Anwesenheit von Co-Faktoren angewiesen, um effizient TLR4 aktivieren zu können. LPS bindet zunächst über seine Lipid A-Domäne an das LPS-bindende Protein (LBP) im Blut. Dieser Komplex interagiert daraufhin mit dem Oberflächenmolekül CD14 (cluster of differentiation 14) und dieser Komplex wiederum interagiert nun mit TLR4 und seinem Ko-Rezeptor MD2 (Chandler und Ernst, 2017). Durch die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor wird die TLR-abhängige Signalkaskade aktiviert. Es kommt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch TIR-Domäne-enthaltende Adaptermoleküle zu der TIR-Domäne des Rezeptors rekrutiert werden. Diese Adaptermoleküle sind notwendig, um downstream liegende Kinasen und Transkriptionsfaktoren zu aktivieren, welche darauffolgend die Immunantwort des Wirtes und die Produktion entzündungsfördernder Zytokine regulieren. Unterschiede in der Immunantwort, welche durch verschiedene Liganden ausgelöst werden, sind teilweise auf unterschiedliche Adaptermoleküle und die dadurch aktivierten Signalwege zurückzuführen (Takeuchi und Akira, 2010). TLR4 verwendet für die Signalweiterleitung die Adaptermoleküle MyD88 (myeloid differentiation factor 88) und TRIF (*TIR-domain-containing adaptor inducing interferon-* β). Diese beiden Wege werden im Folgenden genauer erläutert werden und sind in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

Der Myd88-abhängige Weg wird von allen TLRs, außer TLR3, genutzt, um die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen auszulösen. MyD88 besitzt zusätzlich zur TIR-Domäne eine N-terminale Todesdomäne (*death domain*, DD), über die es mit IRAK4 (*IL-1R-associated kinase*) interagiert. IRAK4 ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche daraufhin andere Mitglieder der IRAK-Familie aktiviert (IRAK1/2). Diese Proteine dissoziieren nun von MyD88 ab und interagieren im Zytosol mit TRAF6 (*TNFR-associated factor 6*), was als

E3-Ubiquitin-Ligase fungiert. TRAF6 katalysiert zusammen mit dem E2-Ubiquitin-Enzym-Komplex die Bildung von Lysin-63-Polyubiquitinketten an TRAF6 selbst und an NEMO (*IKK* γ /*NF* κ *B essential modulators*). Dies führt zur Aktivierung eines Komplexes, welcher aus TAK1 (*TGF-\beta-activated kinase 1*), TAB1 (*TAK1-binding protein1*), TAB2 und TAB3 besteht und der im aktiven Zustand nun sowohl den NF κ B- als auch die MAPK-Signalwege aktivieren kann (Brown *et al.*, 2011; Takeuchi und Akira, 2010).

TRIF besitzt eine N-terminale TRAF-bindende Domäne, mit der es mit TRAF3 interagieren kann und über TBK1 eine Aktivierung von IRF3 auslöst. Durch diese IRF3-Aktivierung folgt dann eine Induktion von Typ-1 Interferonen. TRIF besitzt darüber hinaus auch eine C-terminale RHIM (*RIP homotypic interaction motif*) Domäne, über die es mit RIP1 interagieren kann. Diese Interaktion kann auch zu einer Aktivierung des NFkB-Signalweges über den TAK1/TAB1/2-Komplex führen (Brown *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2008; Takeuchi und Akira, 2010).

Der NF κ B-Signalweg wird von dem IKK-Komplex reguliert. Dieser Komplex besteht aus IKK α , IKK β und NEMO. Wird der Signalweg aktiviert, kommt es zu einer IKK-Komplexvermittelten Phosphorylierung von I κ B (*inhibitor of \kappaB*). Bei I κ B handelt es sich um einen Inhibitor, der im nicht stimulierten Zustand an NF κ B bindet und so dessen Aktivierung verhindert. Auf die Phosphorylierung von I κ B folgt dessen Lys48-Ubiquitinierung und dadurch der proteasomale Abbau. Das nun freigesetzte, aktivierte NF κ B transloziert in den Kern und kann dort die Transkription proinflammatorischer Faktoren induzieren. Zudem wirkt NF κ B der Induktion von Apoptose entgegen, indem es die Transkription antiapoptotischer Gene induziert (Brown *et al.*, 2011; Kanarek *et al.*, 2010; Takeuchi und Akira, 2010).





Nach LPS-Stimulation vermittelt der TLR4-Signalweg über die Adaptermoleküle Myd88 und TRIF die Induktion der Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen oder von Typ-1 Interferonen.

2.7.2 Die Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase-(MAPK)-Signalwege

Die MAPK-Signalwege sind weitere hoch konservierte Signalwege, welche über externe Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zellstress oder Zytokine aktiviert werden und zelluläre Prozesse wie beispielsweise Proliferation, Differenzierung und Zelltod regulieren (Zhang et al., 2015). Sie beinhalten drei parallele Kinase-Kaskade-Signalwege, welche wiederum aus je einer dreistufigen Signalkaskade bestehen. Nach Aktivierung durch extrazelluläre Stimuli wird zunächst die übergeordnete MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK) aktiviert. Diese stimuliert wiederum die darunterliegende MAPK-Kinase (MAPKK) durch eine Serin/Threonin-Phosphorylierung innerhalb des Kinase-Aktivierungsloops. MAPKK sind dann in der Lage, MAP-Kinasen (MAPK), vermittelt durch eine Thyrosin oder Threonin-Phosphorylierung im Kinase-Aktivierungsloop, zu aktivieren. Dies führt zu einer Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, Zytoskelettproteinen, Kinasen und anderen Enzymen, welche die Zellteilung, den Zellmetabolismus und die Zellmorphologie regulieren. Die drei verschiedenen Kaskade-Signalwege wurden nach ihren jeweiligen downstream liegenden MAPK-Komponenten benannt: der ERK-Signalweg (extracellular regulated kinase), der JNK-Signalweg (c-Jun N-terminal Kinase) und der p38-Signalweg (Katz et al., 2007; Kyosseva, 2004; Zhang et al., 2015). Der ERK-Signalweg ist der bisher am besten untersuchte. Er wird durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, Mitogene oder oxidativen Stress aktiviert. Hauptsächlich spielt er eine Rolle bei der Regulation der Zell-Proliferation und Differenzierung, sowie der neuronalen Plastizität, dem Zellsterben oder Zellüberleben (Yoon und Seger, 2006). Der JNK-Signalweg wird vorwiegend als Antwort auf zellulären Stress, wie Hitze, ionisierende Strahlung, oxidativen Stress oder DNA-schädigenden Agenzien aktiviert. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zell-Proliferation und -Differenzierung, sowie der Aktivierung von Apoptose und Entzündungsreaktionen (Sabapathy, 2012).

2.7.2.1 Der p38α-Signalweg

Der p38-Signalweg ist einer der drei MAPK-Kaskaden und wurde 1994 von drei Gruppen identifiziert (Han *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994, Rouse *et al.*, 1994). Aufgrund der wichtigen Rolle des Signalweges bei der Regulation vieler inflammatorischer Reaktionen ist p38 ein intensiv erforschtes Zielprotein für die Behandlung und Inhibition von chronisch entzündlichen Erkrankungen (Singh *et al.*, 2017). Insgesamt sind vier verschiedene Isoformen von p38 bekannt: p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ . p38 α wird ubiquitär in den meisten Zellarten exprimiert und ist aus diesem Grund am besten charakterisiert, wohingegen p38 β , p38 γ und p38 δ gewebsspezifisch exprimiert werden und andere spezifischere Funktionen haben (Cuadrado und Nebreda, 2010). In Säugetierzellen wird der p38-Signalweg hauptsächlich von Stresssignalen, wie oxidativem Stress, UV Strahlung, Sauerstoffmangel (Ischämie) oder von Zytokinen, wie TNFa oder IL-1, aktiviert (Cargnello und Roux, 2011). Durch diese Stimuli werden verschiedene MAPKKK aktiviert, welche wiederum eine Aktivierung von MKK3 (MAPKK), MKK4 (MAPKK) oder MKK6 (MAPKK) auslösen. MKK6 phosphoryliert und aktiviert alle vier p38-Isoformen. MKK3 phosphoryliert hingegen nur p38a, p38y und p38a, nicht aber p38ß, und MKK4 aktiviert nur p38a (Alonso et al., 2000; Enslen et al., 1998). Die Phosphorylierung im Aktivierungsloop an Thr180 und Tyr182 führt zu einer Konformationsänderung von p38, wobei es aus einer geschlossenen, inaktiven Form in eine offene übergeht, welche in der Lage ist, ein Substrat und ATP zu binden (Cuadrado und Nebreda, 2010). Durch seine Rolle bei entzündlichen Erkrankungen ist p38a ein interessantes pharmazeutisches Zielprotein. Pyridinyl-Imidazolverbindungen, wie SB203580, waren die ersten p38-Inhibitoren. Sie inhibieren effektiv p38 durch eine kompetitive Bindung an die ATP-Bindungsstelle. Aufgrund von Toxizität und schweren Nebenwirkungen hat jedoch bisher kein p38-Inhibitor eine klinische Zulassung bekommen (Singh et al., 2017). Durch Studien mit Inhibitoren sind dafür schon eine Vielzahl von p38-Substraten identifiziert worden (Cuadrado und Nebreda, 2010). Verschiedene zytosolische Proteine können von p38 phosphoryliert werden. Hier wäre beispielhaft FLIPs zu erwähnen, welches von p38 phosphoryliert und darauffolgend proteasomal abgebaut wird (Kundu et al., 2009). Auch Protein-Kinasen können Substrate von p38 sein. Sie sind in die Kontrolle der Genexpression involviert. MSK1/2 können als p38-Substrate die Transkriptionsfaktoren CREB, ATF1, NFkB und STAT1/3 phosphorylieren und aktivieren, wodurch die Genexpression von entzündungsfördernden Zytokinen aktiviert wird. Eine weitere Protein-Kinase, welche als Substrat von p38 bekannt ist, ist MK2 (MAPK-activated protein kinase-2), welche im Folgenden näher erläutert werden soll.

2.7.2.2 Die MAPK-aktivierte Protein Kinase-2 (MAPKAPK, MK2)

MK2 ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche zur Familie der MAPK-aktivierten Proteinkinasen gehört und exklusiv und direkt von p38a und p38ß aktiviert wird. Zu dieser Familie gehören auch die phylogenetisch verwandten Kinasen MK3 und MK5, welche 75 % bzw. 42 % homolog zu MK2 sind. MK3 wird auch von p38α und p38β aktiviert, MK5 hauptsächlich über den ERK-Signalweg (Kotlyarov hingegen et al., 2002; Ronkina et al., 2008; Ronkina et al., 2010). MK2 besteht aus einer N-terminalen Prolinreichen Domäne, einer katalytischen Domäne und einer autoinhibitorischen α-Helix. Des Weiteren besitzt MK2 ein Kernlokalisationssignal (nuclear localization signal, NLS), ein Kernexportsignal (nuclear export signal, NES) und eine C-terminale Docking-(D)-Domäne, welche für die Interaktion mit p38 verantwortlich ist (Singh et al., 2017). In unstimulierten Zellen bilden p38 und MK2 einen Komplex, in dem das NLS konstitutiv aktiv ist und so den Komplex im Kern hält. Kommt es zu einer Aktivierung des Signalweges, wird MK2 an Thr222, Ser272 und Thr334 von p38 phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung an Thr334 wird die NLS maskiert und die NES freigelegt, so dass der p38/MK2-Komplex aus dem Kern in das Zytoplasma translozieren kann und dort downstream liegende Substrate aktivieren kann (Ben-Levy et al., 1998). Die Phosphorylierung an Thr334 wirkt damit als Schalter zwischen Kern Import und Export. Zusätzlich führt die Phosphorylierung dieser drei Phosphorylierungsstellen zu einer Konformationsänderung innerhalb der autoinhibitorischen α-Helix und so zur Aktivierung der MK2-Kinase (Ben-Levy et al., 1995). Innerhalb des p38/MK2-Komplexes stabilisieren sich beide Kinasen gegenseitig. So konnte gezeigt werden, dass das Expressionsniveau von p38 in MK2-defizienten Zellen reduziert ist und es umgekehrt zu einem geringeren Level an MK2 in p38-defizienten Zellen kommt (Kotlyarov et al., 2002, Sudo et al., 2005). MK2 spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion der inflammatorischen Zytokin Produktion. MK2-defiziente Mäuse sind vital, weisen jedoch einen Defekt in der LPS-induzierten Zytokin-Produktion auf (TNFa, IL-1β, IL-6, IL-10) und zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für Infekte (Kotlyarov et al., 1999; Roux und Blenis, 2004; Xiao et al., 2006). Dies kommt durch die MK2-vermittelte Regulation der Stabilität und Translation von mRNAs bestimmter Zytokine zustande. Aktives MK2 phosphoryliert verschiedene Substrate, darunter auch Tristetraprolin (TTP). In unstimulierten Zellen bindet TTP an AU-reiche Elemente (ARE) in der 3'-untranslatierten Region von instabilen Zytokin mRNAs und vermittelt so ihren Abbau. Durch die MK2-vermittelte Phosphorylierung von TTP bindet dies an 14-3-3 Proteine und nicht mehr an mRNA, was zur Stabilisierung ebendieser führt (Cargnello und Roux, 2011; Clement et al., 2011). Durch die Stabilisierung von mRNA ist MK2 essentiell für die LPS-induzierte Zytokin-Synthese. Des Weiteren ist MK2 in die Regulation der Struktur und Funktion des Zytoskeletts bei Leukozyten involviert. Durch die MK2-vermittelte Phosphorylierung von LSP1 (leukocyte-specific protein1), welches als F-Aktin bindendes Protein am Umbau des Aktinzytoskeletts beteiligt ist, reguliert MK2 Zellmigration. Diese ist besonders bei phagozytierenden Zellen der angeborenen Immunantwort wichtig, um eindringende Mikroorganismen zu eliminieren. MK2-defiziente Neutrophile zeigen einen Defekt in der gerichteten Migration (Hannigan et al., 2001; Huang et al., 1997; Klein et al., 1990). Aktuell rückt MK2 immer mehr in den Fokus als Zielprotein für mögliche therapeutische Ansätze gegen entzündliche Erkrankungen. Aufgrund seines Einflusses in der Induktion von proinflammatorischen Zytokinen, und da es exklusiv von p38 aktiviert wird, ist es ein potentieller neuer Angriffspunkt, um diesen inflammatorischen Signalweg zu inhibieren. Im besten Fall wäre die Inhibition des Signalweges über MK2 genauso effizient wie über p38, aber ohne die toxischen Nebenwirkungen, welche bei einer p38-Inhibition auftraten (Singh *et al.*, 2017; Qian *et al.*, 2016).

2.7.3 Die RIP1-Kinase

RIP1 gehört zur Familie der RIP-Kinasen (receptor interacting protein kinases), bei denen es sich um Serin/Threonin-Kinasen handelt und welche insgesamt sieben Mitglieder umfasst (RIP1-7). Bei der Regulation der bereits beschriebenen proinflammatorischen und Zelltod-Signalwege nimmt RIP1 eine Schlüsselrolle ein. Es kann als sogenannter molekularer Schalter bezeichnet werden und ist in der Lage, sowohl Zellüberleben, als auch Apoptose oder Nekroptose auszulösen. Werden Zellen nur mit TNF α oder LPS stimuliert, überleben sie dies normalerweise. In diesem Fall aktiviert RIP1 einen Zellüberlebens-Signalweg. Es muss demnach Mechanismen geben, die das zytotoxische Potential von RIP1 in diesem Moment unterdrücken. Diese sind jedoch noch nicht genau bestimmt. RIP1 ist aus drei verschiedenen Domänen aufgebaut: Der N-terminalen Kinasedomäne (KD), der Intermediärdomäne und der C-terminalen Todesdomäne (death domain, DD) (Abbildung 6). Die DD ist in Interaktionen mit Proteinen involviert, welche ebenfalls eine DD enthalten. Hierzu zählen Todesrezeptoren, wie FAS und TNFR1, sowie Adapterproteine, wie beispielsweise FADD und TRADD. Nach Ligandenbindung an den jeweiligen Rezeptor werden durch diese Interaktionen Signalkomplexe an der Plasmamembran oder im Zytosol gebildet. Beispielsweise kann durch die Interaktion von RIP1 mit der DD von FADD Apoptose ausgelöst werden (Park et al., 2007; Park et al., 2013). Neben der DD befindet sich die Intermediärdomäne. Innerhalb dieser Domäne wird RIP1 am Lysin 377 ubiquitiniert, was eine wichtige Rolle bei der Regulation der verschiedenen Funktionen von RIP1 spielt. K377-ubiquitiniertes RIP1 wird von verschiedenen Ubiquitin-bindenden Proteinen erkannt (NEMO, TAB1, TAB2), die daraufhin an RIP1 binden und einen NFkB-abhängigen und unabhängigen Zellüberlebens-Signalweg aktivieren (Ea et al., 2006; Li et al., 2006; O'Donnell et al., 2007; Zhang et al., 2000). Darüber hinaus kann RIP1 noch an diversen anderen Stellen ubiquitiniert werden, für die jedoch noch keine genaue Funktion charakterisiert wurde. Zusätzlich enthält die Intermediärdomäne noch das RIP homotypic interaction motif (RHIM), über das die Interaktion mit anderen RHIM-enthaltenden Proteinen, wie RIP3 oder TRIF, ermöglicht wird (Kaiser et al., 2005; Sun et al., 2002). Innerhalb der N-terminalen Kinasedomäne befinden sich die konservierten funktionellen Bereiche der RIP1-Kinaseaktivität. Die ATP-Bindungstasche, welche essentiell für ATP Bindung und Hydrolyse ist, enthält die drei konservierten Aminosäuren Lys45-Glu63-Asp156. Es wurde gezeigt, dass eine Mutation von Lysin 45 zu Alanin (K45A) eine Kinase-inaktive RIP1-Mutante erzeugt (Sun et al., 2002). Des Weiteren liegen in der Kinase-Domäne alle bisher identifizierten potentiellen RIP1-Autophosphorylierungsstellen (Ser14/15, Ser20, Ser161 und Ser166) (Degterev et al., 2008). Ein Einfluss dieser Phosphorylierungen auf die RIP1-Kinaseaktivität und damit auf die Regulation von Zellüberleben und Zelltod wird angenommen, konnte aber bisher noch nicht für eine spezifische Stelle nachgewiesen werden. Viele weitere RIP1-Phosphorylierungen (Ser6, Ser25, Ser303, Ser320, Ser330/331 und Ser333) hängen nicht von der RIP1-Kinaseaktivität ab und sind somit auf die Aktivität von externen Kinasen zurückzuführen. Auch für diese sind jedoch noch keine genauen Funktionen charakterisiert (Dondelinger et al., 2016). Dondelinger et al. (2015) konnten als erste eine unerwartete Rolle von IKKa und IKKß bei der Inhibition des zytotoxischen Potentials von RIP1 zeigen, die durch eine RIP1-Phosphorylierung vermittelt wird. IKK α und IKK β phosphorylieren RIP1 nach Aktivierung des TNFR1-Signalweges direkt und schützen damit die Zellen vor RIP1-Kinase-abhängigem Zelltod. Dies verläuft unabhängig von der protektiven Wirkung des IKK-Komplexes, welche durch die Aktivierung des NFkB-Signalweges vermittelt wird. Als mögliche Phosphorylierungsstellen weisen massenspektrometrische Untersuchungen auf Ser166, Ser331 und Ser416 hin (Dondelinger et al., 2015).



Abbildung 6: Schematische Darstellung der RIP1-Proteinstruktur (modifiziert nach Ofengeim und Yuan, 2013)

Dargestellt sind die verschiedenen RIP1-Domänen, sowie mögliche posttranslationale Modifikationen von speziellen Aminosäuren. P = Phosphorylierung; Ub = Ubiquitinierung; Ac = Acetylierung

Verschiedene *in vivo* Experimente zeigten, dass die Regulation von Zellüberleben und Zelltod mit RIP1 als Schlüsselprotein sehr komplex und fein abgestimmt ist. Mäuse mit einer homozygoten Deletion von RIP1 weisen eine normale embryonale Entwicklung auf, sterben jedoch schnell nach der Geburt (Kelliher *et al.*, 1998). Nur zusätzliche Deletionen von Caspase-8 (bzw. FADD) und RIP3 führen zu einer normalen Entwicklung und Reifung der

Mäuse. Die Deletion von entweder Caspase-8 (bzw. FADD) oder RIP3 rettet RIP1-defiziente Mäuse nicht vor dem postnatalen Tod. RIP1 unterdrückt demnach die Aktivierung des FADD-Caspase-8-abhängigen apoptotischen Signalweges, sowie des RIP3-abhängigen nekroptotischen Weges und hat somit einen schützenden Effekt. Fällt dieser schützende Effekt weg, sterben die Mäuse postnatal über den einen oder den anderen der beiden Zelltod-Signalwege (Dillon et al., 2014; Kaiser et al., 2014; Rickard et al., 2014). RIP1 kann jedoch in der embryonalen Entwicklung auch einen toxischen Effekt haben. Die alleinige Deletion von Caspase-8 (bzw. FADD) führt zu einem sehr frühen embryonalen Tod der Mäuse (Sakamaki et al., 2002; Varfolomeev et al., 1998; Yeh et al., 1998). Die zusätzliche Deletion von RIP1 bewirkt eine verlängerte embryonale Entwicklung bis zur Geburt der Mäuse. Dies lässt darauf schließen, dass die Letalität von Caspase-8-(bzw. FADD)-defizienten Embryonen über RIP1 verstärkt wird (Dillon et al., 2014; Kaiser et al., 2014; Zhang et al., 2011). Aus diesem Grund wurde RIP1 von Weinlich und Green (2014) auch als "Dr. Jekyll and Mr. Hyde" bezeichnet. Abhängig von posttranslationalen Modifikation und dem zellulären Kontext kann es unterschiedliche Funktionen einnehmen, die einer sehr genauen Regulation bedürfen. Bei einer Fehlregulation von RIP1 kann sowohl proinflammatorisches Verhalten, sowie Zellsterben beobachtet werden.

Am besten untersucht ist die Rolle von RIP1 bei der Signaltransduktion nach Aktivierung des TNF-Rezeptors-1 (TNFR1) durch seinen Liganden TNFα. Nach Stimulation des TNFR1 kommt es zur Ausbildung von verschiedenen Protein-Komplexen, von denen jeder das Zellschicksal in anderer Weise bestimmt. In allen Komplexen ist RIP1 enthalten und es spielt eine essentielle Rolle bei der Regulation der Entscheidung zwischen Zellüberleben und Zelltod (Abbildung 7).

Als Komplex I wird der membrangebundene Komplex bestehend aus TNFR1, TRADD, RIP1, TRAF2 und cIAP1/2 (*cellular inhibitor of apoptosis proteins*) bezeichnet. Er führt zur Aktivierung des NF κ B-Signalweges, zum Zellüberleben und zur Zellproliferation (Christofferson *et al.*, 2014; Micheau und Tschopp, 2003). Voraussetzung für die Ausbildung dieses Komplexes ist die cIAP1/2-vermittelte Lys63-Ubiquitinierung von RIP1 unter anderem am Lys377 (Bertrand *et al.*, 2008; Mahoney *et al.*, 2008; Varfolomeev *et al.*, 2008). Diese Ubiquitinierung bewirkt die Bindung und Ubiquitinierung von weiteren Proteinen, welche zusammen als Gerüst für die Rekrutierung des TAK1/TAB1/2-Komplexes und des IKK-Komplexes (IKK α /IKK β /NEMO) dienen (Haas *et al.*, 2009). Die Bindung dieser beiden Komplexe führt zur Aktivierung der NF κ B- und MAPK-Signalwege. Dies hat die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, sowie die Expression von antiapoptotischen Genen wie

cFLIP oder cIAP1/2 zur Folge. Diese sind in der Lage, die Bildung des proapoptotischen, zytoplasmatischen Komplex IIa, welcher aus TRADD, FADD und Caspase-8 besteht, zu inhibieren (Scheidereit, 2006). Des Weiteren wird RIP1 in Komplex I vom IKK-Komplex direkt phosphoryliert, was zusätzlich die zytotoxische Aktivität von RIP1 und den Übergang zum proapoptotischen Komplex IIb inhibiert. Komplex IIb wird aus RIP1, FADD und Caspase-8 gebildet (Dondelinger *et al.*, 2015). Dies zeigt, dass zusätzlich zur RIP1-Ubiquitinierung die RIP1-Phosphorylierung ein Mechanismus ist, über den die Entscheidung für Zellüberleben oder Zelltod reguliert wird. Für die Aktivierung des NFκB-Signalweges ist die Anwesenheit von RIP1 notwendig, wie RIP1-defiziente Zellen zeigten, die ein Defizit in der NFκB-Aktivierung nach TNFα-Stimulation aufweisen. Die NFκB-Aktivierung erfolgt RIP1-Kinase-unabhängig (Ting und Pimentel-Muinos, 1996). Die Inhibierung der antiapoptotischen Proteine, die Deubiquitinierung von RIP1, oder die Blockade der RIP1-Phosphorylierung durch die Inhibition des IKK-Komplexes hemmt die Ausbildung von Komplex I und bewirkt die Bildung von Komplex IIa oder IIb, welche Apoptose induzieren (Witt und Vucic, 2017).



Abbildung 7: Schematische Darstellung der TNFR1-vermittelten Komplexbildung und Signalweiterleitung (modifiziert nach Zhou und Yuan, 2014)

Bindung des Liganden TNF α an TNFR1 führt zur Bildung des membrangebundenen Komplex I. Dieser vermittelt die Aktivierung der NF κ B- sowie der MAPK-Signalwege. In Abwesenheit der antiapoptotischen Proteine wird der zytosolische Komplex IIa gebildet, welcher zu RIP1-unabhängiger Apoptose führt. Ist die RIP1-Phosphorylierung inhibiert oder wird RIP1 deubiquitiniert, kommt es zur Bildung von Komplex IIb und zu RIP1-abhängiger Apoptose. Wenn Caspase-8 inhibiert oder abwesend ist, interagiert RIP1 mit RIP3 und bildet das Nekrosom. Dieses ist an der Aktivierung der Nekroptose beteiligt. Im Nekrosom und in Komplex IIb ist die Kinaseaktivität von RIP1 essentiell, weswegen die Bildung dieser Komplexe mit Nec-1 blockiert werden kann.

In Abwesenheit der antiapoptotischen Proteine cFLIP und/oder cIAP1/2 löst sich der membrangebundene Komplex I ab, wandert ins Zytosol und wandelt sich dort in den proapoptotischen Komplex IIa um, welcher RIP1-unabhängig Zelltod auslöst. Wird RIP1 deubiquitiniert oder wird die RIP1-Phosphorylierung verhindert, kommt es im Zytosol zur Ausbildung von Komplex IIb. Für die Deubiquitinierung von RIP1 sind unter anderem die Deubiquitinasen (DUB) A20 (*TNFα-induced protein 3*) sowie CYLD (*cylindromatosis*) zuständig. Sie entfernen Ubiquitinketten, so dass nun unmodifiziertes RIP1 Komplex IIb bildet und dieser RIP1-Kinase-abhängig Apoptose auslöst. Der Ubiquitinierung status von RIP1 gibt demnach an, ob RIP1 Zellüberleben oder Zelltod bewirkt. Über die Aktivierung von Caspase-8 in Komplex IIa und IIb wird die Caspase-Kaskade aktiviert und Apoptose induziert (Christofferson *et al.*, 2014; Micheau und Tschopp, 2003; Witt und Vucic, 2017). Ist Caspase-8 aktiviert, prozessiert sie auch RIP1, um die RIP1-abhängige proinflammatorische Immunantwort zu inhibieren (Lin *et al.*, 1999; Ofengeim und Yuan, 2013).

In dem Fall, dass Caspase-8 oder FADD blockiert oder nicht vorhanden sind, bildet sich das Nekrosom und löst Nekroptose aus. Im Nekrosom ist über die RHIM-Domäne RIP3 an RIP1 gebunden. Während die Bildung von Komplex I unabhängig von der RIP1-Kinaseaktivität ist, ist die Bildung des Nekrosoms RIP1- und RIP3-Kinase-abhängig (Cho et al., 2009; He et al., 2009; Sun et al., 2002). Über die RIP1-RIP3 Interaktion kommt es zur Aktivierung von RIP3, welches MLKL aktiviert und so Nekroptose induziert (Sun et al., 2012; Zhao et al., 2012). Da die Bildung des Nekrosoms und des Komplexes IIb RIP1-Kinaseabhängig ist, kann die Bildung und somit die Ausführung von Zelltod unter diesen den RIP1-Kinaseinhibitor Necrostatin-1 Bedingungen durch blockiert werden (Degterev et al., 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die RIP1-Kinaseaktivität stark von posttranslationalen Modifikationen von RIP1 abhängt. De Almagro et al. (2016) zeigten, dass eine Mutation von Lys115 (K115R), welche eine Ubiquitinierung an dieser Stelle unmöglich macht, zu einer stark verminderten RIP1-Kinaseaktivität führt, was wiederum die Autophosphorylierung von RIP1 an Ser166 inhibiert. Diese RIP1-Mutanten sind unfähig, den Nekrosom-Komplex zu bilden, was zu einer verminderten Auslösung von Nekroptose führt. Dies zeigt einen stabilisierenden Einfluss der RIP1-Ubiquitinierung innerhalb des Nekrosoms, was die Bedeutung der posttranslationalen Modifikationen von RIP1 für die Regulation der RIP1-Kinaseaktivität, der Autophosphorylierung und auch der Ausführung von Zelltod unterstreicht (de Almagro et al., 2016).

Es konnte zudem ein weiterer RIP1-enthaltender Komplex, welcher sich unabhängig von der Aktivierung über Todesrezeptoren bildet, identifiziert werden. Er besteht aus den Proteinen

RIP1, FADD, Caspase-8 und cFLIP-Isoformen, ist abhängig von der RIP1-Kinaseaktivität und wird aufgrund der Schlüsselrolle von RIP1 auch Ripoptosom genannt. Das Ripoptosom ist etwa 2 MDa groß und in der Lage, sowohl Apoptose als auch Nekroptose auszulösen (Feoktistova et al., 2011; Tenev et al., 2011). Daher kommt es möglicherweise Komplex IIb bzw. dem Nekrosom gleich. Das Ripoptosom bildet sich aufgrund von genotoxischem Stress, welcher zu einer Reduktion von cIAP-Proteinen führt. Ob das Ripoptosom Caspase-8abhängige Apoptose oder RIP3-abhängige Nekroptose induziert, wird von der Caspase-Aktivität bestimmt, welche von den verschiedenen cFLIP-Isoformen reguliert wird. Beide cFLIP-Isoformen (cFLIP_L, long; cFLIP_S, short) inhibieren die Induktion von Apoptose über das Ripoptosom, nicht aber von Nekroptose. cFLIP_L bildet Heterodimere mit Caspase-8, welche eine begrenzte enzymatische Aktivität aufweisen, um Zelltod zu verhindern, nicht aber um Apoptose auszulösen (Boatright et al., 2004). Das Caspase-8/cFLIP_L Heterodimer prozessiert RIP1, was die Disassemblierung des Ripoptosoms und Zellüberleben bewirkt. Eine Heterodimer-Bildung von Caspase-8 und cFLIPs ist mit einem erhöhten RIP1-Niveau im Ripoptosom assoziiert, welches ausreicht, um RIP3 zu aktivieren und so Nekroptose auszulösen. Nur wenn es zu einer Caspase-8 Homodimer Bildung ohne cFLIP kommt, besitzt dieses ausreichend katalytische Aktivität, um die Caspase-Kaskade zu aktivieren und Apoptose auszulösen.

RIP1 kann nicht nur über die Todesrezeptoren wie TNFR1 aktiviert werden, sondern auch über TLR3 und TLR4. Für den TLR4-vermittelten MyD88-abhängigen Signalweg (2.7.1) wird RIP1 nicht benötigt. Jedoch ist RIP1 in den TRIF-vermittelten Signalweg eingebunden, welcher nur von TLR3 und TLR4 ausgelöst werden kann. Über die RHIM-Domäne kann TRIF mit RIP1 interagieren und die RIP1-abhängigen Signalkaskaden auslösen (Cusson-Hermance *et al.*, 2005; Takeuchi und Akira, 2010). Diese überschneiden sich mit denen der kanonischen TNFR1-Signalwege. Über den IKK-Komplex und TAK1 kann RIP1 den proinflammatorischen Signalweg aktivieren und Zellüberleben sichern. Über FADD und Caspase-8 induziert RIP1 den apoptotischen Signalweg und über die Interaktion mit RIP3 nekroptotischen Zelltod (Christofferson *et al.*, 2014; Humphries *et al.*, 2015; Weinlich und Green, 2014).

Die proapoptotischen Signale bei einer Yersinien-Infektion werden auch TLR4-abhängig induziert. Aus diesem Grund könnte RIP1 eine wichtige Bedeutung bei der durch Yersinien induzierten Immunmodulation innehaben, um Apoptose bei Makrophagen auszulösen.

3 Zielsetzung

Yersinien bilden ein Typ-III-Sekretionssystem aus, mittels dem sie Virulenzproteine, die sogenannten Yops (*Yersinia outer proteins*), in die Wirtszelle einschleusen. Dort modulieren die Yops wirtseigene Signalkaskaden, um im Wirt überleben und sich replizieren zu können. Eines dieser Yops ist YopP. YopP manipuliert die Signalweiterleitung innerhalb der TLR-Signalwege durch Hemmung verschiedener Kinasen in den NF κ B- und MAPK-Signalwegen. Durch die YopP-vermittelte Blockade der Kinasen kommt es zu einer Inhibition der Produktion von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen, zudem wird bei Makrophagen und dendritischen Zellen Apoptose ausgelöst.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Apoptose-induzierende Wirkung von YopP bei Makrophagen genauer zu charakterisieren. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand dabei die Kinase RIP1. RIP1 nimmt eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Entzündung und Zelltod ein. Eine Beteiligung von RIP1 am Yersinien-induzierten Zelltod wurde bereits postuliert. Des Weiteren war zuvor ein Einfluss von YopP auf die RIP1-Phosphorylierung beobachtet worden. In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob sich die Blockade der RIP1-Phosphorylierung durch YopP auf die Zytotoxizität von RIP1 auswirkt Dazu sollte die RIP1-Phosphorylierung zunächst genauer charakterisiert werden. Es sollte ermittelt werden, durch welche Kinase die RIP1-Phosphorylierung vermittelt wird und an welchen Aminosäuren dies stattfindet. Zusätzlich wurden die physiologischen Auswirkungen der RIP1-Phosphorylierung auf das Verhalten von stimulierten bzw. infizierten Makrophagen genauer betrachtet.

Insgesamt sollen diese Untersuchungen zu einem besseren Verständnis der Regulation von Zelltod und zellulärem Überleben bei bakteriellen Infektionen beitragen.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerätebezeichnung	Hersteller
"Mr. Frosty" Kryo-Einfriergefäß	Hartenstein GmbH (Würzburg)
Accujetpro®	Brand (Wertheim)
Brutschränke	B5090E, Heraeus (Hanau); Certomat BS-1,
	Sartorius (Göttingen)
Elektrophorese-/Agarosegelkammer	PeqLab (Erlangen)
Elektrophoresekammer/ SDS-PAGE Hoefer TM SE 400	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Gefrierschrank -80 °C Hera freeze	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Gefrierschränke -20 °C	Liebherr (Biberach an der Riß)
Infinite M200 Mikroplattenleser	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Kamera D5000	Nikon GmbH (Düsseldorf)
Kassette für Filmexposition	Hartenstein GmbH (Würzburg)
Kippschüttler	Hartenstein GmbH (Würzburg)
Kühlschränke	Liebherr (Biberach an der Riß)
Magnetrührer RCT basic	IKA (Staufen)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (Jena)
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon GmbH (Düsseldorf)
Mikrowelle	Severin (Sundern)
NanoDrop ND-1000 TM	PeqLab (Erlangen)
PCR-Bank	LTF Labortechnik (Wasserburg)
PCR-Mastercycler pro	Eppendorf (Hamburg)
pH-Meter Seven Easy	Mettler Toledo (Gießen)
Phosphoimager Typhoon FLA7000	Fuji-Film Europe (Freiburg)
Photometer Ultrospec 3100 Pro	Amersham Biosciences (Freiburg)
Pinzette	Hartenstein GmbH (Würzburg)
Pipetten	1 μl, 10 μl, 20 μl, 100 μl, 200 μl, 1.000 μl Gilson (Middleton, USA); Eppendorf (Hamburg)
PowerPac TM Universal Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Röntgenfilme	Fuji-Film Europe (Freiburg)

Röntgenfilmentwickler Curix 60	Agfa (Köln)
Rotationsschüttler	Hartenstein GmbH (Würzburg)
Roti®-PVDF-Membran Porengröße 0,45 µm	Roth (Karlsruhe)
Rotilabo-Block-Heater H250	Roth (Karlsruhe)
Scanner Scanjet G4050	HP (Böblingen)
sterile Werkbänke Hera Safe	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Sterilfilter Millex-GP 0,22 µm	Merck Millipore (Darmstadt)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
TriStar ² LB942 Mikroplattenleser	Berthold (Bad Wildbad)
UV-Dokumentationstisch Universal Hood II	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
UV-Lampe Intensilight C-HGFI	Nikon GmbH (Düsseldorf)
UV-Transilluminator ETX-20.M	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Vortexer L46	Labinco (Breda, Niederlande)
Waagen	440-47N Kern (Balingen-Frommern); Handy
Wasserhad CEL Typ 1012	Sartorius (Göttingen)
Western Blot Kommon	Unterstein CmbH (Wärzburg)
Western-Blot-Kammer	Hartenstein GmbH (Würzburg)
w natman Papier 0,35 mm	Die Le (Tr. (III)
	Binder (Tuttlingen)
Zellzählkammer (Neubauer, improved)	Hartenstein GmbH (Würzburg)
Zentrifugen	3K30 (Rotor 19776-H), Sigma (Osterode am Harz):
	5810 R (Rotor A-4-81) Eppendorf
	(Hamburg);
	5417 R (Rotor F45-30-11) Eppendorf
	(Hamburg);
	5424 R (Rotor FA-45-24-11) Eppendorf

4.1.2 Chemikalien

Standard Chemikalien wurden von AppliChem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Biozym (Hessisch Oldendorf), Fermentas (St. Leon-Roth), Fluka (Neu-Ulm), GE Healthcare (Freiburg), Merck Millipore (Darmstadt), Perkin Elmer (Waltham, USA), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim) bzw. Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA) bezogen.

4.1.3 Labormaterial und Zellkulturmaterial

Serologische Pipetten, Zellkulturschalen und -flaschen, Reagenzgefäße, sowie 1,5 ml, 2,0 ml, 15 ml bzw. 50 ml Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden von der Firma Falcon (Becton and Dickinson Europe, Le Pont de Claix, Frankreich), Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Kremsmünster, Österreich) und Eppendorf (Hamburg) bezogen.

4.1.4 Reagenzien und Kits

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und Kits	
Name	Hersteller
³² P-γ-ATP (9,25 MBq)	Hartmann Analytic (Braunschweig)
6 × DNA Loading Dye	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Ac-DEVD-AMC Caspase-3 Fluorogenic	BD Bioscience (San Jose, USA)
Substrate	
Albumin bovine Fraction	Serva (Heidelberg)
Aqua	Braun (Melsungen)
Bio-Rad Protein-Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Chrystal Violet	Merck Millipore (Darmstadt)
Color Prestained Protein Standard	New England BioLabs (Frankfurt am Main)
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche (Mannheim)
femtoLUCENT TM PLUS-HRP	G-Bioscience (St Louis, USA)
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
In-Fusion [®] HD Cloning Kit	Takara (Mountain View, USA)
IP/WB Optima C System	Santa Cruz (Dallas, USA)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel (Düren)
PEI (Polyethylenimin)	Polyscience Inc. (Washington, USA)
PeqGold Plasmid Miniprep Kit	PeqLab (Erlangen)
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche (Mannheim)
Protein A/G PLUS-Agarose Beads	Santa Cruz (Dallas, USA)
PureLink TM HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	New England BioLabs (Frankfurt am Main)
Recombinant Murine M-CSF	Peprotech (Hamburg)
Resolving Gel Buffer pH 8,8	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Roti-Safe GelStain	Roth (Karlsruhe)
Stacking Gel Buffer pH 6,8	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)

SYTOX Green [®] Nucleic Acid Stain	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
TA Cloning® Kit	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Trypan Blue Solution	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)

4.1.5 Antibiotika

Antibiotika wurden, wie angegeben, gelöst und durch Filtration unter Verwendung eines Filters mit 0,22 µm Porengröße sterilisiert.

Antibiotikum	Abkürzung	gelöst in	angesetzte Konzentration (mg/ml)	Endkonzentration (µg/ml)
Ampicillin	Amp	ddH ₂ O	100	100
Chloramphenicol	Chlor	70 % EtOH	2	20
Gentamycin	Genta	ddH ₂ O	10	100
Kanamycin	Kan	ddH ₂ O	50	50
Nalidixinsäure	Nal	1M NaOH	6	60

Tabelle 3: Verwendete Antibiotika

4.1.6 Enzyme

Alle *Fast Digest*®-Restriktionsendonukleasen wurden von Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA) bezogen.

Tabelle 4:	Verwendete	Enzyme

Tabelle 4. Vel wendete Enzyme	
Name	Hersteller
FastAP Thermosensitive Alkaline	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Phosphatase	
Pfu Ultra II Polymerase	Agilent (Santa Clare, USA)
T4-DNA-Ligase	New England BioLabs (Frankfurt am Main)

4.1.7 Inhibitoren und Stimulatoren

Tabelle 5: Verwendete Innibitoren	und Stimulatoren	
Name	Endkonzentration	Hersteller
BMS-345541	5 μΜ	Sigma-Aldrich (Steinheim)
GSK'872	2 µM	Calbiochem (Darmstadt)
LPS (von <i>E. coli</i> O55:B5)	1 µg/ml	Sigma-Aldrich (Steinheim)
MK2 Inhibitor III	20 µM	Calbiochem (Darmstadt)
murines TNFα	50 ng/ml	Biomol (Hamburg)

Tabelle 5: Verwendete Inhibitoren und Stimulator

Necrostatin-1s	50 μΜ	Focus Biomolecules (Plymouth Meeting, USA)
NG25	10 µM	Hycultec (Beutelsbach)
NP-009245	1 μM	AnalytiCon (Potsdam)
PD 98059	10 µM	Tocris Bioscience (Bristol, GB)
PF-3644022	15 μΜ	Sigma-Aldrich (Steinheim)
SB 203580	20 µM	Tocris Bioscience (Bristol, GB)
SP 600125	10 μΜ	Tocris Bioscience (Bristol, GB)
TPCA-1	5 μΜ	Tocris Bioscience (Bristol, GB)
zVAD	20 µM	Bachem (Bubendorf, Schweiz)

4.1.8 Antikörper

Tabelle 6: Verwendete primäre un	d sekundäre Antikörper		
Spezifität	Spezies/Verdünnung	Hersteller	
primäre Antikörper			
Aktin	IgG ₂ Maus (1:2.000)	Merck Millipore (Darmstadt)	
	Klon C4		
Caspase-8	Kaninchen (1:1.000)	Cell Signaling (Leiden,	
		Niederlande)	
cleaved-Caspase-8 (Asp387)	IgG Kaninchen (1:1.000)	Cell Signaling (Leiden,	
	Klon D5B2	Niederlande)	
FADD	IgG Kaninchen (1:1.000)	Abcam (Cambridge, GB)	
	Klon EPR5030		
HA-Peroxidase	IgG ₁ Ratte (1:5.000)	Roche (Mannheim)	
	Klon 3F10		
Myc-Tag	IgG _{2a} Maus (1:1.000)	Cell Signaling (Leiden,	
	Klon 9B11	Niederlande)	
RIP1	IgG _{2a} Maus (1:2.000)	BD Bioscience (San Jose,	
	Klon 38	USA)	
phospho-RIP1 (Ser166)	Kaninchen (1:1.000)	Cell Signaling (Leiden,	
		Niederlande)	
sekundäre Antikörper			
Kaninchen	IgG Meerrettichperoxidase-	JIR (Dianova, Hamburg)	
	gekoppelt Ziege (1:20.000)		
Maus	IgG Meerrettichperoxidase-	JIR (Dianova, Hamburg)	
	gekoppelt Ziege (1:20.000)		
Ratte	IgG Meerrettichperoxidase-	Santa Cruz (Dallas, USA)	
	gekoppelt Ziege (1:5.000)		

4.1.9 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide/Primer wurden von eurofins (Hamburg) bezogen und bei -20 °C gelagert.

Name des Primers	Beschreibung	Sequenz $5' \rightarrow 3'$
Q5RIP1_S321D_fw	Mutationsprimer für	gagaatgtttgacctgcagcatgactgtgtac
	Q5-Kit RIP1 S321D	
Q5RIP1_S321D_rev	Mutationsprimer für	tgcagcactgggctttga
	Q5-Kit RIP1 S321D	
Q5RIP1_S336D_fw	Mutationsprimer für	caggtcaaatgacgaacaacctggatcg
	Q5-Kit RIP1 S336D	
Q5RIP1_S336D_rev	Mutationsprimer für	ctcggaggtaagggtaca
	Q5-Kit RIP1 S336D	
S321 T961G FP	Mutagenese Primer	gtgctgcagagaatgtttgcactgcagcatgactgtg
	RIP1 S321A	
S321 T961G RP	Mutagenese Primer	cacagtcatgctgcagtgcaaacattctctgcagcac
	RIP1 S321A	
S336A T1006G FP	Mutagenese Primer	ctccgagcaggtcaaatgcagaacaacctggatcg
	RIP1 S336A	
S336A T1006G RP	Mutagenese Primer	cgatccaggttgttctgcatttgacctgctcggag
	RIP1 S336A	
mRIP1_K45A forw	Mutagenese Primer	ccatggatttgtcatcctggcaaaagtatacacagggccc
	RIP1 K45A	
mRIP1_K45A rev	Mutagenese Primer	gggccctgtgtatacttttgccaggatgacaaatccatgg
	RIP1 K45A	
fwRIP1_pSicoNheI	In-Fusion Primer für	cggcgcctacgctagcaccatgcaaccagacatgtccttgg
	RIP1 in pSico-EF1α-	
	Puro (ohne mCherry)	
rwRIP1_pSicoXmaI	In-Fusion Primer für	cctctgccctcccggggggctctggctggcacgaatcaagtg
	RIP1 in pSico-EF1α-	
	Puro (ohne mCherry)	

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide

4.1.10 Plasmide und Vektoren

Tabelle 8: Verwendete prokaryotische und eukarytoische Expressionsplasmide
--

Plasmid/Vektor	Beschreibung	Referenz
CrmA	pCMV, CrmA-Protein (Kuhpocken), Amp^{R}	Pickup <i>et al.</i> , 1982
pcDNA3.1 (+/-)	Expressionsvektor, Amp^{R}	Thermo Fischer Scientific (Waltham,
		USA)
pcDNA3.1 (+/-) + mRIP1- K45A	pCMV, murines RIP1 K45A mit myc- Tag C-terminal, Amp ^{<i>R</i>}	AG Ruckdeschel

pcDNA3.1 (+/-) + mRIP1- K45AAA	pCMV, murines RIP1 K45A, S321A, S336A mit myc-Tag C-terminal, Amp ^R	AG Ruckdeschel
pcDNA3.1 (+/-) + mRIP1- SSAA	pCMV, murines RIP1 S321A, S336A mit myc-Tag C-terminal, Amp ^{<i>R</i>}	AG Ruckdeschel
pcDNA3.1 (+/-) + mRIP1- SSDD	pCMV, murines RIP1 S321D, S336D mit myc-Tag C-terminal, Amp ^{<i>R</i>}	AG Ruckdeschel
pcDNA3.1 (+/-) + mRIP1- WT	pCMV, murines RIP1 mit myc-Tag C-terminal, Amp ^{<i>R</i>}	AG Ruckdeschel
pCR2.1 TOPO	Klonierungsvektor, bakterielle Expression, Amp ^{<i>R</i>} , Kan ^{<i>R</i>}	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
pCMV-HA-Ubi	Drei Kopien des humanen Ubiquitin-C- Gens in pCMV-HA, Ubiquitinprotein jeweils mit N-terminalem HA-Tag, Amp^{R}	AG Ruckdeschel
pMD2.G	Lentiviraler Vektor, pCMV, VSV-G (envelope), Amp ^{<i>R</i>}	UKE Vector Facility (I. Braren)
psPAX2	Lentiviraler Vektor, pCMV, HIV-1 gag, HIV-1 pol (packaging), Amp ^{<i>R</i>}	UKE Vector Facility (I. Braren)
pSicoR-EF1α-mCh-Puro	Lentiviraler Expressionsvektor, mCherry-T2A-Puro ^{<i>R</i>} , Amp ^{<i>R</i>}	UKE Vector Facility (I. Braren)
pSicoR-EF1α-Puro-	Lentiviraler Expressionsvektor, EF1a-	diese Arbeit
mRIP1-K45A	Promoter, murines RIP1-(K45A)-T2A- Puro ^{R} (ohne mCherry), Amp ^{R} (4.2.1.11)	
pSicoR-EF1α-Puro-	Lentiviraler Expressionsvektor, EF1α-	diese Arbeit
MKIP1-K4JAAA	S321A, S336A)-T2A-Puro ^{R} (ohne mCherry), Amp ^{R} (4.2.1.11)	
pSicoR-EF1α-Puro- mRIP1-SSAA	Lentiviraler Expressionsvektor, EF1 α - Promoter, murines RIP1-(S321A, S336A)-T2A-Puro ^{<i>R</i>} (ohne mCherry), Amp ^{<i>R</i>} (4.2.1.11)	diese Arbeit
pSicoR-EF1α-Puro- mRIP1-SSDD	Lentiviraler Expressionsvektor, EF1 α - Promoter, murines RIP1-(S321D, S336D)-T2A-Puro ^{<i>R</i>} (ohne mCherry), Amp ^{<i>R</i>} (4.2.1.11)	diese Arbeit
pSicoR-EF1α-Puro- mRIP1-WT	Lentiviraler Expressionsvektor, EF1 α - Promoter, murines RIP1-T2A-Puro ^{<i>R</i>} (ohne mCherry), Amp ^{<i>R</i>} (4.2.1.11)	diese Arbeit

4.1.11 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz	
Escherichia col	li		
DH5a	F- φ 80d <i>lac</i> Z Δ M15, <i>rec</i> A1, <i>end</i> A1, <i>gyr</i> AB, <i>thi</i> -1,	Hanahan, 1983	
	$hsdR17(r_{K-}, m_{K+}), supE44, relA1, deoR,$		
	$\Delta(lacZYA$ -argF) U169, phoA		
TOP 10	<i>F</i> - <i>mcrA</i> , Δ (<i>mcrBC</i> - <i>hsd</i> RMS- <i>mrr</i>), <i>end</i> A1, <i>rec</i> A1,	Thermo Fischer	
	relA1, gyrA96, Φ 80lacZ Δ M15, deoR, nupG,	Scientific (Waltham,	
	araD139, F(lacIq, Tn10 (Tetr)), galU, ΔlacX74,	USA)	
	galK, $\Delta(araleu)$ 7697		
Stellar TM	F-, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96,	Takara (Mountain	
	phoA, Φ 80d lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF) U169,	View, USA)	
	Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Δ mcrA, λ -		
Yersinia enterocolitica			
WA	WA-314 O:8, pYVO8-Virulenzplasmid,	Heesemann und Laufs,	
	Biogruppe 1B, intrinsische Nal-Resistenz	1983	
WA- $\Delta yopP$	WA-P, yopP-Gen durch Chlor-Kassette ersetzt	Trulzsch et al., 2004	

Tabelle 9: Verwendete Bakterienstämme

4.1.12 Zelllinien und Zellkulturmedien

Name	Beschreibung/Referenz	Kultivierungs- Bedingungen
HEK293	ATCC: CRL 1573; immortalisierte humane	DMEM, 10 % FBS,
	embryonale Nieren-Zelllinie	optional 100 µg/ml
		Pen/Strep
J774A.1	ATCC: TIB-67; immortalisierte murine	RPMI 1640, 10 %
	Makrophagen-Zelllinie	FBS, 5 mM
		L-Glutamin, optional
		100 µg/ml Pen/Strep
KMM WT	Immortalisierte Knochenmarks-Makrophagen	DMEM, 10 % FBS,
	aus Wildtyp-Mäusen (Ehlting et al., 2011;	1 mM NEAA
	Kotlyarov et al., 1999; Ronkina et al., 2007)	(Non-Essential-
		Aminoacids), optional
		100 µg/ml Pen/Strep
KMM	Immortalisierte Knochenmarks-Makrophagen	
MK2/MK3 ^{-/-} +	aus MK2/MK3-Doppelknockout-Mäusen mit	6.0
MK2	pMMP-IRES-MK2 rekomplementiert	5.0.
	(Ehlting et al., 2011; Ronkina et al., 2007)	

Tabelle 10: Verwendete Säugerzellen

KMMImmortalisierte Knochenmarks-MakrophagenMK2/MK3 ^{-/-} +aus MK2/MK3-Doppelknockout-Mäusen mits.o.GFPpMMP-IRES-GFP rekomplementierts.o.(Eblting et al., 2011; Ronkina et al., 2007)s.o.MEF WTImmortalisierte murine embryonale Fibroblastens.o.aus Wildtyp-Mäusens.o.(Ronkina et al., 2007; Ronkina et al., 2011)s.o.MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblastens.o.#RIP1-Knockout-Mäusen (Mack et al., 2008)s.o.MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblastens.o.#RIP1-Ka5Aaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1αs.o.Puro-mRIP1-K45A rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.s.o.MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblastens.o.+RIP1-aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1αs.o.K45AAAPuro-mRIP1-K45AAA rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblastens.o.+RIP1-SSDDaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α-s.o.aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α-s.o.s.o.Puro-mRIP1-SSAA rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.mitoralisierte murine embryonale Fibroblasten+RIP1-SSDDaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α-s.o.aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α-s.o.Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten+RIP1-SDDaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α-s.o			
MK2/MK3 ^{-/-} + aus MK2/MK3-Doppelknockout-Mäusen mit GFP s.o. GFP pMMP-IRES-GFP rekomplementiert s.o. (Ehlting et al., 2011; Ronkina et al., 2007) s.o. MEF WT Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus Wildtyp-Mäusen s.o. mer Ad., 2007; Ronkina et al., 2011) s.o. MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen (Mack et al., 2008) s.o. MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1a- Puro-mRIP1-K45A rekomplementiert (4.2.2.12) s.o. MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten (4.2.2.12) s.o. MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSDD s.o. mertalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSDD s.o. p.o. MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SNOckout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12) s.o. MEF-Δrip Immortalisierte murine embryo	KMM	Immortalisierte Knochenmarks-Makrophagen	
GFP pMMP-IRES-GFP rekomplementiert (Ehlting et al., 2011; Ronkina et al., 2007) No. MEF WT Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus Wildyp-Mäusen (Ronkina et al., 2007; Ronkina et al., 2011) s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen (Mack et al., 2008) s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- s.o. s.o. HRF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1- s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1- s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1- s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSAA s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSDD s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSDD s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSDD s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-WT s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-WT s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-WT s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- s.o. <t< td=""><td>MK2/MK3^{-/-} +</td><td>aus MK2/MK3-Doppelknockout-Mäusen mit</td><td></td></t<>	MK2/MK3 ^{-/-} +	aus MK2/MK3-Doppelknockout-Mäusen mit	
(Ehlting et al., 2011; Ronkina et al., 2007) MEF WT Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus Wildtyp-Mäusen s.o. (Ronkina et al., 2007; Ronkina et al., 2011) s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen (Mack et al., 2008) s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-K45A s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1 s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1 s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1 s.o. HEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSAA s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten (4.2.2.12) s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSAD s.o. aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- Puro-mRIP1-SSAA rekomplementiert (4.2.2.12) s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-WT s.o. aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12) s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-WT s.o. MEF-Δ <i>rip</i>	GFP	pMMP-IRES-GFP rekomplementiert	5.0.
MEF WT Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus Wildtyp-Mäusen (Ronkina et al., 2007; Ronkina et al., 2011) s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen (Mack et al., 2008) s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen (Mack et al., 2008) s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-K45A s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1- s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1- s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SAA s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSAA s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSDD s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSDD s.o. MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-WT s.o. muro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12) s.o. puro-mRIP1-SSDD MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-WT s.o. muro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12) s.o. muro-mRIP1-SSDD		(Ehlting et al., 2011; Ronkina et al., 2007)	
aus Wildtyp-Mäusen (Ronkina et al., 2007; Ronkina et al., 2011) s.o. (Ronkina et al., 2007; Ronkina et al., 2011) MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen (Mack et al., 2008) s.o. MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-K45A aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1a- s.o. MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1- aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1a- (4.2.2.12) MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SAAA puro-mRIP1-K45AA rekomplementiert (4.2.2.12) MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSAA s.o. metr-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSDD s.o. mEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SNCkott-Mäusen mit pSicoR-EF1a- s.o. s.o. mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12) mCh-Puro-PIT-ST s.o. MEF-Δrip Immortalisierte	MEF WT	Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten	
(Ronkina et al., 2007; Ronkina et al., 2011) MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen (Mack et al., 2008) 8.0. MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-K45A s.o. MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten Puro-mRIP1-K45A rekomplementiert (4.2.2.12) s.o. MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1- aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1a- (4.2.2.12) s.o. MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSAA s.o. s.o. MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSAA s.o. MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSAD s.o. MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSDD s.o. MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSDD s.o. MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSDD s.o. mCh-Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12) s.o. puro-mRIP1-SSD MEF-Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-WT s.o. s.o. mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12) mortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1a- s.		aus Wildtyp-Mäusen	S.O.
MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen (Mack <i>et al.</i> , 2008)s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-K45As.o.s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1- aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α s.o.s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1- aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α s.o.s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSAAs.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSDA aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α s.o.s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSDD aus RIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSDD aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α s.o.s.o.Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-Δ <i>rip</i> s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-WT aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α s.o.s.o.Puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-WTs.o.Puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α s.o.s.o.Puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +Vektors.o.Puro-mRIP1-SNDSSPferdeserum,NFR1-Knockout-Mäusen (4.2.2.8)		(Ronkina et al., 2007; Ronkina et al., 2011)	
aus RIP1-Knockout-Mäusen (Mack et al., 2008)5.0.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten+RIP1-K45Aaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α Puro-mRIP1-K45A rekomplementiert (4.2.2.12)MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten+RIP1-aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α K45AAAPuro-mRIP1-K45A rekomplementiert(4.2.2.12)MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten+RIP1-SSAAaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α s.o.Puro-mRIP1-SSAA rekomplementiert (4.2.2.12)MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten+RIP1-SSDDaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α s.o.Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten+RIP1-WTaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α s.o.Puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten+RIP1-WTaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α s.o.mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)primäreprimäre Knochenmarks-Makrophagen ausTNFR1 ^{+/-} TNFR1-Knockout-Mäusen (4.2.2.8)S % Pferdeserum,Anninoacids), optionalMakrophagenImmortaliserte murine embryonale Fibroblasten+Vektoraus RIP1-Knockout-Mäusen (4.2.2.8)MakrophagenS % Pferdeserum,	MEF- Δrip	Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten	
MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten+RIP1-K45Aaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1a- Puro-mRIP1-K45A rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1- (4.2.2.12)s.o.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten (4.2.2.12)s.o.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten (4.2.2.12)s.o.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSAAs.o.+RIP1-SSAAaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1a- s.o. Puro-mRIP1-SSDD aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1a- s.o. Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSDDs.o.+RIP1-WTaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1a- puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-WTs.o.HEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-WTs.o.was RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1a- mortalisierte murine embryonale Fibroblasten +Vektors.o.mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)MEK, 10 % FBS, 5 % Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (Non- Essential- Aminoacids), optional 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT- Knochenmarks- Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.primäre WT- Knochenmarks-Makrophagen ausJou puro- Neither Maisen 4(2.2.8)s.o.		aus RIP1-Knockout-Mäusen (Mack et al., 2008)	8.0.
+RIP1-K45Aaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α Puro-mRIP1-K45A rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten (4.2.2.12)	MEF- Δrip	Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten	
Puro-mRIP1-K45A rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- (4.2.2.12)K45AAAPuro-mRIP1-K45AAA rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- puro-mRIP1-SSAA rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten puro-mRIP1-SSAA rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)Makrophagenprimäre Knochenmarks-Makrophagen aus RNechenmarks-DMEM, 10 % FBS, S % Pferdeserum, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (Non- Essential- Aminoacids), optional 100 µg/mI Pen/Strepprimäre WT- Knochenmarks-wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.primäre WT- Knochenmarks-wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.	+RIP1-K45A	aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α-	S.O.
MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- N45AAAs.o.K45AAAPuro-mRIP1-K45AAA rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- Puro-mRIP1-SSAA rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- Puro-mRIP1-SSDDs.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- Puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- Puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- primäre Knochenmarks-Makrophagen auss.o.TNFR1 ^{-/-} TNFR1-Knockout-Mäusen (4.2.2.12)DMEM, 10 % FBS, 5 % Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (<i>Non-Essential-Aminoacids</i>), optional 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT- Knochenmarks-wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.		Puro-mRIP1-K45A rekomplementiert (4.2.2.12)	
+RIP1- K45AAAaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- s.o.K45AAAPuro-mRIP1-K45AAA rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSAAs.o.+RIP1-SSAAaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- Puro-mRIP1-SSAA rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-SSDDs.o.+RIP1-SSDDaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +Vektors.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +Vektors.o.mCh-Puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.primäre mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.primäre MKnochenmarks-Makrophagen ausDMEM, 10 % FBS, 5 % Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (<i>Non-Essential-Aminoacids</i>), optional 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT- primäre Knochenmarks-Makrophagen ausDMEM, 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT- Knochenmarks-Wakrophagen aus0 µg/ml Pen/Strepprimäre WT- Knochenmarks-Wakrophagen auss.o.Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.	MEF- Δrip	Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten	
K45AAAPuro-mRIP1-K45AAA rekomplementiert (4.2.2.12)S.O.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten + RIP1-SSAAaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α - s.o. Puro-mRIP1-SSAA rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten + RIP1-SSDDaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α - s.o. Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten + RIP1-WTaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α - s.o. Puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten + Vektors.o.+RIP1-WTaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α - mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten + Vektors.o.+Vektoraus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α - mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.primäre Knochenmarks- MakrophagenDMEM, 10 % FBS, 5 % Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (Non- Essential- Aminoacids), optional 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT- primäre Knochenmarks-Makrophagen aus Knochenmarks- Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.	+RIP1-	aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α-	
(4.2.2.12)MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α - Puro-mRIP1-SSAA rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten + RIP1-WT aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten + Vektors.o.mch-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)DMEM, 10 % FBS, 5 % Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (<i>Non-Essential-Aminoacids</i>), optional 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT- primäre WT- Knochenmarks-primäre Knochenmarks-Makrophagen aus Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)S.o.	K45AAA	Puro-mRIP1-K45AAA rekomplementiert	S.O.
MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten+RIP1-SSAAaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α - Puro-mRIP1-SSAA rekomplementiert (4.2.2.12)MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α - s.o. Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α - s.o. Puro-mRIP1-WTMEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α - s.o. Puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +Vektor+Vektoraus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α - s.o. mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)primäre primäre NFR1- ⁷⁻ -S.O. mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)primäre MakrophagenDMEM, 10 % FBS, 5 % Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (Non- Essential- Aminoacids), optional 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT- primäre Knochenmarks-Makrophagen aus Knochenmarks-primäre Knochenmarks-Makrophagen aus S.o.Makrophagenprimäre Knochenmarks-Makrophagen aus Knochenmarks-Multoreherenminoacids, optional 100 µg/ml Pen/StrepPrimäre WT- Knochenmarks-s.o.Multoreherens.o.		(4.2.2.12)	
+RIP1-SSAAaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- Puro-mRIP1-SSAA rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- RIP1-WTs.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- RIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.primäreprimäre Knochenmarks-Makrophagen aus TNFR1 ^{-/-} DMEM, 10 % FBS, 5 % Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (<i>Non-Essential-Aminoacids</i>), optional 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT-primäre Knochenmarks-Makrophagen aus Knochenmarks- Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.MultersbareneWildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.	MEF- Δrip	Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten	
Puro-mRIP1-SSAA rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten + RIP1-WT aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten + vektor+Vektoraus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- s.o. mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)primäre primäre TNFR1-'-Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen (4.2.2.12)primäre mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)DMEM, 10 % FBS, 5 % Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (Non- Essential- Aminoacids), optional 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT- primäre WT- Knochenmarks-primäre Knochenmarks-Makrophagen aus Knochenmarks- Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.	+RIP1-SSAA	aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α-	S.O.
MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-WT aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α Puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-WT aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α s.o. Puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.primäre TNFR1 ^{-/-} primäre Knochenmarks-Makrophagen aus TNFR1- ^{/-} DMEM, 10 % FBS, 5 % Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (Non- Essential- Aminoacids), optional 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT- primäre Knochenmarks-Makrophagen aus Knochenmarks-primäre Knochenmarks-Makrophagen aus Mildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.		Puro-mRIP1-SSAA rekomplementiert (4.2.2.12)	
+RIP1-SSDDaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +RIP1-WTs.o.+RIP1-WTaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α Puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten +Vektors.o.mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.primäreprimäre Knochenmarks-Makrophagen aus TNFR1 ^{-/-} DMEM, 10 % FBS, 5 % Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (Non- Essential- Aminoacids), optional 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT-primäre Knochenmarks-Makrophagen aus Knochenmarks-s.o.primäre WT-primäre Knochenmarks-Makrophagen aus Knochenmarks-s.o.knochenmarks-s.o.s.o.knochenmarks-s.o.s.o.knochenmarks-s.o.s.o.knochenmarks-s.o.s.o.knochenmarks-s.o.s.o.knochenmarks-s.o.s.o.knochenmarks-s.o.s.o.knochenmarks-s.o.s.o.knochenmarks-s.o.s.o.	MEF- Δrip	Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten	
Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- Puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)primäreprimäre Knochenmarks-Makrophagen aus TNFR1- ⁷⁻ -DMEM, 10 % FBS, 5 % Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (Non- Essential- Aminoacids), optional 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT-primäre Knochenmarks-Makrophagen aus Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.	+RIP1-SSDD	aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α-	S.O.
MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α - Puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF- Δrip Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α - aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1 α - mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.primäreprimäre Knochenmarks-Makrophagen aus TNFR1-'DMEM, 10 % FBS, 5 % Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (Non- Essential- Aminoacids), optional 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT-primäre Knochenmarks-Makrophagen aus Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.		Puro-mRIP1-SSDD rekomplementiert (4.2.2.12)	
+RIP1-WTaus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- Puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.primäreprimäre Knochenmarks-Makrophagen aus TNFR1-'DMEM, 10 % FBS, 5 % Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (Non- Essential- Aminoacids), optional 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT-primäre Knochenmarks-Makrophagen aus Knochenmarks-100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT-primäre Knochenmarks-Makrophagen aus Knochenmarks-s.o.	MEF- Δrip	Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten	
Puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)MEF-ΔripImmortalisierte murine embryonale Fibroblasten+Vektoraus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)primäreprimäre Knochenmarks-Makrophagen ausTNFR1- ⁷⁻ -TNFR1-Knockout-Mäusen (4.2.2.8)Knochenmarks-S% Pferdeserum, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1% NEAA (Non- Essential- Aminoacids), optional 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT-primäre Knochenmarks-Makrophagen ausKnochenmarks-Kochenmarks-Makrophagen ausKnochenmarks-S.0.	+RIP1-WT	aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α-	S.O.
MEF-Δ <i>rip</i> Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten+Vektoraus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)primäreprimäre Knochenmarks-Makrophagen ausTNFR1-'-TNFR1-Knockout-Mäusen (4.2.2.8)Knochenmarks- Makrophagen2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (<i>Non-Essential-Aminoacids</i>), optional 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT-primäre Knochenmarks-Makrophagen ausMalmarks-Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.s.o.		Puro-mRIP1-WT rekomplementiert (4.2.2.12)	
+Vektoraus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α- mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)s.o.primäreprimäre Knochenmarks-Makrophagen ausDMEM, 10 % FBS, 5 % Pferdeserum,TNFR1-'TNFR1-Knockout-Mäusen (4.2.2.8)5 % Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (<i>Non-Essential-Aminoacids</i>), optional 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT-primäre Knochenmarks-Makrophagen ausIO0 µg/ml Pen/Strepprimäre WT-s.o.s.o.Knochenmarks-Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.	MEF- Δrip	Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten	
mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)primäreprimäre Knochenmarks-Makrophagen ausTNFR1-'-TNFR1-Knockout-Mäusen (4.2.2.8)Knochenmarks-2 mM L-Glutamin,Makrophagen10 mM HEPES,I mM Na-Pyruvat,1 % NEAA (Non-Essential-Aminoacids), optional100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT-primäre Knochenmarks-Makrophagen ausKnochenmarks-S.O.	+Vektor	aus RIP1-Knockout-Mäusen mit pSicoR-EF1α-	S.O.
primäreprimäre Knochenmarks-Makrophagen ausDMEM, 10 % FBS,TNFR1-/TNFR1-Knockout-Mäusen (4.2.2.8)5 % Pferdeserum,Knochenmarks-2 mM L-Glutamin,Makrophagen10 mM HEPES,I mM Na-Pyruvat,1 % NEAA (Non-Essential-Aminoacids), optional100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT-primäre Knochenmarks-Makrophagen ausKnochenmarks-Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.		mCh-Puro rekomplementiert (4.2.2.12)	
TNFR1-'TNFR1-Knockout-Mäusen (4.2.2.8)5 % Pferdeserum,Knochenmarks-2 mM L-Glutamin,10 mM HEPES,Makrophagen10 mM HEPES,1 mM Na-Pyruvat,I mM Na-Pyruvat,1 % NEAA (Non-Essential-Aminoacids), optional100 µg/ml Pen/Strep100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT-primäre Knochenmarks-Makrophagen ausKnochenmarks-Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.	primäre	primäre Knochenmarks-Makrophagen aus	DMEM, 10 % FBS,
Knochenmarks- Makrophagen2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (Non- Essential- Aminoacids), optional 100 µg/ml Pen/Strepprimäre WT- primäre WT- Knochenmarks-primäre Knochenmarks-Makrophagen aus Kildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.	TNFR1 ^{-/-} -	TNFR1-Knockout-Mäusen (4.2.2.8)	5 % Pferdeserum,
Makrophagen 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (<i>Non-Essential-</i> <i>Aminoacids</i>), optional 100 µg/ml Pen/Strep primäre WT- primäre Knochenmarks-Makrophagen aus Knochenmarks- Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8) s.o.	Knochenmarks-		2 mM L-Glutamin,
1 mM Na-Pyruvat, 1 % NEAA (Non- Essential- Aminoacids), optional 100 μg/ml Pen/Strepprimäre WT- primäre Knochenmarks-Makrophagen ausKnochenmarks- Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)S.O.	Makrophagen		10 mM HEPES,
1 % NEAA (Non- Essential- Aminoacids), optional 100 μg/ml Pen/Strepprimäre WT- primäre Knochenmarks-Makrophagen ausKnochenmarks- Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.	1 U		1 mM Na-Pyruvat,
Essential- Aminoacids), optional 100 μg/ml Pen/Strep primäre WT- Knochenmarks- Knochenmarks- Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8) S.o.			1 % NEAA (Non-
primäre WT- primäre Knochenmarks-Makrophagen aus Knochenmarks- Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8) s.o.			Essential-
primäre WT- primäre Knochenmarks-Makrophagen aus Knochenmarks- Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8) s.o.			Aminoacids), optional
primäre WT- Knochenmarks-primäre Knochenmarks-Makrophagen ausKnochenmarks- Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)s.o.			100 µg/ml Pen/Strep
Knochenmarks- Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8) s.o.	primäre WT-	primäre Knochenmarks-Makrophagen aus	
Malwanhagan	- Knochenmarks-	Wildtyp-Mäusen (4.2.2.8)	S.O.
Makrophagen	Makrophagen		

RIP1 ^{-/-}	Immortalisierte murine fetale Leber-	DMEM, 10 % FBS, 1 mM
Makrophagen	Makrophagen aus RIP1-Knockout-	NEAA (Non-Essential-
	Mäusen (Kang et al., 2015;	Aminoacids), optional
	Kelliher et al., 1998)	100 µg/ml Pen/Strep
RIP1 ^{+/+}	Immortalisierte murine fetale Leber-	
Makrophagen	Makrophagen aus Wildtyp-Mäusen	S.O.
	(Kang et al., 2015; Kelliher et al., 1998)	

Tabelle 11:	۲	verwendete Zellkulturmedier	n und	-zusätze
		er if en aeve Bennarvar meare		

Name	Beschreibung	Hersteller
Zellkulturmedien		
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle	Thermo Fischer Scientific
	Medium + Glutamax	(Waltham, USA)
DMEM, ohne Phenolrot,	Dulbecco's Modified Eagle	Thermo Fischer Scientific
ohne L-Glutamin	Medium	(Waltham, USA)
Opti-MEM®	Opti-MEM® I Reduced	Thermo Fischer Scientific
	Serum Medium, 1 ×	(Waltham, USA)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial	Thermo Fischer Scientific
	Institute Nr. 1640 Medium,	(Waltham, USA)
	mit L-Glutamin	
Zusätze/Zellkulturlösungen		
DPBS	Dulbecco's Phosphate	Thermo Fischer Scientific
	<i>Buffered Saline</i> (ohne Ca ²⁺ ,	(Waltham, USA)
	Mg^{2+}), 1 ×	
FBS	Fötales Rinderserum (fetal	Thermo Fischer Scientific
	bovine serum)	(Waltham, USA)
Glukose	D-(+)-Glucose solution,	Sigma-Aldrich (Steinheim)
	100 g/l	
HEPES	HEPES Buffer Solution, 1 M	Thermo Fischer Scientific
		(Waltham, USA)
L-Glutamin	L-Glutamin, 200 mM (100 ×)	Thermo Fischer Scientific
		(Waltham, USA)
MEM NEAA	MEM Non-Essential-	Thermo Fischer Scientific
	Aminoacids, 100 ×	(Waltham, USA)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin,	Thermo Fischer Scientific
	5.000 Units/ml; 5.000 µg/ml	(Waltham, USA)
Pferdeserum	Horse Serum	Thermo Fischer Scientific
		(Waltham, USA)
Puromycin	Puromycin Dihydrochloride,	Thermo Fischer Scientific
	10 mg/ml	(Waltham, USA)
Sodium Pyruvat	Sodium Pyruvate, 100 mM	Thermo Fischer Scientific
		(Waltham, USA)
Trypsin	0,25 % Trypsin-EDTA, 1 \times	Thermo Fischer Scientific
		(Waltham, USA)

4.1.13 Lösungen und Puffer

Alle Puffer wurden mit zweifach deionisiertem Wasser (ddH_2O) einer aus Ionenaustauschanlange (MilliQ, Millipore) angesetzt.

Tabelle 12: Zusammensetzung allgemein verwendeter Lösungen und Puffer		
Name	Zusammensetzung	
PBS, pH 7,4	10 mM Na ₂ HPO ₄	
(Phosphate Buffered Saline)	140 mM NaCl	
	2,5 mM KCl	
	1,8 mM KH ₂ PO ₄	
RIPA-Puffer	50 mM Tris HCl pH 8,0	
	150 mM NaCl	
	1 mM EDTA	
	1 mM EGTA	
	1 % (v/v) NP-40	
	0,5 % (w/v) DOC	
	0,1 % (w/v) SDS	
	1 mM NaF	
	20 mM β-Glycerolphosphat	
	1 mM Na ₃ VO ₄	
	0,4 mM PMSF	
	1 Tablette Complete Protease Inhibitor	
	Cocktail auf 50 ml	
	1 Tablette PhosSTOP auf 10 ml	
TAE-Puffer, pH 7,8	40 mM Tris HCl	
	20 mM Essigsäure (100 %)	
	1 mM EDTA	
TBS, pH 7,6	15 mM Tris HCl	
	140 mM NaCl	

4.1.13.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

4.1.13.2 Puffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und den Western-Blot

Tabelle 13: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für SDS-PAGE und Western-Blot		
Name	Zusammensetzung	
$4 \times Protein Ladepuffer$	12 % (w/v) SDS	
	40 % (v/v) Glycerol (86 %)	
	200 mM Tris HCl, pH 7,0	
	0,004 % (w/v) Bromphenolblau	
	5 % (v/v) β -Mercaptoethanol	
Blot-Puffer A, pH 10,4	300 mM Tris	
	10 % (v/v) Methanol	

Blot-Puffer B, pH 10,4	25 mM Tris
	10 % (v/v) Methanol
Blot-Puffer C, pH 9,4	25 mM Tris
	25 mM Aminohexansäure
	10 % (v/v) Methanol
PBS-Tween	$1 \times PBS$
	0,05 % (v/v) Tween 20
Sammelgel	5 % (v/v) Acryl-Bisacrylamid
	125 mM Tris HCl, pH 6,8 (Stacking Gel
	Buffer)
	0,1 % (w/v) SDS
	0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
	0,1 % (v/v) TEMED
SDS-Gelelektrophorese-Puffer (1 ×)	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	3,5 mM SDS
TBS-Tween	1 × TBS
	0,05 % (v/v) Tween 20
Trenngel	6-15 % (v/v) Acryl-Bisacrylamid
	375 mM Tris HCl, pH 8,8 (Resolving Gel
	Buffer)
	0,1 % (w/v) SDS
	0,1 % (w/v) Ammonium Persulfat
	0,04 % (v/v) TEMED

4.1.13.3 Puffer für die Immunpräzipitation bzw. Ko-Immunpräzipitation von Proteinen

aus Zellen

Tabelle 14: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für Immunpräzipitation bzw. Ko-Immunpräzipitation

Name	Zusammensetzung
Ko-IP Lysepuffer	10 mM Tris, pH 8,0
	1 % (v/v) NP-40
	10 % (v/v) Glycerol
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	5 mM β-Glycerolphosphat
	0,4 mM PMSF
	0,2 mM Na ₃ VO ₄
	1 mM NaF
	1 mM EGTA
	1 Tablette Complete Protease Inhibitor
	Cocktail auf 50 ml
	1 Tablette PhosSTOP auf 10 ml

Ubiquitin IP Lysepuffer	1 % (w/v) SDS
	50 mM Tris HCl pH 7,4
	5 mM EDTA
	10 mM DTT
	15 U/ml DNase
	1 Tablette Complete Protease Inhibitor
	Cocktail auf 50 ml
	1 Tablette PhosSTOP auf 10 ml
Ubiquitin IP Waschpuffer	50 mM Tris HCl pH 8,0
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM EGTA
	1 % (v/v) NP-40
	0,5 % (w/v) DOC
	1 mM NaF
	20 mM β-Glycerolphosphat
	1 mM Na ₃ VO ₄
	0,4 mM PMSF
	1 Tablette Complete Protease Inhibitor
	Cocktail auf 50 ml
	1 Tablette PhosSTOP auf 10 ml

4.1.13.4 Puffer für in vitro Kinase-Assay

Tabelle 15: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für einen in vitn	<i>o</i> Kinase-Assay

Name	Zusammensetzung
Kinase Lysepuffer	1 % (v/v) Triton X-100
	150 mM NaCl
	20 mM HEPES, pH 7,3
	5 mM EDTA
	5 mM NaF
	0,2 mM Na ₃ VO ₄
	1 Tablette Complete Protease Inhibitor
	Cocktail auf 50 ml
Kinase Waschpuffer	20 mM HEPES, pH 7,3
	0,025 % (v/v) NP-40
Kinase Puffer	20 mM HEPES, pH 7,3
	5 mM MnCl ₂
	5 mM MgCl ₂
	0,025 % (v/v) NP-40
Kinase Reaktionspuffer	Kinase Puffer
	30 µM ATP
	2 μCi (pro Ansatz)
	0,5 µg MBP (pro Ansatz)

Tabelle 16: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für einen Ac-DEVD-AMC-Assay		
Name	Zusammensetzung	
Caspase-Lysepuffer	1 % (v/v) NP-40	
	10 mM Tris HCl pH 7,4	
	10 mM NaCl	
	3 mM MgCl ₂	
	1 mM oxidiertes Glutathion	
	1 mM PMSF	
	0,3 mM Aprotinin > immer frisch	
	1 mM Leupeptin	
CFS-Puffer	10 mM DTT	
	10 mM HEPES, pH 7,4 (NaOH)	
	220 mM Mannitol	
	68 mM Sucrose	
	2 mM MgCl ₂	
	2 mM NaCl	
	2,5 mM H ₂ KPO ₄	
	0,5 mM EGTA	
	0,5 mM Na-Pyruvat	
	0,5 mM L-Glutamin	

4.1.13.5 Puffer für Ac-DEVD-AMC-Assay

Tabelle 16: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für einen Ac-DEVD-AMC-Assay

4.1.13.6 Puffer für die Herstellung kompetenter Bakterien

	Tabelle 17: Zusammensetzung der verwendeten Puff	er für die Herstellung kompetenter Bakterien
--	--	--

Name	Zusammensetzung
TFB1-Puffer, pH 5,8	15 % (v/v) Glycerol
(CH3COOH)	10 mM CaCl ₂
	30 mM Kaliumacetat
	100 mM RbCl ₂
	50 mM MnCl ₂
TFB2-Puffer	15 % (v/v) Glycerol
	10 mM MOPS
	75 mM CaCl ₂
	10 mM RbCl ₂

4.1.14 Medien für die Bakterienkultur

Alle Medien wurden mit zweifach deionisiertem Wasser einer (ddH_2O) aus Ionenaustauschanlange (MilliQ, Millipore) angesetzt und für 20 min bei 120 °C und 1,2 bar autoklaviert.

Tabene 18: Herstener/Zusammensetzung der verwendeten Medien für Dakterienkulturen	
Name	Hersteller/Zusammensetzung
LB-Medium	Roth (Karlsruhe)
$2 \times \text{YT-Medium}$	Roth (Karlsruhe)
SOC-Medium	2 % (w/v) Trypton
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glukose

Taballa 10. Hanatall ammongstrung dar vorwandstan Madian für Paktariankulturar

4.1.15 Verwendete Software

Microsoft Office Programme (Powerpoint, Word, Excel), GraphPad Prism 5, SnapGene, CLC DNA Workbench, ApE (Plasmid Editor, M. Wayne Davis), Multi Gauge V3.0 (Fuji-Film Europe, Düsseldorf).

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Plasmidpräparation

Die Isolation von Plasmid-DNA für analytische Zwecke erfolgte aus einer 2 ml Vorkultur, welche aus LB-Medium mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum bestand und mit einer Bakterienkolonie angeimpft wurde. Sie wurde über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA mit dem PeqGold Plasmid Miniprep Kit nach Herstelleranweisung. Zur Gewinnung größerer Mengen und qualitativ hochwertiger DNA wurde eine Plasmidisolation mit dem PureLinkTM HiPure Plasmid Maxiprep Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden 200 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum mit einer Bakterienkolonie angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Isolierte Plasmide wurden bei -20 °C aufbewahrt.

4.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA in Lösung lässt sich photometrisch bestimmen, da aromatische Basen der DNA ein Absorptionsmaximun bei 260 nm aufweisen. Aus der gemessenen Absorption kann die DNA-Konzentration berechnet werden. Eine Absorption von 1,0 entspricht hierbei einer DNA-Konzentration von 50 μ g/ml. Das Absorptionsmaximun von Proteinen liegt bei 280 nm. So kann aus dem Quotienten der OD 260 und 280 nm eine Aussage über die Reinheit der gemessenen DNA-Lösung getroffen werden. Im Optimalfall liegt der Quotient zwischen 1,8-2,0 bei diesen Werten ist die Verunreinigung durch Salze oder Proteine am geringsten. Die DNA-Konzentration einer Lösung wurde am NanoDrop (PeqLab) unter Einsatz von 1 μ l der Lösung ermittelt.

4.2.1.3 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Ein Restriktionsverdau von Plasmid-DNA (4.2.1.1) wurde zur Charakterisierung eines Plasmides oder im Rahmen einer Klonierung durchgeführt. Die Restriktionsspaltung beruht auf der Fähigkeit von bakteriellen Restriktionsenzymen, die Phosphodiesterbindungen der DNA an spezifischen Erkennungsstellen zu binden und zu spalten. Restriktionsendonukleasen des Typ II erkennen kurze (4-8 Basen) spezifische, meist palindromische Sequenzen und schneiden die doppelsträngige DNA in unmittelbarer Nähe zu dieser Sequenz. Es können glatte Enden (blunt ends) oder 3'- bzw. 5'-überhängende Enden (sticky ends) der DNA entstehen. Verwendet wurden in dieser Arbeit verschiedene Fast Digest®-Restriktionsendonukleasen (Thermo Fischer Scientific). Ein Standard-Ansatz erfolgte laut Herstellerangaben nach folgendem Schema:

0,5-1 µg	DNA
2 µl	$10 \times \text{Reaktionspuffer}$
1 µl	Restriktionsenzym (10 U/ml)
ad 20 µl	ddH ₂ O

Bei Bedarf konnten auch mehrere Restriktionsenzyme gleichzeitig eingesetzt werden. Die Inkubation erfolgte abhängig vom Enzym für 10-60 min bei 37 °C, mit anschließender 5-minütiger Hitze-Inaktivierung bei 65 °C bzw. 80 °C. Die vollständige Hydrolyse der Plasmid-DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (4.2.1.5).

4.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion wurden spezifische DNA-Abschnitte amplifiziert. Durch entsprechende Primer war es zudem möglich, eine Mutation an einer gewünschten Stelle in ein Plasmid einzubringen (4.2.1.10) oder ein gewünschtes Fragment mit Restriktionsschnittstellen bzw. anderen, für die Klonierung wichtigen Bereichen, zu verlängern (4.2.1.11). Die PCR-Ansätze und Bedingungen richteten sich nach den verwendeten Primern und der Länge des zu amplifizierenden Bereiches und werden jeweils in den Beschreibungen der Klonierungen genauer erläutert.

4.2.1.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden und die Größe von PCR-Produkten (4.2.1.4) kann kontrolliert werden. Die Auftrennung der DNA-Fragmente beruht auf unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten von Fragmenten mit verschiedenen Größen innerhalb einer Matrix aus Agarose: größere Fragmente wandern langsamer durch die Agarose-Matrix als kleinere Fragmente. Durch das Anlegen einer Gleichspannung wird die durch die Phosphatgruppen negativ geladene DNA im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch das Mitlaufen einen Größen-Standards (Gene Ruler 1 kb DNA Ladder) kann die ungefähre Größe der Fragmente abgeschätzt werden. Der Agarosegehalt des Gels richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente und lag meist zwischen 0,8-2,0 % (w/v) Agarose in 1 × TAE-Puffer mit 0.005 % (v/v) Roti-Safe GelStain versetzt. Der verwendete Farbstoff ist ein Fluorophor, welcher bei Bindung an DNA sein Absorptionsspektrum verändert. Durch die Nutzung von UV-Licht und einem Transilluminator wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht. Vor dem Auftragen der Proben in die Gel-Taschen wurden die Proben mit 6 × Probenpuffer (6 × DNA Loading Dye) versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1 × TAE-Puffer bei 80-100 V. Für eine mögliche Präparation der DNA aus dem Gel wurde ein Gelschneidetisch verwendet.

4.2.1.6 Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen oder aus Agarose-Gelen

Hergestellte PCR-Produkte (4.2.1.4) oder aus einem Agarose-Gel ausgeschnittene DNA (4.2.1.5) wurden mittels NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben aufgereinigt und so für die weitere Verwendung von Oligonukleotiden und Enzymen getrennt.

4.2.1.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine mögliche Religation eines durch Restriktionsverdau (4.2.1.3) linearisierten Vektors zu blockieren, wurde dieser mit einer Phosphatase (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase) dephosphoryliert. Dazu wurde der geschnittene Vektor mit 2 μ l FastAP Phosphatase direkt im Anschluss an den Restriktionsverdau für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde bei 75 °C und fünf Minuten Inkubation abgestoppt.

4.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die durch einen Restriktionsverdau hergestellten kompatiblen Enden eines linearisierten Vektors und eines Inserts lassen sich durch einen Ligationsansatz zusammenfügen. Das Enzym T4-DNA-Ligase bildet dabei unter ATP-Verbrauch eine Phosphodiester-Bindung zwischen der 3'-Hydroxyl-Gruppe eines DNA-Stranges und der 5'-Phosphat-Gruppe eines anderen DNA-Stranges. Vektor-DNA und Insert-DNA wurden etwa in einem Verhältnis 1:3-1:5 nach folgendem Schema eingesetzt:

1-100 ng	linearisierter Vektor
10-500 ng	geschnittenes Insert
1 µl	10 × Ligase Puffer
0,5 µl	T4-DNA-Ligase
ad 10 µl	ddH ₂ O

Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert und anschließend über Hitzeschock in *E. coli* transfomiert (4.2.2.4).

4.2.1.9 DNA-Sequenzierung

Eine Sequenzierung zur Überprüfung der Korrektheit eines Plasmides wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) entsprechend ihrer Standard-Protokolle durchgeführt.

4.2.1.10 Mutagenese von Plasmiden mit Hilfe des Q5® Site-Directed Mutagenesis Kits

Mit Hilfe des Q5® Site-Directed Mutagenesis Kits (New England BioLabs) konnten gewünschte Mutationen gezielt in existierende Plasmide eingebracht werden. Zunächst wurden spezielle Primer mittels des von New England BioLabs zur Verfügung gestellten *NEBase Changer*TM konzipiert. Diese beinhalteten im Vorwärts-Primer die gewünschte Mutation. Ein PCR-Reaktionsansatz mit diesen Primern setzte sich folgendermaßen zusammen:

12,5 µl	Q5 Hot Start High-Fidelity 2 × Master Mix
1,25 µl	Vorwärts-Primer (10 µM)
1,25 µl	Rückwärts-Primer (10 µM)
1-25 ng	DNA-Template
ad 25 ul	ddH2O

Die Bedingungen für einen solchen Reaktionsansatz im Thermocycler waren wie folgt:

Initiale Denaturierung98 °C	30 s		
Denaturierung	98 °C	10 s)
Annealing	50-72 °C	30 s	\geq 25 Zyklen
Elongation	72 °C	30 s/kBp	J
Finale Elongation	72 °C	2 min	
Pause	4 °C	∞	

Die Annealing-Temperatur richtete sich nach den verwendeten Primern und wurde, wie vom *NEBase ChangerTM* vorgeschlagen, eingestellt. Die Elongations-Zeit wurde an das zu amplifizierende Plasmid angepasst. Der Erfolg der PCR wurde mit einer geringen Menge des PCR-Produktes in einem Agarose-Gel (4.2.1.5) überprüft. Mit dem übrigen PCR-Produkt wurde eine KLD-Reaktion (Kinase-Ligase-DpnI-Reaktion) nach folgendem Schema durchgeführt:

1 µl	PCR-Produkt
5 µl	2 × KLD-Reaktions-Puffer
1 µl	10 × KLD-Enzym-Mix
3 µl	ddH ₂ O

Dieser Ansatz wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurden 5 µl des Ansatzes mittels Hitzeschock-Transformation (4.2.2.4) in chemisch kompetente *E. coli* transformiert. 100-200 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Vorkulturen mit dem Material einer Kolonie angeimpft, über Nacht bei 37 °C inkubiert und am darauffolgenden Tag wurde eine Plasmid-Isolation für analytische Zwecke (4.2.1.1) durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA konnte mittels Restriktionsverdau (4.2.1.3) auf die korrekte Größe überprüft werden. Die korrekte Mutation an der gewünschten Stelle kann nicht durch einen Restriktionsverdau kontrolliert werden, sondern muss mittels einer DNA-Sequenzierung (4.2.1.9) mit einem passenden Sequenzierungs-Primer für den Bereich überprüft werden.

4.2.1.11 Klonierung mit Hilfe des In-Fusion® HD Cloning Kits

Das In-Fusion[®] HD Cloning-Kit wurde verwendet, um das *rip1*-Gen aus dem pcDNA3.1 (+/-)-Vektor heraus in den pSicoR-EF1 α -mCh-Puro umzuklonieren. Das Kit eignet sich in diesem Fall besonders gut, da es eine Klonierung jedes Inserts an jede beliebige Stelle eines Vektors erlaubt ohne einen Restriktionsverdau durchführen zu müssen. Das ist besonders bei lentiviralen Vektoren von Vorteil, da diese meist eine sehr begrenzte Anzahl von Restriktionsschnittstellen aufweisen. Des Weiteren können mit Hilfe des Kits auch größere Inserts in instabile Vektoren ohne Probleme kloniert werden. Zunächst mussten spezielle Primer so konzipiert werden, dass das dadurch entstehende PCR-Produkt an jedem Ende 15 bp zusätzlich besaß, welche homolog zu dem Bereich des Vektors waren, an dem das Insert eingebaut werden sollte. Mit diesen Primern setzte sich ein PCR-Reaktionsansatz folgendermaßen zusammen:

12,5 µl	Clone Amp HiFi PCR Premix
0,75 µl	Vorwärts-Primer (10 µM)

0,75 µl	Rückwärts-Primer (10 µM)
<100 ng	DNA-Template
ad 25 µl	ddH ₂ O

Die Bedingungen für einen solchen PCR-Reaktionansatz im Thermocycler waren wie folgt:

Initiale Denaturierung98 °C	5 s		
Denaturierung	98 °C	10 s)
Annealing	55 °C	15 s	> 30 Zyklen
Elongation	72 °C	5 s/kBp	J
Finale Elongation	72 °C	10 min	
Pause	4 °C	00	

Die Elongations-Zeit wurde an das zu amplifizierende Plasmid angepasst. Der Erfolg der PCR wurde mit einer geringen Menge des PCR-Produktes in einem Agarose-Gel (4.2.1.5) überprüft und die PCR wurde aufgereinigt (4.2.1.6). Parallel wurde der Vektor linearisiert. Die vollständige Menge des linearisierten Vektors wurde auf ein Agarose-Gel aufgetragen, um die vollständige Linearisierung zu überprüfen (4.2.1.5). Um besonders die sehr mutationsanfälligen lentiviralen Vektoren keinem UV-Licht auszusetzen und so die Möglichkeit für entstehende Mutationen gering zu halten, wurden die hier verwendeten Agarose-Gele mit Chrystal Violet angefärbt (1 μ g/ml). So war es möglich, die DNA-Banden ohne UV-Licht sichtbar zu machen und auszuschneiden. Die DNA wurde aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt (4.2.1.6) und zusammen mit dem aufgereinigten PCR-Produkt wurde die In-Fusion Reaktion nach folgendem Schema angesetzt:

10-200 ng	aufgereinigtes PCR-Produkt
50-200 ng	linearisierter Vektor
1 µl	5 × In-Fusion HD Enzyme Premix
ad 5 µl	ddH ₂ O

Dieser Ansatz wurde 15 min bei 50 °C inkubiert und anschließend wurden 2,5 µl des StellarTM Bakterien mittels Ansatzes in kompetente Hitzeschock-Transformation transformiert. 100-300 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Vorkulturen mit dem Material einer Kolonie angeimpft, über Nacht bei 37 °C inkubiert und am darauffolgenden Tag wurde eine Plasmid-Isolation für analytische Zwecke (4.2.1.1) durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA konnte nun mittels Restriktionsverdau (4.2.1.3) auf die erfolgreiche Insertion des gewünschten DNA-Fragmentes überprüft werden. Zusätzlich wurde eine DNA-Sequenzierung (4.2.1.9) durchgeführt, um auch eventuell entstandene Mutationen ausschließen zu können.

4.2.2 Mikrobiologische und zellbiologische Methoden

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden in Laboren der gentechnischen Sicherheitsstufe 2 (S2) durchgeführt.

4.2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Die verwendeten *Y. enterocolitica* Stämme wurden auf LB-Agar-Platten kultiviert. Dafür wurden die Platten nach dem Animpfen für 24-48 Stunden bei 27 °C inkubiert und etwa vier Wochen bei 4 °C gelagert. Danach wurden von diesen Platten neue LB-Agar-Platten angeimpft. Für Infektionsversuche benötigte Flüssigkulturen (4.2.2.10) wurden von diesen Platten in LB-Medium mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum am Tag zuvor mit einer sterilen Impföse angeimpft und über Nacht bei 27 °C schüttelnd inkubiert.

Benötigte *E. coli* Stämme wurden, wenn vorhanden, zunächst von einem Glycerol-Stock auf einer LB-Agar-Platte mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum mittels einer sterilen Impföse ausplattiert und die Platte wurde für mindestens 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Von einer solchen Platte konnte nun eine Einzel-Kolonie gepickt und eine Flüssigkultur mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum angeimpft werden, welche erneut für mindestens 16 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert wurde.

Zur Langzeitaufbewahrung wurden Glycerol-Stocks aus 0,7 ml einer Übernachtkultur und 0,7 ml 30 % (v/v) Glycerol in 2,0 ml Reaktionsgefäßen hergestellt und bei -80 °C gelagert.

4.2.2.2 Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen

Um eine Aussage der Zelldichte einer Bakteriensuspension machen zu können, wurde die optische Dichte der Lösung bestimmt. An einem Photometer wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) einer Lösung in einer Halb-Mikro-Küvette ermittelt. Als Nullwert diente das jeweils verwendete Medium.

4.2.2.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Damit Bakterien in der Lage sind, effizient DNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen, müssen sie zunächst kompetent gemacht werden. Das heißt, die Permeabilität der Zellmembran wird erhöht. Die Herstellung von chemisch-kompetenten Bakterien erfolgte in diesem Fall nach der Rubidiumchlorid-Methode. Der gewünschte *E. coli* Stamm würde dafür über Nacht in 20 ml LB-Medium bei 37 °C schüttelnd kultiviert. Am nächsten Morgen wurden 2 ml der Übernacht-Vorkultur in 200 ml LB-Medium + 4 mM MgSO₄ und 10 mM KCl überführt und unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 inkubiert. Die Bakterien wurden 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend fünf Minuten bei 4°C und 4.000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 60 ml TFB1-Puffer resuspendiert und erneut 60 min auf Eis

inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation für fünf Minuten bei 4 °C und 4.000 g und das entstandene Pellet wurde in 8 ml TFB2-Puffer vorsichtig resuspendiert. Die nun chemisch kompetenten Bakterien wurden sofort in 200 µl Aliquots in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.2.4 Hitzeschock-Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

Für die Hitzeschock-Transformation wurden 100 μ l chemisch-kompetente Bakterien (4.2.2.3) schonend auf Eis aufgetaut und mit 10 μ l eines Ligationsansatzes (4.2.1.8) bzw. 10-100 ng Plasmid-DNA versetzt und sanft gemischt. Der Transformationsansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 60-90 Sekunden bei 42 °C, wonach die Bakterien sofort wieder für weitere zwei Minuten auf Eis abgekühlt wurden. Es folgte die Zugabe von 500 μ l SOC-Medium und der Transformationsansatz wurde für 60-90 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 50-100 μ l des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert, um die transformierten Bakterien zu kultivieren.

4.2.2.5 Kultivierung von Säugerzellen

Die Kultivierung von eukaryotischen Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchte. Alle Zelllinien wurden je nach Konfluenz alle 2-3 Tage in einem passenden Verhältnis umgesetzt (verwendete Medien siehe Tabelle 10).

HEK293-Zellen, sowie alle MEF-Zelllinien, wurden in 10 cm bzw. 15 cm Zellkulturschalen kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurden diese mit DPBS gewaschen und anschließend für etwa fünf Minuten bei 37 °C mit Trypsin/EDTA inkubiert. Die enzymatische Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium abgestoppt. Eine gewünschte Menge an Zellen wurde in eine neue Zellkulturschale überführt und diese wurde für eine Weiterkultivierung mit frischen Medium aufgefüllt.

Alle Makrophagen-Zelllinien wurden in T25- bzw. T75-Zellkulturflaschen angezüchtet. Das Passagieren erfolgte durch vorsichtiges Ablösen der Zellen in frischem Medium mittels eines Zellschabers. Die gewünschte Zellzahl wurde in eine frische Zellkulturflasche überführt und für die weitere Kultivierung mit ausreichend frischem Medium versetzt.

4.2.2.6 Kryokonservierung von Zellen und Reaktivierung von Kryokulturen

Die Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen erfolgte in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei -196 °C in speziellen Kryo-Gefäßen. Dafür wurden die Zellen vom Zellkulturgefäß abgelöst (4.2.2.5) und für fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,6 ml Einfriermedium (FBS + 10 % Dimethylsulfoxid) resuspendiert und in 2,0 ml
Kryo-Gefäße überführt. Diese wurden sofort in einen Gefrierbehälter, welcher mit Isopropanol gefüllt war, transferiert und bei -80 °C eingefroren. Das Isopropanol sorgt für eine schonende Temperaturabnahme von ca. 1 °C/min. Nach 24 Stunden konnten die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen von Zellen wurde das Kryo-Gefäß zügig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und die Zellen wurden umgehend in dem entsprechenden, vorgewärmten Medium aufgenommen. Zum Entfernen des Einfriermediums wurden die Zellen für fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert und das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen und in ein geeignetes Zellkulturgefäß überführt.

4.2.2.7 Zellzahlbestimmung

Zum Ausbringen einer bestimmten Zellzahl in einem Zellkulturgefäß wurden die Zellen zunächst gezählt. Die entsprechende Zelllinie wurde zunächst abgelöst und mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde dafür im Verhältnis 1:8 mit Trypanblau-Lösung versetzt. So konnten lebende von toten Zellen unterschieden werden. Zellen mit intakter Zellmembran, welche den Farbstoff nicht aufnahmen und daher keine Blaufärbung aufwiesen, wurden gezählt. Mit folgender Formel wurde die Zellzahl/ml berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} (8) \times 10^4}{4}$$

Die benötigte Zellzahl wurde eingestellt und die Zellen wurden in einem entsprechenden Zellkulturgefäß ausgesät und weiter kultiviert.

4.2.2.8 Isolierung und Kultivierung von primären Knochenmarks-Makrophagen

Für die Isolation primärer muriner Knochenmarks-Makrophagen wurden die Wildtyp- bzw. TNFR1-Knockout-Mäuse durch CO₂-Begasung zunächst narkotisiert und durch cervicale Dislokation getötet. Die Ober- und Unterschenkelknochen wurden entnommen und möglichst vollständig von Muskeln und Sehnen befreit. Die fertig präparierten Knochen wurden in 70 % Ethanol gelegt und anschließend getrocknet. Darauffolgend wurden die beiden Knochenenden abgeschnitten und das Knochenmark wurde mittels einer RPMI-befüllten Spritze in ein 50 ml Reaktionsgefäß gespült. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und anschließend fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml RPMI-Medium resuspendiert und die Zellzahl der Zellsuspension wurde bestimmt. Es wurden 5×10^6 Zellen pro 10 cm Zellkulturschale in speziellem Medium für primäre Makrophagen (Tabelle 10) ausgesät. Zusätzlich wurde zu dem Medium

10 ng/ml M-CSF gegeben, welches für die Ausdifferenzierung der isolierten Zellen zu Makrophagen sorgt. Für die weiteren Tage wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. An Tag 4 wurden 5 ml frisches Medium mit 10 ng/ml M-CSF zu den Zellen gegeben. An Tag 7 erfolgte ein kompletter Mediumswechsel und erneut die Zugabe von frischem Medium mit 10 ng/ml M-CSF. Ab Tag 8 konnte eine Stimulation der Zellen in anschließenden Experimenten erfolgen.

4.2.2.9 Transfektion von Zellen mit Polyethylenimin (PEI)

Als Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Dies geschieht oft mittels chemischer Reagenzien. Durch eine Komplexbildung des Transfektionsreagenz mit der negativ geladenen DNA kommt es zur Bildung eines kationischen Polymers und zu dessen Aufnahme in die Zelle durch Endozytose.

Die Zellen wurden einen Tag zuvor ausgesät, so dass sie am Transfektionstag etwa 80 % konfluent waren (MEF-Zellen in 15 cm Schale: 7×10^6). Sie wurden dann mittels Polyethylenimin (PEI) transfiziert. Es wurde ein Transfektionsansatz mit der für das Zellkulturgefäß entsprechenden Menge Plasmid-DNA, PEI sowie Opti-MEM hergestellt. Für eine 15 cm Zellkulturschale wurden insgesamt 20 µg Plasmid-DNA mit der 50-fachen Menge Opti-MEM (1.000 µl) zusammengegeben, gevortext und kurz abzentrifugiert. Hierzu wurde das 12,5-fache an PEI (250 µl) gegeben und ebenfalls kurz gevortext und abzentrifugiert. Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium auf den Zellen gegen frisches Medium ohne Antibiotikum ausgetauscht. Nach 30 min Inkubation wurde der Transfektionansatz vorsichtig zu den Zellen getropft und die Platte leicht geschwenkt. Nach 5-6 Stunden wurde das Medium von den Zellen genommen und das entsprechende Vollmedium mit allen Zusätzen hinzugegeben. Jeweilige Änderungen von diesem Protokoll sind bei den entsprechenden Versuchen genauer beschrieben.

4.2.2.10 Infektion und Stimulation von Zellen

Für Infektions- bzw. Stimulationsversuche wurden die entsprechenden Zellen am Vortag gezählt und in Medium ohne Antibiotikum ausgesät. Bei allen Makrophagen-Zelllinien wurden $0,25 \times 10^6$ Zellen pro *well* einer 24-*well* Zellkulturplatte ausgesät. Bei allen MEF-Zelllinien wurden $0,1 \times 10^6$ Zellen pro *well* einer 24-*well* Zellkulturplatte ausgesät.

Für eine Infektion wurden die Yersinien am Vorabend in 3 ml LB-Medium mit Selektions-Antibiotikum bei 27 °C schüttelnd über Nacht angezüchtet. Die Vorkultur wurde am nächsten Morgen 1:10 mit frischem LB-Medium verdünnt und für weitere 90 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Inkubation der Yersinien bei 37 °C diente der Aktivierung des *Yersinia* Typ-III-Sekretionssystems. Dies sollte gewährleisten, dass bei der Infektion die Translokation

59

der Effektorproteine effizient stattfindet. Nach dieser Inkubation wurden die Bakterien für fünf Minuten bei 3.000 g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet wurde in kaltem, sterilen $1 \times PBS$ resuspendiert. Von dieser Bakteriensuspension wurde die optische Dichte (OD₆₀₀) photometrisch ermittelt (4.2.2.2) und eine OD₆₀₀ von 0,36 bei einer 1:10 Verdünnung nach folgender Formel eingestellt:

$$Auffüllen(ml) = \frac{OD_{600} \times Suspensionsvolumen(ml)}{0,36} - Suspensionsvolumen(ml)$$

Eine Stunde vor der Infektion wurden die Zellen mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt und anschließend mit einer Bakterienmenge der jeweils angegebenen MOI infiziert bzw. mit LPS stimuliert (1 μ g/ml). Bei längeren Infektionen wurden die Yersinien nach 90 min mit Gentamycin abgetötet, um eine Weitervermehrung der Bakterien zu verhindern.

4.2.2.11 Herstellung von lentiviralen Partikeln aus HEK293 Zellen

Lentivirale Partikel stellen geeignete Vektoren für den Gentransfer in eukaryotische Zellen dar. Durch die Transduktion integrieren Teile des viralen Genoms in das Genom der Wirtszelle. Dies führt zu einer stabilen Expression des gewünschten Gens, welches auch in Tochterzellen übertragen wird. Ein Vorteil von lentiviralen Partikeln ist, dass sie in der Lage sind, auch ruhende Zellen zu infizieren. Als Verpackungszelllinie wurden in dieser Arbeit HEK293-Zellen verwendet.

Für die Herstellung von lentiviralen Partikeln wurden am Vortag 7×10^6 HEK293-Zellen pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Diese wurden am nächsten Morgen mit Hilfe des Transfektionsreagenz PEI transfiziert. Insgesamt wurden 16 µg Plasmid-DNA eingesetzt, welche sich wie folgt aufteilten: 6 µg pSico-EF1- α -mCh-Puro, 4 µg psPAX2, 2 µg pMD2.G, 4 µg CrmA. Dazu wurde 1 ml Opti-MEM gegeben. Der Ansatz wurde kurz gevortext und abzentrifugiert. Anschließend wurden 48 µl PEI dazu gegeben, der Ansatz wurde ebenfalls gevortext und abzentrifugiert. Während der 30 min Inkubation des Transfektionsansatzes bei Raumtemperatur wurde das alte Medium von den HEK293-Zellen gegen frisches Medium ohne Antibiotikum ausgetauscht. Nach der Inkubation wurde der Transfektionansatz vorsichtig zu den Zellen getropft und die Platte leicht geschwenkt. Nach 5-6 Stunden wurde das Medium gegen frisches Medium ohne Antibiotikum ausgetauscht. Der erste virushaltige Überstand nach 24 Stunden wurde verworfen, da er zu geringe Mengen an Viruspartikeln enthält. Erneut wurde frisches Medium ohne Antibiotikum zu den HEK293-Zellen gegeben. Nach 48 und 72 Stunden wurde der Virusüberstand geerntet, durch einen 0,22 µm Filter filtriert und direkt auf die zu transduzierenden Zellen gegeben. Zu den HEK293-Zellen wurde frisches Medium gegeben bzw. fand nach der Ernte der 72 Stunden Überstände die Entsorgung statt.

4.2.2.12 Transduktion von Zellen mit lentiviralen Partikeln

Mittels Transduktion wurden RIP1-negative murine Fibroblasten (MEF- Δrip) mit verschiedenen RIP1-Konstrukten rekomplementiert. So konnten stabile Zelllinien hergestellt werden, welche unterschiedlich mutierte RIP1-Konstrukte exprimierten. Durch die zusätzliche Kodierung eines Resistenz-Gens auf dem integrierbaren DNA-Abschnitt können nach der Transduktion erfolgreich infizierte Zellen selektioniert werden. Die Herstellung der viralen Partikel ist in 4.2.2.11 beschrieben. Für die Transduktion von MEF-Arip-Zellen wurden diese einen Tag zuvor ausgesät $(0,2 \times 10^6$ Zellen pro T25-Zellkulturflasche). Am nächsten Tag wurden sie direkt mit frisch geerntetem Virusüberstand infiziert. Der Überstand einer 10 cm Zellkulturschale wurde dafür komplett für eine T25-Zellkulturflache verwendet und die Zellen mit diesem Überstand wurden für 24 Stunden inkubiert. Dies wurde sowohl mit den nach 48 Stunden als auch mit den nach 72 Stunden geernteten Überständen durchgeführt. 24 Stunden nach der zweiten Infektion wurde das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht. Nach weiteren drei Tagen Kultivierung konnte mit der Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen begonnen werden. Dazu wurden 3 µg/ml Puromycin zum Zellmedium zugegeben und die Zellen für etwa eine Woche selektioniert. Nach der Selektion konnte der Erfolg der Transduktion mittels Western-Blot analysiert werden.

4.2.2.13 Bestimmung des Zelltodes mittels SYTOX® Green Färbung

Zur Bestimmung der Zelltodrate nach Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren und Stimulation bzw. Yersinien-Infektion wurde eine SYTOX® Green Anfärbung der Zellen durchgeführt. SYTOX® Green ist nicht in der Lage, intakte Zellmembranen zu durchdringen, jedoch diffundiert es leicht durch beeinträchtigte Membranen von abgestorbenen Zellen. Dort bindet es an DNA, was zu einem etwa 500-fachen Anstieg der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes führt. Die dabei hervorgerufene grüne Fluoreszenz kann durch Anregung bei 488 nm und Messung der Absorption bei 523 nm quantifiziert werden. So wurde der prozentuale Anteil von toten Zellen in Bezug zur Gesamtzellzahl bestimmt.

Für diese Versuche wurden die Zellen direkt am Morgen der Infektion in einer 96-*well* Zellkulturplatte ausgesät. Bei den verschiedenen MEF-Zelllinien wurden $0,02 \times 10^6$ Zellen pro *well* ausgesät. Bei den verschiedenen Makrophagen-Zelllinien waren es $0,05 \times 10^6$ Zellen pro *well*. Die Zellen wurden etwa eine Stunde zum Absetzen ruhen gelassen. Anschließend wurden die Zellen für den jeweiligen Versuch mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt und eine weitere Stunde später mit Yersinien in der angegeben MOI infiziert bzw. mit LPS

61

stimuliert. 90 min nach der Infektion folgte das Abtöten der Bakterien mit Gentamycin, um eine Weitervermehrung der Bakterien zu blockieren. Der SYTOX® Green Farbstoff wurde mindestens 30 min vor der ersten Messung in einer Konzentration von 0,5 μM zu den Zellen gegeben. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes wurde jede Stunde in einem TriStar² LB942 Mikroplattenleser (Berthold, Bad Wildbad) ermittelt. Zwischen den Messungen wurden die Zellen zurück zu 37 °C und 5 % CO₂ gestellt. Um die Menge des Hintergrundzelltodes zu bestimmen, wurde auch immer die Fluoreszenzintensität unbehandelter Zellen ermittelt. Am Ende der Messung wurden die Zellen durch Zugabe von Triton X-100 (Endkonzentration 1 %) lysiert und die maximale Fluoreszenzintensität wurde bestimmt. Dies entspricht der Maximalzelltod-Rate. Es wurde der prozentuale Anteil toter Zellen unter Versuchsbedingungen aus dem Verhältnis der beiden gewonnenen Fluoreszenzintensitäten nach folgender Formel ermittelt:

$$Zelltod [\%] = \frac{(induzierter Zelltod - Hintergrundzelltod)}{(Maximaler Zelltod - Hintergrundzelltod)}$$

4.2.3 Proteinbiochemische Methoden

4.2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen

Zur Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen für die weitere Verwendung in der SDS-PAGE und im Western-Blot wurden die zu untersuchenden Zellen mittels RIPA-Lysepuffer (Tabelle 12Tabelle 13) lysiert. Schwammen viele Zellen nach einer Infektion, wurden diese direkt im Medium zügig abgescraped, 10 min bei 200 g und 4 °C abzentrifugiert und mit einem angemessenen Volumen kalten RIPA-Lysepuffer versetzt. Schwammen keine Zellen, wurde das Medium abgesaugt und ein angemessenes Volumen kalter RIPA-Lysepuffer wurde direkt auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation der Zellen mit RIPA-Puffer für 30 min auf Eis und eine 30 minütige Zentrifugation bei 23.000 g und 4 °C, um die Zelltrümmer abzutrennen. Das Pellet wurde verworfen, gegebenenfalls wurde die Proteinkonzentration des Überstandes ermittelt (4.2.3.2) oder dieser wurde direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen (4.2.3.6). Der Überstand konnte für die weitere Verwendung auch bei -20 °C gelagert werden.

4.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit Hilfe des Bio-Rad Protein-Assay Reagenz durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Fertigreagenz, welches den Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250 enthält. Coomassie-Brilliantblau G-250 bildet in saurer Lösung Komplexe mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm. Unter Verwendung einer Eichgeraden, welche mittels BSA erstellt wird, kann durch die photometrische Bestimmung der Absorption bei 595 nm die Proteinkonzentration ermittelt werden.

Zur Vorbereitung des Bio-Rad Protein-Assay Reagenz wurde dies zunächst 1:5 mit ddH_2O verdünnt. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde eine Proteinkonzentration von 1 µg, 5 µg, 10 µg sowie 25 µg verwendet. In einer Küvette wurde jeweils 1 µl der Probe zu 1 ml Bradford-Reagenz gegeben und die Absorption mittels eines Photometers bei 595 nm ermittelt. Als Nullwert diente reines Bradford-Reagenz.

4.2.3.3 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität mittels Ac-DEVD-AMC-Assay

Die Aktivität von Caspase-3 wurde mittels eines Ac-DEVD-AMC-Assays ermittelt. Bei Ac-DEVD-AMC handelt es sich um ein synthetisches fluorogenes Substrat, welches eine Schnittstelle für Caspase-3 enthält. Kommt es durch aktive Caspase-3 zur Spaltung des Substrates, wird der fluorogene AMC-Teil freigesetzt, was in einem Fluorometer quantitativ gemessen werden kann.

Von allen Makrophagen-Zelllinien wurden 0.5×10^6 Zellen am Vortag in einer 6-well Zellkulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden sie, wie jeweils bei dem Versuch angegeben, mit Inhibitoren behandelt und mit Yersinien infiziert bzw. mit LPS stimuliert. Nach der geplanten Infektions- bzw. Stimulationsdauer wurden die Zellen im Medium auf Eis vorsichtig abgescraped und anschließend für fünf Minuten bei 200 g und 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit kaltem PBS gewaschen und erneut für fünf Minuten bei 200 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 150 µl Caspase-Lysepuffer (Tabelle 16) lysiert, das Zelllysat wurde gevortext und anschließend für 20 min auf Eis inkubiert. An dieser Stelle konnten die hergestellten Zelllysate bei -20 °C weggefroren werden oder es wurde direkt damit weitergearbeitet. Zum Abtrennen der Zelltrümmer wurden die Zellysate 10 min bei 23.000 g und 4 °C zentrifugiert. In dieser Zeit wurde ausreichend CSF-Puffer frisch mit dem Ac-DEVD-AMC Substrat versetzt. Pro Probe wurden 150 µl CSF-Puffer benötigt und das Ac-DEVD-AMC Substrat in einer Endkonzentration von 50 µM zugefügt. 150 µl des so angesetzen CSF-Puffers mit Ac-DEVD-Substrat wurden in eine Mikrotiterplatte gegeben und 10 µl des zentrifugierten Überstandes wurden zu dem CSF-Puffer pipettiert. Die entstehende Fluoreszenz wurde im Infinite M200 Mikroplattenleser (Tecan, Männedorf, Schweiz) alle zwei Minuten über eine Stunde hinweg bei 37 °C gemessen. Aus den gewonnenen Werten wurde die Steigung der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zeit ermittelt.

4.2.3.4 Immunpräzipitation von ubiquitiniertem RIP1

Die Ubiquitinierung von RIP1 wurde untersucht, indem RIP1 mit Hilfe einer Immunpräzipitation angereichert und mittels Western-Blot der Ubiquitinierungsstatus bestimmt wurde.

Mit dem pCMV-HA-Ubi Plasmid transfizierte und anschließend stimulierte MEF-Zellen (4.2.2.9) wurden im Medium auf Eis abgescraped und für fünf Minuten bei 200 g und 4 °C abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 650 µl Ubiquitin IP Lysepuffer (Tabelle 14) lysiert. Das Zelllysat wurde 20 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 95 °C aufgekocht. Danach wurden die Zelltrümmer für 10 min bei 4 °C und 18.000 g abzentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde erneut für 10 min bei 18.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde erneut in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde das Zelllysat mit Ubiquitin IP Waschpuffer verdünnt, so dass die SDS Konzentration nur noch 0,1 % betrug und einem Preclearing Prozess unterzogen. Dafür wurde das Zelllysat mit 50 µl A/G PLUS-Agarose Beads versetzt und 30 min bei 4 °C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Beads für zwei Minuten bei 400 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand wurde erneut in ein frisches 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Von dem Zelllysat wurden 7,3 mg Protein eingesetzt und es folgte die Immunpräziptation mit 5 µl RIP1-Antikörper und erneut 50 µl A/G PLUS-Agarose Beads über Nacht bei 4 °C auf dem Rotationsschüttler. Am nächsten Morgen wurden die A/G PLUS-Agarose Beads fünfmal mit Ubiquitin IP Waschpuffer gewaschen und direkt mittels SDS-PAGE analysiert (4.2.3.6).

4.2.3.5 Ko-Immunpräzipitation von Proteinen aus Zellen

Mittels Ko-Immunpräzipitation sollte die Komplex-Bildung zwischen RIP1, FADD und Caspase-8 untersucht werden. Durch die Aufreinigung von RIP1 über einen spezifischen Antikörper, der an Beads immobilisiert ist, können im Western-Blot zusätzliche ko-präzipitierte Proteine nachgewiesen werden.

Am Vortag wurden 20×10^6 Zellen der KMM MK2/MK3^{-/-} + MK2 Zelllinie in einer 10 cm Schale ausgesät. Diese wurden am nächsten Morgen, wie bei dem Versuch angegeben, mit Inhibitoren behandelt und mit Yersinien infiziert. In dieser Zeit wurde ein IP-Matrix-Antikörper-Komplex hergestellt. Bei einer gewöhnlichen Ko-Immunpräzipitation würde ko-präzipitiertes FADD auf der Höhe der leichten Antikörper-Bande laufen und wäre dadurch nicht zu erkennen. Aus diesem Grund wurde die Ko-Immunpräzipitation mit Hilfe des IP/WB Optima C Systems (Santa Cruz) durchgeführt. Dieses System ermöglicht es, präzipitierte Proteine, welche auf Höhe der schweren oder leichten Antikörper-Bande laufen, im Western-Blot zu erkennen. Dafür wurden 50 µl der IP-Matrix (Santa Cruz) mit 6 µl RIP1-Antikörper und 500 µl PBS zusammengegeben und über den Tag bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung auf dem Rotationsschüttler inkubiert.

Nach der gewünschten Infektionsdauer wurden die Zellen im Medium auf Eis abgescraped und für fünf Minuten bei 200 g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Mit 1 ml kaltem Ko-IP Lysepuffer wurden die Zellen lysiert und für 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer für 40 min bei 18.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Parallel wurde die IP-Matrix zweimal mit PBS gewaschen (18.000 g, 4 °C, 30 s). Von dem Proteinlysat wurden 3,5 mg Protein eingesetzt und zu der gewaschenen IP-Matrix gegeben. Der Ko-Immunpräzipitationskomplex wurde über Nacht bei 4 °C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Matrix dreimal mit PBS gewaschen (18.000 g, 30 s, 4 °C) und direkt mittels SDS-PAGE analysiert (4.2.3.6).

4.2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamid-Gel mit Hilfe eines angelegten elektrischen Feldes. In dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt. Das bedeutet, dass zwei unterschiedlich stark konzentrierte Gelbereiche vorhanden sind: im oberen Bereich liegt das Sammelgel mit niedrigerer Konzentration und niedrigerem pH-Wert. Hier sammeln sich die Proteine, bis sie im höher konzentrierten Trenngel mit höherem pH-Wert aufgetrennt werden. Durch die Zugabe von SDS werden die Proteine denaturiert, so dass ihre Quartärstruktur zerstört wird. Des Weiteren maskiert SDS die eigentliche Proteinladung, so ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Gel unabhängig von deren Ladungszustand und es kann direkt von der Wanderungsstrecke auf das Molekulargewicht geschlossen werden. Durch die Verwendung eines Größenstandards kann das Molekulargewicht direkt abgelesen werden.

Für die Herstellung von Polyacrylamidgelen wurde ein Trenngel in der benötigten Konzentration angesetzt. Diese ist abhängig von der Größe der aufzutrennenden Proteine. Auf das erhärtete Trenngel wurde das Sammelgel gegossen. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 13 zu sehen. Die zu analysierende Proteinlösung wurde mit der entsprechenden Menge 4 × Protein Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C aufgekocht. Das SDS-Gel wurde in eine Gelelektrophoresekammer mit 1 × Gelelektrophoresepuffer gestellt. Ein großes Gel (13x15 cm) wurde zunächst für etwa zwei Stunden bei 30 mA leer vorlaufen gelassen. Erst dann folgte die Beladung mit den aufgekochten Proteinproben. Bis die Lauffront die

Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatte, wurde das Gel weiterhin bei 30 mA laufen gelassen. Nach Beginn der Auftrennung der Proben im Trenngel konnte auf 40 mA hochgestellt werden. Nach erfolgter Auftrennung folgte ein Western-Blot (4.2.3.7).

4.2.3.7 Western-Blot Analysen und Immundetektion

Die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden anschließend mittels eines *Semi-Dry-Blot*-Verfahrens auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) transferiert und diese wurde anschließend einer Immundetektion unterzogen. So ist es möglich, in einem Proteingemisch ein bestimmtes Protein zu detektieren.

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte elektrophoretisch. Auf die Anode der Western-Blot-Kammer wurden dafür zuerst in der Größe des Trenngels zwei Lagen mit Blot-Puffer A (Tabelle 13) und eine Lage mit Blot-Puffer B getränktes Whatman Papier gelegt. Darauf wurde die zuvor in Methanol aktivierte und danach kurz in Blot-Puffer B geschwenkte PVDF-Membran gelegt. Das Trenngel aus der SDS-PAGE (4.2.3.6) wurde kurz in Blot-Puffer C inkubiert und auf der Membran platziert. Weitere drei Lagen in Blot-Puffer C getränkte Whatman Papiere wurden auf das Trenngel gelegt. Bei jeder Lage wurde besonders darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen bildeten. Abschließend wurde die Kathode auf die Western-Blot-Kammer gestellt. Um ein Verrutschen zu vermeiden, wurde diese mit einer Flasche beschwert. Der Transfer der Proteine erfolgte bei einem großen Gel für 50 min bei 400 mA.

Nach erfolgtem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran zuerst kurz in PBS-Tween bzw. TBS-Tween geschwenkt, um Reste des Blot-Puffers zu entfernen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen der PVDF-Membran durch Inkubation der Membran für etwa eine Stunde in 5 % (w/v) Milchpulver/PBS-Tween bzw. TBS-Tween bei Raumtemperatur blockiert. Der primäre Antikörper wurde laut Herstellerangaben und in der in Tabelle 6 angegebenen Verdünnung angesetzt. Die Membran wurde in der Antikörper-Lösung über Nacht bei 4 °C schwenkend inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal für etwa 10 min mit PBS-T bzw. TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper in der in Tabelle 6 ausgewiesenen Verdünnung. Dieser wurde auch in 5 % (w/v) Milchpulver/PBS-T bzw. TBS-T angesetzt. Der sekundäre Antikörper bindet spezifisch an den F_c-Teil des primären Antikörpers und ist für die folgende Immundetektion an HRP (*horseradish peroxidase*) gekoppelt. Die Inkubation wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur schwenkend durchgeführt. Abschließend wurde die Membran erneut dreimal für etwa 10 min mit PBS-T bzw. TBS-T gewaschen. Für die Detektion der Proteine wurde die Membran mit femtoLUCENTTM PLUS-HRP Reagenz, welches zuvor 1:2

angesetzt wurde, bei Raumtemperatur für eine Minute inkubiert. Die an den sekundären Antikörper gebundene HRP oxidiert das in dem Entwicklerreagenz enthaltene Luminol, was zu einer Lumineszenz führt, welche auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Die emittierten Lichtsignale wurden auf dem Röntgenfilm detektiert und anschließend entwickelt. Durch das Vorhandensein eines Größenstandards kann die Größe des nachgewiesenen Proteins kontrolliert werden.

4.2.3.8 In vitro Kinase-Assay

Die Aktivität von Kinasen lässt sich mittels eines *in vitro* Kinase-Assays untersuchen. Dabei werden radioaktiv-markierte Phosphatgruppen (³²P-γ-ATP) von einer aktiven Kinase auf ein Substrat übertragen. Das Substrat kann im Fall einer Autophosphorylierung die Kinase selbst sein, oder ein extern zugegebenes Substrat. Mittels einer Autoradiographie können die radioaktiv-markierten Proteine sichtbar gemacht werden.

Zunächst wurden 10×10^6 Zellen der verschiedenen MEF-Zelllinien pro 15 cm Schale am Vortag ausgesät, um eine Expression der zu untersuchenden Kinase zu ermöglichen. Die Zellen wurden, wie angegeben, mit den Inhibitoren behandelt und stimuliert. Es folgte eine Immunpräzipitation der Kinase, indem die Zellen zunächst mit kaltem PBS gewaschen wurden und dann mit 1 ml Kinase Lysepuffer lysiert wurden. Um eine vollständige Lyse zu gewährleisten, wurden die Zellkulturschalen einmal auf Trockeneis schockgefroren und auf Eis wieder aufgetaut. Nach dem Überführen des Zelllysats in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde dieses erneut in Trockeneis schockgefroren und auf Eis wieder aufgetaut. Anschließend wurden die Zelltrümmer für 30 min bei 18.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Vom Zelllysat wurden 4,4 mg für die Immunpräzipitation eingesetzt. Es wurden 5 µl RIP1-Antikörper und 40 µl A/G PLUS-Agarose Beads zum Zelllysat gegeben und der Ansatz wurde für 18 Stunden bei 4 °C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Am nächsten Morgen folgte ein dreimaliges Waschen mit Kinase Lysepuffer (1.000 g, 4 min, 4 °C), ein zweimaliges Waschen mit Kinase Waschpuffer und ein einmaliges Waschen mit Kinase Puffer, welches der Äquilibrierung der Proben dienen sollte. Proben, welche mit dem RIP1-Kinaseinhibitor Nec-1s (50 µM) behandelt werden sollten, wurden an diesem Punkt noch einmal mit dem Inhibitor für 10 min inkubiert. Es folgte die Zugabe von 30 µl des Kinase Reaktionspuffers. Der Ansatz wurde für 30 min bei 30 °C im Thermoschüttler inkubiert. Abschließend wurden die Ansätze mit der angemessenen Menge 4 × Protein Ladepuffer versetzt, für 10 min bei 95 °C aufgekocht und anschließend per SDS-PAGE aufgetrennt (4.2.3.6). Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurden die phosphorylierten Proteine mittels Autoradiographie detektiert (4.2.3.9) und anschließend wurde die Proteinmenge per Western-Blot kontrolliert (4.2.3.7).

4.2.3.9 Anfertigung eines Autoradiogramms

Zur Anfertigung eines Autoradiogramms wurde die Western-Blot-Membran in einer Röntgenfilm-Kassette einer radiosensitiven Folie (*Phosphoimager-Screen*) exponiert. Der Screen beinhaltet eine PSP-Schicht (*phospho-stimulable phospholayer*) aus Barium-Fluor-Bromid (BaFBr) mit Europium (Eu) dotiert. Von der Aktivität der Probe wird die Expositionsdauer abhängig gemacht. Die Moleküle der PSP-Schicht werden durch die radioaktive Strahlung angeregt und in einen höheren, metastabilen Energiezustand versetzt. Der Screen wird daraufhin im Phosphoimager mit einem Helium-Neon-Laser abgetastet, wodurch die angeregten Moleküle wieder in den stabilen Grundzustand versetzt werden und Energie in Form von blauem Licht abgeben. Das Signal wird über einen Photomultiplier durch das Erzeugen von Sekundärelektronen verstärkt, deren Ladung auf einer Anode detektiert werden kann. Das emittierte Licht ist dabei proportional zur Radioaktivität der Probe und die so erhaltenen Daten konnten über den angeschlossenen Computer ausgewertet und als Autoradiogramm dargestellt werden.

5 Ergebnisse

5.1 Die Rolle von RIP1 bei Yersinia-induziertem Zelltod von Makrophagen

5.1.1 Y. enterocolitica vermittelt RIP1-abhängigen Zelltod bei Makrophagen

Y. enterocolitica ist in der Lage bei Makrophagen und dendritischen Zellen Zelltod auszulösen (Ruckdeschel *et al.*, 1997; Erfurth *et al.*, 2004). Frühere Studien zeigten, dass dieser Yersinien-induzierte Zelltod über den TLR4/TRIF-Signalweg und über FADD und Caspase-8 vermittelt wird (Haase *et al.*, 2003; Ruckdeschel *et al.*, 2004). Da RIP1 eine wichtige Rolle in diesem Signalkomplex spielt, sollte eine mögliche Beteiligung von RIP1 am Yersinien-vermittelten Zelltod untersucht werden.

Mit Hilfe von Infektionsversuchen mit immortalisierten, fetalen Maus-Makrophagen, welche von RIP1-Knockout Mäusen gewonnen wurden, sollte analysiert werden, ob *Y. enterocolitica* Zelltod bei RIP1-negativen Makrophagen auslöst. Für diese Experimente wurden RIP1-negative (RIP1^{-/-}) Makrophagen, sowie RIP1-positive (RIP1^{+/+}) Wildtyp-Makrophagen als Kontrolle verwendet. Abbildung 8 zeigt einen Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen RIP1 als Nachweis des RIP1-Knockouts.





Von RIP1^{+/+} und RIP1^{-/-} Makrophagen wurden Zelllysate angefertigt und diese im Western-Blot auf RIP1 analysiert. Eine gleichmäßige Beladung des Gels mit Zelllysaten wurde mittels Aktin-Immunoblot nachgewiesen.

Beide Makrophagen Zelllinien wurden mit dem Wildtyp-Yersinien Stamm (WA) oder dem YopP-defizienten Yersinien Stamm (WA-Δ*yopP*) infiziert und nach mehreren Stunden wurde der Anteil der toten Zellen mittels einer SYTOX[®] Green Färbung (4.2.2.13) bestimmt. Es zeigte sich, dass RIP1^{-/-} Makrophagen deutlich geschützt waren vor Yersinien-induziertem Zelltod im Gegensatz zu RIP1^{+/+} Makrophagen. Jedoch zeigten auch RIP1^{-/-} Makrophagen ein geringes Maß an Zelltod (Abbildung 9). Wie zu erwarten war, führte eine Infektion der RIP1^{+/+} Makrophagen mit dem YopP-negativen Yersinien Stamm zu keiner zytotoxischen Reaktion. Bei RIP1^{-/-} Makrophagen lösten YopP-negative Yersinien jedoch etwa gleich viel Zelltod aus wie Wildtyp-Yersinien. Daraus lässt sich schließen, dass RIP1 notwendig ist für

den *Y. enterocolitica*-induzierten Zelltod von Makrophagen und dass es bei RIP1^{-/-} Makrophagen nach Infektion zu einem RIP1-unabhängigen Zelltod kommt.



Abbildung 9: RIP1-Knockout schützt Makrophagen vor Y. enterocolitica-induziertem Zelltod (modifiziert nach Menon, Gropengießer et al., 2017)

RIP1^{+/+} und RIP1^{-/-} Makrophagen wurden mit Wildtyp-Yersinien (WA) oder YopP-defizienten Yersinien (WA- $\Delta yopP$) infiziert (MOI 20:1). Die Infektion wurde nach 90 min mit Gentamycin abgestoppt, um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Die Zellen wurden mit SYTOX® Green (0,5 µM) versetzt und nach sechs Stunden wurde die Fluoreszenzintensität gemessen. Abschließend wurden die Zellen mittels Triton X-100 (1 %) lysiert und die Fluoreszenzintensität wurde erneut bestimmt (100 % tote Zellen). Der prozentuale Anteil von toten Zellen unter Versuchsbedingungen wurde aus dem Verhältnis der beiden Fluoreszenzintensitäten berechnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von n = 3 unabhängigen Experimenten (*** p < 0,001, ungepaarter t-Test).

Um genauer zu untersuchen, ob speziell die RIP1-Kinaseaktivität für den Yersinienvermittelten Zelltod notwendig ist, wurden RIP1^{+/+} Makrophagen vor ihrer Infektion mit Wildtyp-Yersinien mit dem RIP1-Kinaseinhibitor Necrostatin-1s (Nec-1s) behandelt. Bei Nec-1s handelt es sich um ein Analog des älteren RIP1-Kinaseinhibitors Necrostatin-1 (NS-1), mit jedoch stabileren und spezifischeren Eigenschaften als NS-1. Beide wirken als selektiver, allosterischer Inhibitor der RIP1-Kinaseaktivität (Degterev *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2012). Erneut wurde mittels einer SYTOX[®] Green Färbung der prozentuale Anteil von toten Zellen bestimmt. Die Behandlung von Wildtyp-Makrophagen mit Nec-1s führte zu einer signifikanten Reduktion des Yersinien-vermittelten Zelltodes im Vergleich zu unbehandelten infizierten Makrophagen (Abbildung 10). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass RIP1 und dessen Kinaseaktivität für die Aktivierung des zytotoxischen Signalweges bei *Y. enterocolitica* infizierten Makrophagen benötigt werden.



Abbildung 10: Inhibition der RIP1-Kinaseaktivität reduziert den *Y. enterocolitica*-induzierten Zelltod RIP1^{+/+} Makrophagen blieben unbehandelt oder wurden eine Stunde vor Infektion mit dem RIP1-Kinaseinhibitor Nec-1s (50 μ M) behandelt. Anschließend wurden sie mit Wildtyp-Yersinien (WA) für fünf Stunden infiziert (MOI 20:1). Nach 90 min wurde die Infektion mit Gentamycin abgestoppt, um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Die Zellen wurden mit SYTOX® Green (0,5 μ M) versetzt und mittels der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde der prozentuale Anteil an toten Zellen berechnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von n = 3 unabhängigen Experimenten (*** p < 0,001, ungepaarter t-Test).

5.1.2 YopP löst RIP1-abhängige Apoptose aus

Für *Yersinia enterocolitica*-induzierten Zelltod bei Makrophagen wurde gezeigt, dass es sich um eine Form des apoptotischen Zelltodes handelt (Ruckdeschel *et al.*, 1997). Untersuchungen mit dendritischen Zellen hingegen konnten nicht vollständig klären, ob eine Yersinien-Infektion dort zu einem rein apoptotischen oder teilweise auch zu einem nekrotischen Zelltod führen kann (Gröbner *et al.*, 2006). Da RIP1 sowohl Apoptose (Wang *et al.*, 2008) als auch Nekroptose (Degterev *et al.*, 2008; Holler *et al.*, 2000) auslösen und regulieren kann, wurde genauer untersucht, um welche Art von RIP1-abhängigen Zelltod es sich bei *Y. enterocolitica*-Infektion handelt.

die Caspase-3-Aktivität nach Yersinien-Infektion eines Hierfür wurde mittels Ac-DEVD-AMC-Assays (4.2.3.3) gemessen. Bei Caspase-3 handelt es sich um eine Effektor-Caspase, welche speziell bei Apoptose aktiviert wird. Somit kann die Caspase-3-Aktivität als Marker für Apoptose verwendet werden. RIP1^{+/+} und RIP1^{-/-} Makrophagen wurden mit Wildtyp Yersinien (WA) oder YopP-negativen Yersinien (WA- $\Delta yopP$) infiziert und sechs Stunden später die Caspase-3-Aktivität gemessen. In Abbildung 11 ist zu sehen, dass Yersinien-induzierter Zelltod mit einer Caspase-3-Aktivierung einhergeht. Eine Infektion mit Wildtyp-Yersinien zeigte nur bei RIP1^{+/+} Makrophagen eine Aktivierung der Effektor-Caspase-3. Im Gegensatz dazu führte eine Infektion von RIP1^{-/-} Makrophagen, sowie eine Infektion mit YopP-negativen Yersinien bei beiden Zelllinien zu keiner messbaren Caspase-3-Aktivität.



Abbildung 11: Caspase-3-Aktivierung spielt eine Rolle bei Yersinien-induziertem Zelltod (modifiziert nach Menon, Gropengießer *et al.*, 2017)

RIP1^{+/+} und RIP1^{-/-} Makrophagen blieben unbehandelt (Ø) oder wurden mit Wildtyp-Yersinien (WA) oder dem YopP-negativen Yersinien (WA- $\Delta yopP$) infiziert (MOI 25:1). Die Infektion wurde nach 90 min mit Gentamycin abgestoppt, um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Nach drei Stunden wurde ein Ac-DEVD-AMC-Assay durchgeführt, um die Aktivität von Caspase-3 zu ermitteln. Alle gemessenen Werte wurden auf die Werte von unbehandelten Zellen normalisiert. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± SEM von n = 6 unabhängigen Experimenten (** p < 0,01, ungepaarter t-Test).

Des Weiteren wurde die Caspase-8-Aktivität als Marker für apoptotischen Zelltod ermittelt. Bei Caspase-8 handelt es sich um eine Initiator-Caspase, welche bei Apoptose prozessiert und somit aktiviert wird. Die Prozessierung von Caspase-8 kann im Western-Blot (4.2.3.7) mit speziellen Antikörpern gegen das kleine aktive p18-Fragment, welches bei der Prozessierung entsteht, nachgewiesen werden. Auch für diesen Versuch wurden RIP1^{+/+} und RIP1^{-/-} Makrophagen mit Wildtyp Yersinien (WA) oder YopP-negativen Yersinien (WA- $\Delta yopP$) infiziert und nach 3,5 Stunden wurden Zelllysate angefertigt. Diese wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit speziellen Antikörpern gegen das aktive p18-Fragment von Caspase-8 untersucht. So konnte gezeigt werden, dass nur eine Infektion mit Wildtyp-Yersinien bei RIP1^{+/+} Makrophagen zu einer deutlich sichtbaren Prozessierung und somit Aktivierung von Caspase-8 führte (Abbildung 12).



Abbildung 12: Caspase-8 Prozessierung ist in Yersinien-induzierten Zelltod involviert (modifiziert nach Menon, Gropengießer *et al.*, 2017)

RIP1^{+/+} und RIP1^{-/-} Makrophagen blieben unbehandelt (Ø) oder wurden mit Wildtyp-Yersinien (WA) oder YopP-negativen Yersinien (WA- $\Delta yopP$) infiziert (MOI 30:1). Die Infektion wurde nach 90 min mittels Gentamycin abgestoppt, um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Nach 3,5 Stunden wurden Zelllysate angefertigt und im Western-Blot auf das aktive Fragment (p18) der prozessierten Caspase-8 analysiert. Eine gleichmäßige Beladung des Gels mit Zelllysaten wurde mit einem Aktin-Immunoblot kontrolliert. Beide Experimente deuten also darauf hin, dass es sich bei dem zuvor beobachteten Yersinien-vermittelten Zelltod von RIP1^{+/+} Makrophagen hauptsächlich um Apoptose handelt. Bei RIP1^{-/-} Makrophagen war nur eine geringe Caspase-Aktivität nach Yersinien-Infektion zu beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei dem gemessenen geringen Zelltod von RIP1^{-/-} Makrophagen nicht um Caspase-abhängige Apoptose handelt.

5.1.3 Bei RIP1-negativen Zellen führt eine Yersinien-Infektion zu Nekroptose

Wie schon in Abschnitt 5.1.1 beschrieben, sterben auch RIP1^{-/-} Makrophagen nach Wildtyp-Yersinien-Infektion bzw. Infektion mit YopP-negativen Yersinien in geringem Maße. In Abschnitt 5.1.2 konnte gezeigt werden, dass es trotz dieses gemessenen Zelltodes zu keiner Aktivierung der Caspasen-3 oder -8 kam. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob es sich bei dem gemessenen Zelltod um eine Form der regulierten Nekrose (Nekroptose) handelt. Hierfür wurden Infektionsversuche mit dem spezifischen RIP3-Kinaseinhibitor GSK'872 durchgeführt (Kaiser et al., 2013). Die RIP3 Kinaseaktivität spielt eine essentielle Rolle bei der Induktion von Nekroptose (Cho et al., 2009; He et al., 2009; Zhang et al., 2009). GSK'872 konnte in den durchgeführten Infektionsversuchen den bei RIP1^{-/-} Makrophagen ausgelösten Zelltod nach Yersinien-Infektion nahezu komplett unterdrücken (Abbildung 13). Dies war sowohl nach Wildtyp-Yersinien-Infektion der Fall, als auch nach Infektion mit dem YopP-negativen Yersinien Stamm. Hieraus lässt sich herleiten, dass bei RIP1^{-/-} Makrophagen ein RIP1-Kinase-unabhängiger, dafür aber RIP3 Kinase-abhängiger nekroptotischer Zelltod auftritt.



Abbildung 13: RIP1-Knockout führt zu nekroptotischem Zelltod nach Yersinien-Infektion (modifiziert nach Menon, Gropengießer *et al.*, 2017)

RIP1^{-/-} Makrophagen blieben unbehandelt oder wurden eine Stunde vor Infektion mit dem RIP3-Kinaseinhibitor GSK'872 (2 μM) behandelt. Anschließend wurden sie mit Wildtyp-Yersinien (WA) oder YopP-defizienten Yersinien (WA-Δ*yopP*) für sechs Stunden infiziert (MOI 20:1). Nach 90 min wurde die Infektion mit Gentamycin abgestoppt, um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Die Zellen wurden mit SYTOX® Green (0,5 μM) versetzt und mittels der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde der prozentuale Anteil an toten Zellen berechnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± SEM von n = 4 (WA) bzw. n = 3 (WA-Δ*yopP*) unabhängigen Experimenten (** p < 0,01; *** p < 0,001, ungepaarter t-Test).

Der RIP3-Kinaseinhibitor GSK'872 war jedoch nicht in der Lage RIP1^{+/+} Makrophagen vor Wildtyp-Yersinien induziertem Zelltod zu schützen (Abbildung 14). Bei Wildtyp-Makrophagen scheint demnach RIP3-abhängige Nekroptose zunächst keine wichtige Rolle zu spielen. Mit dem spezifischen Caspase-Inhibitor zVAD hingegen ließ sich der Zelltod von RIP1^{+/+} Makrophagen nach Yersinien-Infektion deutlich unterdrücken, was ein weiteres Indiz für Caspase-abhängigen apoptotischen Zelltod bei diesen Zellen ist, wie auch schon in 5.1.2 beschrieben wurde. Interessanterweise wurde der Zelltod mittels zVAD Behandlung jedoch nicht komplett unterdrückt. Eine zusätzliche Behandlung mit GSK'872 konnte hingegen den Zelltod von RIP1^{+/+} Makrophagen nach Yersinien-Infektion und zVAD Behandlung nahezu vollständig blockieren (Abbildung 14).



Abbildung 14: Inhibition von Apoptose führt bei Yersinien-infizierten Zellen zu Nekroptose (modifiziert nach Menon, Gropengießer *et al.*, 2017)

RIP1^{+/+} Makrophagen blieben unbehandelt oder wurden eine Stunde vor Infektion mit dem Caspase-Inhibitor zVAD (20 μ M) und/oder mit dem RIP3-Kinaseinhibitor GSK'872 (2 μ M) inkubiert. Anschließend wurden sie mit Wildtyp-Yersinien (WA) für fünf Stunden infiziert (MOI 20:1). Nach 90 min wurde die Infektion mit Gentamycin abgestoppt, um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Die Zellen wurden mit SYTOX® Green (0,5 μ M) versetzt und mittels der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde der prozentuale Anteil an toten Zellen berechnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± SEM von n = 4 unabhängigen Experimenten (*** p < 0,001, ungepaarter t-Test).

Der nun schützende Effekt von GSK'872 deutet darauf hin, dass sich der durch Yersinien ausgelöste apoptotische Zelltod hin zur RIP3-abhängigen Nekroptose verschiebt, wenn Caspasen durch zVAD inhibiert sind.

5.1.4 Die Inhibition von TAK1 oder IKKβ induziert bei stimulierten Makrophagen RIP1-abhängigen Zelltod

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde analysiert, wie YopP RIP1-abhängigen Zelltod nach Yersinien-Infektion auslöst. Unter physiologischen Bedingungen bewirkt eine Aktivierung des TLR4/TRIF-Signalweges durch LPS Stimulation keinen Zelltod. Die zytotoxischen Signalwege sind in diesem Fall demnach nicht aktiv. Folglich muss das Effektorprotein YopP nach der Translokation in die Zielzelle dort immunmodulatorische Effekte ausüben, die die zytotoxischen Signalwege aktivieren. Es wurde bereits beschrieben, dass YopP den NFkBsowie die MAPK-Signalwege inhibiert (Boland und Cornelis, 1998; Ruckdeschel et al., 1997; Ruckdeschel et al., 1998). Bei diesen beiden Signalwegen handelt es sich um zwei zentrale proinflammatorische Signalkaskaden mit einer bedeutenden Rolle bei der Regulation der Immunantwort und des zellulären Überlebens. Innerhalb der beiden Signalwege sind verschiedene Angriffspunkte von YopP bekannt: Beispielsweise bindet und inhibiert YopP die NFkB aktivierende Kinase IKKB und die oberhalb geschaltete Kinase TAK1 (Ruckdeschel et al., 2001). Durch Acetylierung von kritischen Serin und Threonin Aminosäuren dieser Kinasen verhindert YopP deren Phosphorylierung und behindert so die IKKβ- und TAK1-Aktivierung (Haase et al., 2005; Paquette et al., 2012). Durch diese Eigenschaften von YopP ist es Yersinien möglich, die Aktivierung von verschiedenen, konservierten Signalwegen der angeborenen Immunantwort zu hemmen. Untersuchungen im TNFa-Signalweg zeigten, dass sowohl TAK1, als auch der IKK-Komplex vor RIP1abhängigem Zelltod schützen und die zytotoxische Aktivität von RIP1 inhibieren (Arslan und Scheidereit, 2011; Dondelinger et al., 2013; Dondelinger et al., 2015; Lamothe et al., 2012). Eine Hemmung dieser Kinasen könnte also die Aktivierung des zytotoxischen Potentials von RIP1 zur Folge haben und Ursache für den durch YopP ausgelösten Zelltod von Makrophagen sein. Mit spezifischen Inhibitoren von TAK1 oder dem IKK-Komplex wurden Infektionsexperimente durchgeführt, um den inhibitorischen Effekt von YopP zu imitieren und zu ermitteln, ob sich die bei Wildtyp-Yersinien-Infektion beobachteten Effekte reproduzieren lassen.

RIP1^{+/+} und RIP1^{-/-} Makrophagen wurden für diese Versuche vor ihrer Infektion mit YopPnegativen Yersinien mit Inhibitoren von TAK1 oder dem IKK-Komplex behandelt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil an toten Zellen bestimmt. Da die Aktivierung der Signalkaskaden bei einer Yersinien-Infektion, wie bereits erwähnt, über TLR4/TRIF abläuft, wurde zudem, anstelle der Yersinien-Infektion, eine Stimulation der Zellen mit *E. coli* LPS durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine Inhibition von TAK1 oder des IKK-Komplexes mit

75

anschließender Infektion (WA- $\Delta yopP$) oder Stimulation (LPS) der RIP1^{+/+} Makrophagen zu einem hohen Maß an Zelltod führte (Abbildung 15). Im Gegensatz dazu zeigten RIP1-Knockout Makrophagen jeweils signifikant weniger Zelltod. Diese Beobachtungen sind mit denen nach Wildtyp-Yersinien-Infektion vergleichbar. Somit wird deutlich, dass aktives TAK1 und auch der aktive IKK-Komplex einen schützenden Effekt auf Yersinien-infizierte oder LPS-stimulierte Makrophagen ausüben. Fällt durch die Inhibition einer der beiden Kinasen dieser protektive Effekt weg, kann RIP1 seine proapoptotischen Eigenschaften ausführen und es kommt zu RIP1-abhängigem Zelltod.



Abbildung 15: Inhibition von TAK1 oder des IKK-Komplexes führt bei stimulierten Makrophagen zu RIP1-abhängigem Zelltod (modifiziert nach Menon, Gropengießer *et al.*, 2017)

RIP1^{+/+} und RIP1^{-/-} Makrophagen blieben unbehandelt oder wurden eine Stunde vor Infektion mit dem TAK1-Inhibitor (NP-009245; 1 μ M) oder IKK-Komplex Inhibitor (TPCA-1; 5 μ M) inkubiert. Anschließend wurden sie für fünf Stunden mit YopP-negativen Yersinien (WA- $\Delta yopP$) (MOI 20:1) infiziert oder mit LPS (1 μ g/ml) stimuliert. Nach 90 min wurde die Infektion mit Gentamycin abgestoppt, um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Die Zellen wurden mit SYTOX® Green (0,5 μ M) versetzt und anhand der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde der prozentuale Anteil an toten Zellen berechnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von n = 3 unabhängigen Experimenten (** p < 0,01; *** p < 0,001, ungepaarter t-Test).

Es wurde als nächstes untersucht, ob bei Einsatz der Inhibitoren speziell auch die RIP1-Kinaseaktivität notwendig ist, um Zelltod auszulösen. Hierfür wurden immortalisierte Knochenmarks-Makrophagen (KMM) verwendet. Sie wurden wie zuvor mit den spezifischen Inhibitoren von entweder TAK1 oder IKK β behandelt und mit YopP-negativen Yersinien infiziert oder mit LPS stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Nec-1s behandelt, um die RIP1-Kinaseaktivität zu inhibieren. Nec-1s reduzierte dabei den durch TAK1- oder IKK β -Inhibition bei Wildtyp-KMMs ausgelösten Zelltod (Abbildung 16). Somit spiegeln die Ergebnisse mit den TAK1 und IKK β Inhibitoren den Apoptose-induzierenden Effekt von YopP bei Wildtyp-Yersinien-Infektion wider.



Abbildung 16: Zelltod von stimulierten Makrophagen nach TAK1 oder IKKβ Inhibition ist abhängig von der RIP1-Kinaseaktivität (modifiziert nach Menon, Gropengießer *et al.*, 2017)

Immortalisierte Knochenmarks-Makrophagen (KMM) wurden eine Stunde vor Infektion mit dem TAK1-Inhibitor (NP-009245; 1 μ M) oder IKK β -Inhibitor (BMS-345541; 5 μ M) und RIP1-Inhibitor (Nec-1s; 50 μ M) inkubiert. Anschließend wurden sie für vier Stunden mit YopP-negativen Yersinien (WA- $\Delta yopP$) (MOI 20:1) infiziert oder mit LPS (1 μ g/ml) stimuliert. Nach 90 min wurde die Infektion mit Gentamycin abgestoppt, um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Die Zellen wurden mit SYTOX® Green (0,5 μ M) versetzt und mittels der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde der prozentuale Anteil an toten Zellen berechnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± SEM von n = 3 unabhängigen Experimenten (* p < 0,05; *** p < 0,001, ungepaarter t-Test).

5.1.5 TAK1- oder IKKβ-Hemmung vermittelt Apoptose bei infizierten Makrophagen

In Abschnitt 5.1.2 wurde gezeigt, dass eine Infektion mit Wildtyp-Yersinien bei Wildtyp-Makrophagen apoptotischen Zelltod herbeiführt. Ob sich diese Art von Zelltod auch nach Inhibition der TAK1-Kinase einstellt, wurde durch die folgenden Experimente untersucht. Dazu wurde erneut die Caspase-3-Aktivität mittels eines Ac-DEVD-AMC-Assays ermittelt. RIP1^{+/+} und RIP1^{-/-} Makrophagen wurden mit dem TAK1-Inhibitor behandelt und mit YopPnegativen Yersinien infiziert oder mit LPS stimuliert. Nach drei Stunden wurde die Caspase-3-Aktivität gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die Inhibition von TAK1 sowohl bei Infektion mit YopP-negativen Yersinien als auch unter LPS Stimulation bei RIP1^{+/+} Makrophagen zu einer deutlichen Caspase-3-Aktivität führte. Im Gegensatz dazu zeigten RIP1^{-/-} Makrophagen auch unter Einfluss des Inhibitors eine kaum erhöhte Caspase-3-Aktivität (Abbildung 17).



Abbildung 17: Inhibition der TAK1-Kinase mit anschließender Stimulation führt bei RIP1^{+/+} Makrophagen zu Caspase-3-Aktivierung (modifiziert nach Menon, Gropengießer *et al.*, 2017) RIP1^{+/+} und RIP1^{-/-} Makrophagen blieben unbehandelt (Ø) oder wurden mit dem Inhibitor der TAK1-Kinaseaktivität (NP-009245; 1 µM) inkubiert und anschließend mit dem YopP-negativen Yersinien Stamm (WA- $\Delta yopP$) infiziert (MOI 25:1) oder mit LPS (1 µg/ml) stimuliert. Die Infektion wurde nach 90 min mit Gentamycin abgestoppt, um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Nach drei Stunden wurde mittels eines Ac-DEVD-Assays die Caspase-3-Aktivität ermittelt. Alle gemessenen Werte wurden auf die Werte von unbehandelten Zellen normalisiert. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± SEM von n = 3 (WA- $\Delta yopP$) bzw. 4 (LPS) unabhängigen Experimenten (** p < 0.01, ungepaarter t-Test).

Zusätzlich wurde auch die Aktivierung von Caspase-8 mittels Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen prozessierte Caspase-8 analysiert. Auch für diesen Versuch wurden RIP1^{+/+} und RIP1^{-/-} Makrophagen mit Inhibitoren von TAK1 oder IKK β behandelt und anschließend mit dem YopP-negativen Yersinien Stamm WA- $\Delta yopP$ infiziert. 3,5 Stunden später wurden Zelllysate angefertigt, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Caspase-8-Prozessierung untersucht. Auch hier wurde deutlich, dass eine Inhibition der TAK1- oder IKK β -Kinase bei anschließender Infektion mit YopP-negativen Yersinien nur bei RIP1^{+/+} Makrophagen zu einer Caspase-8-Aktivierung führte. RIP1^{-/-} Makrophagen zeigten dagegen auch in diesem Versuch keine eindeutigen Anzeichen von Apoptose (Abbildung 18).



Abbildung 18: Caspase-8-Prozessierung bei RIP1+/+ Makrophagen nach Inhibition von TAK1 oder IKKβ und Infektion (modifiziert nach Menon, Gropengießer *et al.*, 2017)

Der durch YopP hervorgerufene apoptotische Zelltod bei Infektion mit Wildtyp-Yersinien konnte also in beiden Fällen durch die Inhibition entweder der TAK1-Kinase oder der IKKβ-Kinase imitiert werden und es kam folglich zu RIP1-abhängigem Zelltod bei infizierten oder LPS-stimulierten Wildtyp-Makrophagen. Beides deutet darauf hin, dass der Einfluss von YopP auf TAK1 oder IKKβ das Schicksal der Zelle hinsichtlich Zellüberleben und RIP1-abhängiger Apoptose bestimmt.

5.2 YopP inhibiert die RIP1-Phosphorylierung bei Makrophagen

5.2.1 YopP unterdrückt die p38/MK2-induzierte RIP1-Phosphorylierung bei infizierten Makrophagen

Neben der Fähigkeit von YopP, den zytotoxischen RIP1-abhängigen Signalweg zu aktivieren und so Zellen in die Apoptose zu führen, war zuvor ein Einfluss von YopP auf das Phosphorylierungsverhalten von RIP1 bei J774A.1-Makrophagen von der Arbeitsgruppe entdeckt worden. Hierbei wurde gezeigt, dass RIP1 nach Infektion von J774A.1-Makrophagen mit YopP-negativen Yersinien oder nach LPS Stimulation mehrere Phosphorylierungen aufweist, welche nach Infektion mit Wildtyp-Yersinien zeitabhängig unterdrückt werden. Die beobachteten Phosphorylierungsreaktionen äußern sich in einer verlangsamten elektrophoretischen Mobilität von RIP1 im SDS-Gel. Transloziertes YopP von *Y. enterocolitica* unterdrückt diese RIP1-Phosphorylierung bei Makrophagen (Novikova, Dissertation, 2012). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die RIP1-Phosphorylierung

RIP1^{+/+} und RIP1^{-/-} Makrophagen blieben unbehandelt oder wurden mit Inhibitoren der TAK1-Aktivität (NP-009245; 1 μM) oder IKKβ-Aktivität (BMS-345541; 5 μM) inkubiert und anschließend mit dem YopPnegativen Yersinien Stamm (WA- $\Delta yopP$) infiziert (MOI 30:1). Die Infektion wurde nach 90 min mit Gentamycin abgestoppt, um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Nach 3,5 Stunden wurden Zelllysate angefertigt und im Western-Blot auf das aktive Fragment (p18) der prozessierten Caspase-8 analysiert. Eine gleichmäßige Beladung des Gels mit Zelllysaten wurde mittels Aktin-Immunoblot kontrolliert.

nicht auf eine RIP1-Autophosphorylierung zurückzuführen ist, sondern von externen Kinasen vermittelt wird. Als RIP1-phosphorylierende Kinase konnte MAPKAPK2 (MK2) ermittelt werden (Novikova, Dissertation, 2012). Bei MK2 handelt es sich um ein Substrat der p38a MAP-Kinase, welche eine wichtige Rolle in der Regulation der angeborenen Immunantwort spielt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob diese zuvor gemachten Beobachtungen auch für die nun verwendeten immortalisierten, fetalen Maus-Makrophagen zutreffen. Dafür wurden die RIP1-positiven Makrophagen mit Wildtyp-Yersinien oder den YopP-negativen Yersinien infiziert bzw. mit LPS stimuliert. Zu verschiedenen Infektionszeitpunkten wurden Zelllysate angefertigt, diese elektrophoretisch im Western-Blot aufgetrennt und mit Antikörpern auf RIP1 analysiert. Dabei konnten die zuvor gemachten Beobachtungen reproduziert werden. Es zeigte sich, dass eine Infektion der Makrophagen mit dem YopP-defizienten Yersinien Stamm, ebenso wie die Stimulation der Zellen mit LPS, zu der beobachteten Veränderung der elektrophoretischen Mobilität von RIP1 führten. Diese Modifikation war zuvor als RIP1-Phosphorylierung charakterisiert worden (Novikova, Dissertation, 2012). Makrophagen, die mit dem Wildtyp-Yersinien Stamm infiziert wurden, zeigten diese RIP1-Modifikation nicht. Auch bei den hier erstmalig verwendeten immortalisierten, fetalen Maus-Makrophagen ist YopP demnach in der Lage, die RIP1-Phosphorylierung zu blockieren (Abbildung 19).



Abbildung 19: YopP inhibiert die RIP1-Phosphorylierung bei infizierten Wildtyp-Makrophagen

RIP1^{+/+}-Makrophagen blieben uninfiziert (Ø) oder wurden mit Wildtyp-Yersinien (WA), YopP-negativen Yersinien (WA- $\Delta yopP$) (MOI 20:1) infiziert oder mit LPS (1 µg/ml) stimuliert. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden Zelllysate angefertigt, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend gegen RIP1 analysiert. Eine gleichmäßige Beladung des Gels wurde mittels Aktin-Immunoblot nachgewiesen.

Anschließend sollte durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren von verschiedenen Kinasen des NF κ B- bzw. der MAPK-Signalwege ermittelt werden, ob der p38 α /MK2-Signalweg an der Induktion dieser RIP1-Phosphorylierung beteiligt ist. Um dies zu untersuchen, wurden RIP1^{+/+} Makrophagen eine Stunde vor der Infektion mit Wildtyp oder YopP-negativen

Yersinien mit spezifischen Inhibitoren von TAK1, IKK β , dem IKK-Komplex, p38, MK2, JNK oder MEK1/2 (MAPKK) inkubiert. Anschließend wurden wie zuvor Zelllysate angefertigt und analysiert. Diese Versuche zeigten erneut, dass eine Inhibition von p38 oder des *downstream* liegenden MK2 bei WA- $\Delta yopP$ infizierten Makrophagen die RIP1-Phosphorylierung blockierte (Abbildung 20). Im Gegensatz dazu bewirkten die Inhibitoren von IKK β , des IKK-Komplexes, von JNK, sowie von MEK1/2 keinen inhibitorischen Effekt auf die RIP1-Modifikation. Die Inhibition von TAK1 vermittelte eine teilweise Reduktion der RIP1-Phosphorylierung, was darauf zurückzuführen ist, dass sich diese Kinase *upstream* von p38/MK2 befindet. Auch die Induktion der RIP1-Phosphorylierung, vermittelt durch den p38/MK2-Signalweg, konnte demnach mit den immortalisierten, fetalen Maus-Makrophagen nach WA- $\Delta yopP$ -Infektion reproduziert werden.



Abbildung 20: Effekt verschiedener Kinase-Inhibitoren auf die RIP1-Phosphorylierung bei stimulierten Makrophagen (modifiziert nach Menon, Gropengießer *et al.*, 2017)

RIP1^{+/+} Makrophagen blieben unbehandelt (Ø) oder wurden mit Inhibitoren von TAK1 (NP-009245; 1 μM, NG25; 10 μM), IKKβ (BMS-345541; 5 μM), IKK (TPCA-1; 5 μM), p38 (SB 203580; 20 μM), MK2 (MK2-III; 20 μM, PF-3644022; 15 μM), JNK (SP 600125; 10 μM) oder MEK1/2 (PD 98059; 10 μM) behandelt. Eine Stunde später wurden die Zellen mit Wildtyp (WA) oder YopP-negativen Yersinien (WA- $\Delta yopP$) (MOI 20:1) infiziert. Nach 75 min wurden Zelllysate angefertigt, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend gegen RIP1 analysiert. Eine gleichmäßige Beladung des Gels wurde mittels Aktin-Immunoblot kontrolliert.

Immortalisierte, fetale Maus-Makrophagen verhalten sich demnach Makrophagen der J774A.1-Zelllinie vergleichbar. Nach Stimulation der Zellen und der Aktivierung des TLR-Signalweges kommt es zu einer Phosphorylierung von RIP1, welche von p38/MK2 vermittelt wird. Bei einer Infektion der Zellen mit *Y. enterocolitica* blockiert transloziertes YopP den p38-Signalweg und inhibiert so die MK2-induzierte Phosphorylierung von RIP1.

5.2.2 Die Aktivierung des zytotoxischen RIP1-Signalweges verläuft bei Yersinien-Infektion TNFR1-unabhängig

Wie bereits beschrieben, wurde für den Yersinien-induzierten Zelltod gezeigt, dass dieser hauptsächlich über den TLR4-Signalweg vermittelt wird. Um nun eine TNFR1-Abhängigkeit sowohl für den Yersinien-induzierten Zelltod, als auch für die RIP1-Phosphorylierung nach Infektion mit YopP-negativen Yersinien auszuschließen, wurden Infektionsexperimente mit

TNFR1^{-/-} Makrophagen durchgeführt. Dazu wurden primäre Knochenmarks-Makrophagen von Wildtypmäusen und TNFR1-Knockout-Mäusen isoliert und mit Wildtyp-Yersinien oder YopP-negativen Yersinien infiziert. Nach 6,5 Stunden wurde die Menge an toten Zellen ermittelt. TNFR1-negative Makrophagen wiesen in diesen Experimenten ähnlich viel Zelltod nach Infektion mit Wildtyp-Yersinien auf, wie die TNFR1^{+/+}-Kontrollzellen (Abbildung 21). *Y. enterocolitica* benötigt demnach keine Aktivierung des TNFR1-Signalweges, um bei Makrophagen Zelltod auszulösen. Wie zuvor beschrieben, geschieht dies über den TLR-Signalweg.



Abbildung 21: TNFR1-unabhängiger Zelltod nach Yersinien-Infektion bei Makrophagen (modifiziert nach Menon, Gropengießer *et al.*, 2017)

Primäre Knochenmarks-Makrophagen wurden von Wildtypmäusen oder TNFR1-Knockout-Mäusen isoliert. So gewonnene TNFR1^{+/+} und TNFR1^{-/-} Zellen wurden für 6,5 Stunden mit Wildtyp-Yersinien (WA) oder YopPnegativen Yersinien (WA- $\Delta yopP$) (MOI 20:1) infiziert. 90 min später wurde die Infektion mit Gentamycin abgestoppt, um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Die Zellen wurden mit SYTOX® Green (0,5 µM) versetzt und durch die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde der prozentuale Anteil an toten Zellen berechnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± SEM von n = 2 unabhängigen Experimenten.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob auch die RIP1-Phosphorylierung nach Stimulation der Makrophagen TNFR1-unabhängig verläuft. Auch hier wurden TNFR1^{+/+} und TNFR1^{-/-} Makrophagen mit Wildtyp-Yersinien oder YopP-negativen Yersinien infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten Zelllysate hergestellt. Diese wurden mit spezifischen Antikörpern gegen RIP1 analysiert. Es zeigte sich, dass die TNFR1^{-/-} Makrophagen verglichen zu Kontroll-Makrophagen keinen Unterschied in der RIP1-Phosphorylierung aufwiesen (Abbildung 22). Dies deutet darauf hin, dass auch hier keine TNFR1-Abhängigkeit besteht und die RIP1-Phosphorylierung vermutlich über den TLR-Signalweg induziert wird. Sowohl der RIP1-abhängige Zelltod, als auch die RIP1-Phosphorylierung werden demnach über den TLR-Signalweg reguliert. Ob diese Modifikation von RIP1 auch im Zusammenhang mit dem RIP1-abhängigen Zelltod nach Yersinien-Infektion steht, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit analysiert.



Abbildung 22: RIP1-Phosphorylierung nach Stimulation ist TNFR1-unabhängig (modifiziert nach Menon, Gropengießer *et al.*, 2017)

TNFR1^{+/+} und TNFR1^{-/-} Makrophagen blieben unbehandelt (Ø) oder wurden mit Wildtyp (WA) oder YopPnegativen Yersinien (WA- $\Delta yopP$) (MOI 20:1) infiziert. Nach 30 bzw. 60 min wurden Zelllysate angefertigt, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend gegen RIP1 analysiert. Eine gleichmäßige Beladung des Gels wurde mittels Aktin-Immunoblot kontrolliert.

5.3 p38/MK2 haben einen hemmenden Effekt auf die zytotoxische RIP1-Aktivität

5.3.1 Die alleinige Inhibition des p38/MK2-Signalweges hat keine signifikante Zelltod fördernde Wirkung

Im bisherigen Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Y. enterocolitica YopP einen RIP1abhängigen Zelltod bei Makrophagen auslöst, sowie eine MK2-vermittelte RIP1-Phosphorylierung nach Stimulation der Zellen verhindert. Des Weiteren konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass RIP1 und MK2 konstitutiv miteinander interagieren und dass MK2 RIP1 in vitro phosphoryliert (Novikova, 2012 Dissertation). Diese Ergebnisse deuten auf eine bisher unbekannte Regulation von RIP1 durch MK2 hin, welche durch die MK2-abhängige Phosphorylierung von RIP1 vermittelt werden könnte. Um die physiologischen Auswirkungen dieser Phosphorylierung genauer zu analysieren, wurde untersucht, ob die p38/MK2-vermittelte RIP1-Phosphorylierung einen Einfluss auf das Zellüberleben von Makrophagen nach Für Yersinien-Infektion hat. diese Versuche wurden MK2/MK3-Doppelknockout Makrophagen, welche entweder mit MK2 oder mit GFP rekomplementiert worden waren, verwendet. Mit GFP rekomplementierte Makrophagen sind ohne MK2 nicht in der Lage, RIP1 nach einer Stimulation zu phosphorylieren, sie sind also RIP1-Phosphorylierungsinkompetente Zellen. Mit MK2 rekomplementierte Makrophagen können eine normale RIP1-Phosphorylierung nach Stimulation aufweisen, sie sind RIP1-Phosphorylierungs-kompetent. Mit Hilfe dieser Zellen im Vergleich sollte der Einfluss der RIP1-Phosphorylierung auf die Aktivierung des zytotoxischen Signalweges analysiert werden. Beide Zelllinien wurden mit Wildtyp-Yersinien infiziert und der ausgelöste Zelltod wurde quantifiziert. Wie zu erwarten,

löste eine Wildtyp Yersinien-Infektion bei beiden Zellinien Zelltod aus (Abbildung 23A). Hierbei machte es keinen Unterschied, ob die Zellen MK2-positiv oder -negativ waren, da, vermittelt durch die YopP-Aktivität, dieser Signalweg ohnehin blockiert war. Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit Nec-1s konnte in beiden Fällen den zytotoxischen Effekt signifikant inhibieren. Um nun eine mögliche Verbindung zwischen der p38/MK2vermittelten RIP1-Phosphorylierung und der Yersinien-induzierten Apoptose beurteilen zu können, wurden MK2-positive Zellen in Anwesenheit von p38- bzw. MK2-Inhibitoren, welche den Effekt von YopP imitieren sollten, mit YopP-defizienten Yersinien infiziert (Abbildung 23A) bzw. mit LPS stimuliert (Abbildung 23B). Um mögliche off target Effekte der Inhibitoren ebenfalls ausschließen zu können, wurden auch RIP1-Phosphorylierungsinkompetente Zellen analysiert. Es zeigte sich, dass die Inhibition von p38 bzw. MK2 bei anschließender Infektion bzw. Stimulation nur im geringen Maß Zelltod auslöste (Abbildung 23). Dies war auch bei den RIP1-Phosphorylierungs-inkompetenten Zellen zu beobachten. Die zusätzliche Inhibition der RIP1-Kinaseaktivität konnte den zytotoxischen Effekt leicht reduzieren, jedoch wiesen diese Unterschiede keine statistische Signifikanz auf. Die von p38/MK2 vermittelte Blockade verursacht demnach nur im geringen Maße Zelltod. Folglich scheint die Inhibition dieses Signalweges alleine kein wesentliches zytotoxisches Potential zu aktivieren.



Abbildung 23: Inhibition von p38 bzw. MK2 oder das Fehlen von MK2 haben keinen wesentlichen Zelltod auslösenden Effekt

Immortalisierte Knochenmarks-Makrophagen (KMM) von MK2/MK3 Doppelknockout-Mäusen (MK2/MK3^{-/-}) mit MK2 oder GFP rekomplementiert (MK2/MK3^{-/-} + MK2, MK2/MK3^{-/-} + GFP), blieben unbehandelt oder wurden eine Stunde vor Infektion mit dem RIP1-Kinase-Inhibitor (Nec-1s; 50 μ M) oder mit Inhibitoren von p38 (SB203580; 20 μ M) bzw. MK2 (PF-3644022; 15 μ M) behandelt. Anschließend wurden sie für fünf Stunden mit Wildtyp-Yersinien (WA), YopP-negativen Yersinien (WA- Δ *yopP*) (MOI 20:1) oder mit LPS (1 μ g/ml) stimuliert. Nach 90 min wurde die Infektion mit Gentamycin abgestoppt, um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Die Zellen wurden mit SYTOX® Green (0,5 μ M) versetzt und anhand der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde der prozentuale Anteil an toten Zellen berechnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± SEM von n = mind. 3 unabhängigen Experimenten (*** p < 0,001, ungepaarter t-Test).

5.3.2 p38/MK2 und IKKβ üben gemeinsam einen inhibitorischen Effekt auf RIP1abhängigen Zelltod aus

Da YopP nicht nur die MAPK-Signalwege inhibiert, sondern auch den NFkB-Signalweg durch die Inaktivierung von IKKß blockiert, wurden in weiteren Infektionsexperimenten sowohl der p38/MK2-, als auch der IKKβ/NFκB-Weg inhibiert. Die Blockierung beider Signalwege sollte mehr der physiologischen Wirkung einer Yersinien-Infektion entsprechen. Für den IKK-Komplex ist bei TNFa-stimulierten Zellen gezeigt worden, dass dieser RIP1 direkt phosphoryliert und so die zytotoxische Aktivität von RIP1 unterdrückt (Dondelinger et al., 2015). Da die Hemmung des p38/MK2-Signalweges allein nicht ausgereicht hat, signifikant Zelltod auszulösen, wäre es möglich, dass der IKK-Komplex und p38/MK2 gemeinsam die zytotoxische Aktivität von RIP1 kontrollieren. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die p38/MK2-Aktivität einen Effekt auf den RIP1-abhängigen Zelltod, bei gleichzeitiger Inhibition von IKKB, hat. Erneut wurden für diese Infektionsexperimente MK2/MK3 Doppelknockout Makrophagen, welche entweder mit MK2 (MK2/MK3^{-/-} + MK2) oder mit GFP (MK2/MK3^{-/-} + GFP) rekomplementiert worden waren, verwendet. Die Makrophagen wurden mit den Inhibitoren von p38, MK2, IKKß und RIP1, wie angegeben, inkubiert und mit YopP-negativen Yersinien infiziert (Abbildung 24A) bzw. mit LPS stimuliert (Abbildung 24B). Hierbei zeigte sich, dass die Inhibition von IKKβ bei MK2positiven Makrophagen bei anschließender Infektion mit YopP-defizienten Yersinien bzw. LPS-Stimulation bereits zu einer starken zytotoxischen Reaktion führte. Diese konnte bei zusätzlicher Inhibition von p38 bzw. MK2 oder bei MK2^{-/-} Makrophagen noch bedeutend gesteigert werden. Es handelte sich überall um RIP1-Kinase-abhängigen Zelltod, da Necrostatin einen schützenden Effekt ausübte.



Abbildung 24: Gleichzeitige Inhibition von IKKβ und MK2 fördert RIP1-abhängigen Zelltod (modifiziert nach Menon, Gropengießer *et al.*, 2017)

Immortalisierte Knochenmarks-Makrophagen (KMM) von MK2/MK3 Doppelknockout-Mäusen (MK2/MK3^{-/-}) mit MK2 oder GFP rekomplementiert (MK2/MK3^{-/-} + MK2, MK2/MK3^{-/-} + GFP), wurden eine Stunde vor Infektion mit Inhibitoren von p38 (SB203580; 20 μ M), MK2 (PF-3644022; 15 μ M) IKK β (BMS-345541; 5 μ M) und/oder RIP1 (Nec-1s; 50 μ M), wie angegeben, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für vier Stunden mit YopP-negativen Yersinien (WA- Δ *yopP*) (MOI 20:1) infiziert oder mit LPS (1 μ g/ml) stimuliert. Nach 90 min wurde die Infektion mit Gentamycin abgestoppt, um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Die Zellen wurden mit SYTOX® Green (0,5 μ M) versetzt und anhand der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde der prozentuale Anteil an toten Zellen berechnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± SEM von n = 4 (A) bzw. n = mind. 5 (B) unabhängigen Experimenten (** p < 0,01; *** p < 0,001, ungepaarter t-Test).

Diese Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass das gleichzeitige Blockieren des IKK- sowie des p38/MK2-Signalweges notwendig ist, um das zytotoxische Potential von RIP1 vollständig zu aktivieren und so RIP1-Kinase-abhängigen Zelltod bei infizierten bzw. stimulierten Makrophagen effizient auszulösen. Durch YopP kommt es zur Blockade beider Signalwege. Zusätzlich, zu der durch IKK ausgelösten Phosphorylierung (Dondelinger *et al.*, 2015), zeigen unsere Ergebnisse eine neue, bisher unerkannte MK2-abhängige RIP1-Phosphorylierung. Auch diese scheint einen protektiven Effekt auf RIP1-vermittelten Zelltod aufzuweisen, wenn der IKK-Signalweg zusätzlich inhibiert ist. Es scheint demnach, als habe die Zelle zwei Wege, um die zytotoxische Aktivität von RIP1 zu inhibieren. YopP von *Y. enterocolitica* inhibiert sowohl die Aktivität von IKK, als auch von p38/MK2, so dass dieser Schutz wegfällt und RIP1 sein proapoptotisches Potential ausüben kann. Genauere Untersuchungen, ob der protektive Effekt von MK2 durch die RIP1-Phosphorylierung vermittelt wird und die Charakterisierung möglicher MK2-abhängiger RIP1-Phosphorylierungsstellen war weiterer Bestandteil dieser Arbeit.

5.3.3 Die Inhibition von IKKβ und MK2 verhindert die Bildung eines proapoptotischen RIP1-Komplexes

Für ein genaueres Verständnis des Mechanismus der RIP1-Regulation wurde untersucht, ob die p38/MK2-abhängige RIP1-Phosphorylierung Einfluss auf bereits bekannte Interaktionen von RIP1 hat. Die meisten Aufschlüsse über RIP1-Interaktionspartner gaben Untersuchungen bei der TNFα-induzierten Signaltransduktion. Der TNFR1-Signalweg ist einer der bestuntersuchten Signalwege zur Funktion von RIP1. Sowohl bei der Bildung von Komplex I, als auch von Komplex IIb ist RIP1 maßgeblich beteiligt. Über diese Komplexbildung kann sowohl Zellüberleben, als auch Zelltod über Apoptose oder Nekroptose reguliert und aktiviert werden (Vandenabeele et al., 2010). Auch für die Aktivierung über den TLR-Signalweg ist die Bildung eines zytosolischen RIP1-Komplexes bekannt. Um diesen von Komplex IIb zu unterscheiden, welcher nach TNFR1-Aktivierung gebildet wird, wurde dieser nach TLR-Aktivierung und IAP-Depletion gebildete Komplex "Ripoptosome" genannt. Den Ripoptosome-Komplex bildet RIP1 gemeinsam mit FADD, Caspase-8 und cFLIP. Die Bildung ist RIP1-Kinase-abhängig und das Ripoptosome kann cFLIP-reguliert sowohl Apoptose, als auch Nekroptose auslösen (Feoktistova et al., 2011; Tenev et al., 2011). Ein Einfluss der IKKβ-, sowie der MK2-abhängigen RIP1-Phosphorylierung auf die Bildung eines vergleichbaren Komplexes sollte in Ko-Immunpräzipitations-Experimenten untersucht werden. MK2/MK3 Doppelknockout Makrophagen, welche mit MK2 rekomplementiert worden waren, wurden für diesen Versuch mit den Inhibitoren von MK2 und IKKß behandelt und mit Wildtyp-Yersinien infiziert bzw. mit LPS stimuliert. Um eine Abhängigkeit von der RIP1-Kinaseaktivität zu untersuchen, wurden die Zellen zusätzlich mit Nec-1s behandelt. Mit den gewonnenen Zelllysaten wurde eine Ko-Immunpräzipitation mittels RIP1-Antikörper durchgeführt und die Präzipitate wurden auf RIP1, FADD, sowie prozessierte Caspase-8 (p43) im Western-Blot untersucht. Abbildung 25 zeigt, dass es nach Wildtyp-Yersinien-Infektion zur Bildung eines Komplexes zwischen RIP1, FADD und prozessierter Caspase-8 (p43) kam. Die Bildung ist von der RIP1-Kinaseaktivität abhängig, da der Einsatz des RIP1-Kinaseinhibitors die Komplexbildung verhinderte. Folglich hat eine Yersinien-Infektion Auswirkungen auf das Bindungsverhalten von RIP1 und führt durch die Bildung eines RIP1, FADD und Caspase-8-Komplexes zu Apoptose bei Makrophagen. Eine Behandlung der Zellen mit dem IKKβ-Inhibitor bei anschließender LPS Stimulation führte nur zu einer schwachen Bildung des Komplexes. Diese wurde bei zusätzlicher Inhibition von MK2 deutlich verstärkt. Die Inhibition beider Signalwege wirkt sich demnach additiv auf die Bildung des proapoptotischen RIP1, FADD und Caspase-8-Komplexes aus. Auch hier war die Komplexbildung RIP1-Kinase-abhängig. Die bei Wildtyp-Yersinien-Infektion gemachte Beobachtung ließ sich somit durch den Einsatz des IKKβ- sowie MK2-Inhibitors reproduzieren. Dies zeigt, dass sich die YopP-vermittelte Inhibition der IKKβ- und MK2-Kinase auf die Bildung des RIP1, FADD und Caspase-8-Komplexes auswirkt. Durch die gleichzeitige Inhibition der beiden Kinasen wird das zytotoxische Potential von RIP1 vollständig aktiviert und die Bildung dieses proapoptotischen Komplexes stark begünstigt. Dies führt zu RIP1-abhängiger Apoptose bei Yersinien infizierten Makrophagen.



Abbildung 25: Inhibition von MK2 verstärkt die Interaktion zwischen RIP1, FADD und Casp-8 (modifiziert nach Menon, Gropengießer *et al.*, 2017)

Mit MK2 rekomplementierte, immortalisierte Knochenmarks-Makrophagen (KMM) von MK2/MK3 Doppelknockout-Mäusen (MK2/MK3^{-/-} + MK2) blieben unbehandelt oder wurden eine Stunde vor Infektion mit Inhibitoren von p38 (SB203580; 20 μ M), IKK β (BMS-345541; 5 μ M) und/oder RIP1 (Nec-1s; 50 μ M), wie angegeben, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 bzw. 120 min mit Wildtyp-Yersinien (WA) (MOI 25:1) infiziert oder mit LPS stimuliert. Nach 90 min wurde die Infektion mit Gentamycin abgestoppt, um eine Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Es wurden Zelllysate angefertigt und diese einer α RIP1-Immupräzipitation (IP) unterzogen. Die so gewonnenen Präzipitate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und gegen RIP1, FADD und aktiver Caspase-8 (p43) analysiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Expression der Proteine wurden auch die Rohlysate im Western-Blot auf RIP1, FADD und Caspase-8 analysiert. (*) kennzeichnet die schwere Kette des IgG-Antikörpers.

5.4 S321 und S336: Zwei potentielle MK2 Phosphorylierungsstellen in RIP1

5.4.1 Phosphorylierung an S321 und S336 inhibieren das zytotoxische Potential von RIP1

Die vorangegangenen Experimente zeigten eindrücklich, dass RIP1 MK2-abhängig phosphoryliert wird. Auch eine Beteiligung des p38/MK2-Signalweges an der Regulation des Zellschicksals über die Kinase RIP1 konnte in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden. Die MK2-vermittelte RIP1-Phosphorylierung scheint einen inhibitorischen Effekt auf das zytotoxische Potential von RIP1 zu haben und übt somit einen protektiven Effekt auf die Zelle aus. Experimente mit Zellen, bei denen potentielle MK2-abhängige Phosphorylierungsstellen in RIP1 mutiert worden waren, sollten zeigen, ob dieser schützende Effekt tatsächlich von der MK2-abhängigen RIP1-Phosphorylierung ausgeht. Ein Phosphorylierungsmotiv für eine effiziente Phosphorylierung durch MK2 ist bereits bekannt: MK2 phosphoryliert sowohl Serin (S) oder Threonin (T) Aminosäuren, welche sich drei Aminosäuren *downstream* eines Arginin (R) befinden. Zusätzlich wird eine hydrophobe Aminosäure fünf Positionen *downstream* des Serins oder Threonins benötigt (Stokoe *et al.*, 1993; Clifton *et al.*, 1996).



Abbildung 26: Schematische Darstellung der RIP1-Domänen, sowie ein Ausschnitt der Aminosäuresequenz der Intermediärdomäne (modifiziert nach Vandenabeele et al., 2010) Gezeigt sind auf der rechten Seite die Domänen des RIP1-Proteins, auf der linken Seite ein Ausschnitt der Aminosäuresequenz der strukturell wichtigen Intermediärdomäne. Rot markiert sind Serin-Aminosäuren und die dazugehörigen drei Positionen *downstream* liegenden Arginin-Aminosäuren, welche eine potentielle MK2-Phosphorylierungsstelle darstellen (S321, S336, S415, S437). Rot umrandet sind S321 und S336, welche hochkonservierte Aminosäuren sind und in ersten Vorversuchen als wahrscheinliche MK2-vermittelte Phosphorylierungsstellen ermittelt wurden.

RIP1 besitzt mehrere dieser MK2-Phosphorylierungsmotive in der strukturell wichtigen Intermediärdomäne. Die Serine S321, S336, S415 sowie S437 wären somit mögliche MK2abhängige Phosphorylierungsstellen in RIP1 (Abbildung 26). Durch gezieltes Mutieren dieser vier Serin-Aminosäuren und nachfolgender Untersuchungen der Auswirkungen auf den RIP1-Phosphorylierungsstatus (verlangsamte Migration im SDS-Gel nach Phosphorylierung), wurden zwei potentielle MK2-vermittelte Phosphorylierungsstellen in RIP1 im Vorfeld dieser Arbeit identifiziert. Es ist bekannt, dass durch die Mutation eines Serins zu Alanin (A) ein an dieser Stelle nicht phosphorylierbares Protein entsteht. Andersherum kann durch die Mutation eines Serins zu Asparaginsäure (D) in den meisten Fällen eine Phosphorylierung an dieser Stelle dauerhaft imitiert werden. S321, S336, S415 sowie S437 von murinem RIP1, welches C-terminal mit einem myc-*Tag* fusioniert war, wurden einzeln oder kombiniert sowohl zu Alanin als auch zu Asparaginsäure innerhalb eines Plasmides mutiert und das Plasmid wurde in J774A.1 Makrophagen transfiziert. Die transfizierten Makrophagen blieben unstimuliert oder wurden mit YopP-negativen Yersinien infiziert, um eine Stimulation der Zellen zu erreichen. Die gewonnenen Zelllysate wurden im Western-Blot mit spezifischem myc-Antikörper auf den RIP1-Phosphorylierungsstatus untersucht. Mit Hilfe des myc-Tags konnte sichergestellt werden, dass nicht auch chromosomal kodiertes, endogenes RIP1 auf dem Westen-Blot dargestellt wurde. Dabei zeigte sich, dass nur eine gleichzeitige Mutation von S321 und S336 zu Alanin die beobachtete MK2-vermittelte RIP1-Phosphorylierung nach Stimulation vollständig verhindern konnte (Abbildung 27). Im Gegensatz dazu führte eine gleichzeitige Mutation von S321 und S336 zu Asparaginsäure zu einem verlangsamten Laufverhalten des RIP1-Proteins im SDS-Gel bereits ohne Stimulation der Zellen. Diese Imitation der Phosphorylierung durch Asparaginsäure war der beobachteten RIP1-Phosphorylierung vermittelt durch MK2 nach Stimulation der Zellen vergleichbar. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den in Säugetieren hochkonservierten Aminosäuren S321 und S336 um die MK2-vermittelten RIP1-Phosphorylierungsstellen handelt. Eine Mutation von S415 und S437 Alanin wies hingegen keine Veränderung RIP1zu im Phosphorylierungsstatus im Western-Blot auf.



Abbildung 27: Auswirkungen der Mutationen von S321 und S336 auf den Migrations- und damit Phosphorylierungsstatus von RIP1

J774A.1 Makrophagen wurden, wie angegeben, mit Plasmiden transfiziert, welche die verschiedenen RIP1-Mutationen trugen. 24 Stunden später wurden die Zellen für eine Stunde mit YopP-negativen Yersinien (WA- $\Delta yopP$) (MOI 20:1) infiziert. Es wurden Zelllysate angefertigt, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend gegen den myc-*Tag* analysiert.

Massenspektrometrische Untersuchungen konnten S321 und S336 als MK2-abhängige Phosphorylierungsstellen in RIP1 bestätigen (Menon *et al.*, 2017). Aus diesen Gründen wurde speziell der Einfluss dieser beiden Phosphorylierungsstellen auf den RIP1-abhängigen Zelltod untersucht. Für die Analysen wurden lentivirale Partikel hergestellt, welche einen Expressionsvektor mit den jeweils unterschiedlich mutierten RIP1-Sequenzen und eine Puromycin-Resistenz als Selektions-Marker enthielten. Mit Hilfe dieser viralen Partikel wurden RIP1-negative murine Fibroblasten (MEF- Δrip) transduziert, so dass sich der gewünschte Bereich des Expressionsvektors in das Genom der Zielzelle integrierte und die Zelle das gewünschte Protein stabil exprimierte. Auf diese Weise wurden RIP1-negative Zellen mit einem RIP1-Wildtyp Konstrukt (RIP1-WT) rekomplementiert, oder mit einem Konstrukt, in dem die beiden potentiellen MK2-abhängigen Phosphorylierungsstellen S321 und S336 zu Alanin (A) (RIP1-SSAA) bzw. zu Asparaginsäure (D) (RIP1-SSDD) mutiert worden waren. Durch das RIP1-SSAA Konstrukt soll die YopP-vermittelte Blockierung von MK2 dargestellt werden, bei der die MK2-abhängige RIP1-Phosphorylierung ausbleibt. Im Gegensatz dazu soll das RIP1-SSDD Konstrukt eine dauerhafte Phosphorylierung an beiden Stellen imitieren. Ein drittes Konstrukt wurde hergestellt, bei dem zusätzlich zu beiden Serinen (S321/S336) das konservierte Lysin K45 zu Alanin (K45A) mutiert wurde (RIP1-SSAA-K45A). Dies führt zu einer Kinase-inaktiven RIP1-Mutante (Sun et al., 2002). In Abbildung 28 ist ein Kontroll-Blot über die erfolgreiche Rekomplementierung der Fibroblasten zu sehen. Mittels Antikörper gegen RIP1 wurden hergestellte Zelllysate auf ihre RIP1-Expression untersucht. Zu sehen ist die RIP1-Expression nach erfolgreicher Rekomplementierung der zuvor RIP1-negativen Fibroblasten mit dem RIP1-WT, RIP1-SSAA oder dem RIP1-SSDD Konstrukt im Vergleich zu Wildtyp-Fibroblasten und den RIP1negativen Fibroblasten transduziert mit dem Leervektor.



Abbildung 28: Nachweis über erfolgreiche Rekomplementierung der RIP1-^{*I*} Fibroblasten Von den rekomplementierten Fibroblasten (MEF- Δrip) mit den verschiedenen RIP1-Konstrukten wurden Zelllysate hergestellt, elektrophoretisch aufgetrennt und auf ihre RIP1-Expression mittels α RIP1 untersucht. Die gleichmäßige Beladung des Gels wurde mittels Aktin-Immunoblot kontrolliert.

Um die Funktionsfähigkeit der verschiedenen RIP1-Konstrukte zu testen, wurde die RIP1-Phosphorylierung nach TNF α -Stimulation der Zellen und nach Inkubation mit dem MK2-Inhibitor untersucht. Zellen, die mit dem RIP1-WT Konstrukt rekomplementiert sind, sollten nach Stimulation eine RIP1-Phosphorylierung aufweisen, welche bei MK2-Inhibition blockiert werden kann. Im Gegensatz dazu sollten mit RIP1-SSAA rekomplementierte Zellen auch unter TNF α -Stimulation keine RIP1-Phosphorylierung zeigen und Zellen mit dem RIP1-SSDD Konstrukt sollten eine konstitutive Phosphorylierung aufweisen, welche sich auch unter MK2-Inhibition nicht blockieren lässt. Unter diesen Bedingungen hergestellte Zelllysate wurden im Western-Blot mit spezifischem Antikörper gegen RIP1 analysiert. Das Ergebnis in Abbildung 29 zeigt, dass alle Erwartungen erfüllt sind und die rekomplementierten Zelllinien demnach biologisch korrekt und funktionell aktiv erscheinen.



Abbildung 29: Überprüfung der Funktionalität der hergestellten rekomplementierten Fibroblasten Die mit den angegebenen RIP1-Konstrukten rekomplementierten Fibroblasten (MEF- Δrip) wurden, wie angegeben, mit dem IKK β -Inhibitor (BMS-345541; 5 μ M) und dem MK2-Inhibitor (PF-3644022; 15 μ M) inkubiert und eine Stunde später mit mTNF α (50 ng/ml) stimuliert. Von den Zellen wurden Zelllysate hergestellt und elektrophoretisch im Western-Blot aufgetrennt. Dieser wurde mittels α RIP1 detektiert.

Als Zellsystem für die weiteren Versuche wurden murine, embryonale Fibroblasten (MEF- Δrip) verwendet, welche mit TNF α stimuliert wurden. Infektionsexperimente mit Yersinien konnten in diesem Fall nicht durchgeführt werden, da Yersinien bei Fibroblasten keinen Zelltod auslösen. Jedoch wird RIP1 sowohl im TLR-Signalweg als auch im TNF-Signalweg gleichermaßen aktiviert, so dass die Stimulation mit TNF α erfolgen kann. Auch Dondelinger *et al.*, 2015 zeigten anhand TNF α -stimulierter Fibroblasten, dass die IKK-abhängige RIP1-Phosphorylierung einen inhibierenden Effekt auf die zytotoxische Aktivität von RIP1 hat. Mit Hilfe der erfolgreich rekomplementierten Zellen wurde in den folgenden Experimenten ein Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung und dem zytotoxischem Potential von RIP1 untersucht.

Um einen möglichen Schutz der MK2-vermittelten RIP1-Phosphorylierung zu untersuchen, wurden als erstes Fibroblasten, welche mit RIP1-WT oder RIP1-SSDD rekomplementiert worden waren, miteinander verglichen. Es wurde analysiert, ob die Imitation der RIP1-Phosphorylierung an den Aminosäuren 321 und 336 die Zellen vor TNFα-induziertem Zelltod schützen kann. Beide Zelllinien wurden dafür mit Inhibitoren von IKKβ und MK2 behandelt und anschließend mit TNFα stimuliert. Es ist anzunehmen, dass die Inhibition von IKK und der MK2-Kinase bei Zellen mit RIP1-WT Zelltod auslöst. Sollte die Phosphorylierung von RIP1 an S321 und S336 tatsächlich einen protektiven Effekt für die Zellen haben, wäre eine Reduktion des Zelltodes bei RIP1-SSDD rekomplementierten Zellen trotz der Inhibition der MK2-Kinase zu erwarten. In Abbildung 30 wird diese Annahme bestätigt. Zellen, bei denen die Phosphorylierung der Aminosäuren 321 und 336 durch die Mutationen dauerhaft imitiert

ist, zeigten ein signifikant geringeres Maß an Zelltod nach Inhibition und Stimulation, verglichen zu den Kontroll-Zellen. Dies lässt auf einen schützenden Effekt der MK2vermittelten Phosphorylierung schließen.



Abbildung 30: RIP1-SSDD Zellen weisen Schutz vor RIP1-abhängigem Zelltod auf (modifiziert nach Menon, Gropengießer *et al.*, 2017)

Mit RIP1-WT bzw. RIP1-SSDD rekomplementierte Fibroblasten (MEF- Δrip) wurden eine Stunde vor Stimulation mit Inhibitoren von MK2 (PF-3644022; 15 μ M) und IKK β (BMS-345541; 5 μ M), wie angegeben, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 21 Stunden mit mTNF α (50 ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden mit SYTOX® Green (0,5 μ M) versetzt und anhand der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde der prozentuale Anteil an toten Zellen berechnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± SEM von n = 3 unabhängigen Experimenten (* p < 0,05; ungepaarter t-Test).

Als nächstes wurde umgekehrt der zytotoxische Effekt von unphosphoryliertem RIP1 untersucht. Dafür wurden Zellen verglichen, welche mit RIP1-SSAA oder mit dem RIP1-WT Konstrukt rekomplementiert worden waren. Beide Zelllinien wurden mit dem IKKβ-Inhibitor inkubiert und mit TNFα stimuliert. Dadurch wurde der NFκB-Signalweg blockiert und es konnte untersucht werden, ob mittels der beiden Mutationen der Effekt der MK2-Inhibition imitiert werden kann. Durch die Zugabe von Nec-1s sollte in diesem Fall zusätzlich der Einfluss der RIP1-Kinaseaktivität untersucht werden. Es zeigte sich, dass Zellen, rekomplementiert mit dem RIP1-SSAA Konstrukt, unter den beschriebenen Bedingungen einen signifikant höheren Zelltod aufwiesen als mit RIP1-WT rekomplementierte Zellen (Abbildung 31). Dies lässt darauf schließen, dass an den Aminosäuren 321 und 336 unphosphoryliertes RIP1 ein höheres zytotoxisches Potential aufweist als phosphoryliertes RIP1. Mit dem RIP1-SSAA Konstrukt zeigte sich demnach ein vergleichbarer Effekt wie unter MK2-Inhibition. Dies untermauert die Hypothese eines protektiven Effekts der MK2induzierten RIP1-Phosphorylierung. Die Inhibition der RIP1-Kinaseaktivität vermittelt durch Nec-1s konnte den ausgelösten Zelltod bei beiden Zelllinien zwar signifikant reduzieren,
jedoch war der Effekt nicht so ausgeprägt wie zuvor bei Wildtyp-Makrophagen. Dies könnte auf RIP1-unabhängigen Zelltod zurückzuführen sein, welcher bei Zellen ausgelöst wird, bei denen die RIP1-Expression zurückgegangen ist. Auf diesen RIP1-unabhängigen Zelltod kann Nec-1s keine Wirkung zeigen. Weitere Experimente sollten deshalb über die Beteiligung der RIP1-Kinaseaktivität Aufschluss geben.



Abbildung 31: RIP1-SSAA Zellen zeigen verstärkten Zelltod (modifiziert nach Menon, Gropengießer et al., 2017)

Mit RIP1-WT bzw. RIP1-SSAA rekomplementierte Fibroblasten (MEF- Δrip) wurden eine Stunde vor Stimulation mit Inhibitoren von IKK β (BMS-345541; 5 μ M) und/oder RIP1 (Nec-1s; 50 μ M), wie angegeben, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 21 Stunden mit mTNF α (50 ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden mit SYTOX® Green (0,5 μ M) versetzt und anhand der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde der prozentuale Anteil an toten Zellen berechnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± SEM von n = 4 unabhängigen Experimenten (* p < 0,05; ** p < 0,01, ungepaarter t-Test).

5.4.2 Die RIP1-Kinaseaktivität ist notwendig für RIP1-abhängigen Zelltod

Da die Behandlung der Zellen mit Nec-1s zwar einen signifikanten, jedoch nicht so stark ausgeprägten Einfluss wie zuvor zeigte, wurde die RIP1-Kinase-Abhängigkeit auf anderem Weg untersucht. Dafür wurden RIP1-SSAA rekomplementierte Zellen mit RIP1-SSAAK45A rekomplementierten Zellen verglichen. Wie bereits erklärt, handelt es sich bei der RIP1-K45A Mutante um eine Kinase-inaktive RIP1-Mutante. Beide Zelllinien wurden erneut mit dem IKKβ-Inhibitor inkubiert und mit TNFα stimuliert. Sollte der so ausgelöste Zelltod RIP1-Kinase-abhängig sein, sollten Zellen rekomplementiert mit dem RIP1-SSAAK45A Konstrukt weniger Zelltod aufweisen, als Zellen, welche mit dem RIP1-SSAA Konstrukt rekomplementiert worden waren. Die in Abbildung 32 dargestellten Experimente bestätigen diese Hypothese. Bei beiden Zelllinien sind die Aminosäuren 321 und 336 unphosphoryliert, was die proapoptotische Aktivität von RIP1 aktiviert. Dass der so ausgelöste Zelltod jedoch RIP1-Kinase-abhängig ist, zeigen mit dem Kinase-inaktiven Konstrukt rekomplementierte Zellen, welche deutlich vor Zelltod geschützt waren, verglichen mit RIP1-SSAA rekomplementierten Zellen.



Abbildung 32: RIP1-Kinaseaktivität ist essentiell für RIP1-abhängigen Zelltod (modifiziert nach Menon, Gropengießer *et al.*, 2017)

Fibroblasten (MEF- Δrip), mit RIP1-SSAA bzw. RIP1-SSAAK45A rekomplementiert, blieben unbehandelt oder wurden mit dem Inhibitor von IKK β (BMS-345541; 5 μ M) eine Stunde vor Stimulation behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 21 Stunden mit mTNF α stimuliert. Die Zellen wurden mit SYTOX® Green (0,5 μ M) versetzt und anhand der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde der prozentuale Anteil an toten Zellen berechnet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von Duplikaten eines durchgeführten repräsentativen Experiments (* p < 0,05; ** p < 0,01, ungepaarter t-Test).

Des Weiteren wurde ein in vitro Kinase-Assay (4.2.3.8) durchgeführt, um die RIP1-Kinaseaktivität darzustellen. Hierbei wurden mit RIP1-WT, RIP1-SSAA und RIP1-SSDD rekomplementierte Zellen verglichen. Alle Zellen wurden mit dem IKKβ-Inhibitor inkubiert und mit TNFa stimuliert. Zusätzlich wurde auch der Einfluss von Nec-1s untersucht. Mittels spezifischer Antikörper wurde RIP1 immunpräzipitiert und anschließend ein in vitro Kinase-Assay mit den Proben durchgeführt. Hierbei überträgt die Kinase im aktiven Zustand eine radioaktiv markierte Phosphatgruppe von ³²-P-γ-ATP auf ein zugegebenes Substrat oder im Falle einer Autophosphorylierung auf sich selbst. Mittels eines Autoradiogramms können die so radioaktiv-markierten Proteine sichtbar gemacht werden. Auf dem Autoradiogramm in Abbildung 33 ist zu sehen, dass Zellen, welche mit dem RIP1-SSAA Konstrukt rekomplementiert worden waren, eine deutlich stärkere Autophosphorylierung zeigten, welche auf eine erhöhte RIP1-Kinaseaktivität zurückzuführen ist, im Vergleich zu Zellen mit dem RIP1-WT Konstrukt. Dies war auch ohne TNFα-Stimulation der Fall, was auf eine Grundaktivierung der transduzierten Zellen zurückzuführen sein kann. Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit Nec-1s reduzierte die RIP1-Autophosphorylierung bei RIP1-SSAA rekomplementierten Zellen. Dies zeigt, dass es sich eindeutig um eine RIP1Autophosphorylierung handelt, welche aus der RIP1-Kinaseaktivität hervorging, und nicht durch ko-präzipitierte Kinasen hervorgerufen wurde. Zellen, welche mit dem RIP1-SSDD Konstrukt rekomplementiert worden waren, wiesen unter den verschiedenen Bedingungen nahezu keine RIP1-Kinasektivität auf. Phosphorylierung an S321 und S336 scheint demnach die RIP1-Kinaseaktivität zu unterdrücken, wodurch der MK2-vermittelte protektive Effekt erklärt werden kann. Die Blockade beider Phosphorylierungen führt zu einer deutlich erhöhten RIP1-Kinaseaktivität, welche wiederum zu einer erhöhten RIP1-Autophosphorylierung führt und RIP1-abhängigen Zelltod auslöst.



Abbildung 33: RIP1-SSAA führt zu einer verstärkten RIP1-Kinaseaktivität (modifiziert nach Menon, Gropengießer et al., 2017)

Mit RIP1-WT, RIP1-SSAA bzw. RIP1-SSDD rekomplementierte RIP1^{-/-} Fibroblasten (MEF- Δrip) wurden, wie angegeben, mit dem IKK β -Inhibitor (BMS-342241; 5 μ M) bzw. RIP1-Inhibitor (Nec-1s; 50 μ M) eine Stunde vor Stimulation inkubiert. Darauf folgte eine 2,5 stündige Stimulation mit mTNF α (50 ng/ml). Von diesen Zellen wurden anschließend Zelllysate hergestellt und einer RIP1-Immunpräzipitation (IP) unterzogen. Mit den gewonnenen Präzipitaten wurde eine *in vitro*-Kinasereaktion in Gegenwart von ³²P- γ -ATP durchgeführt. Die Kinaseansätze wurden elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch analysiert. Eine gleichmäßige RIP1-Präzipitation wurde mittels RIP1-Antikörpern kontrolliert.

5.4.3 Die MK2-abhängige RIP1-Phosphorylierung nimmt Einfluss auf die Autophosphorylierung und Ubiquitinierung von RIP1

Die RIP1-Kinaseaktivität spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion des RIP1-abhängigen Zelltodes. In Zelltod-Experimenten wurde zunächst die Kinase-Abhängigkeit bei RIP1abhängigem Zelltod festgestellt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die RIP1-Kinaseaktivität zu einer Autophosphorylierung von RIP1 führt. Mit Hilfe von in vitro Kinase-Assays konnten Degterev et al. (2008) verschiedene Autophosphorylierungsstellen innerhalb von RIP1 identifizieren. Alle Autophosphorylierungsstellen liegen in der N-terminalen Kinase-Domäne RIP1. weshalb angenommen dass die Kinaseaktivität über die von wird. Autophosphorylierung reguliert wird. Eine Hypothese ist, dass RIP1 in einer geschlossenen, inaktiven Form vorliegt und durch eine Autophosphorylierung in eine offene, kinaseaktive Form übergeht, welche nun mit bestimmten Proteinen interagieren kann, um sein zytotoxisches Potential auszuüben (Degterev et al., 2008). Daher wird ein Zusammenhang zwischen der RIP1-Kinaseaktivität, der RIP1-Autophosphorylierung und der zytotoxischen Aktivität von RIP1 angenommen. Aus diesem Grund wurde als nächstes der Autophosphorylierungsstatus von RIP1 bei den unterschiedlich rekomplementierten Fibroblasten untersucht. Dabei wurden die Auswirkungen der MK2-vermittelten RIP1-Phosphorylierung, bzw. deren Blockade, auf die RIP1-Autophosphorylierung bei gleichzeitiger Inhibition von IKKß analysiert. Die RIP1-Autophosphorylierung wurde nun mittels eines speziellen Antikörpers, welcher S166 phosphoryliertes RIP1 erkennt, untersucht. Für S166 ist bekannt, dass es sich um eine der Autophosphorylierungsstellen von RIP1 handelt. Mehrere Studien konnten eine Verbindung zwischen einer gesteigerten RIP1-S166-Autophosphorylierung und der Aktivierung des zytotoxischen Potentials von RIP1 zeigen (de Almagro et al., 2016; Dondelinger et al., 2017; Geng et al., 2017; Jaco et al., 2017). Die S166-Autophosphorylierung wird aus diesem Grund auch als Marker für die Aktivität von RIP1 betrachtet. Hierbei zeigte sich eine deutlich stärkere Autophosphorylierung von RIP1-S166 bei den RIP1-SSAA rekomplementierten Zellen, im Vergleich zu RIP1-WT rekomplementierten Zellen (Abbildung 34). Den Nachweis, dass es sich um eine Autophosphorylierung handelt, lieferte die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Nec-1s, welche zu einer Abnahme der RIP1-S166 Phosphorylierung führte. Diese Ergebnisse stimmen mit den zuvor im in vitro Kinase-Assay (Abbildung 33) gemachten Beobachtungen überein, bei dem für RIP1-SSAA rekomplementierte Zellen auch eine erhöhte RIP1-Kinaseaktivität und Autophosphorylierung, verglichen mit RIP1-WT rekomplementierten Zellen, gezeigt wurde. Jedoch war eine geringe RIP1-Autophosphorylierung auch bei RIP1-WT rekomplementierten Zellen zu beobachten und auch RIP1-SSAA rekomplementierte Zellen zeigten bereits ohne jegliche Stimulation eine Autophosphorylierung. Dies könnte erneut auf eine Grundaktivierung der transduzierten Zellen und einer Genexpression auf verändertem Niveau zurückzuführen sein. Interessanterweise zeigten mit dem RIP1-SSDD Konstrukt rekomplementierte Zellen, welche bisher einen Schutz vor RIP1-abhängigem Zelltod aufwiesen, auch eine konstitutive S166-RIP1-Phosphorylierung. Da Nec-1s zu einer Verringerung der S166-RIP1-Phosphorylierung führte, ist diese auf die RIP1-Kinaseaktivität zurückzuführen und kann nicht durch andere externe Kinasen vermittelt sein. Dies steht im Gegensatz zu dem zuvor durchgeführten in vitro Kinase-Assay, bei dem Zellen mit der RIP1-SSDD Mutante kaum eine Kinaseaktivität zeigten. Überaschenderweise scheinen die rekomplementierten Zellen hier ein Ergebnis zu erzielen, welches nicht zu den zuvor gemachten Beobachtungen passt. Die S166-Autophosphorylierung scheint also nicht in allen Fällen mit verstärkter Zytotoxizität zu korrelieren. Dies bedarf noch genauerer Überprüfung.



Abbildung 34: Eine erhöhte RIP1-Kinaseaktivität bei RIP1-SSAA führt zu einer verstärkten RIP1-S166-Autophosphorylierung (modifiziert nach Menon, Gropengießer *et al.*, 2017)

Fibroblasten (MEF- Δrip), mit dem RIP1-WT, RIP1-SSAA bzw. RIP1-SSDD Konstrukt rekomplementiert, wurden, wie angegeben, mit dem IKK β -Inhibitor (BMS-345541; 5 μ M) und RIP1-Inhibitor (Nec-1s; 50 μ M) eine Stunde vor Stimulation inkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit mTNF α für weitere 2,5 Stunden. Von den behandelten Zellen wurden Zelllysate hergestellt, elektrophoretisch aufgetrennt und mit speziellen Antikörpern gegen pS166-RIP1 analysiert. Eine gleichmäßige RIP1-Expression wurde mit RIP1-Antikörpern untersucht und eine gleichmäßige Beladung des Gels wurde mittels eines Aktin-Immunoblots kontrolliert.

Um die mögliche Grundaktivierung der transduzierten Zellen vernachlässigen zu können, wurde die RIP1-Autophosphorylierung auch bei Wildtyp-Fibroblasten (MEF-WT) und IKKβ-Knockout Fibroblasten (MEF-IKK^{-/-}) untersucht. Die Zellen wurden mit Inhibitoren von MK2 und IKKß behandelt und mit TNFa stimuliert. Es sollte untersucht werden, ob die Blockierung beider Signalwege einen additiven Effekt auf die RIP1-Kinaseaktivität und somit auf die RIP1-Autophosphorylierung hat. Zelllysate wurden auch in diesem Fall mit spezifischen Antikörpern gegen S166 phosphoryliertes RIP1 analysiert. Für Wildtyp-Zellen zeigte sich zunächst, dass bei unstimulierten oder nur TNFa-stimulierten Zellen keine Hintergrundphosphorylierung von S166-RIP1 zu beobachten war. Die in Abbildung 34 zu sehende RIP1-Autophosphorylierung bei nicht stimulierten oder nur TNF α -stimulierten Zellen scheint demnach tatsächlich eine Besonderheit der transduzierten Zellen zu sein und könnte auf deren vorherige Behandlung zurückzuführen sein. Eine Inhibition von MK2 oder IKKβ bei MEF-WT Zellen führte zu einer sichtbaren RIP1-S166-Autophosphorylierung, welche bei gleichzeitiger Inhibition beider Kinasen deutlich verstärkt wurde (Abbildung 35). Durch eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit Nec-1s konnte diese S166-RIP1-Phosphorylierung inhibiert werden, was bestätigt, dass diese RIP1-Phosphorylierung auf die eigene RIP1-Kinaseaktivität zurückzuführen ist. Bei MEF-IKKβ^{-/-} Zellen konnte wie erwartet bereits durch TNFα-Stimulation eine RIP1-Autophosphorylierung ausgelöst werden. Diese ließ sich durch die zusätzliche Blockierung von MK2 verstärken. Folglich konnte ein additiver Effekt der Inhibition des IKK- und des p38/MK2-Signalweges auf die RIP1-Autophosphorylierung und somit auch dessen Kinaseaktivität bestätigt werden. Für eine effiziente RIP1-Autophosphorylierung müssen demnach sowohl der IKK- als auch der p38/MK2-Signalweg inhibiert sein. Dies korreliert mit der vollständigen Aktivierung des zytotoxischen Potentials von RIP1, was einen Zusammenhang der RIP1-Autophosphorylierung mit der Zytotoxizität von RIP1 nahelegt.



Abbildung 35: Inhibition von MK2 und IKK β führt zu einer verstärkten RIP1-Autophosphorylierung MEF WT sowie MEF IKK $\beta^{-/}$ Zellen wurden, wie angegeben, mit Inhibitoren von MK2 (PF-3644022; 15 μ M), IKK β (BMS-345541; 5 μ M) bzw. RIP1 (Nec-1s; 50 μ M) eine Stunde vor Stimulation behandelt. Nach 16 stündiger Stimulation wurden Zelllysate hergestellt. Diese wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem speziellen Antikörper gegen pS166-RIP1 entwickelt.

Eine weitere bekannte posttranslationale Modifikation, welche einen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität und Funktion von Proteinen hat, ist die Ubiquitinierung. Bei Ubiquitin handelt es sich um ein Protein, welches in Ketten reversibel an andere Proteine gebunden werden kann. Die Ubiquitinierung eines Proteins hat Einfluss auf dessen Aktivität, Stabilität und Interaktionen und reguliert so die Funktionen von Proteinen (Ikeda et al., 2010; Swatek und Komander, 2016). Für RIP1 ist bekannt, dass es an verschiedenen Stellen ubiquitiniert werden kann und so die Feinregulation der RIP1-Aktivität gesteuert wird (Weinlich und Green, 2014). Es wurde beispielsweise ein Zusammenhang zwischen der RIP1-Ubiquitinierung an K115, einer darauf folgenden RIP1-Autophosphorylierung und der Aktivierung des Nekrosoms, und somit der Auslösung der Nekroptose beobachtet (de Almagro et al., 2017) Auf Grund dieses Zusammenhangs wurde auch die RIP1-Ubiquitinierung genauer analysiert. Für diesen Versuch wurden Zellen, welche mit RIP1-WT RIP1-SSAA rekomplementiert worden waren, verglichen. Sie wurden und mit HA-fusioniertem Ubiquitin transfiziert, am folgenden Tag mit dem IKKβ-Inhibitor inkubiert und mit TNF α stimuliert. Aus den gewonnenen Zelllysaten wurde mittels eines spezifischen Antikörpers RIP1 immunpräzipiert und die Präzipitate wurden mit HA-Antikörper auf ihren RIP1-Ubiquitinstatus untersucht. Als Negativkontrolle dienten Proben, welche ohne RIP1Antikörper behandelt worden waren. Im so gewonnenen Western-Blot waren deutlich mehr und stärkere RIP1-Ubiquitin Banden bei RIP1-SSAA rekomplementierten Zellen zu sehen, verglichen mit RIP1-WT rekomplementierten Zellen (Abbildung 36). Jedoch war auch in diesem Fall eine konstitutive RIP1-Ubiquitinierung ohne Stimulation bei den Zellen zu sehen, was erneut auf die Grundaktivierung der transduzierten Zellen zurückzuführen sein kann. Somit war keine weitere Zunahme der RIP1-Ubiquitinierung nach Inhibition der IKKβvermittelten RIP1-Phosphorylierung zu sehen. RIP1, welches an den Aminosäuren 321 und 336 unphosphoryliert vorliegt, führt folglich nicht nur zu einer stärkeren Kinaseaktivität und dadurch auch zu einer verstärkten RIP1-Autophosphorylierung, sondern auch zu einer verstärkten RIP1-Ubiquitinierung. Auch auf der Ubiquitinierung könnte die verstärkte zytotoxische Aktivität von RIP1-SSAA rekomplementierten Zellen beruhen. Die MK2abhängige RIP1-Phosphorylierung an S321 und S336 hat demnach möglicherweise auf verschiedene Art und Weise einen protektiven Effekt auf die Zelle und inhibiert das zytotoxische Potential von RIP1, um sowohl Apoptose als auch Nekroptose zu verhindern.



Abbildung 36: RIP1-SSAA weist vermehrte RIP1-Ubiquitinierung auf (modifiziert nach Menon, Gropengießer *et al.*, 2017)

Fibroblasten (MEF- Δrip), mit RIP1-WT bzw. RIP1-SSAA rekomplementiert, wurden mit einem 3 × HA-Ubiquitin Expressionsplasmid transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen, wie angegeben, mit dem Inhibitor von IKK β (BMS-345541; 5 μ M) inkubiert und eine Stunde später mit mTNF α (50 ng/ml) für 2,5 Stunden stimuliert. Es wurden Zelllysate angefertigt und diese einer Immunpräzipitation mit α RIP1 oder nur Protein *A/G* Plus-Agarose-Beads (Ø α RIP1) unterzogen. Die gewonnenen Präzipitate wurden mittels HA-Antikörper analysiert. Eine gleichmäßige RIP1-Präzipitation bzw. RIP1-Expression wurde mittels α RIP1 in den Präzipitaten bzw. Rohlysaten kontrolliert.

6 Diskussion

6.1 Die Rolle von RIP1 beim Yersinien-vermittelten Zelltod

Die angeborene Immunität stellt die erste Abwehrreihe bei der Bekämpfung von eindringenden Mikroorganismen dar. Dabei werden verschiedene Rezeptorsysteme eingesetzt, um gefährliche Mikroorganismen zu erkennen. Dazu zählen unter anderem die *Toll-like* Rezeptoren (TLR). Sie erkennen potentielle Krankheitserreger anhand konservierter Strukturen, den sogenannten Pathogen-assoziierten-molekularen-Mustern (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) und aktivieren daraufhin den NFkB-, sowie die MAPK-Signalwege. Durch die Induktion dieser Signalwege werden schützende Faktoren, wie beispielsweise proinflammatorische Zytokine, gebildet, um eine protektive Immunantwort des Wirtes einzuleiten (Akira *et al.*, 2006; Chandler und Ernst, 2017).

Viele pathogene Bakterien-Arten sind jedoch durch spezifisch wirkende Virulenzfaktoren, welche sie in die Wirtszelle translozieren, dazu fähig, genau diese Signalwege in ihrem Sinne zu verändern, um so der Immunantwort des Wirtes zu entgehen. Die drei humanpathogenen Yersinia-Spezies verfügen dafür über ein Typ-III-Sekretionssystem, mit dessen Hilfe sie spezielle Effektorproteine (Yersinia outer proteins, Yops) in die Wirtszelle einschleusen. Mittels dieser Effektorproteine modulieren Yersinien konservierte Signalkaskaden der wirtseigenen Immunantwort. Sie sind damit in der Lage, die Immunabwehr des Wirtes zu umgehen, im Wirt zu überleben, sich zu vermehren und eine Infektion auszulösen. Die Translokation der Effektor-Yops in die Zielzelle bewirkt unter anderem die Inhibition der Phagozytose, sowie eine Reduktion der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. So verhindern Yersinien ihre Eliminierung durch Phagozyten und unterdrücken die Entstehung einer antibakteriellen Entzündungsreaktion (Atkinson und Williams, 2016). Vermittelt von dem Effektorprotein YopP/J sind Yersinien zudem dazu fähig, bei Makrophagen und dendritischen Zellen Zelltod auszulösen (Monach et al., 1997; Ruckdeschel et al., 1997). YopP fungiert dabei als Acetyltransferase und acetyliert Serin- oder Threonin-Reste im activation loop verschiedener Kinasen und blockiert so deren Aktivierung, welche durch eine Phosphorylierung vermittelt werden würde. Als Substrate der Acetyltransferase-Aktivität von YopP sind bereits mehrere Kinasen innerhalb des NFkB- sowie der MAPK-Signalwege bekannt, unter anderem IKK β , TAK1 und Kinasen der MAPKK-Familie (Mittal *et al.*, 2006; Mukherjee et al., 2006; Paquette et al., 2012). Diese YopP-vermittelte Inaktivierung des NFkB- sowie der MAPK-Signalwege führt zu einer Inhibition der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und von antiapoptotisch wirkenden Proteinen, wodurch bei gleichzeitiger Stimulation des TLR4-Rezeptors über LPS von gramnegativen Bakterien Zelltod ausgelöst wird.

Eine Schlüsselrolle bei der Regulation dieser Signalwege kommt dabei der Serin/Threonin-Kinase RIP1 (*receptor interacting protein kinase 1*) zu. RIP1 trägt über die Aktivierung von antiapoptotischen Signalwegen zum Zellüberleben bei, ist paradoxerweise aber auch aktiv an der Induktion von Zelltod, sowohl über den apoptotischen, als auch den nekroptotischen Signalweg, beteiligt (Meylan und Tschopp, 2005). Eine reine Stimulation von TLR4 führt bei den meisten Zellarten nicht direkt zum Zelltod. Dies bedeutet, dass es molekulare Mechanismen geben muss, die die RIP1-abhängigen zytotoxischen Signalwege aktiv inhibieren. Details, wie die zytotoxische RIP1-Aktivität inhibiert wird und dadurch reguliert wird, welches der gegensätzlichen Zellschicksale eintritt, sind noch wenig bekannt und sollten in dieser Arbeit genauer untersucht werden.

Eine Yersinia enterocolitica-Infektion führt bei Makrophagen zu Apoptose. Unsere Ergebnisse zeigten mit Hilfe von RIP1^{-/-} Makrophagen und RIP1-Kinaseinhibitoren, dass die Yersinien-induzierte Apoptose RIP1 und dessen Kinaseaktivität benötigt. Andere Studien konnten diese Beobachtung der RIP1-Kinase-abhängigen Apoptose auch nach Yersinia pestis bzw. Yersinia pseudotuberculosis-Infektion teilen (Peterson et al., 2017; Philip et al., 2014; Weng et al., 2014). Es kam jedoch auch bei RIP1^{-/-} Makrophagen in einem geringen Maße zu Caspase-unabhängigem Zelltod. Dieser konnte mittels eines RIP3-Inhibitors nahezu komplett blockiert werden, woraus geschlossen werden kann, dass es sich hier nicht um Apoptose, sondern um RIP3-abhängige Nekroptose handelt. Nekroptose wird normalerweise über die Bildung des Nekrosoms induziert, dessen Bildung von der RIP1-Kinaseaktivität abhängig ist. Bei einer Stimulation von TLR3 bzw. TLR4 kann TRIF über seine RHIM-Domäne hingegen auch direkt mit RIP3 interagieren, es aktivieren und so Nekroptose bei Abwesenheit von RIP1 auslösen. Ist RIP1 anwesend, ist dessen Kinaseaktivität essentiell eingebunden und kann nicht über eine direkte Interaktion von TRIF und RIP3 übergangen werden (Pasparakis und Vandenabeele, 2015). Bei RIP1^{+/+} Makrophagen kommt es nach Yersinien-Infektion auch zur Bildung des Nekrosoms und somit zur Nekroptose, wenn der apoptotische Weg durch Inhibition der Caspasen blockiert ist.

Bei TNF-Rezeptor-1-Stimulation konnte gezeigt werden, dass RIP1 die Bildung verschiedener Signalkomplexe reguliert und so das Zellschicksal bestimmt. In Komplex I ist RIP1 als Adaptermolekül eingebunden, um über TAK1 sowohl den NF κ B-, als auch die MAPK-Signalwege zu aktivieren und so zum Zellüberleben beizutragen. Ist dieser Weg durch einen Mangel an antiapoptotischen Proteinen blockiert, folgt die Bildung von Komplex IIa,

welcher zu Apoptose über die Aktivierung von Caspasen führt. Komplex I fungiert also als früher Kontrollpunkt bei der Stabilisierung der Zellüberlebens-Signalwege. Seine Bildung ist zunächst Transkriptions-unabhängig und erfordert die Ubiquitinierung von RIP1. Durch Komplex I wird die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und antiapoptotischen Proteinen aktiviert und so der Übergang von Komplex I zu Komplex IIa gehemmt. Weitere Faktoren, welche RIP1 regulieren, sind noch nicht im Detail bekannt. Bisherige Studien konnten zeigen, dass durch eine Inhibition von cIAP1/2, TAK1 oder NEMO die Zellen nach einer TNFα-Stimulation in einen RIP1-abhängigen Zelltod übergehen, welcher unabhängig von der Inhibition des NFkB-Signalweges stattfindet und durch Komplex IIb vermittelt wird (Dondelinger et al., 2013; Legarda-Addison et al., 2009; O'Donnell et al., 2012). Es wird spekuliert, dass der normalerweise schützende Effekt dieser Proteine downstream auf den IKK-Komplex zurückzuführen ist. Denn für den IKK-Komplex konnte vor kurzem gezeigt werden, dass er RIP1 in Komplex I nach TNFa-Stimulation direkt phosphoryliert. Diese RIP1-Phosphorylierung schützt die Zellen vor einem RIP1-Kinase-abhängigen Zelltod, indem der Übergang von Komplex I hin zum proapoptotischen Komplex IIb unterdrückt wird. Lange war für den IKK-Komplex nur über die Aktivierung des NFkB-Signalweges ein schützender Effekt bekannt. Nun konnte auch eine protektive Wirkung über eine IKK-Komplexvermittelte Phosphorylierung gezeigt werden, welche unabhängig von der Aktivierung des NFkB-Signalweges verläuft. Dies war eine wichtige neue Erkenntnis, denn bisher war nur die RIP1-Ubiquitinierung als Schutz vor RIP1-abhängigem Zelltod beschrieben worden. Jetzt wurde dies auch für eine RIP1-Phosphorylierung gezeigt. Es ist noch nicht bekannt, über welche molekularen Mechanismen der schützende Effekt der RIP1-Phosphorylierung ausgeführt wird (Dondelinger et al., 2015).

Da es sich bei IKK β und TAK1 um Substrate der Acetyltransferase-Aktivität von YopP handelt, konnte angenommen werden, dass die Hemmung der beiden Kinasen ein Ansatzpunkt von YopP ist, um das zytotoxische Potential von RIP1 zu aktivieren und so Zelltod bei Makrophagen auszulösen. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine spezifische Inhibition von TAK1 oder IKK β , bei LPS-Stimulation oder bei Infektion mit YopP-negativen Yersinien, zu RIP1-abhängiger Apoptose führt. Somit wird deutlich, dass auch bei TLR-Stimulation aktives TAK1 und der aktive IKK-Komplex einen schützenden Effekt auf die Zelle ausüben und die zytotoxische Aktivität von RIP1 inhibieren. Fällt durch die Inhibition der Kinasen dieser protektive Effekt weg, kommt es zu RIP1abhängiger Apoptose. Hier befindet sich daher ein weiterer Kontrollpunkt des zytotoxischen RIP1-Potentials. In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe war ein Einfluss von YopP auf das Phosphorylierungsverhalten von RIP1 entdeckt worden. Es zeigte sich, dass im Verlauf einer Stimulation von Makrophagen mit LPS, bzw. einer Infektion mit YopP-negativen Yersinien, RIP1 phosphoryliert wird. Im Western-Blot konnten zusätzliche RIP1-Banden mit einer verlangsamten elektrophoretischen Mobilität dargestellt werden. welche durch Dephosphorylierungs-Experimente als Phosphorylierung charakterisiert wurden. Bei einer Infektion mit Wildtyp-Yersinien wurden all diese Phosphorylierungsereignisse durch YopP inhibiert. RIP1 kann, wie schon beschrieben, sowohl durch externe Kinasen phosphoryliert werden (wie beispielsweise IKK β), als auch durch Autophosphorylierung vermittelt von seiner eigenen Kinaseaktivität. Mit Hilfe des selektiven RIP1-Kinaseinhibitors Necrostatin-1 (Nec-1s) konnte eine Autophosphorylierung als Ursache für die beobachtete Phosphorylierung ausgeschlossen werden. Es lag demnach nahe, dass YopP, möglicherweise indirekt durch die Inhibition einer anderen Kinase, die Phosphorylierung von RIP1 unterdrückt. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren von Kinasen, von denen bekannt ist, dass sie durch YopP gehemmt werden, konnte gezeigt werden, dass die beobachtete RIP1-Phosphorylierung von MK2 vermittelt wird. Eine, wie schon nach TNFa-Stimulation beobachtete, zusätzliche IKKβ-abhängige **RIP1-Phosphorylierung** auch nach TLR-Stimulation kann dadurch nicht ausgeschlossen werden. Es handelt sich bei der von uns untersuchten Phosphorylierung jedoch um eine durch MK2 induzierte Phosphorylierung. Diese zuvor gemachten Beobachtungen wurden in dieser Arbeit mit erstmalig eingesetzten immortalisierten, fetalen Maus-Makrophagen verifiziert. So konnte ein Einfluss des p38/MK2-MAPK-Signalweges auf RIP1 spezifiziert werden.

6.2 Der Einfluss von p38/MK2 auf RIP1-abhängigen Zelltod

MK2 befindet sich *downstream* von p38 innerhalb der MAPK-Signalwege und wird exklusiv von p38α aktiviert. Bei der Induktion der Produktion von inflammatorischen Zytokinen spielt MK2 eine entscheidende Rolle. So weisen MK2-defiziente Mäuse einen Defekt bei der LPSinduzierten Zytokin Produktion von beispielsweise TNFα, IL-1β, IL-6 sowie IL-10 auf. Dies kommt durch die MK2-vermittelte Stabilisierung von Zytokin mRNAs zustande. Aktives MK2 phosphoryliert unter anderem Tristetraprolin, wodurch dieses nicht mehr an mRNAs binden und deren Abbau induzieren kann. Inaktives MK2 führt demnach zu einer Destabilisierung und somit zu einer verringerten Translation von Zytokin mRNAs. Ein Einfluss von MK2 auf RIP1 war hingegen noch nicht bekannt und auch die physiologischen Auswirkungen der MK2-vermittelten RIP1-Phosphorylierung wurden noch nicht untersucht. Durch die zuvor gemachten Beobachtungen der IKK-Komplex-abhängigen RIP1-

Phosphorylierung lag die Vermutung nahe, dass auch die MK2-induzierte RIP1-Phosphorylierung Einfluss auf das zytotoxische Potential von RIP1 haben könnte. Es wäre ein weiterer molekularer Schaltmechanismus, wie die zytotoxische Aktivität von RIP1 reguliert wird und wie RIP1 zwischen Zellüberleben und Zelltod entscheiden kann. Auch für das genauere Verständnis des YopP-vermittelten Zelltodes bei einer Yersinien-Infektion kann diese Entdeckung wichtige neue Erkenntnisse liefern. So wäre es möglich, dass die YopPvermittelte p38-Inhibition nicht nur zur Hemmung der Zytokin-Expression führt, sondern über MK2 auch Einfluss auf die RIP1-Kinaseaktivität nimmt, um Zelltod auszulösen. Mittels verschiedener Zelltod-Experimente sollte diese Vermutung überprüft werden.

Es stellte sich heraus, dass eine alleinige Inhibition des p38/MK2-Signalweges nur in einem geringen Maß zu Zelltod bei LPS stimulierten oder infizierten Makrophagen führte. Dieser mäßig ausgelöste Zelltod konnte mit dem RIP1-Kinaseinhibitors Nec-1s nochmals leicht reduziert werden. Keiner dieser Effekte war jedoch signifikant. Da Yersinien durch YopP nicht nur den p38/MK2-Signalweg inhibieren, sondern gleichzeitig auch IKKß hemmen, wurde der Einfluss von MK2 auf den RIP1-abhängigen Zelltod auch bei gleichzeitiger Inhibition von IKKß untersucht. Dies ähnelt mehr den physiologischen Verhältnissen einer Yersinien-Infektion. In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass eine alleinige Inhibition von IKK^β bei anschließender LPS-Stimulation bzw. Yersinien-Infektion von Makrophagen zu RIP1-abhängiger Apoptose führt. Bei zusätzlicher pharmakologischer Inhibition des p38/MK2-Signalweges oder bei MK2-defizienten Zellen war es möglich diesen Zelltod nochmals signifikant zu verstärken. Mittels des RIP1-Kinaseinhibitors konnte die RIP1-Abhängigkeit des Zelltodes dargelegt werden. Die MK2-Aktivität scheint demnach, ebenso wie die IKKβ-Aktivität, einen protektiven Effekt auf Zellen auszuüben. Es ist zu vermuten, dass dieser schützende Effekt durch die MK2-induzierte RIP1-Phosphorylierung vermittelt wird. Dies wäre vergleichbar mit der IKKβ-abhängigen RIP1-Phosphorylierung, welche auch das zytotoxische Potential von RIP1 inhibiert. Die MK2-vermittelte Phosphorylierung zeigt, ebenso wie die IKKβ-vermittelte Phosphorylierung, keinen Einfluss auf die NFκB-Aktivierung, sowie auf die Bildung von Komplex I (Menon, Gropengießer et al., 2017).

Insgesamt scheint es, als würden die beiden protektiv wirkenden MK2- und IKK-abhängigen RIP1-Phosphorylierungen auf verschiedenen Ebenen die zytotoxische RIP1-Aktivität inhibieren und somit additiv wirken. Bei einer Yersinien-Infektion hemmt YopP beide Signalwege und löst so effizient Apoptose von Makrophagen aus.

Maus-Experimente zeigten, dass eine MK2-Inhibition *in vivo* auch ohne zusätzliche IKK β -Inhibition Zelltod auslöst. Inaktiviertes MK2 reduziert signifikant die Lebensfähigkeit von Mäusen im TNF-induzierten Schock-Modell durch RIP1-abhängigen Zelltod. Die MK2-vermittelte Regulation von RIP1 spielt *in vivo* somit eine wichtige Rolle (Berger *et al.*, 2014; Newton *et al.*, 2016).

Um einen genaueren Einblick zu bekommen, wie MK2 seine schützende Wirkung auf stimulierte Zellen ausübt, wurden Ko-Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob die Aktivität von MK2 Einfluss auf das Bindungsverhalten von RIP1 mit bekannten Interaktionspartnern nimmt. In Komplex I interagiert RIP1 unter anderem mit TRADD, TRAF2 und cIAP1/2. Dies führt zur Aktivierung des NFkB- und der MAPK-Signalwege und zum Zellüberleben nach TNFR1-Aktivierung. Geht RIP1 in den zytosolischen Komplex IIb über und interagiert mit FADD und Caspase-8, löst dieser Apoptose aus. Vorstellbar ist eine Regulation der Bildung dieser Komplexe über die MK2induzierte RIP1-Phosphorylierung. Tatsächlich konnte eine verstärkte Interaktion von RIP1 mit FADD und Caspase-8 gezeigt werden, wenn die MK2-abhängige RIP1-Phosphorylierung blockiert So Wildtyp-Yersinien-Infektion eine war. induzierte eine deutliche RIP1/FADD/Casp-8 Interaktion und auch eine LPS-Stimulation unter p38α- und IKKβinhibitorischen Bedingungen führte zur verstärkten Bildung dieses Komplexes. Diese Komplexbildung war RIP1-Kinase-abhängig, wie es auch für die Bildung des Komplex IIb im TNFR1-Signalweg beschrieben ist. Genau unter diesen Bedingungen konnte auch ein hohes Maß an RIP1-Kinase-abhängigem Zelltod ausgelöst werden. Dies spricht dafür, dass über die Bildung dieses Komplexes Zelltod bei stimulierten Makrophagen ausgelöst wird und die MK2-vermittelte RIP1-Phosphorylierung die Bildung dieses Komplexes verhindert. Auch für die IKKβ-vermittelte RIP1-Phosphorylierung konnte gezeigt werden, dass sie mit der Fähigkeit von RIP1, in den proapoptotischen Komplex IIb überzugehen, interferiert und so einen schützenden Effekt auf die Zellen bewirkt (Dondelinger et al., 2015). Sowohl die IKKβabhängige, als auch die MK2-vermittelte RIP1-Phosphorylierung schützen also vor RIP1abhängigem Zelltod, indem sie die Bildung des Zelltod-induzierenden Komplex IIb inhibieren (Dondelinger et al., 2015; Dondelinger et al., 2017; Menon, Gropengießer et al., 2017).

Dondelinger *et al.* (2015) zeigten, dass die IKKβ-abhängige RIP1-Phosphorylierung innerhalb des TNFR1-assoziierten, membrangebundenen Komplex I stattfindet. Sie ist abhängig von der RIP1-Ubiquitinierung, welche von cIAP1/2 vermittelt wird. Umgekehrt ist die RIP1-Ubiquitinierung nicht von der RIP1-Phosphorylierung abhängig. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass die RIP1-Ubiquitinierung und die Phosphorylierung

aufeinanderfolgend stattfinden und die später auftretende Phosphorylierung das zytotoxische Potential von RIP1 reguliert. Die MK2-abhängige RIP1-Phosphorylierung findet hingegen im Zytosol statt (Menon, Gropengießer et al., 2017). MK2 interagiert mit RIP1, welches im Zytosol weder an Komplex I, noch an Komplex IIb gebunden vorliegt, und phosphoryliert es dort. MK2 interagiert nicht mit dem membrangebundenen Komplex I. MK2-phosphoryliertes RIP1 konnte nichtdestotrotz auch in Komplex I aufgefunden werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass RIP1-Mutanten, welche durch eine fehlende Todesdomäne strukturell nicht in Komplex I rekrutiert werden können, trotzdem von MK2 phosphoryliert werden und Komplex IIb ausbilden können (Dondelinger et al., 2017; Menon, Gropengießer et al., 2017). Die bisher vorherrschende Ansicht einer linearen Entwicklung, in der RIP1 von Komplex I in Komplex IIb übergeht, muss demnach korrigiert werden. Die neuen Beobachtungen zeigen deutlich, dass auch im Zytosol vorliegendes RIP1 zur Bildung des Komplexes IIb beiträgt und dass dies über die MK2-vermittelte Phosphorylierung von zytosolischem RIP1 reguliert wird. Es wird demnach ein Model angenommen, in dem RIP1 zuerst an Komplex I rekrutiert wird, um dann seinerseits den NFkB- und die MAPK-Signalwege und somit auch MK2 zu aktivieren. So aktiviertes MK2 kann wiederum zytosolisches RIP1 phosphorylieren, welches teilweise in Komplex I zurückrekrutiert wird (Dondelinger et al., 2017). Diese unterschiedlichen Ebenen der RIP1-Phosphorylierung können erklären, warum eine Inhibition von MK2 allein nicht ausreichend ist, um bei stimulierten bzw. infizierten Makrophagen effektiv RIP1-abhängigen Zelltod auszulösen. Die Inhibition von MK2 erleichtert indes die Induktion von Zelltod, wenn Bedingungen herrschen, die den RIP1-abhängigen Zelltod zusätzlich fördern, wie in unserem Fall die gleichzeitige Inhibition von IKKβ. Es scheint, als würde die MK2-Inhibition unter diesen Bedingungen additiv einen zweiten Gipfel der zytotoxischen RIP1-Aktivität im Zytosol auslösen. Die MK2-abhängige RIP1-Phosphorylierung stellt somit, nach der IKKβ-abhängigen Phosphorylierung, einen weiteren zentralen Kontrollpunkt bei der Regulation des zytotoxischen Potentials von RIP1 dar. Die molekularen Konsequenzen dieser RIP1-Phosphorylierung und wie genau diese den Übergang von RIP1 in Komplex IIb hemmen, sollte im Folgenden weiter untersucht werden.

Mutationsexperimente, sowie massenspektrometrische Untersuchungen, identifizierten die Aminosäuren S321 sowie S336 als MK2-abhängige Phosphorylierungsstellen in murinem RIP1 (entspricht S320 sowie S335 in humanem RIP1) (Menon, Gropengießer *et al.*, 2017). S321 konnte auch in anderen Studien als MK2-abhängige Phosphorylierungsstelle in RIP1 identifiziert werden (Dondelinger *et al.*, 2017; Jaco *et al.*, 2017). MK2 phosphoryliert RIP1 demnach nicht nur räumlich und zeitlich getrennt von IKKβ, sondern auch an anderen Aminosäuren. Für weitere Experimente wurden RIP1-Knockout Fibroblasten stabil mit unterschiedlich mutierten RIP1-Konstrukten rekomplementiert, welche die MK2-abhängige Phosphorylierung an diesen Stellen entweder blockierten (RIP1-SSAA) bzw. imitierten (RIP1-SSDD) oder zusätzlich zu der Blockierung auch eine Kinase-inaktivierende Mutation aufwiesen (RIP1-SSAAK45A). So konnte ohne den Einsatz von Inhibitoren und somit möglichen *off-target*-Effekten der Einfluss speziell dieser beiden RIP1-Phosphorylierungen untersucht werden.

Zelltod-Experimente bestätigten, dass die MK2-abhängige RIP1-Phosphorylierung an S321 und S336 für den protektiven Effekt nach Zell-Stimulation verantwortlich ist und dass eine Blockade dieser Phosphorylierung zum RIP1-abhängigen Zelltod führt. Die Abhängigkeit des Zelltodes von der RIP1-Kinaseaktivität konnte mit Zellen, welche mit der RIP1-SSAAK45A Mutante rekomplementiert worden waren, gezeigt werden. Mittels eines in vitro Kinase-Assays konnte zusätzlich eine verstärkte RIP1-Kinaseaktivität bei Zellen nachgewiesen werden, bei denen die RIP1-Phosphorylierung an S321 und S336 blockiert war, wohingegen kaum eine Kinaseaktivität bei imitierter RIP1-Phosphorylierung auftrat. Dies deutet darauf hin, dass die beiden RIP1-Phosphorylierungen die RIP1-Kinaseaktivität inhibieren, was zur Reduktion des ausgelösten Zelltodes führt. Wie diese Inhibition abläuft, ist bisher nicht in jeder Einzelheit verstanden. Zurzeit wird spekuliert, dass es durch protektive RIP1-Phosphorylierungen zu einer Konformationsänderung von RIP1 kommt. So würde die RIP1-Kinaseaktivität blockiert und eine Autophosphorylierung von RIP1 verhindert werden, welche für die Bildung und Stabilisierung von Komplex IIb nötig ist. Eine vorstellbare Erklärung ist, dass die RIP1-Phosphorylierungen eine weitere Autophosphorylierung strukturell blockieren, so dass es zu einer sterischen Hinderung kommt. Die beiden MK2-Phosphorylierungsstellen sind räumlich sehr nahe, was sie auch zu einer möglichen Bindungsstelle für 14-3-3 Proteine macht und dadurch eine Aktivierung von RIP1 räumlich behindert werden könnte. Dies wurde auch schon für andere MK2-Substrate mit zwei Phosphorylierungsstellen beobachtet (Bsp. Tristetraprolin) (Stoecklin et al., 2004). Interessanterweise grenzt zusätzlich auch die Caspase-8 Schnittstelle D325 in murinem RIP1 (D324 in humanem RIP1) an die beiden MK2-abhängigen Phosphorylierungsstellen. Es könnte zu einer verstärkten Exponiertheit der Schnittstelle und so zu einer stärkeren Prozessierung von RIP1 durch Caspase-8 kommen, was den RIP1-abhängigen Zelltod reduzieren würde. Die Phosphorylierungen könnten somit einen Einfluss auf die Affinität des proteolytischen Caspase-8/cFLIP-Komplexes für RIP1 haben. Degterev et al. (2008) konnten bereits mehrere RIP1-Autophosphorylierungsstellen identifizieren, welche alle innerhalb der N-terminalen Domäne liegen. Deshalb wird angenommen, dass über sie die RIP1-Kinaseaktivität reguliert wird. RIP1 weist strukturelle Ähnlichkeiten mit B-Raf auf. Dessen katalytische Aktivität wird durch eine Autophosphorylierung positiv reguliert. Durch die Phosphorylierung einer oder mehrerer Aminosäurereste in der Aktivierungsschleife wird eine offene Konformation des *activation loops* hergestellt und die Kinase ist katalytisch aktiv. Eine ähnliche Regulation wird aufgrund der Strukturhomologien auch für RIP1 angenommen (Degterev *et al.*, 2008). Es wird vermutet, dass RIP1 in einer inaktiven, geschlossenen Konformation vorliegt und durch eine Autophosphorylierung in eine kinaseaktive, offene Form übergeht, welche nun mit anderen Proteinen interagieren kann und sein zytotoxisches Potential entfaltet. Eine bereits bekannte RIP1-Autophosphorylierungsstelle ist S166. In mehreren Berichten konnte eine Verbindung zwischen einer gesteigerter RIP1-S166-Autophosphorylierung und der Aktivierung des zytotoxischen Potentials von RIP1 gezeigt werden, so dass die S166-Autophosphorylierung als Marker für die Aktivität von RIP1 angesehen wird (de Almagro *et al.*, 2016; Dondelinger *et al.*, 2017; Geng *et al.*, 2017; Jaco *et al.*, 2017).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Zellen mit einer Blockade der MK2-vermittelten RIP1-Phosphorylierung eine gesteigerte RIP1-Kinaseaktivität aufweisen und diese mit einer verstärkten RIP1-S166-Autophosphorylierung einhergeht. Dies würde zu der zuvor beschriebenen Hypothese passen. Jedoch zeigten Zellen, bei denen die RIP1-Phosphorylierung durch die SSDD-Mutation imitiert war und die aus diesem Grund eine verringerte RIP1-Kinaseaktivität und einen reduzierten Zelltod aufwiesen, auch eine verstärkte RIP1-Autophosphorylierung an S166. Die RIP1-S166-Autophosphorylierung korreliert also nicht in allen Fällen mit einer verstärkten RIP1-Zytotoxizität. Es könnte bei der Überexpression eines RIP1-Konstruktes mit Mutationen in dem scheinbar sehr sensitiven Bereich (S321/S336) zu einer konstitutiven S166-Autophosphorylierung kommen. Vor bei hyperphosphorylierten **RIP1-Mutante** kurzem wurde auch einer (S321E/S332E/S334E/S336E) eine verstärkte RIP1-S166-Autophosphorylierung beobachtet (Geng et al., 2017). Eine Imitation der RIP1-Phosphorylierung an diesen vier Serinen induzierte eine verstärkte RIP1-Kinaseaktivität und S166-Autophosphorylierung, welche zu Nekroptose führte. Es wurde vermutet, dass hyperaktives TAK1 zu der verstärkten RIP1-Phosphorylierung führt. Dies würde erklären, warum A20^{-/-} Zellen, welche eine gesteigerte TAK1-Aktivität aufzeigen, den nekroptotischen Zelltod sterben. Dies war insoweit erstaunlich, da angenommen werden kann, dass eine gesteigerte TAK1-Aktivität zu einer verstärkten NFkB-Aktivierung führt und somit zellprotektiv wirkt. Die Komplexität der RIP1-Phosphorylierungen und deren unterschiedliche Auswirkungen auf die Zelle werden hier

nochmal deutlich. Es bedarf vermutlich noch weiterer Untersuchungen zur der RIP1-Phosphorylierung, Autophosphorylierung und deren Auswirkungen auf die zytotoxische Aktivität.

Eine weitere posttranslationale Modifikation von RIP1, die Einfluss auf dessen Aktivität und Komplexbildung hat, ist die Ubiquitinierung. Die bekannteste RIP1-Ubiquitinierung ist die Polyubiquitinierung von K377, welche Voraussetzung für die Bindung an TAK1 ist und so zum Zellüberleben beiträgt. De Almagro et al., (2016) konnten eine zusätzliche RIP1-Ubiquitinierung an K115 identifizieren. Diese ist von der RIP1-Kinaseaktivität abhängig und auch selbst für die Aufrechterhaltung der Kinaseaktivität erforderlich. Eine Mutation der Aminosäure K115 führte zu einem Defekt bei der Bildung des Nekrosoms und dadurch zu einer Blockade der Nekroptose. Hier scheint demnach die RIP1-Ubiquitinierung zur Induktion von Nekroptose beizutragen, im Gegensatz zu der K377-Ubiquitinierung, welche einen protektiven Effekt auf die Zelle hat. Auch für die RIP1-Ubiquitinierung ist es demnach möglich gegensätzliche Effekte auf die Zelle zu bewirken und es ist von entscheidender Bedeutung, an welchen Aminosäuren RIP1-ubiquitiniert vorliegt. Unsere Untersuchungen deuten darauf hin, dass auch die Aktivierung des zytotoxischen Potentials von RIP1, vermittelt durch die Blockade der MK2-abhängigen Phosphorylierungsstellen, zu einem veränderten RIP1-Ubiquitinierungstatus führt. RIP1 weist unter diesen Bedingungen eine deutlich verstärkte Ubiquitinierung auf. Die MK2-abhängige RIP1-Phosphorylierung übt demnach über verschiedene Mechanismen einen protektiven Effekt aus, um das zytotoxische Potential von RIP1 sowohl im Bezug auf die Induktion von Apoptose, als auch von Nekroptose, zu inhibieren. Der p38/MK2-RIP1-Rückkopplungsmechanismus ist somit für die Regulation von Zelltod unter vielfältigen Bedingungen von Bedeutung.

Auch für therapeutische Ansätze kann dieses Wissen von Bedeutung sein. So war es bisher aufgrund von Nebenwirkungen nicht möglich, p38-Inhibitoren in klinischen Studien einzusetzen. Es wäre interessant zu wissen, ob manche Nebenwirkungen auf den p38/MK2-RIP1-Signalweg zurückzuführen sind. Mit diesem Wissen ließen sich vielleicht andere wirksame Inhibitoren entwickeln, die ohne die unerwünschten Nebenwirkungen im Kampf gegen entzündliche Erkrankungen einsetzbar wären. Ein weiteres Einsatzgebiet, in dem dieses neu gewonnene Wissen anwendbar ist, stellt die Krebs-Therapie dar. So wurde vor kurzem gezeigt, dass die gemeinsame Anwendung eines p38- bzw. MK2-Inhibitors und eines cIAP-Inhibitors unerwartet eine bessere Wirkung bei der Behandlung von akuter myeloische Leukämie (AML) hat, als cIAP-Inhibitoren alleine. Erklärt wurde dies durch eine gesteigerte TNFα-Produktion, was überrascht, da eine reduzierte TNFα-Produktion bei p38/MK2-

Inhibition angenommen wurde (Lalaoui *et al.*, 2016). Der hier neu entdeckte Einfluss von p38/MK2 auf RIP1 könnte Ursache für die verbesserte Wirksamkeit von p38/MK2-cIAP-Inhibitoren sein.

6.3 Yersinien-induzierte Apoptose: Virulenzmechanismus oder Immunantwort?

Die Ergebnisse zeigen, dass Yersinien, vermittelt von dem Effektorprotein YopP/J, bei Makrophagen RIP1-abhängige Apoptose auslösen. Dies wurde lange Zeit als ein Virulenzmechanismus der Bakterien angesehen, da es den Bakterien einen Überlebensvorteil verschaffen könnte. Im Gegensatz zu Nekroptose oder Pyroptose, welche als Auslöser für eine Entzündungsreaktion bekannt sind, wird Apoptose als "stille" Art des Zelltodes bezeichnet, welcher keine Immunreaktion hervorruft. Das Auslösen von Apoptose ist aus diesem Grund häufig Bestandteil der Infektionsstrategie von Krankheitserregern, um Wirtszellen zu eliminieren und die Fähigkeit des Wirtes, eine Immunreaktion hervorzubringen, zu verringern (Lindgren *et al.*, 1996). Immer mehr Studien zeigen jedoch, dass die bei einer Yersinien-Infektion hervorgerufene Apoptose eine Immunreaktion auslöst, die dem Wirt hilft eine Yersinien-Infektion zu bekämpfen.

So konnte nachgewiesen werden, dass der apoptotische Zelltod von Makrophagen bei Yersinien-Infektion mit der Prozessierung und somit der Aktivierung von Caspase-1 einhergeht, welche wiederum zur Reifung von IL-1 β , sowie IL-18 führt (Philip *et al.*, 2014; Weng et al., 2014). Diese Zytokine sind wichtiger Bestandteil der inflammatorischen Immunantwort des Wirtes gegen Mikroorganismen. Der ausgelöste Zelltod ist aber nicht von der Aktivierung von Caspase-1 abhängig, weshalb es sich nicht um Pyroptose im eigentlichen Sinn handelt. Sowohl für den Zelltod, als auch für die Caspase-1-Aktivierung sind Caspase-8, RIP1 und FADD vonnöten. Dies deckt eine unerwartete Verflechtung des Caspase-1- und des Caspase-8-abhängigen Zelltod-Signalweges auf. Caspase-8-, RIP1- oder FADD-defiziente Makrophagen, welche gleichzeitig auch RIP3-defizient sind, zeigen keinen Yersinieninduzierten Zelltod und parallel eine signifikante Reduktion der Caspase-1-Aktivierung. Gleichzeitig sind die Mäuse extrem anfällig für eine Yersinien-Infektion und es kommt zu einer unkontrollierten, systemischen Ausbreitung der Bakterien (Philip et al., 2014; Weng et al., 2014). Zusätzlich konnten Peterson et al. (2017) nachweisen, dass Mäuse mit einer Kinase-inaktiven RIP1 Mutante und einem daraus folgenden Defekt bei der Yersinieninduzierten Apoptose, auch ein Defizit bei der Kontrolle der Yersinien-Infektion aufweisen. Sie sterben schnell nach einer Infektion. Die Kinaseaktivität wird hier für eine korrekte proinflammatorische Zytokin-Produktion von Neutrophilen und Makrophagen verantwortlich gemacht (Peterson et al., 2017).

Andere Untersuchungen zeigten, dass eine erhöhte YopP/J vermittelte Zytotoxizität paradoxerweise zu einer reduzierten Virulenz *in vivo* führt (Brodsky und Medzhitov, 2008; Zauberman *et al.*, 2009). All dies deutet darauf hin, dass RIP1-abhängige Apoptose bei Yersinien-infizierten Makrophagen *in vivo* mit der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen assoziiert ist. Der Zelltod scheint demnach Teil der Immunantwort des Wirtes zu sein, um so die durch Yersinien hervorgerufene Blockade des Immunsystems zu umgehen. Er fördert die Wirtsabwehr und trägt zur immunologischen Kontrolle der Yersinien-Infektion bei.

Wie genau Caspase-8 und Apoptose die proinflammatorische Antwort verstärken, ist im Detail noch nicht verstanden. Neben der Aktivierung von Caspase-1 und der daraus resultierenden Freisetzung von IL-1 β und IL-18 scheint Caspase-8 auch eine Rolle bei der Induktion anderer inflammatorischer Zytokine nach TLR-Stimulation zu spielen. Dies ist offenbar unabhängig von der Fähigkeit, Apoptose auszulösen, denn die Autoprozessierung von Caspase-8 wurde in diesem Fall nicht benötigt. Die Aktivierung der Zytokin Expression benötigt jedoch die enzymatische Aktivität von Caspase-8 (Philip *et al.*, 2016). Dies könnte ebenfalls eine verstärkte Virulenz von Yersinien bei Caspase-8-defizienten Mäusen erklären. Es ist zudem bekannt, dass Apoptose unter bestimmten Bedingungen auch als immunogener Stimulus fungiert, um die adaptive Immunantwort zu induzieren. So kann die Phagozytose von infizierten, apoptotischen Makrophagen durch professionelle Phagozyten zu einer Stimulation der Immunantwort über die Differenzierung von T_H17-Zellen beitragen (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Comer *et al.* (2010), sowie DePaolo *et al.* (2012) konnten bereits zeigen, dass eine T_H17-vermittelte Immunantwort während einer Yersiniose induziert wird.

Es ist ferner auffällig, dass Yersinien nur bei Makrophagen und dendritischen Zellen Zelltod auslösen, nicht aber bei anderen Zellarten. Der NF κ B- sowie die MAPK-Signalwege hingegen sind bei allen Zellarten gleich beeinträchtigt. Dies könnte darauf hindeuten, dass Apoptose bei den Zelltypen unterschiedlich reguliert wird und auch zu unterschiedlichen Effekten führt. Das würde erklären, warum Apoptose, eigentlich als nicht-immunogener Zelltod beschrieben, speziell bei Makrophagen eine inflammatorische Immunantwort auslösen kann und zur Immunabwehr des Wirtes beiträgt.

Literaturverzeichnis

- Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E. 1999. Yersinia pestis, the cause of plague, is a recently emerged clone of Yersinia pseudotuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A 96(24):14043-14048.
- Aderem A, Underhill DM. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol 17:593-623.
- Aepfelbacher M, Heesemann J. 2001. Modulation of Rho GTPases and the actin cytoskeleton by Yersinia outer proteins (Yops). Int J Med Microbiol 291(4):269-276.
- Aizawa SI. 2001. Bacterial flagella and type III secretion systems. FEMS Microbiol Lett 202(2):157-164.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. Cell 124(4):783-801.
- Aleksic S, Bockemuhl J. 1984. Proposed revision of the Wauters et al. antigenic scheme for serotyping of Yersinia enterocolitica. J Clin Microbiol 20(1):99-102.
- Alonso A, Bottini N, Bruckner S, Rahmouni S, Williams S, Schoenberger SP, Mustelin T. 2004. Lck dephosphorylation at Tyr-394 and inhibition of T cell antigen receptor signaling by Yersinia phosphatase YopH. J Biol Chem 279(6):4922-4928.
- Alonso G, Ambrosino C, Jones M, Nebreda AR. 2000. Differential activation of p38 mitogenactivated protein kinase isoforms depending on signal strength. J Biol Chem 275(51):40641-40648.
- Andersson K, Magnusson KE, Majeed M, Stendahl O, Fallman M. 1999. Yersinia pseudotuberculosis-induced calcium signaling in neutrophils is blocked by the virulence effector YopH. Infect Immun 67(5):2567-2574.
- Arslan SC, Scheidereit C. 2011. The prevalence of TNFalpha-induced necrosis over apoptosis is determined by TAK1-RIP1 interplay. PLoS One 6(10):e26069.
- Asplund K, Johansson T, Siitonen A. 1998. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments in the discrimination of Yersinia enterocolitica O:3. Epidemiol Infect 121(3):579-586.
- Atkinson S, Williams P. 2016. Yersinia virulence factors a sophisticated arsenal for combating host defences. F1000Res 5.
- Autenrieth IB, Firsching R. 1996. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by Yersinia enterocolitica: an ultrastructural and histological study. J Med Microbiol 44(4):285-294.
- Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ. 1998. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. Curr Biol 8(19):1049-1057.
- Ben-Levy R, Leighton IA, Doza YN, Attwood P, Morrice N, Marshall CJ, Cohen P. 1995. Identification of novel phosphorylation sites required for activation of MAPKAP kinase-2. EMBO J 14(23):5920-5930.

- Benabdillah R, Mota LJ, Lutzelschwab S, Demoinet E, Cornelis GR. 2004. Identification of a nuclear targeting signal in YopM from Yersinia spp. Microb Pathog 36(5):247-261.
- Bengoechea JA, Najdenski H, Skurnik M. 2004. Lipopolysaccharide O antigen status of Yersinia enterocolitica O:8 is essential for virulence and absence of O antigen affects the expression of other Yersinia virulence factors. Mol Microbiol 52(2):451-469.
- Berger SB, Kasparcova V, Hoffman S, Swift B, Dare L, Schaeffer M, Capriotti C, Cook M, Finger J, Hughes-Earle A and others. 2014. Cutting Edge: RIP1 kinase activity is dispensable for normal development but is a key regulator of inflammation in SHARPIN-deficient mice. J Immunol 192(12):5476-5480.
- Bergsbaken T, Cookson BT. 2007. Macrophage activation redirects yersinia-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. PLoS Pathog 3(11):e161.
- Berneking L, Schnapp M, Rumm A, Trasak C, Ruckdeschel K, Alawi M, Grundhoff A, Kikhney AG, Koch-Nolte F, Buck F and others. 2016. Immunosuppressive Yersinia Effector YopM Binds DEAD Box Helicase DDX3 to Control Ribosomal S6 Kinase in the Nucleus of Host Cells. PLoS Pathog 12(6):e1005660.
- Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, Ho WC, Boudreault A, Durkin J, Gillard JW, Jaquith JB, Morris SJ, Barker PA. 2008. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. Mol Cell 30(6):689-700.
- Black DS, Bliska JB. 1997. Identification of p130Cas as a substrate of Yersinia YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. EMBO J 16(10):2730-2744.
- Black DS, Bliska JB. 2000. The RhoGAP activity of the Yersinia pseudotuberculosis cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. Mol Microbiol 37(3):515-527.
- Black DS, Montagna LG, Zitsmann S, Bliska JB. 1998. Identification of an amino-terminal substrate-binding domain in the Yersinia tyrosine phosphatase that is required for efficient recognition of focal adhesion targets. Mol Microbiol 29(5):1263-1274.
- Black RE, Jackson RJ, Tsai T, Medvesky M, Shayegani M, Feeley JC, MacLeod KI, Wakelee AM. 1978. Epidemic Yersinia enterocolitica infection due to contaminated chocolate milk. N Engl J Med 298(2):76-79.
- Bliska JB, Black DS. 1995. Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the Yersinia pseudotuberculosis tyrosine phosphatase. Infect Immun 63(2):681-685.
- Bliska JB, Guan KL, Dixon JE, Falkow S. 1991. Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential Yersinia virulence determinant. Proc Natl Acad Sci U S A 88(4):1187-1191.
- Blocker A, Gounon P, Larquet E, Niebuhr K, Cabiaux V, Parsot C, Sansonetti P. 1999. The tripartite type III secreton of Shigella flexneri inserts IpaB and IpaC into host membranes. J Cell Biol 147(3):683-693.
- Boatright KM, Deis C, Denault JB, Sutherlin DP, Salvesen GS. 2004. Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L). Biochem J 382(Pt 2):651-657.

- Boatright KM, Salvesen GS. 2003. Mechanisms of caspase activation. Curr Opin Cell Biol 15(6):725-731.
- Boland A, Cornelis GR. 1998. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during Yersinia infection. Infect Immun 66(5):1878-1884.
- Bottone EJ. 1997. Yersinia enterocolitica: the charisma continues. Clin Microbiol Rev 10(2):257-276.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.
- Brough D, Rothwell NJ. 2007. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. J Cell Sci 120(Pt 5):772-781.
- Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, Martin M. 2011. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. J Dent Res 90(4):417-427.
- Brubaker RR, Beesley ED, Surgalla MJ. 1965. Pasteurella pestis: Role of Pesticin I and Iron in Experimental Plague. Science 149(3682):422-424.
- Burroughs AL. 1947. Sylvatic plague studies: The vector efficiency of nine species of fleas compared with Xenopsylla cheopis. J Hyg (Lond) 45(3):371-396.
- Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang HC, Choksi S, Liu J, Ward Y, Wu LG, Liu ZG. 2014. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNFinduced necroptosis. Nat Cell Biol 16(1):55-65.
- Cargnello M, Roux PP. 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. Microbiol Mol Biol Rev 75(1):50-83.
- Carniel E, Guilvout I, Prentice M. 1996. Characterization of a large chromosomal "highpathogenicity island" in biotype 1B Yersinia enterocolitica. J Bacteriol 178(23):6743-6751.
- Chan FK, Shisler J, Bixby JG, Felices M, Zheng L, Appel M, Orenstein J, Moss B, Lenardo MJ. 2003. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. J Biol Chem 278(51):51613-51621.
- Chandler CE, Ernst RK. 2017. Bacterial lipids: powerful modifiers of the innate immune response. F1000Res 6.
- Chen H, Ning X, Jiang Z. 2017. Caspases control antiviral innate immunity. Cell Mol Immunol 14(9):736-747.
- Chimini G, Chavrier P. 2000. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. Nat Cell Biol 2(10):E191-196.
- Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK. 2009. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. Cell 137(6):1112-1123.
- Christofferson DE, Li Y, Yuan J. 2014. Control of life-or-death decisions by RIP1 kinase. Annu Rev Physiol 76:129-150.

- Chung LK, Philip NH, Schmidt VA, Koller A, Strowig T, Flavell RA, Brodsky IE, Bliska JB. 2014. IQGAP1 is important for activation of caspase-1 in macrophages and is targeted by Yersinia pestis type III effector YopM. MBio 5(4):e01402-01414.
- Clark MA, Hirst BH, Jepson MA. 1998. M-cell surface beta1 integrin expression and invasinmediated targeting of Yersinia pseudotuberculosis to mouse Peyer's patch M cells. Infect Immun 66(3):1237-1243.
- Clement SL, Scheckel C, Stoecklin G, Lykke-Andersen J. 2011. Phosphorylation of tristetraprolin by MK2 impairs AU-rich element mRNA decay by preventing deadenylase recruitment. Mol Cell Biol 31(2):256-266.
- Clifton AD, Young PR, Cohen P. 1996. A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress. FEBS Lett 392(3):209-214.
- Comer JE, Sturdevant DE, Carmody AB, Virtaneva K, Gardner D, Long D, Rosenke R, Porcella SF, Hinnebusch BJ. 2010. Transcriptomic and innate immune responses to Yersinia pestis in the lymph node during bubonic plague. Infect Immun 78(12):5086-5098.
- Cornelis GR. 2002. The Yersinia Ysc-Yop 'type III' weaponry. Nat Rev Mol Cell Biol 3(10):742-752.
- Cornelis GR. 2006. The type III secretion injectisome. Nat Rev Microbiol 4(11):811-825.
- Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, Sory MP, Stainier I. 1998. The virulence plasmid of Yersinia, an antihost genome. Microbiol Mol Biol Rev 62(4):1315-1352.
- Cornelis GR, Denecker G. 2001. Yersinia lead SUMO attack. Nat Med 7(1):21-23.
- Cuadrado A, Nebreda AR. 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. Biochem J 429(3):403-417.
- Cusson-Hermance N, Khurana S, Lee TH, Fitzgerald KA, Kelliher MA. 2005. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF-{kappa}B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. J Biol Chem 280(44):36560-36566.
- de Almagro MC, Goncharov T, Izrael-Tomasevic A, Duttler S, Kist M, Varfolomeev E, Wu X, Lee WP, Murray J, Webster JD and others. 2017. Coordinated ubiquitination and phosphorylation of RIP1 regulates necroptotic cell death. Cell Death Differ 24(1):26-37.
- Degterev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G and others. 2008. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. Nat Chem Biol 4(5):313-321.
- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. Nat Chem Biol 1(2):112-119.
- Dekker JP, Frank KM. 2015. Salmonella, Shigella, and yersinia. Clin Lab Med 35(2):225-246.

- DeLeo FR. 2004. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. Apoptosis 9(4):399-413.
- Delor I, Cornelis GR. 1992. Role of Yersinia enterocolitica Yst toxin in experimental infection of young rabbits. Infect Immun 60(10):4269-4277.
- Deng W, Marshall NC, Rowland JL, McCoy JM, Worrall LJ, Santos AS, Strynadka NCJ, Finlay BB. 2017. Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. Nat Rev Microbiol 15(6):323-337.
- DePaolo RW, Kamdar K, Khakpour S, Sugiura Y, Wang W, Jabri B. 2012. A specific role for TLR1 in protective T(H)17 immunity during mucosal infection. J Exp Med 209(8):1437-1444.
- Dewoody RS, Merritt PM, Marketon MM. 2013. Regulation of the Yersinia type III secretion system: traffic control. Front Cell Infect Microbiol 3:4.
- Dhar MS, Virdi JS. 2014. Strategies used by Yersinia enterocolitica to evade killing by the host: thinking beyond Yops. Microbes Infect 16(2):87-95.
- Dillon CP, Weinlich R, Rodriguez DA, Cripps JG, Quarato G, Gurung P, Verbist KC, Brewer TL, Llambi F, Gong YN and others. 2014. RIPK1 blocks early postnatal lethality mediated by caspase-8 and RIPK3. Cell 157(5):1189-1202.
- Ding J, Wang K, Liu W, She Y, Sun Q, Shi J, Sun H, Wang DC, Shao F. 2016. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. Nature 535(7610):111-116.
- Dondelinger Y, Aguileta MA, Goossens V, Dubuisson C, Grootjans S, Dejardin E, Vandenabeele P, Bertrand MJ. 2013. RIPK3 contributes to TNFR1-mediated RIPK1 kinase-dependent apoptosis in conditions of cIAP1/2 depletion or TAK1 kinase inhibition. Cell Death Differ 20(10):1381-1392.
- Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, Roelandt R, Goncalves A, Bruggeman I, Hulpiau P, Weber K, Sehon CA, Marquis RW and others. 2014. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. Cell Rep 7(4):971-981.
- Dondelinger Y, Delanghe T, Rojas-Rivera D, Priem D, Delvaeye T, Bruggeman I, Van Herreweghe F, Vandenabeele P, Bertrand MJM. 2017. MK2 phosphorylation of RIPK1 regulates TNF-mediated cell death. Nat Cell Biol 19(10):1237-1247.
- Dondelinger Y, Jouan-Lanhouet S, Divert T, Theatre E, Bertin J, Gough PJ, Giansanti P, Heck AJ, Dejardin E, Vandenabeele P and others. 2015. NF-kappaB-Independent Role of IKKalpha/IKKbeta in Preventing RIPK1 Kinase-Dependent Apoptotic and Necroptotic Cell Death during TNF Signaling. Mol Cell 60(1):63-76.
- Dondelinger Y, Vandenabeele P, Bertrand MJ. 2016. Regulation of RIPK1's cell death function by phosphorylation. Cell Cycle 15(1):5-6.
- Donovan S, Shannon KM, Bollag G. 2002. GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling. Biochim Biophys Acta 1602(1):23-45.

- Dukuzumuremyi JM, Rosqvist R, Hallberg B, Akerstrom B, Wolf-Watz H, Schesser K. 2000. The Yersinia protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. J Biol Chem 275(45):35281-35290.
- Ehlting C, Ronkina N, Bohmer O, Albrecht U, Bode KA, Lang KS, Kotlyarov A, Radzioch D, Gaestel M, Haussinger D and others. 2011. Distinct functions of the mitogenactivated protein kinase-activated protein (MAPKAP) kinases MK2 and MK3: MK2 mediates lipopolysaccharide-induced signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation by preventing negative regulatory effects of MK3. J Biol Chem 286(27):24113-24124.
- El Tahir Y, Skurnik M. 2001. YadA, the multifaceted Yersinia adhesin. Int J Med Microbiol 291(3):209-218.
- Engelthaler DM, Hinnebusch BJ, Rittner CM, Gage KL. 2000. Quantitative competitive PCR as a technique for exploring flea-Yersina pestis dynamics. Am J Trop Med Hyg 62(5):552-560.
- Enslen H, Raingeaud J, Davis RJ. 1998. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. J Biol Chem 273(3):1741-1748.
- Erfurth SE, Grobner S, Kramer U, Gunst DS, Soldanova I, Schaller M, Autenrieth IB, Borgmann S. 2004. Yersinia enterocolitica induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. Infect Immun 72(12):7045-7054.
- Ernst JD. 2000. Bacterial inhibition of phagocytosis. Cell Microbiol 2(5):379-386.
- Fabrega A, Vila J. 2012. Yersinia enterocolitica: pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. Enferm Infecc Microbiol Clin 30(1):24-32.
- Feng S, Yang Y, Mei Y, Ma L, Zhu DE, Hoti N, Castanares M, Wu M. 2007. Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. Cell Signal 19(10):2056-2067.
- Feoktistova M, Geserick P, Kellert B, Dimitrova DP, Langlais C, Hupe M, Cain K, MacFarlane M, Hacker G, Leverkus M. 2011. cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. Mol Cell 43(3):449-463.
- Ferber DM, Brubaker RR. 1981. Plasmids in Yersinia pestis. Infect Immun 31(2):839-841.
- Festjens N, Cornelis S, Lamkanfi M, Vandenabeele P. 2006. Caspase-containing complexes in the regulation of cell death and inflammation. Biol Chem 387(8):1005-1016.
- Fiers W, Beyaert R, Boone E, Cornelis S, Declercq W, Decoster E, Denecker G, Depuydt B, De Valck D, De Wilde G and others. 1995. TNF-induced intracellular signaling leading to gene induction or to cytotoxicity by necrosis or by apoptosis. J Inflamm 47(1-2):67-75.
- Fink SL, Cookson BT. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. Infect Immun 73(4):1907-1916.

- Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Korkeala H. 2006. Molecular epidemiology of Yersinia enterocolitica infections. FEMS Immunol Med Microbiol 47(3):315-329.
- Fueller F, Schmidt G. 2008. The polybasic region of Rho GTPases defines the cleavage by Yersinia enterocolitica outer protein T (YopT). Protein Sci 17(8):1456-1462.
- Fukushima H, Shimizu S, Inatsu Y. 2011. Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis Detection in Foods. J Pathog 2011:735308.
- Geng J, Ito Y, Shi L, Amin P, Chu J, Ouchida AT, Mookhtiar AK, Zhao H, Xu D, Shan B and others. 2017. Regulation of RIPK1 activation by TAK1-mediated phosphorylation dictates apoptosis and necroptosis. Nat Commun 8(1):359.
- Gensberger ET, Kostic T. 2017. Green fluorescent protein labeling of food pathogens Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis. J Microbiol Methods 132:21-26.
- Grabowski B, Schmidt MA, Ruter C. 2017. Immunomodulatory Yersinia outer proteins (Yops)-useful tools for bacteria and humans alike. Virulence:1-24.
- Grassl GA, Bohn E, Muller Y, Buhler OT, Autenrieth IB. 2003. Interaction of Yersinia enterocolitica with epithelial cells: invasin beyond invasion. Int J Med Microbiol 293(1):41-54.
- Grobner S, Autenrieth SE, Soldanova I, Gunst DS, Schaller M, Bohn E, Muller S, Leverkus M, Wesselborg S, Autenrieth IB and others. 2006. Yersinia YopP-induced apoptotic cell death in murine dendritic cells is partially independent from action of caspases and exhibits necrosis-like features. Apoptosis 11(11):1959-1968.
- Guarino A, Cohen M, Thompson M, Dharmsathaphorn K, Giannella R. 1987. T84 cell receptor binding and guanyl cyclase activation by Escherichia coli heat-stable toxin. Am J Physiol 253(6 Pt 1):G775-780.
- Guha M, Mackman N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. Cell Signal 13(2):85-94.
- Haas TL, Emmerich CH, Gerlach B, Schmukle AC, Cordier SM, Rieser E, Feltham R, Vince J, Warnken U, Wenger T and others. 2009. Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. Mol Cell 36(5):831-844.
- Haase R, Kirschning CJ, Sing A, Schrottner P, Fukase K, Kusumoto S, Wagner H, Heesemann J, Ruckdeschel K. 2003. A dominant role of Toll-like receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteria-faced macrophages. J Immunol 171(8):4294-4303.
- Haase R, Richter K, Pfaffinger G, Courtois G, Ruckdeschel K. 2005. Yersinia outer protein P suppresses TGF-beta-activated kinase-1 activity to impair innate immune signaling in Yersinia enterocolitica-infected cells. J Immunol 175(12):8209-8217.
- Hakansson S, Galyov EE, Rosqvist R, Wolf-Watz H. 1996. The Yersinia YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. Mol Microbiol 20(3):593-603.
- Hamburger ZA, Brown MS, Isberg RR, Bjorkman PJ. 1999. Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. Science 286(5438):291-295.

- Hamid N, Gustavsson A, Andersson K, McGee K, Persson C, Rudd CE, Fallman M. 1999. YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. Microb Pathog 27(4):231-242.
- Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. Science 265(5173):808-811.
- Han KJ, Su X, Xu LG, Bin LH, Zhang J, Shu HB. 2004. Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappaB activation and apoptosis pathways. J Biol Chem 279(15):15652-15661.
- Han YW, Miller VL. 1997. Reevaluation of the virulence phenotype of the inv yadA double mutants of Yersinia pseudotuberculosis. Infect Immun 65(1):327-330.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol 166(4):557-580.
- Hannigan MO, Zhan L, Ai Y, Kotlyarov A, Gaestel M, Huang CK. 2001. Abnormal migration phenotype of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2-/neutrophils in Zigmond chambers containing formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine gradients. J Immunol 167(7):3953-3961.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol 6(11):1123-1132.
- He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, Wang X. 2009. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. Cell 137(6):1100-1111.
- He WT, Wan H, Hu L, Chen P, Wang X, Huang Z, Yang ZH, Zhong CQ, Han J. 2015. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion. Cell Res 25(12):1285-1298.
- Heesemann J, Hantke K, Vocke T, Saken E, Rakin A, Stojiljkovic I, Berner R. 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(2):397-408.
- Heesemann J, Laufs R. 1983. Construction of a mobilizable Yersinia enterocolitica virulence plasmid. J Bacteriol 155(2):761-767.
- Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. Nature 407(6805):770-776.
- Hinnebusch BJ. 2003. Transmission factors: Yersinia pestis genes required to infect the flea vector of plague. Adv Exp Med Biol 529:55-62.
- Hinnebusch BJ, Rudolph AE, Cherepanov P, Dixon JE, Schwan TG, Forsberg A. 2002. Role of Yersinia murine toxin in survival of Yersinia pestis in the midgut of the flea vector. Science 296(5568):733-735.
- Hofling S, Scharnert J, Cromme C, Bertrand J, Pap T, Schmidt MA, Ruter C. 2014. Manipulation of pro-inflammatory cytokine production by the bacterial cellpenetrating effector protein YopM is independent of its interaction with host cell kinases RSK1 and PRK2. Virulence 5(7):761-771.

- Hoiczyk E, Blobel G. 2001. Polymerization of a single protein of the pathogen Yersinia enterocolitica into needles punctures eukaryotic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 98(8):4669-4674.
- Hoiczyk E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A, Heesemann J. 2000. Structure and sequence analysis of Yersinia YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins. EMBO J 19(22):5989-5999.
- Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B, Tschopp J. 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. Nat Immunol 1(6):489-495.
- Huang CK, Zhan L, Ai Y, Jongstra J. 1997. LSP1 is the major substrate for mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils. J Biol Chem 272(1):17-19.
- Humphries F, Yang S, Wang B, Moynagh PN. 2015. RIP kinases: key decision makers in cell death and innate immunity. Cell Death Differ 22(2):225-236.
- Ikeda F, Crosetto N, Dikic I. 2010. What determines the specificity and outcomes of ubiquitin signaling? Cell 143(5):677-681.
- Iriarte M, Cornelis GR. 1998. YopT, a new Yersinia Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. Mol Microbiol 29(3):915-929.
- Isberg RR, Voorhis DL, Falkow S. 1987. Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. Cell 50(5):769-778.
- Jaco I, Annibaldi A, Lalaoui N, Wilson R, Tenev T, Laurien L, Kim C, Jamal K, Wicky John S, Liccardi G and others. 2017. MK2 Phosphorylates RIPK1 to Prevent TNF-Induced Cell Death. Mol Cell 66(5):698-710 e695.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol 20:197-216.
- Jorgensen I, Rayamajhi M, Miao EA. 2017. Programmed cell death as a defence against infection. Nat Rev Immunol 17(3):151-164.
- Journet L, Agrain C, Broz P, Cornelis GR. 2003. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. Science 302(5651):1757-1760.
- Juris SJ, Rudolph AE, Huddler D, Orth K, Dixon JE. 2000. A distinctive role for the Yersinia protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. Proc Natl Acad Sci U S A 97(17):9431-9436.
- Kaiser WJ, Daley-Bauer LP, Thapa RJ, Mandal P, Berger SB, Huang C, Sundararajan A, Guo H, Roback L, Speck SH and others. 2014. RIP1 suppresses innate immune necrotic as well as apoptotic cell death during mammalian parturition. Proc Natl Acad Sci U S A 111(21):7753-7758.
- Kaiser WJ, Offermann MK. 2005. Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. J Immunol 174(8):4942-4952.

- Kaiser WJ, Sridharan H, Huang C, Mandal P, Upton JW, Gough PJ, Sehon CA, Marquis RW, Bertin J, Mocarski ES. 2013. Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. J Biol Chem 288(43):31268-31279.
- Kanarek N, London N, Schueler-Furman O, Ben-Neriah Y. 2010. Ubiquitination and degradation of the inhibitors of NF-kappaB. Cold Spring Harb Perspect Biol 2(2):a000166.
- Kang S, Fernandes-Alnemri T, Rogers C, Mayes L, Wang Y, Dillon C, Roback L, Kaiser W, Oberst A, Sagara J and others. 2015. Caspase-8 scaffolding function and MLKL regulate NLRP3 inflammasome activation downstream of TLR3. Nat Commun 6:7515.
- Katz M, Amit I, Yarden Y. 2007. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. Biochim Biophys Acta 1773(8):1161-1176.
- Kawai T, Akira S. 2006. TLR signaling. Cell Death Differ 13(5):816-825.
- Keet EE. 1974. Yersinia enterocolitica septicemia. Source of infection and incubation period identified. N Y State J Med 74(12):2226-2230.
- Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P. 1998. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. Immunity 8(3):297-303.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26(4):239-257.
- Kirjavainen V, Jarva H, Biedzka-Sarek M, Blom AM, Skurnik M, Meri S. 2008. Yersinia enterocolitica serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. PLoS Pathog 4(8):e1000140.
- Klein DP, Galea S, Jongstra J. 1990. The lymphocyte-specific protein LSP1 is associated with the cytoskeleton and co-caps with membrane IgM. J Immunol 145(9):2967-2973.
- Kotlyarov A, Neininger A, Schubert C, Eckert R, Birchmeier C, Volk HD, Gaestel M. 1999. MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. Nat Cell Biol 1(2):94-97.
- Kotlyarov A, Yannoni Y, Fritz S, Laass K, Telliez JB, Pitman D, Lin LL, Gaestel M. 2002. Distinct cellular functions of MK2. Mol Cell Biol 22(13):4827-4835.
- Kovacs SB, Miao EA. 2017. Gasdermins: Effectors of Pyroptosis. Trends Cell Biol 27(9):673-684.
- Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galan JE, Aizawa SI. 1998. Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. Science 280(5363):602-605.
- Kundu M, Pathak SK, Kumawat K, Basu S, Chatterjee G, Pathak S, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H, Thien CB and others. 2009. A TNF- and c-Cbl-dependent FLIP(S)degradation pathway and its function in Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage apoptosis. Nat Immunol 10(8):918-926.
- Kutyrev VV, Popov Iu A, Protsenko OA. 1986. [Plasmids of the pathogenicity of Yersinia pestis]. Mol Gen Mikrobiol Virusol(6):3-11.

- Kyosseva SV. 2004. Mitogen-activated protein kinase signaling. Int Rev Neurobiol 59:201-220.
- Lahteenmaki K, Virkola R, Saren A, Emody L, Korhonen TK. 1998. Expression of plasminogen activator pla of Yersinia pestis enhances bacterial attachment to the mammalian extracellular matrix. Infect Immun 66(12):5755-5762.
- Lalaoui N, Hanggi K, Brumatti G, Chau D, Nguyen NN, Vasilikos L, Spilgies LM, Heckmann DA, Ma C, Ghisi M and others. 2016. Targeting p38 or MK2 Enhances the Anti-Leukemic Activity of Smac-Mimetics. Cancer Cell 30(3):499-500.
- Lamkanfi M, Dixit VM. 2010. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. Cell Host Microbe 8(1):44-54.
- Lamothe B, Lai Y, Xie M, Schneider MD, Darnay BG. 2013. TAK1 is essential for osteoclast differentiation and is an important modulator of cell death by apoptosis and necroptosis. Mol Cell Biol 33(3):582-595.
- LaRock CN, Cookson BT. 2012. The Yersinia virulence effector YopM binds caspase-1 to arrest inflammasome assembly and processing. Cell Host Microbe 12(6):799-805.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW and others. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. Nature 372(6508):739-746.
- Lee WL, Grimes JM, Robinson RC. 2015. Yersinia effector YopO uses actin as bait to phosphorylate proteins that regulate actin polymerization. Nat Struct Mol Biol 22(3):248-255.
- Legarda-Addison D, Hase H, O'Donnell MA, Ting AT. 2009. NEMO/IKKgamma regulates an early NF-kappaB-independent cell-death checkpoint during TNF signaling. Cell Death Differ 16(9):1279-1288.
- Leung KY, Reisner BS, Straley SC. 1990. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of Yersinia pestis in mice. Infect Immun 58(10):3262-3271.
- Leung KY, Straley SC. 1989. The yopM gene of Yersinia pestis encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPIb alpha. J Bacteriol 171(9):4623-4632.
- Li J, Yuan J. 2008. Caspases in apoptosis and beyond. Oncogene 27(48):6194-6206.
- Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, Liu ZG. 1999. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. Genes Dev 13(19):2514-2526.
- Lindgren SW, Stojiljkovic I, Heffron F. 1996. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of Salmonella typhimurium. Proc Natl Acad Sci U S A 93(9):4197-4201.
- Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H, Lieberman J. 2016. Inflammasomeactivated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. Nature 535(7610):153-158.
- Logsdon LK, Mecsas J. 2003. Requirement of the Yersinia pseudotuberculosis effectors YopH and YopE in colonization and persistence in intestinal and lymph tissues. Infect Immun 71(8):4595-4607.

- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine 42(2):145-151.
- Mack C, Sickmann A, Lembo D, Brune W. 2008. Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. Proc Natl Acad Sci U S A 105(8):3094-3099.
- Mahoney DJ, Cheung HH, Mrad RL, Plenchette S, Simard C, Enwere E, Arora V, Mak TW, Lacasse EC, Waring J and others. 2008. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNFalphamediated NF-kappaB activation. Proc Natl Acad Sci U S A 105(33):11778-11783.
- Man SM, Kanneganti TD. 2016. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. Nat Rev Immunol 16(1):7-21.
- Martin-Sanchez F, Diamond C, Zeitler M, Gomez AI, Baroja-Mazo A, Bagnall J, Spiller D, White M, Daniels MJ, Mortellaro A and others. 2016. Inflammasome-dependent IL-1beta release depends upon membrane permeabilisation. Cell Death Differ 23(7):1219-1231.
- May RC, Machesky LM. 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. J Cell Sci 114(Pt 6):1061-1077.
- McDonald C, Vacratsis PO, Bliska JB, Dixon JE. 2003. The yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. J Biol Chem 278(20):18514-18523.
- McNally A, Thomson NR, Reuter S, Wren BW. 2016. 'Add, stir and reduce': Yersinia spp. as model bacteria for pathogen evolution. Nat Rev Microbiol 14(3):177-190.
- Menon MB, Gropengiesser J, Fischer J, Novikova L, Deuretzbacher A, Lafera J, Schimmeck H, Czymmeck N, Ronkina N, Kotlyarov A and others. 2017. p38MAPK/MK2dependent phosphorylation controls cytotoxic RIPK1 signalling in inflammation and infection. Nat Cell Biol 19(10):1248-1259.
- Micheau O, Tschopp J. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. Cell 114(2):181-190.
- Mikula KM, Kolodziejczyk R, Goldman A. 2012. Yersinia infection tools-characterization of structure and function of adhesins. Front Cell Infect Microbiol 2:169.
- Miller VL, Falkow S. 1988. Evidence for two genetic loci in Yersinia enterocolitica that can promote invasion of epithelial cells. Infect Immun 56(5):1242-1248.
- Mills SD, Boland A, Sory MP, van der Smissen P, Kerbourch C, Finlay BB, Cornelis GR. 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 U S A 94(23):12638-12643.
- Mittal R, Peak-Chew SY, McMahon HT. 2006. Acetylation of MEK2 and I kappa B kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 103(49):18574-18579.
- Monack DM, Mecsas J, Bouley D, Falkow S. 1998. Yersinia-induced apoptosis in vivo aids in the establishment of a systemic infection of mice. J Exp Med 188(11):2127-2137.

- Monack DM, Mecsas J, Ghori N, Falkow S. 1997. Yersinia signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. Proc Natl Acad Sci U S A 94(19):10385-10390.
- Mukherjee S, Keitany G, Li Y, Wang Y, Ball HL, Goldsmith EJ, Orth K. 2006. Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. Science 312(5777):1211-1214.
- Muller A, Rudel T. 2001. Modification of host cell apoptosis by viral and bacterial pathogens. Int J Med Microbiol 291(3):197-207.
- Murphy JM, Czabotar PE, Hildebrand JM, Lucet IS, Zhang JG, Alvarez-Diaz S, Lewis R, Lalaoui N, Metcalf D, Webb AI and others. 2013. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. Immunity 39(3):443-453.
- Navarre WW, Zychlinsky A. 2000. Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. Cell Microbiol 2(4):265-273.
- Nazir R, Mazurier S, Yang P, Lemanceau P, van Elsas JD. 2017. The Ecological Role of Type Three Secretion Systems in the Interaction of Bacteria with Fungi in Soil and Related Habitats Is Diverse and Context-Dependent. Front Microbiol 8:38.
- Nejedlik L, Pierfelice T, Geiser JR. 2004. Actin distribution is disrupted upon expression of Yersinia YopO/YpkA in yeast. Yeast 21(9):759-768.
- Newton K, Dugger DL, Maltzman A, Greve JM, Hedehus M, Martin-McNulty B, Carano RA, Cao TC, van Bruggen N, Bernstein L and others. 2016. RIPK3 deficiency or catalytically inactive RIPK1 provides greater benefit than MLKL deficiency in mouse models of inflammation and tissue injury. Cell Death Differ 23(9):1565-1576.
- Neyt C, Cornelis GR. 1999. Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by Yersinia enterocolitica: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. Mol Microbiol 33(5):971-981.
- O'Donnell MA, Hase H, Legarda D, Ting AT. 2012. NEMO inhibits programmed necrosis in an NFkappaB-independent manner by restraining RIP1. PLoS One 7(7):e41238.
- Ofengeim D, Yuan J. 2013. Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. Nat Rev Mol Cell Biol 14(11):727-736.
- Orth K. 2002. Function of the Yersinia effector YopJ. Curr Opin Microbiol 5(1):38-43.
- Orth K, Palmer LE, Bao ZQ, Stewart S, Rudolph AE, Bliska JB, Dixon JE. 1999. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector. Science 285(5435):1920-1923.
- Orth K, Xu Z, Mudgett MB, Bao ZQ, Palmer LE, Bliska JB, Mangel WF, Staskawicz B, Dixon JE. 2000. Disruption of signaling by Yersinia effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. Science 290(5496):1594-1597.
- Paquette N, Conlon J, Sweet C, Rus F, Wilson L, Pereira A, Rosadini CV, Goutagny N, Weber AN, Lane WS and others. 2012. Serine/threonine acetylation of TGFbetaactivated kinase (TAK1) by Yersinia pestis YopJ inhibits innate immune signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 109(31):12710-12715.

- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q and others. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nat Immunol 6(11):1133-1141.
- Park HH, Lo YC, Lin SC, Wang L, Yang JK, Wu H. 2007. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. Annu Rev Immunol 25:561-586.
- Park YH, Jeong MS, Park HH, Jang SB. 2013. Formation of the death domain complex between FADD and RIP1 proteins in vitro. Biochim Biophys Acta 1834(1):292-300.
- Pasparakis M, Vandenabeele P. 2015. Necroptosis and its role in inflammation. Nature 517(7534):311-320.
- Pepe JC, Badger JL, Miller VL. 1994. Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the Yersinia enterocolitica inv gene. Mol Microbiol 11(1):123-135.
- Pepe JC, Wachtel MR, Wagar E, Miller VL. 1995. Pathogenesis of defined invasion mutants of Yersinia enterocolitica in a BALB/c mouse model of infection. Infect Immun 63(12):4837-4848.
- Perkins ND. 2000. The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. Trends Biochem Sci 25(9):434-440.
- Perry RD, Fetherston JD. 1997. Yersinia pestis--etiologic agent of plague. Clin Microbiol Rev 10(1):35-66.
- Persson C, Carballeira N, Wolf-Watz H, Fallman M. 1997. The PTPase YopH inhibits uptake of Yersinia, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. EMBO J 16(9):2307-2318.
- Peterson LW, Philip NH, DeLaney A, Wynosky-Dolfi MA, Asklof K, Gray F, Choa R, Bjanes E, Buza EL, Hu B and others. 2017. RIPK1-dependent apoptosis bypasses pathogen blockade of innate signaling to promote immune defense. J Exp Med 214(11):3171-3182.
- Pha K, Navarro L. 2016. Yersinia type III effectors perturb host innate immune responses. World J Biol Chem 7(1):1-13.
- Philip NH, DeLaney A, Peterson LW, Santos-Marrero M, Grier JT, Sun Y, Wynosky-Dolfi MA, Zwack EE, Hu B, Olsen TM and others. 2016. Activity of Uncleaved Caspase-8 Controls Anti-bacterial Immune Defense and TLR-Induced Cytokine Production Independent of Cell Death. PLoS Pathog 12(10):e1005910.
- Philip NH, Dillon CP, Snyder AG, Fitzgerald P, Wynosky-Dolfi MA, Zwack EE, Hu B, Fitzgerald L, Mauldin EA, Copenhaver AM and others. 2014. Caspase-8 mediates caspase-1 processing and innate immune defense in response to bacterial blockade of NF-kappaB and MAPK signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 111(20):7385-7390.
- Pickup DJ, Bastia D, Stone HO, Joklik WK. 1982. Sequence of terminal regions of cowpox virus DNA: arrangement of repeated and unique sequence elements. Proc Natl Acad Sci U S A 79(23):7112-7116.
- Pierson DE, Falkow S. 1993. The ail gene of Yersinia enterocolitica has a role in the ability of the organism to survive serum killing. Infect Immun 61(5):1846-1852.

- Pilz D, Vocke T, Heesemann J, Brade V. 1992. Mechanism of YadA-mediated serum resistance of Yersinia enterocolitica serotype O3. Infect Immun 60(1):189-195.
- Poon IK, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. 2014. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. Nat Rev Immunol 14(3):166-180.
- Qian F, Deng J, Wang G, Ye RD, Christman JW. 2016. Pivotal Role of Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 2 in Inflammatory Pulmonary Diseases. Curr Protein Pept Sci 17(4):332-342.
- Ratner D, Orning MP, Starheim KK, Marty-Roix R, Proulx MK, Goguen JD, Lien E. 2016. Manipulation of interleukin-1beta and interleukin-18 production by Yersinia pestis effectors YopJ and YopM and redundant impact on virulence. J Biol Chem 291(31):16417.
- Rickard JA, O'Donnell JA, Evans JM, Lalaoui N, Poh AR, Rogers T, Vince JE, Lawlor KE, Ninnis RL, Anderton H and others. 2014. RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis. Cell 157(5):1175-1188.
- Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, Alnemri D, Cingolani G, Alnemri ES. 2017. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. Nat Commun 8:14128.
- Roggenkamp A, Neuberger HR, Flugel A, Schmoll T, Heesemann J. 1995. Substitution of two histidine residues in YadA protein of Yersinia enterocolitica abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. Mol Microbiol 16(6):1207-1219.
- Ronkina N, Kotlyarov A, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Hitti E, Milarski K, Askew R, Marusic S, Lin LL, Gaestel M and others. 2007. The mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinases MK2 and MK3 cooperate in stimulation of tumor necrosis factor biosynthesis and stabilization of p38 MAPK. Mol Cell Biol 27(1):170-181.
- Ronkina N, Kotlyarov A, Gaestel M. 2008. MK2 and MK3--a pair of isoenzymes? Front Biosci 13:5511-5521.
- Ronkina N, Menon MB, Schwermann J, Arthur JS, Legault H, Telliez JB, Kayyali US, Nebreda AR, Kotlyarov A, Gaestel M. 2011. Stress induced gene expression: a direct role for MAPKAP kinases in transcriptional activation of immediate early genes. Nucleic Acids Res 39(7):2503-2518.
- Ronkina N, Menon MB, Schwermann J, Tiedje C, Hitti E, Kotlyarov A, Gaestel M. 2010. MAPKAP kinases MK2 and MK3 in inflammation: complex regulation of TNF biosynthesis via expression and phosphorylation of tristetraprolin. Biochem Pharmacol 80(12):1915-1920.
- Rosqvist R, Forsberg A, Rimpilainen M, Bergman T, Wolf-Watz H. 1990. The cytotoxic protein YopE of Yersinia obstructs the primary host defence. Mol Microbiol 4(4):657-667.
- Rosqvist R, Skurnik M, Wolf-Watz H. 1988. Increased virulence of Yersinia pseudotuberculosis by two independent mutations. Nature 334(6182):522-524.

- Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR. 1994. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. Cell 78(6):1027-1037.
- Roux PP, Blenis J. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. Microbiol Mol Biol Rev 68(2):320-344.
- Ruckdeschel K, Harb S, Roggenkamp A, Hornef M, Zumbihl R, Kohler S, Heesemann J, Rouot B. 1998. Yersinia enterocolitica impairs activation of transcription factor NFkappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. J Exp Med 187(7):1069-1079.
- Ruckdeschel K, Machold J, Roggenkamp A, Schubert S, Pierre J, Zumbihl R, Liautard JP, Heesemann J, Rouot B. 1997a. Yersinia enterocolitica promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase. Correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor-alpha production. J Biol Chem 272(25):15920-15927.
- Ruckdeschel K, Mannel O, Richter K, Jacobi CA, Trulzsch K, Rouot B, Heesemann J. 2001. Yersinia outer protein P of Yersinia enterocolitica simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. J Immunol 166(3):1823-1831.
- Ruckdeschel K, Pfaffinger G, Haase R, Sing A, Weighardt H, Hacker G, Holzmann B, Heesemann J. 2004. Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages. J Immunol 173(5):3320-3328.
- Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Lafont V, Mangeat P, Heesemann J, Rouot B. 1997b. Interaction of Yersinia enterocolitica with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. Infect Immun 65(11):4813-4821.
- Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Schubert S, Heesemann J. 1996. Differential contribution of Yersinia enterocolitica virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. Infect Immun 64(3):724-733.
- Sabapathy K. 2012. Role of the JNK pathway in human diseases. Prog Mol Biol Transl Sci 106:145-169.
- Sakamaki K, Inoue T, Asano M, Sudo K, Kazama H, Sakagami J, Sakata S, Ozaki M, Nakamura S, Toyokuni S and others. 2002. Ex vivo whole-embryo culture of caspase-8-deficient embryos normalize their aberrant phenotypes in the developing neural tube and heart. Cell Death Differ 9(11):1196-1206.
- Sansonetti PJ. 2004. War and peace at mucosal surfaces. Nat Rev Immunol 4(12):953-964.
- Scheidereit C. 2006. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. Oncogene 25(51):6685-6705.
- Schesser K, Spiik AK, Dukuzumuremyi JM, Neurath MF, Pettersson S, Wolf-Watz H. 1998. The yopJ locus is required for Yersinia-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. Mol Microbiol 28(6):1067-1079.

- Schoberle TJ, Chung LK, McPhee JB, Bogin B, Bliska JB. 2016. Uncovering an Important Role for YopJ in the Inhibition of Caspase-1 in Activated Macrophages and Promoting Yersinia pseudotuberculosis Virulence. Infect Immun 84(4):1062-1072.
- Schotte P, Denecker G, Van Den Broeke A, Vandenabeele P, Cornelis GR, Beyaert R. 2004. Targeting Rac1 by the Yersinia effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta. J Biol Chem 279(24):25134-25142.
- Schubert S, Rakin A, Heesemann J. 2004. The Yersinia high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. Int J Med Microbiol 294(2-3):83-94.
- Shao F, Merritt PM, Bao Z, Innes RW, Dixon JE. 2002. A Yersinia effector and a Pseudomonas avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. Cell 109(5):575-588.
- Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, Shao F. 2015. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. Nature 526(7575):660-665.
- Simonet M, Riot B, Fortineau N, Berche P. 1996. Invasin production by Yersinia pestis is abolished by insertion of an IS200-like element within the inv gene. Infect Immun 64(1):375-379.
- Singh RK, Diwan M, Dastidar SG, Najmi AK. 2017a. Differential effect of p38 and MK2 kinase inhibitors on the inflammatory and toxicity biomarkers in vitro. Hum Exp Toxicol:960327117715901.
- Singh RK, Najmi AK, Dastidar SG. 2017b. Biological functions and role of mitogen-activated protein kinase activated protein kinase 2 (MK2) in inflammatory diseases. Pharmacol Rep 69(4):746-756.
- Skrzypek E, Cowan C, Straley SC. 1998. Targeting of the Yersinia pestis YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. Mol Microbiol 30(5):1051-1065.
- Skurnik M, Toivanen P. 1992. LcrF is the temperature-regulated activator of the yadA gene of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis. J Bacteriol 174(6):2047-2051.
- Skurnik M, Venho R, Bengoechea JA, Moriyon I. 1999. The lipopolysaccharide outer core of Yersinia enterocolitica serotype O:3 is required for virulence and plays a role in outer membrane integrity. Mol Microbiol 31(5):1443-1462.
- Skurnik M, Wolf-Watz H. 1989. Analysis of the yopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of Yersinia spp. Mol Microbiol 3(4):517-529.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES and others. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. J Cell Biol 144(2):281-292.
- Stoecklin G, Stubbs T, Kedersha N, Wax S, Rigby WF, Blackwell TK, Anderson P. 2004. MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. EMBO J 23(6):1313-1324.
- Stokoe D, Caudwell B, Cohen PT, Cohen P. 1993. The substrate specificity and structure of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-2. Biochem J 296 (Pt 3):843-849.
- Straley SC, Bowmer WS. 1986. Virulence genes regulated at the transcriptional level by Ca2+ in Yersinia pestis include structural genes for outer membrane proteins. Infect Immun 51(2):445-454.
- Sudo T, Kawai K, Matsuzaki H, Osada H. 2005. p38 mitogen-activated protein kinase plays a key role in regulating MAPKAPK2 expression. Biochem Biophys Res Commun 337(2):415-421.
- Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, Wang L, Yan J, Liu W, Lei X and others. 2012. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. Cell 148(1-2):213-227.
- Sun X, Yin J, Starovasnik MA, Fairbrother WJ, Dixit VM. 2002. Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3. J Biol Chem 277(11):9505-9511.
- Swatek KN, Komander D. 2016. Ubiquitin modifications. Cell Res 26(4):399-422.
- Takahashi N, Duprez L, Grootjans S, Cauwels A, Nerinckx W, DuHadaway JB, Goossens V, Roelandt R, Van Hauwermeiren F, Libert C and others. 2012. Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. Cell Death Dis 3:e437.
- Takeuchi O, Akira S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell 140(6):805-820.
- Tenev T, Bianchi K, Darding M, Broemer M, Langlais C, Wallberg F, Zachariou A, Lopez J, MacFarlane M, Cain K and others. 2011. The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. Mol Cell 43(3):432-448.
- Tennant SM, Grant TH, Robins-Browne RM. 2003. Pathogenicity of Yersinia enterocolitica biotype 1A. FEMS Immunol Med Microbiol 38(2):127-137.
- Tertti R, Vuento R, Mikkola P, Granfors K, Makela AL, Toivanen A. 1989. Clinical manifestations of Yersinia pseudotuberculosis infection in children. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 8(7):587-591.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. Science 281(5381):1312-1316.
- Ting AT, Pimentel-Muinos FX, Seed B. 1996. RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. EMBO J 15(22):6189-6196.
- Trebesius K, Harmsen D, Rakin A, Schmelz J, Heesemann J. 1998. Development of rRNAtargeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of Yersinia species. J Clin Microbiol 36(9):2557-2564.
- Triantafilou M, Gamper FG, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, Hartung T, Triantafilou K. 2006. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. J Biol Chem 281(41):31002-31011.

- Trulzsch K, Oellerich MF, Heesemann J. 2007. Invasion and dissemination of Yersinia enterocolitica in the mouse infection model. Adv Exp Med Biol 603:279-285.
- Trulzsch K, Sporleder T, Igwe EI, Russmann H, Heesemann J. 2004. Contribution of the major secreted yops of Yersinia enterocolitica O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. Infect Immun 72(9):5227-5234.
- Tummers B, Green DR. 2017. Caspase-8: regulating life and death. Immunol Rev 277(1):76-89.
- Uliczka F, Pisano F, Schaake J, Stolz T, Rohde M, Fruth A, Strauch E, Skurnik M, Batzilla J, Rakin A and others. 2011. Unique cell adhesion and invasion properties of Yersinia enterocolitica O:3, the most frequent cause of human Yersiniosis. PLoS Pathog 7(7):e1002117.
- Vandenabeele P, Declercq W, Van Herreweghe F, Vanden Berghe T. 2010a. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. Sci Signal 3(115):re4.
- Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. 2010b. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. Nat Rev Mol Cell Biol 11(10):700-714.
- Varfolomeev E, Goncharov T, Fedorova AV, Dynek JN, Zobel K, Deshayes K, Fairbrother WJ, Vucic D. 2008. c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation. J Biol Chem 283(36):24295-24299.
- Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannilkulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O and others. 1998. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. Immunity 9(2):267-276.
- Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W, Vandenabeele P. 1998. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. J Exp Med 187(9):1477-1485.
- Visser LG, Annema A, van Furth R. 1995. Role of Yops in inhibition of phagocytosis and killing of opsonized Yersinia enterocolitica by human granulocytes. Infect Immun 63(7):2570-2575.
- Von Pawel-Rammingen U, Telepnev MV, Schmidt G, Aktories K, Wolf-Watz H, Rosqvist R. 2000. GAP activity of the Yersinia YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. Mol Microbiol 36(3):737-748.
- Wang H, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang LF, Wang FS, Wang X. 2014. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. Mol Cell 54(1):133-146.
- Wang L, Du F, Wang X. 2008. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. Cell 133(4):693-703.
- Wang Y, Gao W, Shi X, Ding J, Liu W, He H, Wang K, Shao F. 2017. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. Nature 547(7661):99-103.

- Wauters G, Kandolo K, Janssens M. 1987. Revised biogrouping scheme of Yersinia enterocolitica. Contrib Microbiol Immunol 9:14-21.
- Weinlich R, Green DR. 2014. The two faces of receptor interacting protein kinase-1. Mol Cell 56(4):469-480.
- Weng D, Marty-Roix R, Ganesan S, Proulx MK, Vladimer GI, Kaiser WJ, Mocarski ES, Pouliot K, Chan FK, Kelliher MA and others. 2014. Caspase-8 and RIP kinases regulate bacteria-induced innate immune responses and cell death. Proc Natl Acad Sci U S A 111(20):7391-7396.
- Witt A, Vucic D. 2017. Diverse ubiquitin linkages regulate RIP kinases-mediated inflammatory and cell death signaling. Cell Death Differ 24(7):1160-1171.
- Woestyn S, Allaoui A, Wattiau P, Cornelis GR. 1994. YscN, the putative energizer of the Yersinia Yop secretion machinery. J Bacteriol 176(6):1561-1569.
- Wren BW. 2003. The yersiniae--a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. Nat Rev Microbiol 1(1):55-64.
- Xiao Z, Xue J, Sowin TJ, Zhang H. 2006. Differential roles of checkpoint kinase 1, checkpoint kinase 2, and mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in mediating DNA damage-induced cell cycle arrest: implications for cancer therapy. Mol Cancer Ther 5(8):1935-1943.
- Yang H, Ke Y, Wang J, Tan Y, Myeni SK, Li D, Shi Q, Yan Y, Chen H, Guo Z and others. 2011. Insight into bacterial virulence mechanisms against host immune response via the Yersinia pestis-human protein-protein interaction network. Infect Immun 79(11):4413-4424.
- Yao T, Mecsas J, Healy JI, Falkow S, Chien Y. 1999. Suppression of T and B lymphocyte activation by a Yersinia pseudotuberculosis virulence factor, yopH. J Exp Med 190(9):1343-1350.
- Yeh WC, de la Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K and others. 1998. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. Science 279(5358):1954-1958.
- Yoon S, Seger R. 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. Growth Factors 24(1):21-44.
- Zauberman A, Tidhar A, Levy Y, Bar-Haim E, Halperin G, Flashner Y, Cohen S, Shafferman A, Mamroud E. 2009. Yersinia pestis endowed with increased cytotoxicity is avirulent in a bubonic plague model and induces rapid protection against pneumonic plague. PLoS One 4(6):e5938.
- Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, Dong MQ, Han J. 2009. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. Science 325(5938):332-336.
- Zhang H, Zhou X, McQuade T, Li J, Chan FK, Zhang J. 2011. Functional complementation between FADD and RIP1 in embryos and lymphocytes. Nature 471(7338):373-376.

- Zhang SQ, Kovalenko A, Cantarella G, Wallach D. 2000. Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. Immunity 12(3):301-311.
- Zhang Y, Bliska JB. 2003. Role of Toll-like receptor signaling in the apoptotic response of macrophages to Yersinia infection. Infect Immun 71(3):1513-1519.
- Zhang Y, Pizzute T, Pei M. 2014. A review of crosstalk between MAPK and Wnt signals and its impact on cartilage regeneration. Cell Tissue Res 358(3):633-649.
- Zhao J, Jitkaew S, Cai Z, Choksi S, Li Q, Luo J, Liu ZG. 2012. Mixed lineage kinase domainlike is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. Proc Natl Acad Sci U S A 109(14):5322-5327.
- Zhou H, Monack DM, Kayagaki N, Wertz I, Yin J, Wolf B, Dixit VM. 2005. Yersinia virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF-kappa B activation. J Exp Med 202(10):1327-1332.
- Zhou W, Yuan J. 2014. Necroptosis in health and diseases. Semin Cell Dev Biol 35:14-23.
- Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. 2010. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. Cell 140(6):798-804.
- Zumbihl R, Aepfelbacher M, Andor A, Jacobi CA, Ruckdeschel K, Rouot B, Heesemann J. 1999. The cytotoxin YopT of Yersinia enterocolitica induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. J Biol Chem 274(41):29289-29293.

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Klaus Ruckdeschel für die Bereitstellung des Themas bedanken. Ich danke ihm für seine Unterstützung in den letzten Jahren, seine exzellente Betreuung und Hilfestellung zu jeder Zeit, aber auch für die ein oder andere konstruktive Diskussion. Am Ende ist jetzt hoffentlich doch fast "alles super".

Bei Prof. Dr. Wolfgang Streit bedanke ich mich für die Bereitschaft, das Zweitgutachten dieser Dissertation zu übernehmen. Ebenso danke ich PD Dr. Andreas Pommerening-Röser für die Übernahme des Zweitgutachtens der Disputation und Prof. Dr. Julia Kehr für die freundliche Übernahme des Vorsitzes der Disputation.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Martin Aepfelbacher für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu dürfen.

Dagmara Nelson und Mika Holthaus von der Isotopenlabor Facility, sowie Dr. Ingke Braren von der Vector Facility möchte ich für ihre fachliche Unterstützung während dieser Arbeit danken. Sie haben die Umsetzung mancher Versuche erst möglich gemacht.

Ein großer Dank gilt allen aktuellen und früheren Mitgliedern des Instituts für med. Mikrobiologie, besonders Manja Czech-Sioli, Denise Ohnezeit, María José Valencia López, Franziska Huschka, Marie Schnapp, Theresa Nauth, Aileen König, Maren Rudolph, Samira Weißelberg und Tabea Schlemeyer. Danke für eure Unterstützung, für die Beantwortung jeder Frage, für das gemeinsame Lösen fast jeden Problems und so manche fachliche Diskussion. Aber auch für die ein oder andere Geschichte abseits vom Laboralltag und die wahrscheinlich besten Themen in der Mittagspause möchte ich euch danken. Ein besonderer Dank gilt Hanna Schimmeck. Danke für deine Unterstützung in den wahrscheinlich schlimmsten Monaten und manchem lustigen Moment gemeinsam mit vier Händen in der Zellkultur.

Auch bei meinen Freunden möchte ich mich bedanken. Danke für einen spontanen Kaffee zur Ablenkung oder für den Lichtblick morgens nach dem Wochenende durch den Montags-Otter. Danke, dass ihr mir immer wieder zugehört und mich motiviert habt.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich von ganzem Herzen für ihre bedingslose Unterstützung ohne die dieser bisherige Weg gar nicht möglich gewesen wär. Danke, dass ihr immer zu mir haltet und mich bis in die letzten Stunden dieser Arbeit unterstützt und motiviert habt.

Der sicherlich größte Dank gilt jedoch meinem Mann (und bestem Mietnomaden) Christopher. Ich danke dir für dein grenzenloses Verständnis und deine Geduld, vor allem in den letzten Wochen, in denen du mich immer wieder aufgebaut und unterstützt hast und auch manchmal in die Realität zurückgeholt hast. Danke, dass du immer an mich glaubst!

Vorveröffentlichungen

p38MAPK/MK2-dependent phosphorylation controls cytotoxic RIPK1 signalling in inflammation and infection (2017)

Manoj B. Menon, Julia Gropengiesser, Jessica Fischer, Lena Novikova, Anne Deuretzbacher, Juri Lafera, Hanna Schimmeck, Nicole Czymmeck, Natalia Ronkina, Alexey Kotlyarov, Martin Aepfelbacher, Matthias Gaestel und Klaus Ruckdeschel.

Nature Cell Biology 19(10):1248-1259.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 16.11.2017

Julia Gropengießer