

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher

## **Untersuchungen zu Ursachen und Konsequenzen des Yersinien-induzierten Zelltods**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Carolin Helene Fenner  
aus Hamburg

Hamburg 2016

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 28.07.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. K. Ruckdeschel**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. F. Haag**

*meinen Eltern*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Die Gattung “Yersinia“ .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Yersinia enterocolitica .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Vorkommen, Verbreitung und klinisches Bild .....	3
1.2.2 Mikrobiologische Nachweisverfahren .....	4
<b>1.3 Yersinia-Virulenzfaktoren .....</b>	<b>5</b>
1.3.1 Adhäsion und Invasion .....	5
1.3.2 Typ III Sekretionssystem und “Yersinia outer proteins“ (Yops) .....	6
1.3.3 YopE .....	7
1.3.4 YopP .....	8
1.3.5 YopQ .....	9
<b>1.4 Das angeborene Immunsystem.....</b>	<b>9</b>
<b>1.5 “Toll-Like“-Rezeptor System.....</b>	<b>10</b>
<b>1.6 “Receptor-interacting“ Protein 1 (RIP1).....</b>	<b>12</b>
<b>1.7 Zelltod.....</b>	<b>14</b>
1.7.1 Apoptose .....	15
1.7.2 Nekrose .....	16
1.7.3 Pyroptose.....	17
<b>1.8 Das Inflammasom - Alarmsignale von Zellen.....</b>	<b>18</b>
<b>1.9 Yersinien-induzierte Apoptose.....</b>	<b>19</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>21</b>
2.1.1 Geräte .....	21
2.1.2 Labormaterial .....	22
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien .....	23
2.1.4 Kommerzielle Testsysteme (Kits).....	24
2.1.5 Medien .....	25
2.1.6 Lösungen und Puffer .....	25
2.1.6.1 Puffer und Lösungen zur Agarosegelelektrophorese .....	25
2.1.6.2 Lösungen zur Zellyse .....	25

2.1.6.3 Puffer zur Proteindenaturierung .....	25
2.1.6.4 Puffer zur SDS-Page .....	26
2.1.6.5 Färbungen für SDS-Page.....	26
2.1.6.6 Puffer für Western-Blot.....	26
2.1.6.7 Puffer für die Herstellung chemokompetenter Bakterien .....	26
2.1.7 Gele .....	26
2.1.7.1 SDS-Gel .....	26
2.1.7.2 Agarose-Gel .....	27
2.1.8 Enzyme .....	27
2.1.9 Inhibitoren/Stimulatoren .....	27
2.1.10 Oligonukleotide.....	28
2.1.11 Marker.....	28
2.1.12 Antibiotika .....	28
2.1.13 Antikörper .....	28
2.1.13.1 Primäre Antikörper.....	28
2.1.13.2 Sekundäre Antikörper .....	29
2.1.14 Plasmide .....	29
2.1.15 Verwendete Zellen .....	29
2.1.15.1 Bakterienstämme .....	29
2.1.15.2 Zelllinien .....	30
2.1.16 Zellkulturmaterialien.....	31
2.1.16.1 Zellkulturmedien .....	31
2.1.16.2 Zusätze/Zellkulturlösungen.....	31
2.1.16.3 Färbungen Zellkultur.....	31
<b>2.2 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>32</b>
2.2.1 “ <i>Polymerase-Chain-Reaction</i> “ (PCR) .....	32
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.2.3 Plasmidpräparation .....	33
2.2.4 Gelextraktion.....	33
2.2.5 Restriktionsverdau .....	33
2.2.6 Transformation, Ligation und Kontrollverdau.....	34
2.2.7 Herstellung kompetenter Bakterien .....	35
2.2.8 Sequenzierung.....	36

<b>2.3</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>37</b>
2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	37
2.3.2	Western-Blot ( <i>Semi-Dry Blot</i> ) .....	37
2.3.3	Immunoblot.....	38
<b>2.4</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>38</b>
2.4.1	Zellkultur.....	38
2.4.2	Infektion von <i>J774</i> - und <i>THP1</i> -Zellen mit Yersinien .....	39
2.4.3	Transfektion eukaryotischer Zellen und <i>GST</i> -“ <i>Pulldown</i> “-Experiment .....	40
2.4.4	ATP-Messung .....	41
2.4.5	Migrationsassay .....	41
2.4.6	“ <i>Enzyme-linked immunsorbent assay</i> “ (ELISA).....	42
<b>2.5</b>	<b>Tierexperimentelle Methoden</b> .....	<b>43</b>
2.5.1	Haltung der Tiere .....	43
2.5.2	Vorbereitung der Yersinienstämme für die Mausinfektion .....	44
2.5.3	Intragastrale Infektion der Tiere .....	44
2.5.4	Präparation der Tiere.....	44
2.5.5	Aufbereitung von Leber, Milz und Peyer-Plaques .....	45
<b>2.6</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>45</b>
<b>2.7</b>	<b>Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren</b> .....	<b>46</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>48</b>
3.1	Yersinien-induzierte Apoptose als chemotaktischer Stimulus.....	48
3.2	Yersinien-induzierte IL-1 $\beta$ -Freisetzung und Pyroptose.....	53
3.3	Interaktion zwischen YopP und RIP1 .....	62
3.4	Abschätzung der Virulenz einer YopP-Punktmutante.....	64
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>70</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>QUELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>90</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>91</b>
<b>10</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b> .....	<b>92</b>

**FRAGESTELLUNG**

Yersinien sind pathogene gramnegative Bakterien, die mit Hilfe eines sogenannten Typ-III-Proteinsekretionssystems bakterielle Virulenzproteine (Yops, *Yersinia outer proteins*) in die Wirtszelle einschleusen, um dadurch die Immunantwort der Wirtszelle zu modulieren. Im Zentrum dieser Arbeit steht der durch Yersinien induzierte Zelltod und damit das Virulenzprotein YopP, welches durch die Inhibition von Signaltransduktionsprozessen der unspezifischen Immunität die Zytokinproduktion von Yersinien-infizierten Zellen beeinträchtigt und Zelltod von Makrophagen durch Apoptose auslöst.

In dieser Doktorarbeit sollten mehrere molekulare und funktionelle Aspekte des durch Yersinien vermittelten Zelltods untersucht werden. Insbesondere sollten Auswirkungen des Yersinien-induzierten Zelltods auf die Entzündungs- und Stressantwort infizierter Makrophagen analysiert werden (ATP-Freisetzung, IL-1 $\beta$ -Produktion). Davon erwarteten wir uns Erkenntnisse dazu, ob der Yersinien-vermittelte Zelltod als chemotaktisches oder proentzündliches Ereignis anzusehen ist. Dieses wiederum könnte dazu beitragen herauszufinden, ob der Tod von Yersinien-infizierten Makrophagen für den Wirt oder eher für das Bakterium von Vorteil ist.

YopP hemmt die Aktivität mehrerer essentieller Kinasen (IKK $\beta$ , MAPKK) der unspezifischen Immunität, um so die Immunantwort zu modulieren. Eine Kinase, die eine zentrale Funktion bei der Regulation von Zelltod und zellulärem Überleben einnimmt, ist RIP1. Deshalb sollte in dieser Arbeit auch eruiert werden, inwieweit die Kinase RIP1 in die durch Yersinien vermittelten Effekte eingebunden ist. Außerdem galt es, in einem Zellkulturtransfektionsassay zu analysieren, ob YopP eine Interaktion mit RIP1 eingehen kann.

Zuletzt sollte im Mausinfektionsmodell abgeschätzt werden, ob sich das Einbringen einer Punktmutation in YopP und die dadurch erzeugte Inaktivierung von YopP auf eine Veränderung der Virulenz von *Yersinia in vivo* auswirkt.

Insgesamt versprochen wir uns von diesen Studien neue Einblicke in die Regulation und den Stellenwert des durch Yersinien bei Makrophagen induzierten Zelltods.

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Die Gattung “*Yersinia*“

Bakterien der Gattung *Yersinia* gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* und wurden erstmals 1894 von Alexandre Yersin als Erreger der Pest isoliert (Bottone, 1997). Derzeit sind 10 verschiedenen Yersinien Arten bekannt: *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. rhodei*, *Y. aldovae*. Von diesen haben allerdings nur *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* eine humanpathogene Bedeutung. Die Zugehörigkeit von *Y. ruckeri* zur Gattung der Yersinien ist noch nicht endgültig geklärt (Holt, 1994; Sulakvelidze, 2000).

Als Erreger des “Schwarzen-Todes“ löste *Y. pestis* ab dem 5. Jahrhundert drei große Pest-Pandemien mit mehr als 200 Millionen Todesfällen aus und ist auch heutzutage noch jährlich für schätzungsweise 1000-3000 Todesfälle weltweit verantwortlich (Perry und Fetherston, 1997; Keeling und Gilligan, 2000). Nagetiere, insbesondere Ratten, stellen das natürliche Reservoir von *Y. pestis* dar. Ein Stich des Rattenflohs *Xenopsylla cheopis* überträgt die Pest auf den Menschen (Perry und Fetherston, 1997; Zhou et al., 2006).

Die Erreger vermehren sich an der Eintrittspforte und breiten sich nach einer Inkubationszeit von 2-6 Tagen in die regionalen Lymphknoten aus. Neben schweren allgemeinen Krankheitssymptomen kommt es in den Inguinal-, Femoral- und Axillarlymphknoten zur Ausbildung einer schweren Lymphadenitis. Charakteristisch für das Krankheitsbild der Beulenpest ist die Entstehung geschwollener, druckschmerzhafter Lymphknoten mit einer hämorrhagischen Entzündung, auch Bubonen genannt (Prentice und Rahalison, 2007). Unbehandelt führt die Pest in 50% der Fälle zum Tod (Robert-Koch-Institut 2011b), in 50-90% der Fälle entsteht durch den Einbruch in die Blutbahn aus der Bubonenpest eine Pestseptikämie. Ein weiterer Manifestationsort ist die Lunge. Die Lungenpest hat eine Letalität von 100%, eine aerogene Übertragung von Mensch zu Mensch ist in diesem Falle möglich (Löscher und Burchard, 2010).

*Y. pseudotuberculosis* ist in erster Linie ein tierpathogener Keim und wird nur selten bei menschlichen Infektionen nachgewiesen (Thomas, 2005). Hauptreservoir sind Nager, Kleintiere und Vögel. Wahrscheinlich infizieren sich Menschen durch die Aufnahme kontaminierter Nahrung (Bockemühl und Roggentin, 2004; Hof und Dörris, 2009).



Klinisch manifestiert sich eine *Y. pseudotuberculosis*-Infektion durch eine terminale Ileitis, mesenteriale Lymphadenitis und Pseudoappendizitis. Als typische Komplikation kann eine Septikämie mit Leber- und Milzabzessen auftreten (Murray, 2003).

## **1.2 *Yersinia enterocolitica***

### **1.2.1 Vorkommen, Verbreitung und klinisches Bild**

Bei 1-4 % der Enteritisfälle in Deutschland wird *Y. enterocolitica* nachgewiesen (Thomas, 2005). Im Jahr 2010 wurden in Deutschland insgesamt 3368 Yersinien-Infektionen gemeldet. Dies entspricht einer bundesweiten Inzidenz von 4,1 Erkrankungen pro 100 000 Einwohner (Robert-Koch-Institut 2011a).

Auf Grund seiner biochemischen Eigenschaften wird *Y. enterocolitica* in die folgenden 6 Biovare unterteilt: 1A, 1B, 2, 3, 4 und 5. Über die Oberflächen (O) und die Geißel (H-) Antigene erfolgt eine Serotypisierung. Weltweit rufen von den bisher über 60 beschriebenen O-Serogruppen in erster Linie die Serogruppen O:3; O:9; O:5,27 und O:8 eine Yersiniose des Menschen hervor (Fàbrega und Vila, 2012, Thomas 2005 ). Während weltweit hauptsächlich Serovar O:8 auftritt liegt in Deutschland bei 90% der nachgewiesenen Yersinien-Infektionen eine Infektion mit der Serogruppe O:3 vor (6% Serogruppe O:9; 1% O:5,27). In den letzten Jahren lässt sich eine steigende Anzahl von Infektionen, ca. 1%, durch Serovar O:8 verzeichnen (Fredriksson-Ahomaa et al., 2006, Robert-Koch-Institut 2011a).

*Y. enterocolitica* ist in aquatischen und tierischen Reservoirien weit verbreitet. Das Hauptreservoir scheint allerdings das Schwein darzustellen. Menschen infizieren sich hauptsächlich fäkal-oral. Als mögliche Übertragungsquellen spielen kontaminierte Fleischprodukte, kontaminiertes Trinkwasser, Rohkost, sowie nicht pasteurisierte Milch eine Rolle. Ferner ist eine Übertragung über kontaminierte Bluttransfusionen möglich (Bockemühl und Roggentin, 2004; Herold, 2011).

Nach oraler Aufnahme durchqueren die Bakterien den Gastrointestinaltrakt bis hin zum terminalen Ileum. Hier binden und penetrieren sie die mit den Peyer-Plaques assoziierten Darmepithelzellen der intestinalen Mukosa (M-Zellen). Auf diese Weise erhalten die Yersinien Anschluss an das *Darm-assoziierte lymphatische Gewebe* (GALT). Zunächst erfolgt hier die Replikation. Es kann eine Abzessbildung in den Follikeln oder eine erneute Absonderung ins Darmlumen erfolgen. Aus der Ausbreitung über die abfließenden Lymphgefäße resultiert eine Besiedlung der mesenterialen Lymphnoten. Bei schweren Verläufen kann dies eine Dissemination bis in Leber und Milz, sowie gelegentlich auch in

Lunge und Niere zur Folge haben (Autenrieth und Firsching, 1996; Fábrega und Vila 2012, Leo und Skurnik, 2011).

Klinisch manifestiert sich die akute Yersiniose mit *Y. enterocolitica* ähnlich wie eine Infektion mit *Y. pseudotuberculosis*. Eine *Y. enterocolitica*-Infektion führt jedoch auch zu wässrigen und blutigen Diarrhöen mit kolikartigen Unterbauchschmerzen und Fieber (Herold, 2011). Häufig manifestiert sich eine *Y. enterocolitica*-Infektion erst durch die auftretenden Komplikationen oder durch Spätfolgen, wie reaktive Arthritis, Erythema nodosum, sowie selten Myokarditis oder Glomerulonephritis. Zu fulminanten Verläufen mit Septikämie (teilweise transfusionsbedingt), Pneumonie, Meningitis, oder Osteomyelitis kommt es allerdings nur selten (Bottone, 1997; Bockemühl und Roggentin, 2004).

Da eine Yersinien-Infektion meist selbstlimitierend verläuft, erfolgt eine Antibiotika-Therapie mit Fluorchinolonen oder Cephalosporinen der 3. Generation nur bei komplizierten Verläufen oder Risikopatienten (Fábrega und Vila 2012).

### **1.2.2 Mikrobiologische Nachweisverfahren**

Yersinien sind gramnegative, Katalase-positive und Oxidase-negative, 0,5-0,8 µm breite und 1-3 µm lange Stäbchen (Holt, 1994). Als relativ unkomplizierte Mikroorganismen wachsen sie sowohl aerob, als auch anaerob und sie vermehren sich in einem Temperaturbereich zwischen 0°C und 42°C. Optimalerweise jedoch bei 28°C-30°C. Abgesehen von *Y. pestis* sind Yersinien bei 22-30°C auf Grund ihrer peritrichen Begeißelung beweglich (Murray, 2003).

Der kulturelle Direktnachweis erfolgt bei akuter Yersinien-Enteritis am besten aus Stuhlkulturen. Bei einer systemischen Infektion oder Sepsis kann der direkte Erregernachweis auch aus Blutkulturen, Abzesspunktionen oder Lymphknotenbiopsien erfolgen. Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) Agar dient als Selektionsmedium. *Y. enterocolitica* zeichnet sich durch ca. 2 mm große Kolonien mit rotem Zentrum, umgeben von einer transparenten Zone, auch „Kuhauge“ genannt, aus. MacConkey- und Salmonellen-Agar eignen sich ebenfalls zur Primärdiagnostik. *Y. enterocolitica* imponiert in diesem Falle als Laktose-negative Kolonie.

Bei immunologischen Folgeerkrankungen wie reaktiver Arthritis oder Erythema nodosum ist meist kein direkter Erregernachweis mehr möglich. Hier empfiehlt sich der serologische Antikörper-Nachweis mittels ELISA oder Westernblot. Im Westernblot lassen sich spezifische Banden gegen die *Yersinia* „outer proteins“ H/M/B/D/N und E sowie gegen LcrV (*low-calcium response V antigen*) nachweisen.

Der isolierte Nachweis von IgG-Antikörper-Titern spricht für einen stattgehabten Erregerkontakt. Ein erhöhter IgA-Antikörper-Titer kann auf eine noch bestehende Infektion hinweisen. Auch Folgeerkrankungen wie die reaktive Arthritis scheinen vor allem mit dem Nachweis von IgA-Antikörpern assoziiert zu sein (Murray, 2003; Thomas, 2005).

### **1.3 *Yersinia*-Virulenzfaktoren**

#### **1.3.1 Adhäsion und Invasion**

Die Voraussetzung für eine bakterielle Kolonisation und Infektion des Wirtes ist die Adhäsion an Strukturen oder Oberflächenproteine der Zielzellen. *Y. enterocolitica* verfügt zu diesem Zweck über die Proteine Invasin, YadA und Ail.

Das chromosomal kodierte Invasin (Inv) ist ein wichtiger Adhäsionsfaktor im Initialstadium einer Yersinieninfektion. Die hochaffine Bindung von Invasin an  $\beta$ 1-Integrin-Rezeptoren von M-Zellen hat die Aufnahme der Bakterien in intestinale Darmepithelzellen und in die Mukosa zur Folge (Grassl et al., 2003). Da M-Zellen als einzige Zellen des Dünndarms  $\beta$ 1-Integrin-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren, erklärt sich die hohe Spezifität der Yersinien für diesen Zelltyp (Isberg und Barnes, 2001).

Als weiteres Adhäsin haben Yersinien das durch das pYV-Plasmid (*“plasmid for Yersinia virulence“*) kodierte *Yersinia Adhäsion A* (YadA). YadA bindet an Proteine der extrazellulären Matrix, wie Kollagen, Fibronectin und Laminin. Die Entstehung der reaktiven Arthritis bei Infektion mit *Y. enterocolitica* ist wahrscheinlich mit der an Kollagen bindenden Komponente von YadA assoziiert (El Tahir und Skurnik, 2001).

Zudem vermittelt YadA Serum- und Phagozytoseresistenz. So schützt YadA die Yersinien vor Defensinen und Angriffen durch das Komplementsystem. Die Beschichtung der Bakterienzelle mit YadA stellt vermutlich eine physikalische Barriere dar, die eine Oponisierung und Bildung von *Membran-Attack-Komplexen* (MAC) verhindert. Zusätzlich bindet YadA den Serumkomplementfaktor H und hemmt so die Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg (Leo und Skurnik, 2011).

Eine Interaktion der YadA Moleküle untereinander kann eine Autoagglutination der Yersinien veranlassen. Abszess- und Mikrokoloniebildungen in Lymphknoten und anderen Organen lassen sich wahrscheinlich auf diese Autoagglutination zurückführen (Hoiczkyk et al., 2000; Fábrega und Vila, 2012).

Das dritte Virulenz-assoziierte Adhäsion ist das chromosomal kodierte *“Attachment and Invasion locus“* (Ail). Es existiert nur bei virulenten Yersinien-Stämmen und spielt gegenüber

YadA eine untergeordnete Rolle (Pierson und Falkow, 1993). Wie YadA vermittelt es durch Bindung des Komplementfaktors H eine gewisse Serumresistenz. Ferner ist es an der Adhäsion und Invasion von Wirtszellen beteiligt (Miller und Falkow, 1988; Kirjavainen et al., 2008).

### 1.3.2 Typ III Sekretionssystem und “*Yersinia outer proteins*“ (Yops)

Um ihr Fortbestehen im menschlichen Organismus zu sichern, manipulieren Yersinien Prozesse der angeborenen Immunabwehr. Bei den drei humanpathogenen *Yersinia species* *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* beruht die Modulation des Immunsystems auf demselben Pathogenitätsprinzip. Zu Grunde liegt diesem das Vorhandensein eines Typ-III-Sekretionssystems (TTSS). Ein 70kb großes pYV Virulenzplasmid kodiert für die Proteine des TTSS (Cornelis et al., 1998). Das TTSS dient der Translokation von Virulenzfaktoren, der sogenannten Yops (*Yersinia outer proteins*), direkt in das Zytosol der Wirtszelle.

Das TTSS System besteht aus dem *Yop-Sekretion* (Ysc) Apparat, auch Ysc-Injektisom genannt, aus Effektor-Yops, die durch dieses System sezerniert werden, und aus Translokator-Yops, die an der Translokation der Effektor-Yops in die Wirtszelle beteiligt sind (Cornelis, 2002a). Die Freisetzung der Yops erfolgt bei 37°C. *In vitro* kann die Sekretion in Ca<sup>2+</sup> freiem Medium ausgelöst werden. *In vivo* führt jedoch erst der unmittelbare Kontakt mit den Zielzellen zur Yop-Sekretion (Rosqvist et al., 1994).

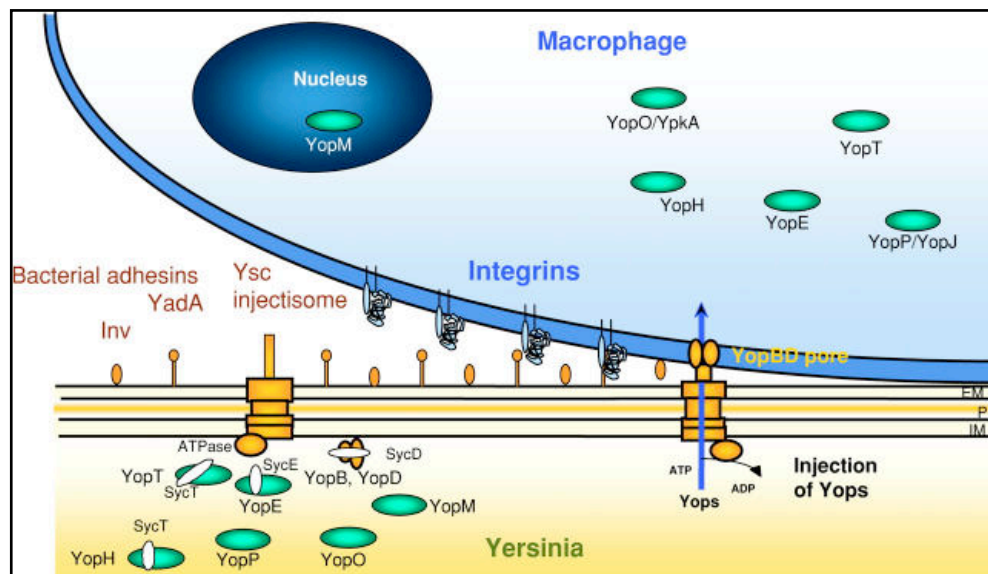
Das Ysc-Injektisom besitzt eine nadelartige Struktur, über welche die Yops aus der Bakterienzelle ausgeschleust und in die Zielzelle eingebracht werden können (Cornelis, 2002b). Damit die Yops in die Zielzellen gelangen, bilden die sogenannten Translokator-Yops YopB, YopD und LcrV eine stabile Pore in der Zellmembran. Über diese Pore gelangen die Effektorproteine schließlich in die Zielzelle (Viboud und Bliska, 2005). Einmal in die Zielzelle gelangt, inhibieren die sechs Effektor Proteine (YopE, YopT, YopO, YopH, YopP und YopM) eine Vielzahl zellulärer Abwehrmechanismen durch Modulation verschiedener Signaltransduktionsprozesse. So interferieren die Yops mit Zytoskelettlagerungsprozessen, der Zytokinproduktion und dem zellulärem Überleben (Aepfelbacher et al., 2007).

YopH, YopE, YopT und YopO hemmen regulatorische Signalmoleküle des Aktinzytoskelett und inhibieren so gemeinsam die Phagozytose und Abtötung der Yersinien. YopE, YopT und YopO interagieren dafür mit Rho-GTPasen. Diese sind an der Regulation der Zytoskelettdynamik, sowie von Zellzyklus- und Vesikeltransportvorgängen beteiligt (Cornelis 2002, Aepfelbacher 2005). YopT ist eine Cysteinprotease, die auf die Rho-GTPasen RhoA,

Rac1 und Cdc42 einwirkt. Durch die proteolytische Trennung der Rho-GTPasen von der Membran kommt es zu deren Inaktivierung und dadurch zur Zerstörung des Aktinzytoskeletts (Viboud und Bliska, 2005). YopO ist eine autophosphorylierende Serin-Threonin-Kinase. Sie wird durch Aktin-Bindung aktiviert (Juris et al., 2000). Durch seine Interaktion mit Rho-GTPasen unterstützt YopO die Zerstörung des Aktinzytoskeletts. YopO wird bei *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* als *Yersinia Proteinkinase A* (YpkA) bezeichnet. YopH ist eine Tyrosinphosphatase, die fokale Adhäsionsproteine wie Fak und Fyb dephosphoryliert. Die dadurch bedingte Zerstörung von fokalen Adhäsionskomplexen fördert die Phagozytoseresistenz von *Yersinia*.

Die Funktion von YopM ist noch weitestgehend ungeklärt. Es wird über Membranvesikel in den Zellkern transportiert. Hier beeinflusst es möglicherweise die Genexpression und dadurch Zellwachstum und Zellzyklus (Aepfelbacher et al., 2007; Cornelis, 2002b).

YopE und YopP werden in den folgenden Kapiteln ausführlicher besprochen.



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung des Yop-Sekretionsapparats (Cornelis, 2002b). Bei 37°C werden die Yops synthetisiert. Im Zytoplasma der Bakterienzelle sind die Yops an Chaperone (Syc) gebunden. Inv und YadA vermitteln die Bindung an die Zielzelle. Durch eine Pore in der Zellmembran, gebildet von YopB und D, werden die Yops ins Zytosol der Zielzelle sezerniert.

### 1.3.3 YopE

YopE kann, gemeinsam mit YopT, YopH und YopO, auf das Aktinzytoskelett einwirken und dadurch die Phagozytose durch Makrophagen verhindern. Zielmoleküle der

immunmodulatorischen Aktivität von YopE sind die Rho-GTPasen. Rho-GTPasen sind an der Organisation des Aktinzytoskeletts maßgeblich beteiligt.

In aktivem Zustand liegen die Rho-GTPasen GTP (Guanosintriphosphat) gebunden vor. GTPase-aktivierende Proteine (GAP) hydrolysieren GTP zu GDP (Guanosindiphosphat) und überführen die GTPasen somit in einen inaktiven Zustand. YopE wirkt als GAP auf RhoA und Rac1 ein und bewirkt so deren Inhibition (Cornelis, 2002b). Die RhoA- und Rac1-Inaktivierung hat eine Störung der Aktinmikrofilamentbildung zur Folge und begünstigt dadurch die Phagozytoseresistenz von *Y. enterocolitica* (Zumbihl et al., 1999; Black und Bliska, 2000).

Da Rac1 auch eine Rolle bei der Caspase-1-abhängigen *Interleukin-1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ )-Prozessierung und -Freisetzung spielt, bewirkt die Hemmung von Rac1 durch YopE zudem eine verminderte IL-1 $\beta$ -Produktion und damit eine Unterdrückung der proinflammatorischen Immunantwort (Aepfelbacher et al., 2007; Schotte et al., 2004).

Zudem ist YopE, vermutlich durch Inaktivierung der Rho-GTPasen, an der Schließung der Yop-Translokationspore beteiligt. Offenbar üben Rho-GTPasen einen aktivierenden Effekt auf die Translokationspore aus, so dass die Hemmung der Rho-GTPasen durch YopE einen Abbruch der Yop-Translokation zur Folge hat. YopE spielt somit eine Rolle bei der Kontrolle der Yop-Translokation (Aepfelbacher et al., 2011; Gaus et al., 2011).

Interessanterweise kann intrazelluläres YopE durch Polyubiquitinierung markiert und durch das Proteasom der Wirtszelle abgebaut werden. Auf diese Weise wird YopE aus der Zelle entfernt und die Yop-Translokationspore bleibt durchlässig. Somit ist eine länger dauernde Yop-Translokation möglich, was zur Aufrechterhaltung der Virulenz von *Yersinia* beiträgt (Ruckdeschel et al., 2006). Allerdings wird nur YopE der *Y. enterocolitica* Serogruppe O:8, aber nicht der Serogruppen O:3 und O:9, durch Ubiquitinierung modifiziert und durch das Proteasom der Zelle inaktiviert (Gaus et al., 2011)

#### **1.3.4 YopP**

Zusätzlich zu ihrem Einfluss auf das Aktinzytoskelett und die Phagozytose können Yersinien durch YopP bzw. YopJ wichtige proinflammatorische Signalwege unterbrechen. YopP von *Y. enterocolitica* wird bei *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* als YopJ bezeichnet.

Einer Infektion von Immunzellen mit Bakterien hat normalerweise eine Aktivierung der proentzündlichen “Mitogen-activated protein kinase“ (MAPK)- und “Nuclear factor- $\kappa$ B“ (NF- $\kappa$ B)- Signaltransduktionswege zur Folge. Das 34kDa große YopP inhibiert die MAPK-

und NF- $\kappa$ B-Signalwege durch Acetylierung zellulärer Kinasen. Infolgedessen wird die Produktion von wichtigen proinflammatorischen Zytokinen, wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1, IL-8 und IL-10, unterdrückt (Aepfelbacher et al., 2007; Ruckdeschel et al., 2008). Durch die Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionsweges wird zudem bei Makrophagen Apoptose ausgelöst (Gröbner et al., 2007; Zhang et al., 2005). Siehe dazu auch Kapitel 1.9 (Yersinien-induzierte Apoptose).

### 1.3.5 YopQ

YopQ (entspricht YopK bei *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) gehört im engeren Sinn nicht zu den Effektorproteinen, es wird aber auch über das TTSS sezerniert. YopQ interagiert mit Proteinen der Translokationspore und verhindert die Stimulation proinflammatorischer Signalwege, welche sonst vom TTSS durch Porenbildung in der Wirtszellmembran aktiviert werden (Inflammasom und Pyroptose, siehe auch nachfolgende Kapitel 1.7.3 und 1.8). So gewährleistet YopQ eine verminderte Produktion von IL-1 $\beta$ , was das Überleben der Yersinien im Wirt begünstigt (Brodsky et al., 2010).

## 1.4 Das angeborene Immunsystem

Um das Eindringen und die Ausbreitung pathogener Erreger zu verhindern verfügt das humane Immunsystem über eine angeborene und eine erworbene Immunität. Das angeborene Immunsystem besteht zum einen aus den physikalischen und chemischen Barrieren wie einer intakten Haut und Schleimhaut, und dort befindlichen bakteriziden Säuren, Enzymen und Peptiden. Auch das Komplementsystem zählt zur angeborenen, unspezifischen Immunität. Proteine des Komplementsystems binden an die Oberfläche von Mikroorganismen und führen über die Ausbildung des „*membran attack complex*“ (MAC) zur Porenbildung in der Membran und damit zur Lyse des Erregers. Gleichzeitig werden über das Komplementsystem Makrophagen, neutrophile Granulozyten und andere phagozytierende Immunzellen rekrutiert. Die Bindung an spezifische Komplementproteine löst zudem Signale aus, die zur Opsonisierung und Phagozytose der Mikroorganismen durch diese Zellen führen.

Darüber hinaus erkennt das angeborene Immunsystem Pathogen-assoziierte Muster (PAMPs, „*pathogen associated molecular patterns*“). Bei PAMPs handelt es sich um hoch konservierte Bestandteile von Mikroorganismen wie bakterielle Peptide, Lipopolysaccharid (LPS), Lipoteichonsäure, Peptidoglykan, Flagellin und Nukleinsäuren von Viren und Bakterien. Sie werden von „*Pattern recognition receptors*“ (PRR) auf Phagozyten erkannt.

Wichtige Vertreter der PRR sind die *“Toll-like“* Rezeptoren (TLR), siehe auch Kapitel 1.5. Die Aktivierung von Makrophagen über TLRs, aber auch durch T-Zell Zytokine wie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), induziert über spezifische Signalkaskaden (siehe auch Kapitel 1.5) die Aktivierung von MAPK und von NF- $\kappa$ B. Dadurch wird im Zellkern die Transkription zahlreicher proinflammatorischer Proteine ausgelöst. Die inflammatorische Immunreaktion hilft dem Organismus, weitere Immunzellen zu rekrutieren, um schließlich durch Phagozytose eine Eliminierung des pathogenen Mikroorganismus erreichen zu können. Aktivierte Makrophagen sezernieren vor allem die Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ . Diese Zytokine sind maßgeblich an der Generierung einer Entzündungsreaktion beteiligt. In der Leber induzieren sie die Freisetzung der *“Akuten-Phase-Proteine“*, wie dem C-reaktiven Protein (CRP) und von Mannan-bindenden Lektinen (MBL). Durch Wirkung auf den Hypothalamus wird Fieber ausgelöst. Im Knochenmark wird die Bildung von neutrophilen Granulozyten (Leukozyten) und deren Mobilisation ins Blut induziert.

IL-1 und TNF $\alpha$  erhöhen die Permeabilität der Blutgefäße. Es kommt lokal zu einer vermehrten Durchblutung und Ödembildung. Durch die erhöhte Gefäßpermeabilität können verstärkt Immunzellen in das entsprechende Gewebe einwandern. Über die freigesetzten Entzündungsmediatoren können so weitere Abwehrzellen rekrutiert und die Beseitigung der Erreger gewährleistet werden.

Die erworbene Immunität wird vor allem durch B- und T-Lymphozyten vermittelt. Ihre Wirkung beruht größtenteils auf spezifisch gebildeten Antikörpern und auf der Eliminierung von infizierten Zellen der Mikroorganismen durch zytotoxische T-Zellen. Es besteht immer eine enge Verknüpfung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. So können Makrophagen beispielsweise durch T-Helferzellen aktiviert werden. Makrophagen können durch Endozytose und intrazelluläre Prozessierung Bestandteile der aufgenommenen Mikroorganismen auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und so wiederum B- und T-Lymphozyten aktivieren (Pezzutto et al., 2006; Rassow et al., 2008; Hof und Dörris, 2009).

## **1.5 *“Toll-Like“* - Rezeptor System**

Um den Organismus vor eindringenden Mikroorganismen zu schützen hat das Immunsystem vielfältige Strategien entwickelt. Damit eine Immunantwort generiert werden kann, müssen Krankheitserreger zunächst erkannt werden. Aus diesem Grunde exprimieren Makrophagen und andere Immunzellen auf ihrer Oberfläche sogenannte *“Toll-like“* Rezeptoren (TLR). Die Gruppe der TLR-Rezeptoren umfasst 10 verschiedenen Transmembranrezeptoren aus der

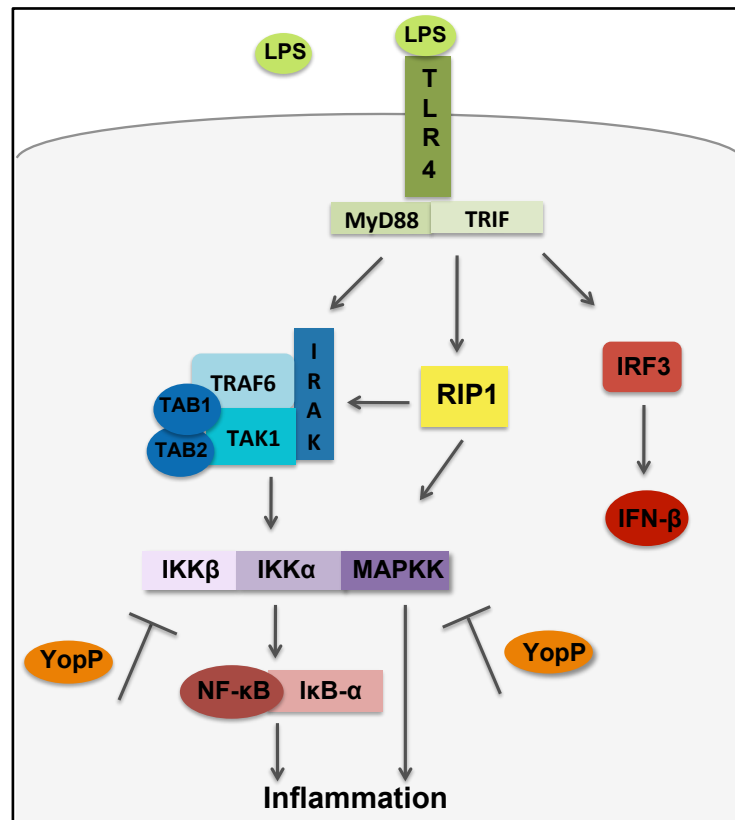


Gruppe der PRRs, die allesamt unterschiedliche Pathogen-assoziierte Muster (PAMPS) von Bakterien, Viren oder Pilzen erkennen (Takeuchi und Akira, 2001; Salaun et al., 2007; Labbé und Saleh, 2008).

Bei Infektionen mit gram-negativen Bakterien spielt vor allem TLR4 eine wichtige Rolle. TLR4 wird durch Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der Zellmembran gram-negativer Bakterien, aktiviert (Faure et al., 2000). Extrazellulär verfügt der TLR4 über einen Bereich Leucin-reicher Sequenzen (LRRs). Zytoplasmisch exprimiert TLR4 eine "*Toll/IL-1-Receptor*" (TIR) Domäne. Die Bindung von LPS aktiviert komplexe Signalkaskaden. Dabei kann ein MyD88 ("*myeloid differentiation primary response gene 88*")-abhängiger und ein MyD88-unabhängiger Signalweg initiiert werden. So führt eine extrazelluläre LPS-Bindung zur Rekrutierung der Adaptermoleküle MyD88 und TRIF ("*TIR-domain-containing adapter inducing interferon  $\beta$* ") an die zytoplasmische TIR Domäne, siehe auch Abb. 1.2.

MyD88 rekrutiert über seine "*Death Domain*" (DD) IRAK4 ("*IL-1 receptor associated kinase 4*"). In diesem Komplex kann IRAK4 durch Phosphorylierung aktiviert werden und so selbst IRAK1 aktivieren (Takeda und Akira, 2004b). Dieser Prozess führt schließlich zur Aktivierung von TRAF6 ("*TNF-receptor-associated factor 6*") (Cao et al., 1996; Takeda und Akira, 2004a, 2004b). Gemeinsam mit anderen E2 Ubiquitin-Protein Ligasen aktiviert TRAF6 einen Komplex aus TAK1 ("*TGF- $\beta$ -activated Kinase 1*") und TAB 1,2,3 ("*TAK 1 binding protein*") (Chen, 2005). Der TAK1/TAB Komplex stimuliert einerseits eine Aktivierung von MAPK ("*Mitogen activated protein kinase*") und über die Aktivierung von IKK ("*I $\kappa$ B kinase*") den NF- $\kappa$ B Signalweg. Der aktivierte IKK-Komplex, bestehend aus IKK  $\alpha$  und  $\beta$  sowie IKK $\gamma$  (NEMO), phosphoryliert I $\kappa$ B- $\alpha$  und I $\kappa$ B- $\beta$  ("*inhibitor of  $\kappa$ B*"), welche NF- $\kappa$ B inhibieren. Durch die Phosphorylierung wird NF- $\kappa$ B abgespalten und kann in den Zellkern gelangen. Im Zellkern wirkt NF- $\kappa$ B als Transkriptionsfaktor und induziert die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 (Brown et al., 2011). Durch die Zytokinfreisetzung kommt es zu Etablierung einer inflammatorischen Immunantwort.

TAK1 induziert zudem die MAPK-Signalwege p38, JNK (c-Jun N-terminale Kinasen) und ERK ("*extracellular signal regulated kinase*") durch Phosphorylierung der den MAPK vorgeschalteten MAPK-Kinasen (MAPKKs). Die MAPK kontrollieren Prozesse, die mit der inflammatorischen Immunantwort assoziiert sind, wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zelltod und die Freisetzung der proinflammatorischen Proteine IL-6 und IL-8 (Li et al., 2010).



**Abbildung 1.2: TLR4-Signalkaskade.** Die TLR4 Signalkaskade wird über LPS aktiviert. Der Komplex aus IRAK, TRAF und TAK1 mit den Adapterproteinen TAB1/2 bewirkt die Aktivierung von MAPK und NF- $\kappa$ B Signalwegen und somit eine inflammatorische Reaktion. Gleichzeitig wird über das Adaptermolekül TRIF, IRF3 aktiviert und IFN- $\beta$  freigesetzt.

Unabhängig von MyD88 können TRAM (*“Trif related adapter molecule“*) und TRIF (*“TIR domain containing adaptor inducing IFN $\beta$ “*) an den TLR4 Rezeptor rekrutiert werden. TRAM und TRIF aktivieren so das *“Receptor-interacting-Protein 1“* (RIP1). RIP1 seinerseits aktiviert NF- $\kappa$ B. Gleichzeitig kann durch RIP1 eine Signalkaskade zur Apoptoseaktivierung eingeleitet werden, (siehe auch im nächsten Kapitel) (Meylan und Tschopp, 2005). Eine Interaktion zwischen TRIF und TRAF3 führt zudem zur Phosphorylierung von IRF3 (*“Interferon Regulatory Factor“*). IRF3 wiederum induziert die Produktion von Interferon (IFN)- $\beta$  (Salaun et al., 2007).

## 1.6 *“Receptor-interacting“* Protein 1 (RIP1)

RIP1 ist eine Serin-Threonin-Kinase, die in vielen Geweben konstitutiv exprimiert wird. Als wichtiger Sensor für Zellstress wird RIP1 bei Stimulation von TLR4 und TLR3, sowie bei

TNF- (*“Tumor necrosis factor“*) - Exposition aktiviert. Die Kinase spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Entscheidung, ob die Zelle nach Stimulation stirbt oder überlebt.

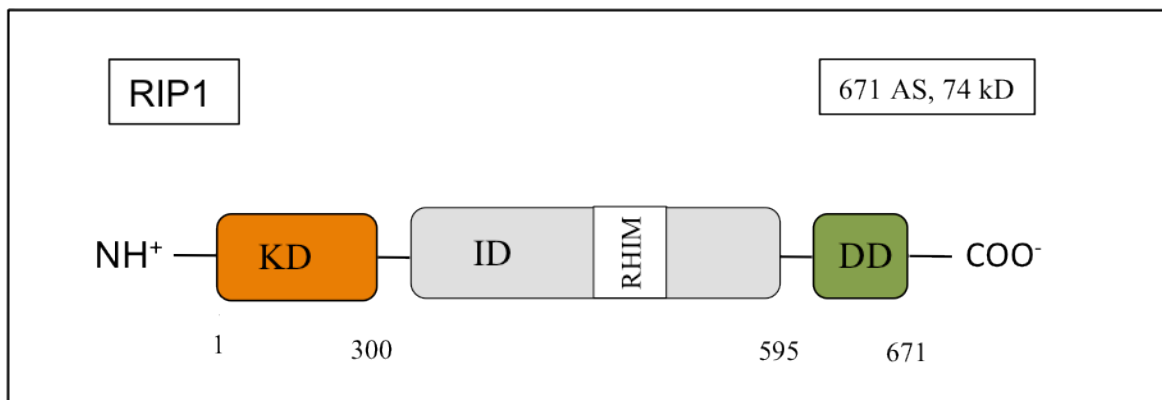
RIP1 ist eine ca. 74 kDa große, aus 671 Aminosäuren (AS) bestehende Kinase. Es besitzt eine N-terminale Kinasedomäne (AS 1-300), gefolgt von einer Intermediärdomäne (AS 301-595). In der Intermediärdomäne findet sich das *“RIP homotypic interaction motif“* (RHIM) das eine Interaktion mit TRIF und RIP3 ermöglicht (siehe Abb. 1.3). C-terminal schließt sich die DD-Domäne (*“Death Domain“*) an (AS 596-671). Über diese Domäne kann RIP1 mit anderen Proteinen interagieren, die ebenfalls eine DD besitzen (z.B. TRADD (*“TNF receptor associated death domain“*) und TRAF) (Meylan und Tschopp, 2005; Festjens et al., 2007).

Sowohl TLR-, als auch TNF-Rezeptor-vermittelt kann RIP1 über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, Zellüberleben und Inflammation induzieren. Andererseits kann RIP1 aber auch Signalkaskaden einleiten, die zu Apoptose oder Nekrose führen. Die TNF-Rezeptoren gehören zur Gruppe der sogenannten *“Death-Receptors“*. Bindet TNF- $\alpha$  an den Rezeptor, kann die Bildung zweier verschiedener Signalkomplexe zwei unterschiedliche Signale aktivieren.

Komplex I signalisiert zelluläres Überleben. Nach Bindung von TNF- $\alpha$  bildet sich Komplex I aus RIP1, TRADD und TRAF2. Komplex I induziert eine schnelle Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die Expression von antiapoptotischen Proteinen wie c-FLIP (*“cellular Fas-associated death-domain-like-IL-1 $\beta$ -converting enzyme inhibitory protein“*) und cIAP1 und cIAP2 (*“cellular inhibitor of apoptosis protein“*). Parallel dazu kann RIP1 verschiedene MAPK aktivieren: p38, JNK und ERK. Ist durch die NF- $\kappa$ B-Aktivierung keine ausreichende Produktion antiapoptotischer Proteine möglich, bildet sich Komplex II, bestehend aus RIP1, TRADD, FADD (*“Fas-associated death domain“*), TRAF2 sowie den Caspasen-8 und 10. Die Aktivierung von Caspase-8 und 10 führt zur Apoptoseinduktion. Gleichzeitig mit der Apoptoseinduktion wird durch Caspase-8 RIP1 prozessiert und die *“Death Domain“* abgespalten. Dadurch wird der antiapoptotische Weg blockiert (Meylan und Tschopp, 2005; Festjens et al., 2007; Van Herreweghe et al., 2010).

Eine Stimulation des TLR4 oder TLR3 führt ebenfalls zu einer RIP1-vermittelten NF- $\kappa$ B Aktivierung oder Apoptoseinduktion. Über die RHIM-Domäne interagiert TRIF mit RIP1 und aktiviert NF- $\kappa$ B. Umgekehrt kann RIP1 nach TLR-Stimulation auch mit FADD interagieren. Daraus resultiert die Prozessierung und Aktivierung von Caspase-8 und damit Caspase-8 abhängige Apoptose (Meylan et al., 2004; Meylan und Tschopp, 2005). Kommt es bei Stimulation der Todesrezeptoren, wie dem TNF- oder Fas-Rezeptor, nur zu einer

unzureichenden Aktivierung von Apoptose oder sind die Caspasen durch spezifische Inhibitoren blockiert, führt dies zu Zelltod durch Nekroptose. Nekroptose ist eine Caspase-unabhängige Form des programmierten Zelltodes, die morphologisch der Nekrose gleicht. Siehe dazu auch Kapitel 1.7.2. Der Pancaspase Inhibitor zVAD-fmk beispielsweise verhindert durch Blockierung der Caspasen Apoptose und leitet über zu Nekroptose (Berghe et al., 2010a; Hitomi et al., 2008; Vandenabeele et al., 2010, 2006). Die Einbindung von RIP1 in die verschiedenen Signalwege ist in Abb. 1.2. und später in 1.4 skizziert. Während die RIP1-Kinaseaktivität für die NF- $\kappa$ B Aktivierung nicht erforderlich ist, erscheint sie essenziell für die Ausführung von Nekroptose. Die RIP1-Kinasedomäne liegt unter normalen Bedingungen offenbar inaktiviert vor. Signale des TNF-Rezeptors hingegen können diese Inaktivierung aufheben und dadurch Nekrose herbeiführen (Christofferson und Yuan, 2010). Die Autophosphorylierung der RIP1-Kinasedomäne und auch die Auslösung Nekroptose können durch den Inhibitor Necrostatin-1 gehemmt werden (Degterev et al., 2008). RIP1 kann also in vielfältiger Weise Einfluss auf die Zellvitalität ausüben. Möglicherweise stellt RIP1 auch bei der Yersinien-induzierten Apoptose ein zentrales Kontrollelement dar, über dessen Modulation NF- $\kappa$ B inaktiviert und Apoptose ausgelöst wird.



**Abbildung 1.3: Die Proteinkinase RIP1.** RIP1 ist eine 74 kD schwere, aus 671 Aminosäuren bestehende Kinase. Die N-terminale Kinasedomäne (KD) wird durch eine Intermediärdomäne (ID) von der C-terminalen "Death Domain" getrennt. Die ID enthält das *RIP homotypic interaction motif* (RHIM), über welches RIP3 und TRIF gebunden werden können.

## 1.7 Zelltod

Zelltod ist ein physiologischer Prozess zur Kontrolle der Zellzahl und zur Aufrechterhaltung der Homöostase in Geweben. Überschüssige, mutierte oder defekte Zellen können auf diese Weise entfernt werden (Vaux und Korsmeyer, 1999; Van Herreweghe et al., 2010). Gleichzeitig dient Zelltod auch der Abwehr von Infektionen. Durch den Tod von infizierten

Zellen kann die Vermehrung und Ausbreitung der Mikroorganismen im Gewebe verhindert werden (Torchinsky et al., 2010). Es werden drei Formen des Zelltods unterschieden: Apoptose, Nekrose und Pyroptose. Die Form des Zelltodes ist von verschiedenen Faktoren, wie z.B. der Art und Menge des Erregers, dem Ort der Infektion und von Einflüssen aus der Umgebung abhängig (Labbé und Saleh, 2008).

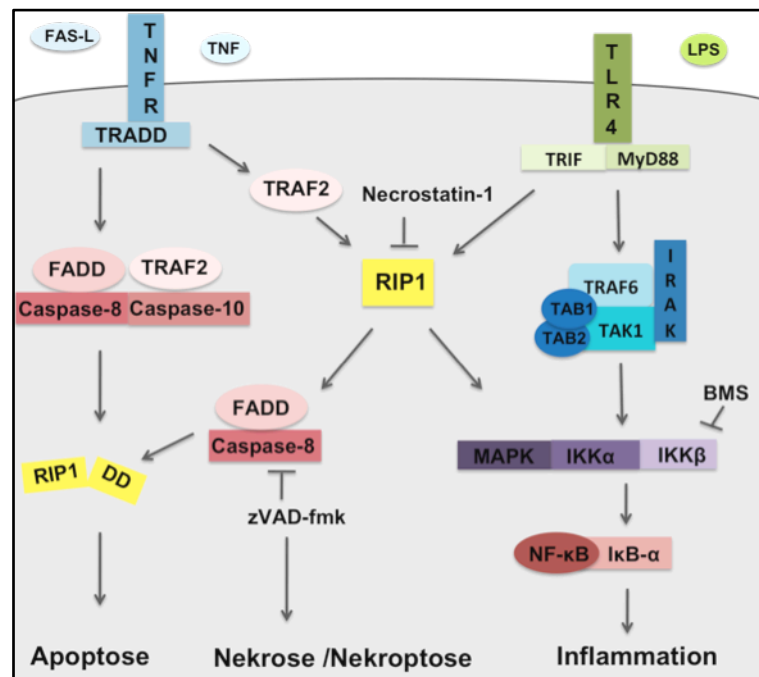
### 1.7.1 Apoptose

Apoptose kann durch bestimmte extrazelluläre Reize, wie Zytokine, UV-Strahlung, aber auch bakterielle Infektionen, in Gang gesetzt werden. Morphologisch kennzeichnend für Apoptose ist ein Umbau der Zellstruktur. Es kommt zur Zellschrumpfung (Pyknose), Kernverdichtung (Kondensation) und Fragmentierung (Karyorhexis). Die gebildeten "*Apoptotic Bodies*" (abgeschnürte Membranvesikel) werden von umliegenden Zellen phagozytiert. Infolgedessen kommt es nicht zur Freisetzung des zytoplasmatischen Inhalts der sterbenden Zelle, so dass im Anschluss an Apoptose im Allgemeinen eine Entzündungsreaktion ausbleibt (Savill et al., 2002; Lamkanfi und Dixit, 2010; Van Herreweghe et al., 2010).

Apoptose kann sowohl über einen extrinsischen, "*Death-Receptor*"-vermittelten, als auch über einen intrinsischen, mitochondrialen Weg ausgelöst werden (Lamkanfi und Dixit, 2010), siehe Abbildung 1.4. Die zentralen Effektorproteine der Apoptose, sogenannte Caspasen, sind Cysteinproteasen, die die Weiterleitung der proapoptotischen Signale und die Ausführung des Apoptoseprogramms vermitteln. Zur Einleitung des extrinsischen Signalweges stimulieren Liganden wie FasL (Fas-Ligand) oder TNF die zugehörigen Todesrezeptoren, und der so genannte DISC ("*death inducing signaling complex*") wird gebildet (Duprez et al., 2009). Dabei werden über das Adapterprotein FADD die Caspasen 8 und 10 rekrutiert und aktiviert. Die aktiven Caspasen können nun die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 induzieren, die schließlich die Spaltung verschiedener Substrate vermitteln und so biochemisch und morphologisch Zelltod herbeiführen.

Yersinien sind in der Lage, Apoptose von Makrophagen und dendritischen Zellen auszulösen. Dies geschieht zu einem Großteil über die Hemmung des antiapoptotischen NF- $\kappa$ B-Signalweges durch YopP/J. Der NF- $\kappa$ B Signalweg vermittelt unter physiologischen Bedingungen zelluläres Überleben durch die Induktion der Bildung antiapoptotischer Proteine aus der Bcl-, IAP- und TRAF-Familie. So kann NF- $\kappa$ B unter Stressbedingungen ein Überleben der Zelle sichern (Martinon und Tschopp, 2004; Labbé und Saleh, 2008; Lamkanfi und Dixit, 2010).

Auf die molekulare Aktivität von YopP/J wird in Kapitel 1.9. näher eingegangen.



**Abbildung 1.4:** Einbindung von RIP1 in die TNFR- und TLR4-Signalkaskaden. Die Proteinkinase RIP1 kann im TNFR- und TLR4-Signalweg sowohl Apoptose, als auch Nekrose bzw. auch Inflammation und zelluläres Überleben vermitteln.

### 1.7.2 Nekrose

Nekrose ist in den meisten Fällen auf einen passiven Zelltod zurückzuführen. Externe Reize wie Hitze, chemische Stoffe, aber auch Mikroorganismen, und interne Schädigung durch Ischämien, Neoplasien oder Hypoxien führen zu Zelltod durch Nekrose (Lamkanfi und Dixit, 2010). Es kommt zur Schwellung und Ruptur der Zelle. So werden intrazelluläre Bestandteile an die Umgebung abgegeben. Diese intrazellulären Bestandteile, auch *“damage-associated molecular patterns“* (DAMPs) genannt, beinhalten DNA-Fragmente, ATP (Adenosintriphosphat), IL-1 $\alpha$  oder mitochondriale Bestandteile. Sie rufen eine Entzündungsreaktion mit starker Gewebeschädigung hervor. Gleichzeitig können sie über Aktivierung von PRRs eine proinflammatorische Immunantwort zur Beseitigung von Mikroorganismen auslösen (Duprez et al., 2009; Fink und Cookson, 2005; Kaczmarek et al., 2013).

Eine Sonderform der Nekrose ist an die Kinaseaktivität von RIP1 geknüpft. Da es sich um eine regulierte Form des Sterbens handelt, wird diese Art des Zelltods als Nekroptose bezeichnet. Bei Nekroptose scheinen ROS (*“Reactive oxygen species“*) an der Durchführung des Zelltods beteiligt zu sein (Berghe et al., 2010; Christofferson und Yuan, 2010). Der RIP1-Kinase-Inhibitor Nekrostatin-1 blockiert sowohl die Durchführung der Nekrose als auch die Autophosphorylierung von RIP1. Er stellt somit ein wichtiges Hilfsmittel dar, um die in Nekroptose und in RIP1-vermittelten Zelltod involvierten Prozesse genauer zu untersuchen (Degterev et al., 2008; Wang et al., 2007).

Physiologischerweise scheint Nekroptose die Beseitigung beschädigter Zellen zu gewährleisten, wenn unter bestimmten Bedingungen Apoptose nicht ausgeführt werden kann, z.B. bei manchen viralen Infektionen oder bei Verwendung des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk. Nekroptose dient somit offenbar als *“Back-up“* Zelltod-Mechanismus des Organismus (Labbé und Saleh, 2008; Duprez et al., 2009; Lamkanfi und Dixit, 2010).

### **1.7.3 Pyroptose**

Pyroptose ist eine Caspase-1-abhängige Form des Zelltodes, die durch eine Zusammenlagerung des sogenannten Inflammasoms (ein zytosolischer Protein Komplex, siehe Kapitel 1.8) gekennzeichnet ist. Die Bildung des Inflammasoms wird durch Rezeptoren der NLR-Familie (*“Nod-like receptor family“*) induziert, die wiederum durch intrazelluläre bakterielle oder virale Partikel, sowie durch DAMPS aktiviert werden (Duprez et al., 2009).

Aktiviert Caspase-1 induziert sowohl die Prozessierung und Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18, als auch die Ausführung des pyroptotischen Zelltods (Schroder und Tschopp, 2010). Dabei kommt es Caspase-1-abhängig zur Porenbildung in der Plasmamembran. Die folgende osmotische Zellschwellung führt zur Membranruptur und hat die Abgabe von zytoplasmatischem Inhalt und proinflammatorischen Zellbestandteilen zur Folge. Daher folgt der Pyroptose eine starke inflammatorische Reaktion. Morphologisch ist Pyroptose, ähnlich der Nekrose, durch eine Schwellung der Zelle und den Verlust der Membranintegrität gekennzeichnet (Labbé und Saleh, 2008; Bryant und Fitzgerald, 2009; Kepp et al., 2010).

Unter welchen Bedingungen die Aktivierung von Caspase-1 zur Auslösung von Pyroptose führt ist noch nicht genau bekannt. Es wird diskutiert, dass Pyroptose dann stattfindet, wenn Inflammations-kontrollierende Mechanismen versagen, die bei einer überschießenden

Immunantwort die Entzündungsreaktion eingrenzen sollen (Kepp et al., 2010; Khare et al., 2010; Schroder und Tschopp, 2010).

## **1.8 Das Inflammasom - Alarmsignale von Zellen**

PAMPs (“*pathogen-associated molecular patterns*“) ermöglichen es dem Immunsystem das Eindringen von Pathogenen zu erkennen. Zu den PAMPs gehören allgemein bakterielle Peptide, LPS, Lipoteichonsäure, Peptidoglykane, Flagellin und Nukleinsäuren von Viren oder Bakterien. Über Bindung an Rezeptoren der NLR-Familie induzieren PAMPs Signalkaskaden, die zur Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 führen. Neben exogenen Stimuli können auch DAMPs als endogene Signale entsprechende Reaktionen auslösen. Es ist anzunehmen, dass das Zusammenspiel aus endogenen und exogenen Gefahrensignalen erst eine möglichst effiziente Immunreaktion hervorruft (Di Virgilio, 2007).

Bei der Stimulation mit PAMPs kommt es zunächst, NF- $\kappa$ B-vermittelt zu einer erhöhten Transkriptionsrate des Pro-IL-1 $\beta$  Genes (Khare et al., 2010). Noch inaktives Pro-IL-1 $\beta$  akkumuliert so im Zytosol der Zelle. Ein weiteres Gefahrensignal, z.B. ausgelöst durch DAMPs, induziert eine Aktivierung des “*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*“ (NLRP3) Inflammasoms (Abdul-Sater et al., 2009). Über das Adapterprotein Asc bildet die katalytisch inaktive Caspase-1 einen Komplex mit dem NLRP3 Inflammasom und kann so autokatalytisch aktiviert werden (Netea et al., 2010; Stutz et al., 2009). Caspase-1 in seiner aktiven Form prozessiert dann Pro-IL-1 $\beta$  zum aktiven IL-1 $\beta$  (Martinon und Tschopp, 2004). Als wichtiges proinflammatorisches Zytokin und Pyrogen aktiviert IL-1 $\beta$  einerseits Neutrophile, Granulozyten und Makrophagen, andererseits induziert es eine TH1- und TH17-adaptierte Immunantwort (Netea et al., 2010; Stutz et al., 2009).

Als weitere Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms gelten Uratkristalle bei Hyperurikämie. Auch UV-Strahlung, Asbestose und Silikose, sowie metabolischer Zellstress können das Inflammasom aktivieren (Schroder und Tschopp, 2010). Dabei ist auch ATP ein Inflammasom-Aktivator. Bei Zellstress, Entzündungen und Zelltod kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von ATP aus dem Intra- in den Extrazellulärraum (la Sala et al., 2003). Da ATP im Extrazellulärraum normalerweise nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden ist, wirkt eine erhöhte ATP-Konzentration als “*Find-me*“- Signal auf umliegende Immunzellen. Selbst durch Apoptose sterbende Zellen setzen ATP frei, sodass apoptotische Zellen aufgespürt und beseitigt werden können (Elliott et al., 2009). Wie solche “*Find-me*“-



Signale von apoptotischen Zellen abgegeben werden, war lange nicht bekannt. Erst kürzlich wurden Pannexin-Kanäle als mögliche Kanäle identifiziert, welche ATP bei apoptotischen Zellen aktiv freisetzen (Chekeni et al., 2010).

Extrazelluläres ATP wird vom P2X<sub>7</sub>-Rezeptor gebunden (Bulanova et al., 2005; Rizzo et al., 2009). Der P2X<sub>7</sub>-Rezeptor gehört zur Gruppe der P2-Rezeptoren und ist ein ATP-regulierter Ionenkanal (Di Virgilio et al., 2001), der das NLRP3 Inflammasom aktiviert (Mariathasan et al., 2006).

Wie genau die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms durch so viele unterschiedliche Stimuli erfolgt, bleibt noch unklar. Diskutiert wird eine indirekte Aktivierung durch freigesetzte Sauerstoffradikale oder durch lysosomale Bestandteile, welche einen Efflux von Kaliumionen auslösen (Bryant und Fitzgerald, 2009).

Neben NLRP3 kann auch NLRC4 eine Inflammasomaktivierung auslösen. NLRC4 reagiert auf bakterielle Flagelline oder Typ-III-Protein-Sekretionssysteme. Durch bisher noch nicht näher bekannte Mechanismen, können Yersinien durch YopE und YopQ/K einer Aktivierung des Inflammasoms und damit einer IL-1 $\beta$ -Produktion entgegenwirken.

## **1.9 Yersinien-induzierte Apoptose**

Bei einer Infektion mit *Y. enterocolitica* wird über die Bindung von LPS an den TLR4-Rezeptor eine Aktivierung der MAPK- und NF- $\kappa$ B-Signalwege ausgelöst. Die daraus folgende Freisetzung proinflammatorischer Proteine rekrutiert weitere Immunzellen, um so eine inflammatorische Immunantwort zu generieren, die den Erreger eliminieren soll. Gleichzeitig kann die Stimulation von TLR4 auch proapoptotische Signale erzeugen (siehe 1.6 und 1.7).

Um der Immunantwort zu entgehen, hat *Y. enterocolitica* verschiedene Mechanismen entwickelt.

Über das Effektorprotein YopP werden die proinflammatorische Immunantwort und antiapoptotische Signalwege gehemmt. YopP bewirkt eine Acetylierung von IKK $\beta$  ("I $\kappa$ B kinase  $\beta$ "). Somit wird die Inaktivierung des NF- $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$  durch den IKK-Komplex verhindert. Folglich kann NF- $\kappa$ B nicht in den Zellkern gelangen und die Transkription proinflammatorischer Proteine wird verhindert (Ruckdeschel et al., 2001). Zudem veranlasst YopP die Acetylierung und somit Inaktivierung verschiedener MAPK-Kinasen. Dadurch wird die Stimulation der nachgeschalteten MAPK p38, ERK und JNK

unterdrückt (Ruckdeschel et al., 2008, 1997). Dies verstärkt die Hemmung der Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. von  $\text{TNF}\alpha$ , bei Yersinien-infizierten Makrophagen. Da NF- $\kappa$ B auch die Produktion antiapoptotischer Proteine kontrolliert, induziert die durch YopP vermittelte NF- $\kappa$ B-Inhibition zudem Apoptose bei Makrophagen. Im Mausmodell ließ sich zeigen, dass bei enteraler Infektion die durch Yersinien induzierte Apoptose eine Disseminierung der Bakterien ins darmassoziierte lymphatische Gewebe und in Leber und Milz begünstigt, sowie die Entstehung einer systemischen Infektion fördert. YopP/J-defiziente Yersinien-Stämme zeigen dabei im Mausmodell eine verminderte Pathogenität. YopP scheint also für die Virulenz von *Y. enterocolitica* von Bedeutung zu sein (Monack et al., 1998).

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Name	Hersteller
Agarosegelkammer, Agagel	Biometra
Autoklavierbehältnis für Präparationsbesteck	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH
Drehrad für 15 ml Falcons	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH
Feinwaage 440-47N	Sartorius
Filmkassette	Dr. Goos Suprema
Gefrierschrank –20 °C	Liebherr
Gefrierschrank –80 °C, Herafreeze	Heraeus
Gelelektrophoresekammer SE 400-15-1,5	Hoefer
Gelgießstand	BIO-RAD Laboratories GmbH
Geltrockner	
Heizblock TDB 120	A. Hartenstein Laborbedarf, GmbH
Inkubator für Zellkultur	Heraeus
Kippschüttler	Johanna Otto GmbH
Kühlschrank Premium	Liebherr
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Laminiergerät Folio	Severin
Mikroplatten Lesegerät Tecan Infinite 200	Tecan
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss GmbH
Mikrowelle	Severin
PCR Cycler, Mastercycler epgradient	Eppendorf
pH-Meter pH Lverl 1	inoLab
Photometer Ultrospec 3100 Pro	
Pipetten	Gilson
Pipettierhilfe Accu-Jet	Brand
Präparationsbesteck (Schere und Pinzette)	
Röntgenfilmentwickler Curix 60	Agfa
SemiDry Blot Kammer Typ SD 18	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH

Software für Tecan Reader: Tecan i- Control	Tecan
Stahlkanülen für intragastrale Injektion	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH
Thermocycler Mastercycler eppgradient	Eppendorf
Thermomixer Compact	Eppendorf
Tischzentrifuge Micro 200	Hettich
UV-Geldokumentationsgerät Universal Hood II	BIO-RAD Laboratories GmbH
UV-Transilluminator ETX-20.M	
Vakuumentrifuge Speed Vac SC100	GMI, Global Medical Instr.
Vortex-Mischer Labinco L46	ProScientific
Wasserbad GFL	Dargatz
Westernblotkammer	Hartenstein, GmbH
Zellkulturbank Herasafe	
Zentrifugen	Sigma 3K30, (Rotor Nos 12156 und 19776), Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Biofuge 13R, Heraeus Sepatech

### 2.1.2 Labormaterial

Labormaterial	Hersteller
Co-Star Transwell Migrationskammern	Corning
ELISA Platten	F96-Nunc Maxisorp, Nunc Immuno Plate-Nunc
Gelloader Spitzen	Hartenstein
Handschuhe Digitil	Paul Hartmann
Impfschlinge (Kunststoff) Greiner-Bio-on	Fa. Greiner
Pipettenspitzen	Sarstedt
PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran	Roth GmbH & Co. KG
Reaktionsgefäße 50 ml und 15 ml	Falcon
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt
Röntgenfilme	Fuji Photo Film
Skalpell	B. Braun
Spritzen	Becton Dickinson GmbH
Sterilfilter	Nalgene

Multiwell™ 24 Well	Becton Dickinson
Whatman 3 mm Papier	Whatman
Zellkulturflaschen und –schalen	Nunc, Wiesbaden
Zählkammer	Neubauer

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Agarose	Invitrogen
Aqua ad injectabilia	B.Braun
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
β-Mercaptoethanol	Biorad
Bromphenolblau	Serva
BSA ( <i>bovine serum albumine</i> )	New England Biolabs
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche
Coomasie Blau	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Glutathione-Sepharose 4B	GE Healthcare Bio Sciences AB
Essigsäure (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	Merck
Ethanol (ETOH)	Merck
Ethidiumbromid	Roth
Ethylen-diamin-tetraacetat (EDTA)	Roth
Glyzerin	Merck
Hefeextrakt	Difco Laboratories
Hydroxyethyl-Piperazin-Ethanosulfonsäure (HEPES)	Serva
Isopropanol	Merck
Kalium-Acetat, (CH <sub>3</sub> COOK)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kalziumchlorid(CaCl <sub>2</sub> )	Merck
Magermilchpulver	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck

Methanol (MeOH)	Merck
4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich
Natriumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche Diagnostics GmbH
Propidiumiodid	Fluka
Red Safe, Nucleic Acid, Stains Solution	iNtRON Biotechnology
Rotiphorese Gel 30	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck
TrisMA	Roth
TrisBase	Roth
Trypanblau	Merck
Tween 20	Roth

#### 2.1.4 Kommerzielle Testsysteme (Kits)

Name	Hersteller
Big Dye-cycle sequencing Kit	ABI
Gene Elute Five Minute Plasmid Miniprep Kit	Sigma
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham
ENLITEN ATP Assay System	Promega
Mouse IL-1 $\beta$ ELISA Ready-SET-Go	eBioscience
NucleoBond PC 100	Macherey Nagel
NucleoSpin Extract II	Macherey Nagel
ProFection-Mammalian Transfection Kit	Promega
TA-Kloning-Kit	Invitrogen

### 2.1.5 Medien

Alle Medien wurden bei 4°C aufbewahrt.

Name	Zusammensetzung	Hersteller
LB-Medium ( <i>Luria-Bertani</i> -Medium)	10 g/L Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, pH 7,4, add 1 L H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Roth
LB-Agarplatten ( <i>Luria-Bertani</i> -Agarplatten)	10 g/L Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 15 g/L Agar, pH 7,4, add 1 L H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Roth
Einfriermedium	LB-Medium mit Zugabe von 20 % Glycerol	
2YT-Medium	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, pH 7,0 ±0,2	Roth
S.O.B.-Medium (Super optimal broth)	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub>	
S.O.C.-Medium	2 % Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose	

### 2.1.6 Lösungen und Puffer

#### 2.1.6.1 Puffer und Lösungen zur Agarosegelelektrophorese

TAE (Tris-Acetat-EDTA) (50-fach)	242 g Tris-Base, 18,6 g Na <sub>2</sub> EDTA, 57,1 mL C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> (Essigsäure, 6-fach)
Probenpuffer (6-fach)	0,25 % Bromphenolblau, 0,1M EDTA, 30 % Glycerin

#### 2.1.6.2 Lösungen zur Zellyse

Lysispuffer (Pulldown)	5 mM NaF, 5 mM β-Glycerolphosphat, 0,5 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 200 μM PMSF, 1 Tablette Complete Protease Inhibitor, add 50 mL 1x PBS
------------------------	---

#### 2.1.6.3 Puffer zur Proteindenaturierung

4xLaemmli-Puffer	12 % SDS, 40 % Glycerol, 0,2 M Tris-HCl pH 7, 004 % Bromphenolblau, 5 % β-Mercaptoethanol
------------------	---

**2.1.6.4 Puffer zur SDS-Page**

Tris-HCl für Trenngel	181,5 g Tris-Base mit HCl auf pH 8,8 einstellen, add 1 L H <sub>2</sub> O
Tris-HCl für Sammelgel	60,6 g Tris-Base, mit HCl auf pH 6,8 einstellen, add 0,5 L H <sub>2</sub> O
10xElektrophoresepuffer	288 g Glyzin, 60 g Tris, 20 g SDS add 2 L H <sub>2</sub> O
10x PBS Tween	4 g KCl, 4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 160 g NaCl, 22,86 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 10 mL Tween 20 add H <sub>2</sub> O 2 L

**2.1.6.5 Färbungen für SDS-Page**

Coomassie Blau	0,1 % Coomassie Blau, 40 % MeOH, 10 % Essigsäure
Entfärbelösung	50 % MeOH, 7,5 % Essigsäure oder 100 % MeOH
Ponceau S	0,2 % Ponceau S in 3 % Trichloressigsäure, add H <sub>2</sub> O 1L

**2.1.6.6 Puffer für Western-Blot**

Anoden-Puffer 1	0,3 M Tris, 10 % MeOH, pH 10,4
Anoden-Puffer 2	25 mM Tris, 10 % MeOH, pH 10,4
Kathoden-Puffer	25 mM Tris, 10 % MeOH, 40 mM 6-Aminohexansäure, pH 9,4
Waschpuffer (PBS-T)	25 mM KCl, 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,4 M NaCl, 80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 % Tween
Blockpuffer	5 % Milchpulver in PBS-T

**2.1.6.7 Puffer für die Herstellung chemokompetenter Bakterien**

TFB1	30 mM KaAcetat, 50 mM MnCl <sub>2</sub> , 100 mM RbCl <sub>2</sub> , 10mM CaCl <sub>2</sub> , 15% Glycerin, pH 5,8
TFB2	10 mM NaMops, 75 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM RbCl, 15 % Glycerin

**2.1.7 Gele**

**2.1.7.1 SDS-Gel**

<b>Trenngel:</b>	<b>10%</b>	<b>15%</b>	<b>Sammelgel</b>	<b>4%</b>
H <sub>2</sub> O	14,1 mL	11,8 mL	H <sub>2</sub> O	7,35 mL
1,5 M Tris HCl, pH 8,8	8,7 mL	8,7 mL	1,5M Tris HCl, pH 6,8	1,24 mL



Acrylamid	11,7 mL	14 mL	Acrylamid	1,33 mL
10 % SDS	350 µL	350 µL	10 % SDS	100 µL
10 % APS	350 µL	350 µL	10 % APS	100 µL
TEMED	40 µL	40 µL	TEMED	20 µL

### 2.1.7.2 Agarose-Gel

<b>0,8 %</b>	1,2 g Agarose auf 150 mL 1xTAE und 7,5 µL Ethidiumbromid
<b>1 %</b>	1,5 g Agarose auf 150 mL 1xTAE und 7,5 µL Ethidiumbromid
<b>1,2 %</b>	1,8 g Agarose auf 150 mL 1xTAE und 7,5 µL Ethidiumbromid

### 2.1.8 Enzyme

Name	Anbieter
Restriktionsenzyme (Bgl II, BamHI, NotI)	New England Biolabs (NEB)
T4-DNA Ligase (400 U/mL)	Invitrogen
PlatinumTaq <sup>®</sup> -Polymerase (5 U/µL)	Invitrogen

### 2.1.9 Inhibitoren/Stimulatoren

Name	Endkonzentration	Anbieter
ARL 67156 trisodium salt (6-N,N-Diethyl-D-β,γ dibromomethylene ATP trisodium salt)	20 mM	Tocris Bio Science
Carbenoxolone disodium salt	100 µM	Sigma-Aldrich
BMS 345541	10 µM	Sigma-Aldrich
LPS (Lipopolysaccharid)	2 µg/mL	Sigma-Aldrich
Necrostatin-1	40 µM	Sigma-Aldrich
z-VAD-fmk	40 µM	Sigma-Aldrich

**2.1.10 Oligonukleotide**

Name	Primersequenz
<b>Amplifikationsprimer</b>	
pYV60216-60235 Forward Primer	5'-GTG CTG CCC GTC TGT TCC GG-3'
YopP pcmv Bgl II GGA, Forward Primer	5'-GGA AGA TCT AGC TCC ACC GCG GTG GCG GCC GCC ATG GAG-3'
YopP pcmv 3B, Reverse Primer	5'-AAC ACT TCT CAA AGT ATA AGC GGC CGC-3'
<b>Sequenzierungsprimer</b>	
M13 <i>forward</i>	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
M13 <i>reverse</i>	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

**2.1.11 Marker**

Name	Anbieter
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder Plus	Fermentas
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (10-250 kDA)	Fermentas

**2.1.12 Antibiotika**

Name	Lösungsmittel	Endkonzentration	Wirkort
Ampicillin	H <sub>2</sub> O	100 µg/mL	Transpeptidasehemmer
Chloramphenicol	70 % ETOH	20 µg/mL	Peptidyltransferasehemmer
Gentamycin	H <sub>2</sub> O	100 µg/mL	Ribosom
Kanamycin	H <sub>2</sub> O	50 µg/mL	30S Ribosom Untereinheit
Nalidixinsäure	1 M NaOH	600 µg/mL	Gyrasehemmer
Spectinomycin	H <sub>2</sub> O	100 mg/mL	30S Ribosom Untereinheit

**2.1.13 Antikörper****2.1.13.1 Primäre Antikörper**

Antikörper	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
Myc	Maus, IgG,	Cell Signaling	1:3000

	monoklonal		
RIP1	Maus, polyklonal	BD Bioscience	1:1500
YopP	Kaninchen, polyklonal	Ruckdeschel und Richter	1:5000

### 2.1.13.2 Sekundäre Antikörper

Name	Herkunft	Verdünnung
Anti-Maus-IgG	Schaf	1:10000
Anti-Kaninchen-IgG	Affe	1:10000

### 2.1.14 Plasmide

pGEM <sup>®</sup> -T-Easy Vektor (3015bP)	Promega
GST-Klonierungsvektor: pCMV5-Vektor, mit Glutathion-S-Transferase Gen (SJ26) mit BglIII und BamHI geschnitten und über die BamHI Seite in den Vektor kloniert	M. Hentschke, Institut für Med. Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, UKE Hamburg
pYopP	N.Czymmek, Institut für Med. Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, UKE Hamburg
pYopP C172A	N.Czymmek, Institut für Med. Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, UKE Hamburg

### 2.1.15 Verwendete Zellen

#### 2.1.15.1 Bakterienstämme

##### 2.1.15.1.1 *E. coli*

XL-1blue	Wurde zur Klonierung verwendet. Eignet sich zur DNA-Transformation und Vervielfältigung von Plasmid-DNA
----------	---

##### 2.1.15.1.2 *Yersinia enterocolitica*

Name	Beschreibung	Referenz
WA	WA-314 der <i>Y. enterocolitica</i> Serogruppe O:8, pYVO8 Virulenzplasmid, intrinsische	Heesemann&Laufs 1983

	Nalidixinsäure-Resistenz	
WAC-TTSS	Enthält ausschließlich das Plasmid, das für das TTSS kodiert	Trulzsch et al 2003, Hentschke et al 2007
WAC-TTSS-YopE	Enthält ausschließlich Plasmide, die für das TTSS und das YopE-Gen kodieren	Trulzsch et al 2003, Hentschke et al 2007
WA- $\Delta$ YopE	WA, YopE-Gen durch Kanamycin-Kassette ersetzt	Zumbihl et al 1999
WA- $\Delta$ YopEO	WA, YopE- und YopO-Gene durch Kanamycin/Spectinomycin Kassette ersetzt	Trulzsch et al 2004
WA- $\Delta$ YopET	WA, YopE- und YopT-Gene durch Kanamycin/Chloramphenicol-Kassetten ersetzt	Trulzsch et al 2004
WA- $\Delta$ YopETO	WA, YopE-, YopT- und YopO-Gene durch Kanamycin/Spectinomycin/Chloramphenicol-Kassetten ersetzt	Trulzsch et al 2004
WA- $\Delta$ YopO	WA, YopO-Gen durch Kanamycin-Kassette ersetzt	Trulzsch et al 2004
WA- $\Delta$ YopOT	WA, YopO- und YopT-Gene durch Kanamycin/Chloramphenicol-Kassetten ersetzt	Trulzsch et al 2004
WA- $\Delta$ YopP	WA, YopP-Gen durch Chloramphenicol-Kassette ersetzt	Trulzsch et al 2004
WA- $\Delta$ YopPE	WA, YopP- und YopE-Gene durch Kanamycin/Chloramphenicol-Kassetten ersetzt	Trulzsch et al 2004
WA- $\Delta$ YopQ	WA, YopQ-Gen durch Kanamycin/Nalidixinsäure-Kassetten ersetzt	Trulzsch et al 2004
WA- $\Delta$ YopQP	WA, YopP- und YopQ-Gene durch Kanamycin/Chloramphenicol-Kassetten ersetzt	Trulzsch et al 2004
WA- $\Delta$ YopT	WA, YopT-Gen durch Chloramphenicol-Kassette ersetzt	Zumbihl et al 1999
WA-YopP WT	pYVO8 Virulenzplasmid	Julian Petersen 2010
WA-YopP C/A	WA, YopP-Gen durch eine Kanamycin-Kassette ersetzt	Julian Petersen 2010

### 2.1.15.2 Zelllinien

Name	Beschreibung
BMM	Knochenmarksmakrophagen

HEK293T	Humane, embryonale Nierenzelllinie
J774	Murine Makrophagen-Zelllinie aus dem Tumor einer BALB/c Maus
THP1	Humane, monozytische Leukämie-Zelllinie

### 2.1.16 Zellkulturmaterialien

#### 2.1.16.1 Zellkulturmedien

Name	Beschreibung	Anbieter
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle medium</i> , + Glutamax Zugabe von 10 %FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin	Gibco
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute Nr. 1640 Medium</i> , Zugabe von 10 % FBS, L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin	Gibco

#### 2.1.16.2 Zusätze/Zellkulturlösungen

Name	Beschreibung	Anbieter
DPBS 1x	<i>Dulbecco's Phosphate Buffer Saline 10x</i>	Gibco
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> , fötales Rinderserum	PAN, Biotech
L-Glutamin (2 mM)		Sigma
Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin, 100 µg Streptomycin)		Gibco
Trypsin 0,05 %		Gibco

#### 2.1.16.3 Färbungen Zellkultur

Trypanblau	0,05 % in H <sub>2</sub> O lösen
------------	----------------------------------

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 “*Polymerase-Chain-Reaction*“ (PCR)

Die PCR dient der Amplifizierung von definierten DNA-Abschnitten. Ausgehend von spezifisch bindenden Oligonukleotiden wird die Sequenz am 3'OH Ende vervielfältigt. Die PCR wurde in 3 Schritten durchgeführt:

Erst erfolgte bei 94°C die Denaturierung der DNA-Stränge. Bei der folgenden Abkühlung auf 63°C wurde die optimale Temperatur für die Anlagerung der Primer an die Einzelstränge erreicht (“*Annealing*“, 30 sec). Während der Elongationszeit bei 72°C verknüpfte die Taq-Polymerase ausgehend von den Primern die Desoxyribonukleotide zu einem komplementären Doppelstrang, dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt, so dass es zu einer exponentiellen Zunahme der amplifizierten-DNA Menge kam.

Eine PCR wurde in folgendem Ansatz durchgeführt.

2 µl (1 µg)	DNA
5 µl	10 x Puffer
2 µl	MgCl <sub>2</sub>
0,5 µl	dNTP-Mix
0,5 µl	Primer I
0,5 µl	Primer II
0,5 µl	Taq-Polymerase
40 µl	ddH <sub>2</sub> O

### 2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten diente die Agarose-Gelelektrophorese.

Zur Herstellung des Agarosegels wurde die entsprechende Menge Agarose, siehe 2.1.7.2., in 150 ml 1 x TAE (Elektrophoresepuffer) aufgekocht. Sobald sich die Agarose vollständig gelöst hatte und das Gemisch bis auf 50°C abgekühlt war, wurden 7,5 µl Ethidiumbromid oder Red Safe zugegeben. Mit Hilfe eines Gelschlittens mit Kamm wurde ein Agarosegel mit Taschen gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde in einer Gelkammer soweit mit 1 x TAE überschichtet bis das Gel knapp bedeckt war. Die zu untersuchenden Proben wurden im Verhältnis 1:6 mit DNA-Proben-Puffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert.

Bei einer Spannung von 80-120 mV wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren von der Kathode zur Anode. Dabei erfolgt die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe. Große DNA Fragmente laufen langsamer als kleine Fragmente. Der in die Gele integrierte Farbstoff Ethidiumbromid bzw. Red Safe interkaliert mit der DNA, so dass DNA-Banden auf einem UV-Tisch durch die rote/grüne Fluoreszenz sichtbar gemacht werden konnten. Zur Größenbestimmung wurden die DNA Banden mit dem mitgeführten 1 kB-Marker, siehe 2.1.11, verglichen. Mit einem UV-Transilluminatorsystem konnte das Gelabbild als Computerdatei gespeichert werden.

### 2.2.3 Plasmidpräparation

Alle Plasmidpräparationen wurden mit Plasmid-Aufreinigungskits nach Herstellerprotokoll durchgeführt. DNA-Mengen bis zu 20 µg wurden mit dem "*Gene Elute Five Minute Plasmid Miniprep Kit*" präpariert. Für größere DNA-Mengen bis zu 500 µg wurde das "*NucleoBond PC 100*" Kit verwendet.

Die Isolierung der Plasmid-DNA beruhte bei allen Kits auf einer alkalischen Lyse. Durch einen stark alkalischen pH-Wert kommt es zur Denaturierung der DNA-Stränge. Die erhaltenen Lysate wurden auf eine Fertigsäule pipettiert. Auf Grund ihrer Konformation kann die Plasmid DNA wieder renaturieren und so im Inneren der Säule an eine Silika-Gel-Membran binden. In mehreren Waschschrritten können alle anderen Zellbestandteile entfernt und die Plasmid-DNA zuletzt aus der Säule eluiert werden.

### 2.2.4 Gelextraktion

Bevor PCR-Fragmente in den Vektor eingebracht werden konnten, erfolgte die Auftrennung in einem Agarose-Gel. Die entsprechenden Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem "*Nucleo Spin Extract II*" Kit aufgereinigt.

### 2.2.5 Restriktionsverdau

Um die DNA in den Klonierungsvektor einzufügen, mussten sowohl der Vektor als auch das Fragment mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten werden. Restriktionsendonucleasen kommen nur in Bakterien vor und spalten Phosphodiesterbindungen der DNA. Sie erkennen und schneiden spezifisch Sequenzen mit 4-8 pallindromisch angeordneten Basenpaaren. Dabei entstehen entweder glatte oder überhängende Enden.

Es entstehen Fragmente, deren Basensequenz am Ende bekannt ist. Über diese bekannten Sequenzen können Fragmente neu zusammengefügt werden. Um die Klonierung zu erleichtern wurden die Konstrukte zunächst in einen *pGEM-T-Easy*-Vektor zwischenkloniert. Aus diesem wurden sie wieder ausgeschnitten und mit dem endgültigen Vektor zusammengefügt.

Folgender Ansatz wurde für den Restriktionsverdau eingesetzt (1h bei 37°C).

### Plasmid:

3 µl	10 x Puffer
2 µl	Restriktionsenzym I
2 µl	Restriktionsenzym II
1 µg	Vektor
dd H <sub>2</sub> O	add 30 µl

### PCR-Produkt

3 µl	10xPuffer
2 µl	Restriktionsenzym I
2 µl	Restriktionsenzym II
2,5 µg	PCR-Produkt (aus dem Zwischenvektor herausgeschnitten)
dd H <sub>2</sub> O	add 30 µl

### **2.2.6 Transformation, Ligation und Kontrollverdau**

Mittels Gelelektrophorese wurde das Vorhandensein der entsprechenden Banden nach dem Restriktionsverdau überprüft. Die entstandenen Fragmente wurden anschließend mit Hilfe von T4-DNA-Ligase in den gewünschten Vektor kloniert. Dazu wurde ein Verhältnis von Vektor zu DNA-Fragment von 1:20 angestrebt.

Um die Klonierung zu erleichtern, erfolgte eine Zwischenklonierung von PCR-Produkten in einen *pGEM-Easy-Vektor*, siehe auch 2.2.5. Dazu wurde das neu entstandene Konstrukt in *E. coli XLI-Blue-Zellen* transformiert und auf Agarplatten mit 30 µl IPTG und 30 µl X-GAL ausgestrichen. Mit dem Verfahren der Blau-Weiß Selektion können positive, also das PCR-Produkt-enthaltende Bakterien, von negativen Klonen getrennt und gleich sequenziert werden. Aus dem *Easy-Vektor* wurde das PCR-Produkt mit Restriktionsenzymen, wie in 2.2.5 beschrieben, herausgeschnitten und mit dem eigentlichen Zielvektor zusammengefügt.



Für die Ligation wurde folgender Ansatz bei 16°C über Nacht inkubiert:

2 µl	10 x Ligase Puffer
1 µl	T4 Ligase
0,5 µl	Vektor
10 µl	Insert
ddH <sub>2</sub> O	add 20 µl

Der neu entstandene Vektor wurde mittels Hitzeschocktransformation in *XLI-Blue*-Zellen transformiert. Dazu wurde der Ansatz vor der Transformation gründlich gevortext und 10 sec herunterzentrifugiert. Anschließend wurden je 10 µl des Ligationsansatzes mit 200 µl kompetenten Zellen 30 min auf Eis inkubiert, 2 min bei 42°C erhitzt und erneut drei Minuten auf Eis gestellt. Zur Regeneration und Vermehrung der Zellen fügte man dem Transformationsansatz 500 µl S.O.C. Medium zu und schüttelte 1-3 h bei 37°C.

Bakterien, die das Plasmid enthielten konnten anschließend durch Wachstum auf Antibiotika-Agarplatten selektioniert werden. Die Plasmide positiver Klone wurden mit einem Plasmidpräparationskit aufgereinigt und durch einen Kontrollverdau identifiziert. Nach erfolgreicher Klonierung wurden die Plasmide mit einer Plasmid Maxi-Präparation aufbereitet.

### **2.2.7 Herstellung kompetenter Bakterien**

Die *E. coli* Stämme *Topten* oder *XLI-Blue* eignen sich gut zur Transformation. Zur Herstellung der kompetenten Bakterien wurden 2 ml Vorkultur in einem Verhältnis von 1:100 mit 200 ml LB-Medium gemischt. Dem LB Medium wurde 0,8 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> und 2 ml 1 M KCl zugefügt.

Hatten die Bakterien eine optimale optische Dichte von 0,3-0,5 erreicht, wurden sie 15 min auf Eis gestellt. Durch Zentrifugation bei 4°C und 6000 rpm über 5 min wurden die Zellen sedimentiert und dann in 15 ml TFB1 Puffer resuspendiert.

Nach einer Inkubationszeit von 1 h auf Eis wurde der Überstand nach erneuter Zentrifugation bei 5 min, 4°C und 6000 rpm abdekantiert und das Sediment rasch in 2 ml TFB2 aufgenommen. Hieraus wurden schnell Aliquots hergestellt und in flüssigem Stickstoff verbannt. Die kompetenten Bakterien wurden bei -80°C gelagert.

### 2.2.8 Sequenzierung

Zur Kontrolle der Basenabfolge in einem DNA-Molekül erfolgte eine DNA-Sequenzierung anhand der Kettenabbruchmethode nach *Sanger*. Die Sequenzierung wurde eingesetzt, um die korrekte Sequenz des YopP-Gens sowohl nach der GST-Fusionsklonierung, als auch bei der Mutante WA-YopP C/A zu überprüfen.

In einem Reaktionsansatz mit jeweils nur einem Primer, sowie normalen dNTPs (Desoxy-Nukleosidtriphosphat) und fluoreszenzmarkierten ddNTPs (didesoxy-Nukleotiden), denen die 3' OH Gruppe fehlt, katalysiert eine DNA-Polymerase die Synthese des komplementären Stranges.

Nach dem Zufallsprinzip werden die ddNTPS in den neusynthetisierten Strang eingebaut. Auf Grund der fehlenden 3' OH Gruppe am C-Atom ist die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids nicht möglich, so dass es zum Kettenabbruch kommt. Nach dem Zufallsprinzip entstehen so unterschiedlich lange Sequenzen, die jeweils mit dem Primer beginnen und mit einem markierten ddNTP enden. Mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Syntheseprodukte der Länge nach getrennt und die verschiedenen Fluoreszenzen der ddNTPs ausgewertet.

Folgender Reaktionsansatz wurde durch Ethanolfällung aufgearbeitet und durch Vakuumzentrifugation getrocknet.

<b>Reaktionsansatz:</b>		<b>Reaktionsbedingungen:</b>			
2 µl	DNA (500 ng)	Denaturierung	94°C	1 min	} 25x
2 µl	Big Dye-Mix	Denaturierung	94°C	20 sec	
1,5 µl	Primer I (10 pg/mol)	Annealing	50-68°C	5 sec	
8 µl	10 x Reaktionspuffer	Elongation	60°C	4 min	
6,5 µl	H <sub>2</sub> O	Aufbewahrung	4°C		

#### **Ethanolfällung:**

80 µl	NaHc 0,3 M
310 µl	EtOH 100 %

Zur Fällung wurde der gesamte Sequenzieransatz dreimal invertiert, bei 14 000 rpm, 4°C, 30 min zentrifugiert, nach Dekantieren des Überstandes im Dunkeln angetrocknet und danach für 10-30 min auf dem „Speed Rack“ vollständig getrocknet.

Die Sequenzen wurden vom Sequenzierlabor des UKE ausgewertet und anschließend mit Hilfe der Datenbank des NCBI ("*National Center for Biotechnology Information*") verglichen.

### 2.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, das Proteine bindet und denaturiert. Dabei kommt es zur Komplexbildung zwischen SDS und Proteinen. Das stark negative SDS verhindert Protein-Protein Wechselwirkungen und überdeckt die ursprüngliche Proteinladung. Somit unterscheiden sich SDS-Protein-Komplexe nur noch in ihrer Größe, aber nicht mehr in ihren hydrodynamischen Eigenschaften.

In einem Polyacrylamidgel wandern die Komplexe zur Anode und trennen sich ihrer molekularen Masse nach auf. In eine Gießvorrichtung wurde erst das Trenngel bis 3 cm unter den Rand gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Entfernung des Isopropanols wurde auf das auspolymerisierte Trenngel, unter Aussparung der Geltaschen durch einen Kamm, das Sammelgel gegeben. Bevor die Proben in die Geltaschen pipettiert werden konnten, wurden sie mit 2x Laemmli Puffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert.

Die Gelelektrophorese erfolgte dann für 1 h bei einer Stromstärke von 30-40 mA. Nach Durchlaufen des Sammelgels, sammelten sich die Proben an der Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel und gingen gemeinsam in das Trenngel über.

#### 2.3.2 Western-Blot (*Semi-Dry Blot*)

Das Verfahren des Western-Blots bezeichnet die Übertragung von Proteinen eines Elektrophorese-Gels auf eine Membran.

Auf die Anode der Blot-Kammer wurden 3 Lagen Whatman-Papier möglichst luftblasenfrei aufgelegt. Zwei Lagen wurden vorher in Anodenpuffer 1, eine Lage in Anodenpuffer 2 getränkt.

Eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurde auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten, kurz in Methanol aktiviert, in Anodenpuffer getaucht und auf die 3 Lagen Whatman-Papier aufgelegt. Auf die PVDF Membran wurden 3 Lagen in Kathodenpuffer getauchte Papiere gelegt. Um ein Verrutschen zu vermeiden, wurde die oben aufgelegte Kathode beschwert. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte für 30 min bei einer Stromstärke von 400 mA.

### 2.3.3 Immunoblot

Um die entsprechenden Proteinbanden des Western-Blots sichtbar zu machen, wurde die Membran mit einem spezifischen Antikörper behandelt, der mit den Proteinen eine Antigen-Antikörper Reaktion eingeht.

Sobald der Transfer der Proteine auf die Membran abgeschlossen war, wurde diese kurz in roten Ponceau S Färbepuffer gelegt und mit H<sub>2</sub>O beschichtet. So wurden die Markerbanden sichtbar und konnten auf der Membran markiert werden.

Um die unspezifische Bindung des Antikörpers an freie Valenzen der Membran zu verhindern, wurde diese für mindestens 30 min bei Raumtemperatur in Blockpuffer (5 % Milchpulver in PBS-T) geblockt. Nach 2 Waschschritten mit PBS-T erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht und bei 4°C. Nach 5 weiteren Waschschritten zwischen jeweils 5-10 min in PBS-T konnte am nächsten Tag die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur erfolgen. Zur vollständigen Entfernung ungebundenen Sekundärantikörpers wurde erneut 3 x je 5 min mit PBS-T gewaschen.

Um den mit Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörper durch Hyperfilmsubstrat (ECL)-Reagenz sichtbar zu machen, wurden je 1 ml einer Luminol-haltigen Lösung und 1 ml H<sub>2</sub>O auf die Membran gegeben. Durch die von der Meerrettichperoxidase katalysierte Oxidation des Luminols wurden Lichtsignale freigesetzt, die auf einen auf den Blot aufgelegten Röntgenfilm übertragen und dann entwickelt wurden.

## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Zellkultur

Die verwendeten Zellen wurden in Schalen mit einem Durchmesser von 10 cm (10 cm Schalen) bei einer Temperatur von 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> bebrütet.

*J774*- und *THP1*-Zellen wurden in RPMI Medium mit Penicillin, Streptomycin und 10 % FCS kultiviert. Auf Grund ihrer hohen Wachstumsrate erfolgte eine Umsetzung im Verhältnis 1:8 alle 3 Tage.

*293*-Zellen wurden in DMEM Medium mit 10 % FCS kultiviert. Um *293*-Zellen umzusetzen wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit 5-8 ml PBS-Puffer gespült, um das restliche Medium zu entfernen. Zum Ablösen der Zellen wurden diese für 7 min mit 0,5-1 ml Trypsin bedeckt. Durch vorsichtiges Beklopfen der Schale lösten sich die Zellen vom Boden. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und in einem Verhältnis von 1:10 umgesetzt.

### 2.4.2 Infektion von *J774*- und *THP1*-Zellen mit Yersinien

Die Vorbereitung der Zellen erfolgte bereits am Vortag der Infektion. Pro Vertiefung (Well) einer 24-Well Platte wurde in einem Volumen von 500  $\mu$ l eine Zellzahl von 250 000 Zellen eingestellt.

Bei einer gut bewachsenen 10 cm Schale erfolgte zunächst ein Mediumwechsel um das antibiotikahaltige Medium zu entfernen. Die Zellen wurden mit einem Schaber vorsichtig vom Boden gelöst. Um die Zellzahl pro ml zu bestimmen, wurden in einem Verhältnis von 1:8 25  $\mu$ l der abgelösten Zellen mit 175  $\mu$ l einer 5 % Trypanblaulösung gemischt und ein Aliquot der Suspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben.

Da lebende Zellen auf Grund ihrer intakten Membran keinen Farbstoff aufnehmen, können sie so von toten, gefärbten Zellen unterschieden und gezählt werden.

In den vier großen Quadraten der Neubauer-Zählkammer wurde die Anzahl der Zellen ausgezählt und anhand folgender Formel die Zellzahl pro ml errechnet:

$$\frac{\text{Gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000}{4} = \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$$

Um die *THP1*-Zellen zu zählen, wurden diese zuerst 5 min bei 1000 rpm und 37°C zentrifugiert, in 5 ml frischem Medium aufgenommen und dann wie oben beschrieben gezählt.

Zur Vorbereitung der Yersinien wurden diese über Nacht in einer Vorkultur aus 3 ml LB-Medium mit dem entsprechendem Selektionsantibiotikum bei 27°C auf dem Schüttelrad angezüchtet. Die Vorkulturen wurden am nächsten Morgen mit LB-Medium 1:10 verdünnt und 90 Minuten bei 37°C geschüttelt. Es folgte eine Sedimentation der Bakterien für 10 min bei 6000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde in 2 ml eiskaltem 1xPBS aufgenommen. Bei einer Verdünnung von 1:10 wurden 100  $\mu$ l der Bakteriensuspension mit 900  $\mu$ l 1 x PBS in einer Küvette gemischt und die Optische Dichte bei 600 nm gemessen. Die Einstellung der optimalen Dichte von 0,36 erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\text{Auffüllung (ml)} = \frac{2 \times \text{OD (gemessen)}}{0,36} - 2$$

Am Versuchstag muss das Medium der Zellen erneuert werden. Wurde in dem Versuch ein Inhibitor verwendet, so wurden die Zellen 1,5-3 h vorher mit dem jeweiligen Inhibitor vorinkubiert.

Eine Infektion erfolgte je nach Versuch mit 5-20  $\mu$ l Bakterien pro Well. Das entspricht einer Infektionsrate von ca 15-60 Bakterien pro Zelle. Nach Zugabe der Bakterien wurde die Platte für 5 min bei 1000 rpm und 37°C zentrifugiert, um eine synchrone und gleichmäßige Infektion der Zellen zu erreichen. Nach 1,5 h Infektionsdauer wurden zum Abtöten der Bakterien je 15  $\mu$ l Gentamycin zugegeben. Je nach Versuch variierte die Infektionsdauer zwischen 3-12 h.

### 2.4.3 Transfektion eukaryotischer Zellen und GST- "Pulldown" - Experiment

Die Transfektion eukaryotischer Zellen mit Fremd-Plasmid-DNA erfolgte mit der Calcium-Phosphat Transfektionsmethode. Es wurden eukaryotische GST (*Glutathion-S-Transferase*)-Expressionsvektoren transfiziert, um GST-Fusionsproteine (GST-YopP) in *293-Zellen* exprimieren und überproduzieren zu können.

Am Vortag der Transfektion wurden in einer 10 cm Schale  $2,5 \times 10^6$  293-Zellen in je 10 ml DMEM Medium ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden jeweils 10  $\mu$ g DNA in ein Eppendorfreaktionsgefäß vorgelegt. Um später das Ergebnis der Transfektion beurteilen zu können, wurde als Standard gleichzeitig eine Transfektion mit dem GST-Reporter-Plasmid pEGFP-N1 durchgeführt.

Der DNA wurden 430  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 62  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> zugefügt. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurden langsam unter stetigem Mischen 500  $\mu$ l 2 x HEPES zugetropft. Während der Inkubationszeit wurde das Medium der *293-Zellen* gewechselt. Nach 30 min wurde der Transfektionsansatz vorsichtig, ohne Zellen abzuspülen, auf die Zellen gegeben. In der Puffersubstanz kommt es zur Präzipitation von DNA und Calciumchlorid. Diese Präzipitate können von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden.

Nach einer Transfektionsdauer von 24 h wurden die Zellen am Folgetag mit 5 ml eiskaltem 1 x PBS auf Eis mit einem Zellschaber abgelöst und bei 4°C mit 1000 rpm 5 min in vorgekühlten Falcon-Röhrchen zentrifugiert. Zur Lyse der Zellen wurde das Pellet in 0,5 ml eiskaltem Lysepuffer aufgenommen. Um den Aufschluss der Zellen zu gewährleisten, wurde das Lysat 3 x in Trockeneis eingefroren und in kaltem Wasser wieder aufgetaut.

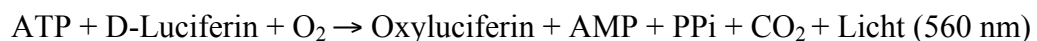
Die Lysate wurden 20 min bei 4°C und 14 000 rpm zentrifugiert. Die GST-Fusionsproteine im Zelllysate wurden durch Glutathion-Sepharose immobilisiert. Dazu wurden erst 50  $\mu$ l der

Glutathion-Sepharose mit 1 ml Lysepuffer gemischt und gewaschen. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und 50 µl Lysepuffer wurden zugegeben. 30 µl der Glutathion-Sepharose-*Beads* wurden dann zu den Lysaten zugesetzt. Die Bindung der Glutathion-Sepharose an das GST-Fusionsprotein erfolgte für 3 h bei 4°C auf dem Schüttelrad. Schließlich wurden die *Beads* abzentrifugiert und 4 x mit Lysepuffer gewaschen (1000 x g bei 4°C, 5 min). Die Fusionsproteine wurden schließlich in 50 µl Probenpuffer aufgenommen, von den „*Beads*“ eluiert und mittels Western-Blot analysiert.

### 2.4.4 ATP-Messung

Mit einem ATP-Assay konnte der ATP-Gehalt in Zellkultur-Überständen nach einer Infektion gemessen werden.

15 µl der zu untersuchenden Zellkultur-Überstände wurden mit 15 µl Reagenz gemischt. Luciferase, ein Enzym, das in dem Reagenz enthalten ist, katalysiert dabei folgende Reaktion:



Die Lichtreaktion wurde in einem Luminometer gemessen. Ist ATP die limitierende Komponente der Reaktion, ist die emittierte Lichtintensität proportional zur ATP Konzentration. Anhand eines mitgeführten Standards konnte auf diese Weise die ATP Konzentration ermittelt werden.

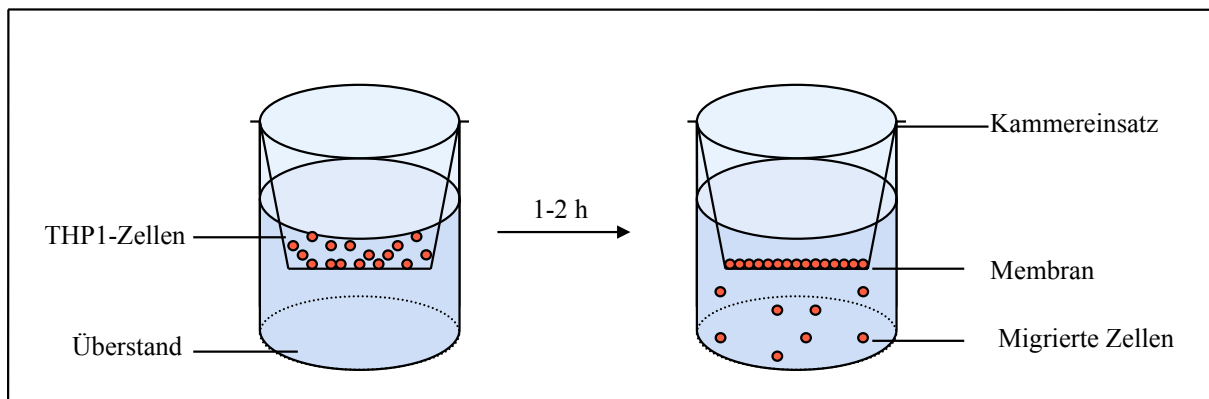
### 2.4.5 Migrationsassay

Um zu untersuchen, ob Überstände von mit *Yersinien* infizierten Makrophagen chemotaktisch wirkende Faktoren enthalten und eine Migration von mononukleären *THP1-Zellen* auslösen können, wurde ein Transwell-Migrationsassay angewendet. Die Transmigrationskammer besteht aus zwei Kompartimenten, getrennt durch eine Polycarbonatmembran.

In das untere Kompartiment wurden 200 µl der zu untersuchenden Überstände mit 300 µl RPMI Medium gegeben. Das obere Kompartiment wurde möglichst blasenfrei aufgesetzt. In das obere Kompartiment wurden, in einem Volumen von 100 µl,  $2 \times 10^5$  THP-1 Zellen gegeben. Durch 5 µm große Poren in der Membran konnten die Zellen aus dem oberen Kompartiment in das untere Kompartiment wandern.

Ob die Zellen zur Migration vom oberen in das untere Kompartiment angeregt werden, hängt von chemotaktischen Stimuli in den zu untersuchenden Überständen ab. Nach 2 h bei 37°C

konnten die Überstände aus dem unteren Kompartiment entnommen werden. Es erfolgte eine Zentrifugationsschritt mit 1000 rpm bei 20°C für 5 min. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Sediment in 30 µl RPMI-Medium aufgenommen. Die enthaltenen, eingewanderten Zellen wurden mit einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt.



**Abbildung 2.1: Aufbau eines Migrationsassays.** Der zu untersuchende Überstand wurde auf den Boden der Vertiefung (Well) pipettiert und oben eine Membran eingesetzt. Auf die Membran wurden THP1-Zellen gegeben. Sind in dem Überstand chemotaktische Stimuli vorhanden, wurden die THP1-Zellen über einen Zeitraum von 2 h bei 37°C zur Migration angeregt und konnten so in das untere Kompartiment gelangen.

#### 2.4.6 “Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA)

Der Nachweis des Zytokins IL-1 $\beta$  in Überständen von mit Yersinien infizierten Zellen wurde mit einem IL-1 $\beta$ -ELISA “Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA)-Kit durchgeführt. Als Grundlage dieses IL-1 $\beta$ -ELISA-Tests dient die sogenannte “Sandwich“-ELISA Methode. Hierbei wird das Antigen von zwei verschiedenen Antikörpern gebunden. Zunächst wird der Primärantikörper auf eine Mikrotiterplatte gegeben. Der zu untersuchende Analyt (Antigen) bindet an den Primärantikörper. Ein markierter Sekundärantikörper bindet erneut an die freien Epitope des Antigens, so dass dieses zwischen den beiden Antikörpern gebunden ist. Eine enzymatische Markierung des Sekundärantikörpers ermöglicht dann eine quantifizierbare Färbereaktion. So kann der zu untersuchende Analyt nachgewiesen werden.

Der Primärantikörper, auch “Capture“-Antikörper genannt wurde zunächst als Lösung auf eine Mikrotiterplatte gegeben. Dazu wurde er in einem Verhältnis von 1:250 in “Coating-Buffer“ verdünnt, je 100 µl in jede Vertiefung (Well) der Platte gegeben und bei 4°C 12 h inkubiert, so dass er nun als feste Phase an der Mikrotiterplatte gebunden war.

In verschiedenen Waschschrinen mit je 400 µl PBS-Tween wurde der überschüssige Primärantikörper entfernt und mit 200 µl Assay-Diluent für 1 h bei Raumtemperatur geblockt.



In 6 Waschschritten wurde das Assay-Diluent entfernt und 100 µl der zu untersuchenden Überstände wurden auf den gebundenen Primärantikörper gegeben. Während der folgenden 2 h Inkubationszeit erfolgte die Reaktion zwischen dem Primärantikörper und IL-1β in den Überständen.

Durch erneutes Waschen wurden ungebundene Proteine entfernt, so dass nur die gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe zurückblieben. Zur Detektion wurden je 100 µl des 1:250 verdünnten "Detection"-Antikörpers zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei erfolgte die Bindung des Sekundärantikörpers an den gebundenen Primärantikörper-Antigen-Komplex. Nach einem weiteren Waschschritt wurde der Sekundärantikörper mit dem Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) markiert. 100 µl des 1:250 verdünnten HRP-Konjugats wurden in die Wells gegeben und 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschritt wurden 100 µl eines Substrates zugegeben. Während der 15 min Inkubationszeit im Dunkeln konnte dieses von der zuvor gebundenen HRP verstoffwechselt werden und das entstandene Reaktionsprodukt verursachte einen Farbumschlag. Diese Reaktion wurde mit 50 µl H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Phosphorsäure) gestoppt.

Die Menge des entstandenen Farbstoffes war direkt proportional zur Menge des an IL-1β gebundenen Zweit-Antikörpers. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm. Die Quantifizierung ermöglichte ein mitgeführter Standard.

## 2.5 Tierexperimentelle Methoden

### 2.5.1 Haltung der Tiere

Als Versuchstiere wurden 5 Wochen alte, weibliche Balb/c Mäuse aus der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Eppendorf verwendet. Die Tiere wurden in Kleingruppen von bis zu 6 Tieren pro Käfig gehalten. Die Käfige wurden mit Sägespänen ausgestreut, Futter und Wasser stand den Tieren frei zur Verfügung. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 12 h. 1 x pro Woche erfolgte die Umsetzung der Tiere in einen neuen Käfig. Das Trinkwasser wurde alle 2 Tage gewechselt.

Für die Infektion wurde die Gruppe auf zwei neue Käfige aufgeteilt. Unmittelbar vor der Infektion und im nachfolgenden Beobachtungszeitraum wurden die Tiere täglich auf ihr äußeres Erscheinungsbild wie Fell, Atmung, Augen, Gewicht, sowie ihr Sozialverhalten überprüft.

### **2.5.2 Vorbereitung der Yersinienstämme für die Mausinfektion**

Zunächst wurden die Bakterienstämme WA-YopP WT und WA-YopP-C/A in 20 ml LB-Medium mit Selektivantibiotikum über Nacht bei 27°C unter konstantem Schütteln bei 180 rpm angezüchtet. Am Folgetag wurde die Bakterienkultur mit 4000 x g bei 4°C 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde 3 mal in je 10-15 ml LB-Medium gewaschen und zuletzt in 25 ml LB-Medium mit 15 % Glycerol, resuspendiert, steril filtriert und schließlich in je 500 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

Nach 1 Woche bei -80°C wurden einige Aliquots zur Bestimmung des Bakteriengehalts aufgetaut. Durch Erstellung einer 10-fachen Verdünnungsreihe und anschließendem Ausplattieren konnte die Anzahl der Kolonie-Bildenden Einheiten (KBE) pro ml in einer Einzelprobe bestimmt werden. Um einen möglichst genauen Wert der Bakterienkonzentration zu erhalten, erfolgte die Bestimmung insgesamt dreimal. So konnte der entsprechende Bedarf für die Mausinfektionen ermittelt werden.

### **2.5.3 Intra-gastrale Infektion der Tiere**

Zur Entfernung des Gefriermediums wurde das Bakterien-Aliquot nach dem Auftauen dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Am Ende wurde das Bakteriensediment in 1 ml eiskalter, physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Die Einstellung der für den Infektionsversuch benötigten Bakterienzahl erfolgte in 250 µl PBS.

Die Infektion der Tiere erfolgte mit  $2 \times 10^8$  Yersinien pro Maus. Um die Aufnahme der Bakterien im Magen und Darm nicht zu behindern, wurde den Mäusen 2 h vor der Infektion Wasser und Futter entzogen. Für die orale Infektion wurden die Mäuse im Nacken fixiert und leicht überstreckt, so dass eine Sonde mit aufsitzender Knopfkanüle bis in den Magen vorgeschoben und die Infektionsdosis in 250 µl PBS über eine 1 ml Heparin Spritze injiziert werden konnte.

### **2.5.4 Präparation der Tiere**

Die infizierten Tiere wurden über einen Zeitraum von 3 und 6 Tagen beobachtet und dann durch CO<sub>2</sub> / O<sub>2</sub>-Inhalation getötet. Unter sterilen Bedingungen wurde die Bauchdecke geöffnet und Leber, Milz und Darm wurden komplett herauspräpariert. Der Darm wurde zum Auffinden der Peyer-Plaques mit Kochsalzlösung gespült. Die Peyer-Plaques konnten als kleine knopfförmige Strukturen identifiziert und vorsichtig herauspräpariert werden. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Organe in sterilen Petri-Schalen auf Eis aufbewahrt.

### **2.5.5 Aufbereitung von Leber, Milz und Peyer-Plaques**

Zur Aufbereitung der Organe wurden der Leber 5 ml, der Milz 2 ml und den Peyerschen-Plaques 0,5 ml eiskaltes, steriles PBS mit 0,5 % Tween zugegeben.

In Handhomogenisatoren wurden die Organe so lange zerkleinert bis eine homogene Flüssigkeit entstand. Von diesen Proben wurden Verdünnungsreihen mit je 10 Verdünnungen angefertigt und je 100 µl des Homogenisats, sowie der Verdünnungsstufen 2, 3, 5 und 6 auf LB-Agar mit Selektivantibiotikum ausplattiert. Nach einem Bebrütungszeitraum von 24-36 h konnten auf den Platten die Kolonie-Bildenden-Einheiten aus den einzelnen Organen gezählt und verglichen werden.

### **2.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Graphpad PRISM. Die Balken über den Auswertungen zeigen die Standardabweichungen der verschiedenen Versuche. Die Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten, zweigeteilten „*student's t-Test*“. Das Konfidenzintervall betrug jeweils 95 %. Die Wahrscheinlichkeit  $p$  betrug bei einem Stern  $p < 0.01-0.05$  (signifikant), bei zwei Sternen betrug  $p < 0.001-0.01$  (sehr signifikant).

## 2.7 Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren



### Freie und Hansestadt Hamburg Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz

BSG Billstraße 80, D – 20539 Hamburg

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
**Herrn PD Dr. med. K. Ruckdeschel**  
Zentrum für Diagnostik  
Institut für Neuropathologie  
Martinistr. 52  
**20246 Hamburg**

Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz  
Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen  
Billstraße 80  
D - 20539 Hamburg  
Telefon 040-428-37-2068  
Telefax 040-428-37-2063  
Ansprechpartnerin: Karolin Zoll, Ph.D.  
Zimmer 5.14  
E-Mail [Karolin.Zoll@bsg.hamburg.de](mailto:Karolin.Zoll@bsg.hamburg.de)  
Gz: G 21307/591-00.33

Hamburg, den 29.06.10-msi

Nachrichtlich: Herr Dr. Haemisch

**FI zu Nr. 49/07**  
(bei Rückfragen bitte angeben)

#### **Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren**

Ihr Fortsetzungsantrag vom 22.06.10, hier eingegangen am 29.06.10 mit der Bezeichnung  
„Die Bedeutung der Apoptose-Induktion bei Makrophagen für die Pathogene der Yersiniose“

Sehr geehrter Herr Dr. Ruckdeschel,

aufgrund § 8 des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1207, 1313), zuletzt geändert am 15. Juli 2009, BGBl. I. S. 1950), wird Ihnen hiermit unter dem Vorbehalt des jederzeitigen Widerrufs und der nachträglichen Aufnahme von Auflagen die Genehmigung zur **Fortsetzung** des mit dem Bescheid der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz vom 08.08.2007, Nr. 49/07 genehmigten Versuchsvorhabens mit der Bezeichnung:

**„Die Bedeutung der Apoptose-Induktion bei Makrophagen für die Pathogene der Yersiniose“**

erteilt.

Leiter des Versuchsvorhabens:	PD Dr. med. Klaus Ruckdeschel
Stellvertretender Leiter:	Dr. med. M. Hentschke
Anzahl und Art der Versuchstiere:	wie in Erstgenehmigung: 268 Mäuse (genehmigt mit Nr. 49/07 am 08.08.07)
Diese Genehmigung gilt bis zum:	31.08.2011

Die Fragestellung, Versuchsmethodik und Tierzahlen ändern sich nicht.

Der Wechsel des Leiters des Versuchsvorhabens oder seines Stellvertreters ist unverzüglich anzuzeigen (§ 8 Abs. 4 Satz 2 TierSchG).

Bei der Durchführung der Versuchsvorhaben sind die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, insbesondere die §§ 9 und 9 a, zu beachten.

Seite 1 von 2

- 2 -

**Gebühren:**

Diese Genehmigung ist nach der Gebührenordnung für das öffentliche Gesundheitswesen in der jeweils gültigen Fassung gebührenpflichtig. Ein Gebührenbescheid wird mit gesonderter Post übersandt.

**Rechtsbehelfsbelehrung:**

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei der im Briefkopf angegebenen Behörde schriftlich oder zur Niederschrift einzulegen.

Mit freundlichen Grüßen



Karolin Zoll, Ph.D.

### 3 ERGEBNISSE

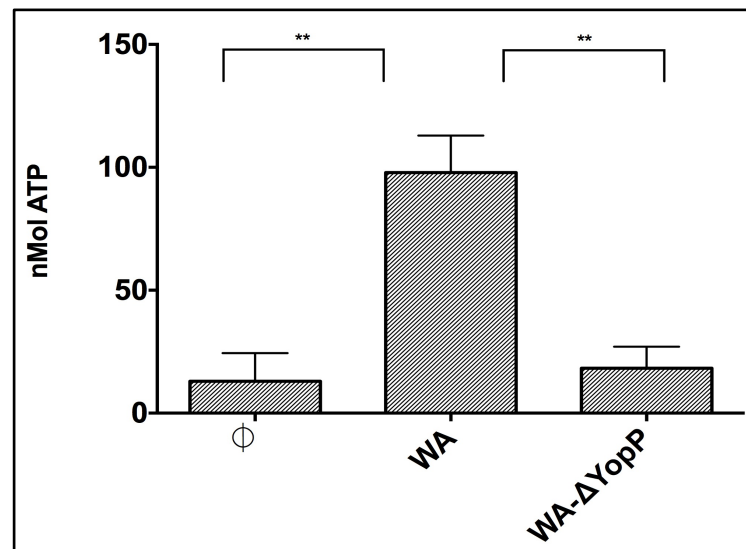
#### 3.1 Yersinien-induzierte Apoptose als chemotaktischer Stimulus

Als erste Verteidigungslinie des angeborenen Immunsystems kommen Makrophagen mit eindringenden Bakterien in Kontakt und werden durch deren PAMPs aktiviert. Eine Infektion mit *Y. enterocolitica* führt bei Makrophagen zu Apoptose (Ruckdeschel et al., 1997b). Im Allgemeinen wird der apoptotische Zelltod als stiller Zelltod angesehen, der ohne eine nennenswerte Freisetzung von Entzündungsmediatoren und die Aktivierung von Immunzellen abläuft. Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass apoptotische Zellen „Find-me“-Signale, wie z.B. Adenosintriphosphat (ATP) freisetzen, um Phagozyten zu rekrutieren, welche die sterbenden Zellen beseitigen sollen (Elliott et al., 2009). Inwieweit eine Infektion mit *Y. enterocolitica* ggf. auch eine ATP-Freisetzung bei Makrophagen induziert und ob ATP als „Find-me“-Signal einen chemotaktischen Einfluss auf Makrophagen hat, wurde im Folgenden untersucht.

In der Zellkultur induzieren Wildtyp-Yersinien Apoptose von Makrophagen. Fehlt einer Mutante das Effektorprotein YopP, bleibt Apoptose aus und die Zellen überleben.

Zunächst wurde die ATP-Freisetzung bei Makrophagen nach Infektion mit dem Wildtyp-Stamm WA und der YopP-negativen Mutante WA- $\Delta$ YopP untersucht. Um eine generelle ATP-Freisetzung auch bei nicht infizierten Zellen auszuschließen und um die ATP-Freisetzung in Relation setzen zu können, wurden nichtinfizierte Zellen als Negativkontrolle mitgeführt.

Bei der Infektion mit Wildtyp-Yersinien konnte im Gegensatz zur YopP-negativen Mutante und den nichtinfizierten Zellen eine deutlich erhöhte ATP-Konzentration im Überstand nachgewiesen werden. Demzufolge führte eine Infektion mit dem *Y. enterocolitica*-Wildtypstamm WA zu einer vermehrten ATP-Freisetzung von Makrophagen, während bei Infektion mit der YopP-negativen Mutante nur eine mäßige ATP-Freisetzung erfolgte, siehe Ergebnisse in Abbildung 3.1.



**Abbildung 3.1: Yersinien-induzierte ATP-Freisetzung bei Makrophagen nach Wildtyp-Yersinieninfektion im Vergleich zu einer YopP-negativen Mutante.** In drei verschiedenen Versuchen wurden J774 Makrophagen mit dem Wildtyp-Yersinien-Stamm WA und der YopP-negativen Mutante WA-ΔYopP über einen Zeitraum von 3 h infiziert. Freigesetztes ATP wurde im Überstand gemessen. Als Vergleichswert diente eine Negativkontrolle mit nicht infizierten Zellen. Zwei Sterne bedeuten  $p < 0.001-0.01$ , d.h. ein signifikantes Ergebnis.

Weiterführend stellte sich nun die Frage, ob ATP aktiv als „Find-me“-Signal von infizierten, apoptotischen Makrophagen freigesetzt wird, oder passiv durch die von der Apoptose resultierenden Poren aus der Zytoplasmamembran austritt. Eine Inhibition der Apoptose ausführenden Caspasen mit dem Pancaspase Inhibitor zVAD-fmk hindert die Zelle an der Induktion des Apoptoseprogramms. Die Zellmembran bleibt intakt, es kommt nicht zur Ausführung der Apoptose mit Zerstörung der Zytoplasmamembran. Folglich könnte eine durch Caspasen bedingte ATP-Freisetzung durch zVAD-fmk blockiert werden, was im Folgenden untersucht wurde.

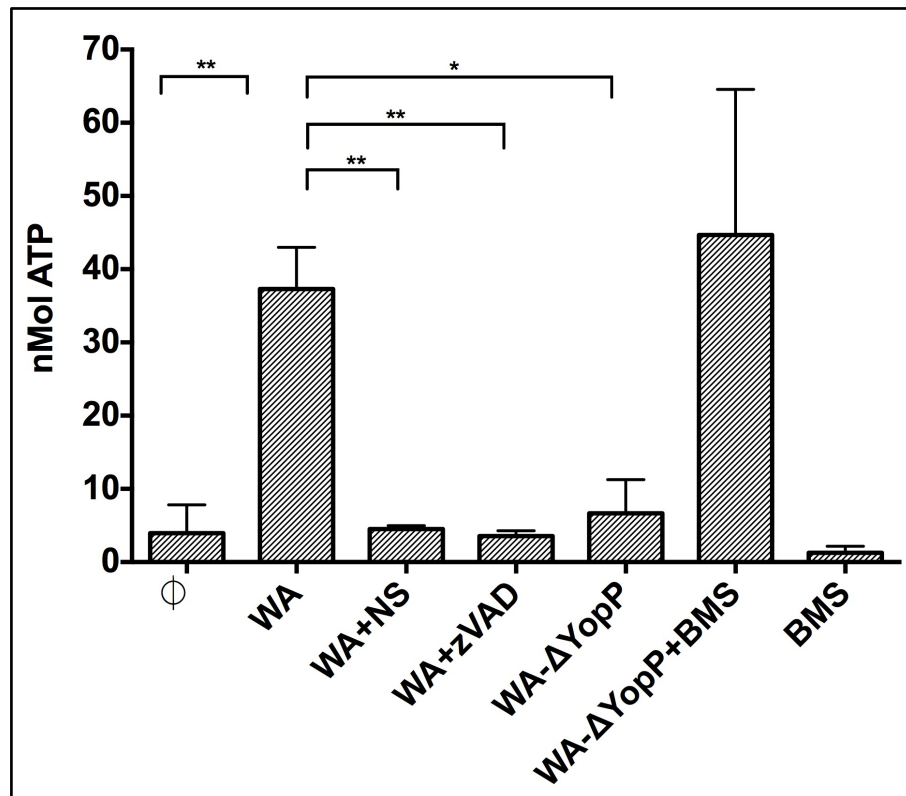
Wie schon in Abb. 3.1. gezeigt, führte eine Infektion mit Wildtyp-Yersinien zu einer verstärkten ATP-Freisetzung. Bei einer Vorbehandlung mit zVAD-fmk und Infektion mit dem Wildtyp-Stamm war die ATP-Freisetzung deutlich vermindert, vergleichbar der Negativkontrolle, siehe Abb. 3.2. Diese deutlich geringere ATP-Konzentration im Überstand lässt sich wahrscheinlich auf die Apoptose-Inhibition durch zVAD-fmk und somit auf eine Hemmung der Porenbildung in der Zellmembran zurückführen. Somit scheint bei der Infektion mit *Y. enterocolitica* keine aktive, sondern eine passive ATP-Freisetzung vorzuliegen, die durch die Aktivierung von Caspasen und die dadurch bedingte Zerstörung der Zellstruktur vermittelt wird.

Die Proteinkinase RIP1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zelltod und zellulärem Überleben. Inwieweit RIP1 möglicherweise an der ATP Freisetzung beteiligt ist, sollte unter Verwendung weiterer Inhibitoren genauer untersucht werden. Nekrostatin-1 ist ein Nekroptose-Inhibitor, der die Autophosphorylierung von RIP1 und die damit verbundene Induktion von Nekrose verhindert (Degterev et al., 2008). Die Behandlung mit Nekrostatin-1 führte zu einer deutlich geringeren ATP-Freisetzung bei Wildtyp-Yersinien-infizierten Makrophagen. Wiederum war die gemessene ATP-Konzentration mit der Konzentration der nicht infizierten bzw. mit zVAD-fmk behandelten Zellen vergleichbar, siehe Abbildung 3.2. Durch die Inhibierung von RIP1 mit Nekrostatin-1 kann also die ATP-Freisetzung gehemmt werden. RIP1 scheint deshalb bei der ATP-Freisetzung und möglicherweise auch bei der Apoptose-Induktion durch Yersinien bei Makrophagen eine wichtige Rolle zu spielen.

Inwieweit die durch Apoptose induzierte ATP-Freisetzung auf eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch YopP zurückzuführen ist, wurde mit Hilfe eines IKK $\beta$ -Inhibitors untersucht, der zusammen mit der YopP-negativen-Mutante verabreicht wurde. Der IKK $\beta$ -Inhibitor BMS verhindert wie YopP über eine IKK $\beta$ -Inhibition die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und induziert dadurch Apoptose. So kann mit BMS der inhibitorische Effekt von YopP auf die NF- $\kappa$ B-Aktivität simuliert werden, was Rückschlüsse auf die generelle Rolle von NF- $\kappa$ B-Inhibition und Apoptoseinduktion bei der ATP Freisetzung zulässt.

Um sicherzustellen, dass BMS keine unspezifischen Effekte auslöst, wurden Zellen in der Negativkontrolle nur mit BMS behandelt. Im Gegensatz zu BMS alleine löste die Infektion BMS-behandelter Makrophagen mit dem YopP-negativen Stamm eine ATP-Freisetzung aus, siehe Abb. 3.2, und war damit einer Infektion mit Wildtyp-Yersinien ähnlich. NF- $\kappa$ B-Inhibition alleine genügte also, in Zusammenwirken mit Bakterien eine ATP-Freisetzung auszulösen, was vermutlich auf die zeitgleich stattfindende Apoptose zurückzuführen ist.

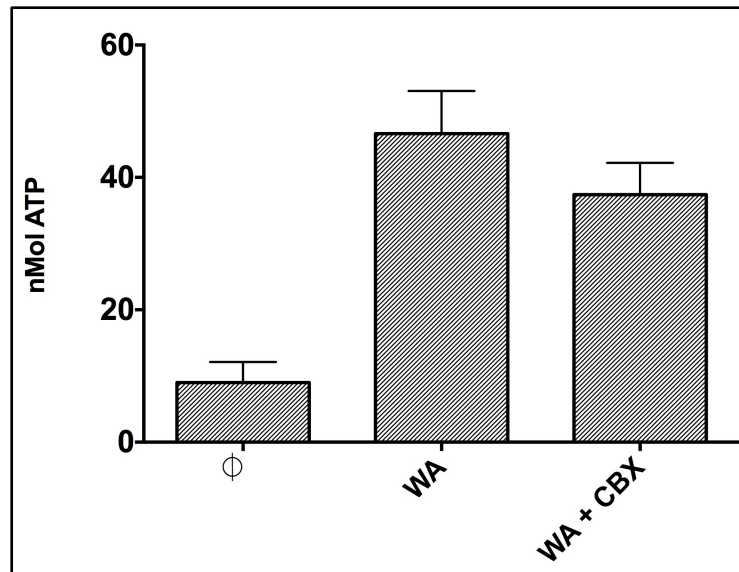




**Abbildung 3.2:** Yersinien-induzierte ATP Freisetzung im Zusammenwirken mit den Inhibitoren zVAD-fmk, Nekrostatin-1 und BMS aus drei verschiedenen Versuchen. J774-Makrophagen wurden entweder mit Wildtyp-Yersinien (WA) oder der YopP-negativen Mutante (WA-Δ-YopP) teilweise zusammen mit den Inhibitoren zVAD-fmk, Nekrostatin-1 oder BMS infiziert und freigesetztes ATP wurde im Überstand bestimmt. Die Makrophagen wurden 1,5 h vor Infektionsbeginn mit dem jeweiligen Inhibitor behandelt, bei einer Gesamt-Infektionsdauer von 3 h. Ein Stern entspricht einem signifikanten ( $p < 0.01-0.05$ ) und zwei Sterne einem sehr signifikanten ( $p < 0.001-0.01$ ) Ergebnis.

Pannexin-Kanäle schleusen Moleküle aus dem Intra- in den Extrazellularraum. Connexin-Kanäle bilden *Gap-Junctions* zwischen Zellen aus und dienen der Zell-Kommunikation. Mit dem Inhibitor Carbenoxolon werden Pannexin- und Connexin-Kanäle gehemmt. So konnten genauere Rückschlüsse über die Rolle dieser Kanäle bei der ATP-Freisetzung bei der Yersinien-Infektion gewonnen werden.

Bei der Infektion mit dem Yersinien-Wildtypstamm WA wurde erneut ATP freigesetzt. Bei einer Infektion im Zusammenwirken mit dem Inhibitor Carbenoxolon ließ sich diese ATP-Freisetzung nicht signifikant unterdrücken, siehe Abbildung 3.3. Somit bestätigt dies die Hypothese aus den vorherigen Versuchen, dass bei der Yersinien-Infektion ATP nicht aktiv, sondern passiv freigesetzt wird.



**Abbildung 3.3:** ATP-Freisetzung in Anwesenheit des Pannexin- und Connexin-Inhibitors Carbenoxolon (CBX). In zwei repräsentativen Versuchsreihen wurde den Makrophagen 1,5 h vor Infektion zur Inhibition der Pannexin- und Connexin-Kanäle Carbenoxolon zugegeben. Nach einer Infektionsdauer von 1 h wurden die Überstände entnommen und der ATP-Gehalt bestimmt.

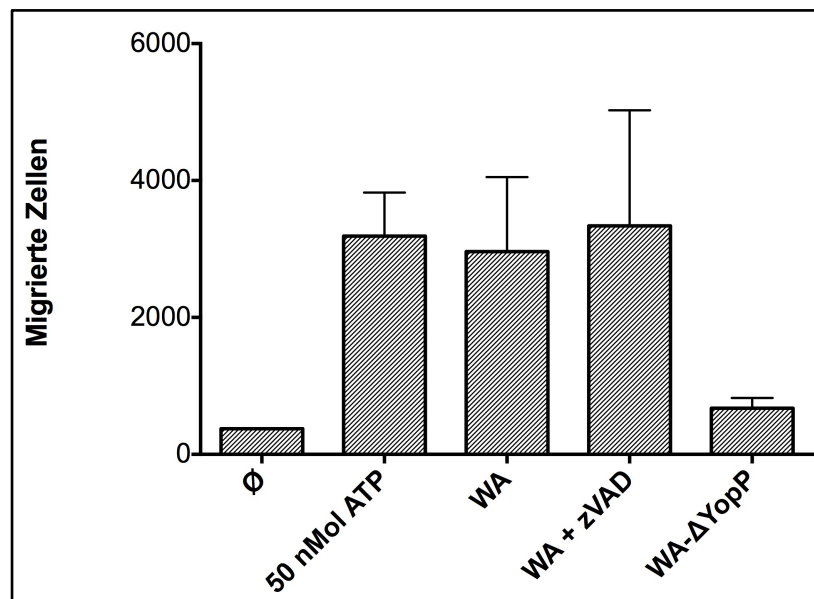
Inwieweit das bei der Yersinien-Infektion freigesetzte ATP als chemotaktischer Stimulus auf Makrophagen wirkt, wurde in einem Transwell Migrationsassay untersucht, siehe Methoden-Teil 2.4.5. Dazu wurden Zellkulturüberstände nach Infektion mit Wildtyp-Yersinien mit und ohne den Inhibitor zVAD-fmk, sowie nach Infektion mit der YopP-negativen Mutante auf ihre Fähigkeit untersucht, monozytäre THP1-Zellen in einem Transwell-System zur Migration anzuregen. Eine Positivkontrolle wurde mitgeführt, in der überprüft wurde, ob ATP generell als chemotaktischer Stimulus auf THP1-Zellen wirkt. Nicht infizierte Zellen wurden dementsprechend als Negativkontrolle eingesetzt.

Eine Infektion mit dem Wildtyp-Yersinienstamm führte, wie in Abbildung 3.1 und 3.2 dargestellt, zu einer ATP-Freisetzung. In Abb. 3.4 ist gezeigt, dass die Überstände der mit Wildtyp infizierten Zellen auch eine erhöhte Zellmigration auslösten, ähnlich wie die ATP-Positivkontrolle. Folglich kam es bei einer Infektion mit *Y. enterocolitica* zur Freisetzung von chemotaktischen Stimuli.

Interessanterweise führte eine Infektion mit dem Wildtypstamm in Verbindung mit dem Pancaspase Inhibitor zVAD-fmk zu einer vergleichbaren Migration wie bei der Positivkontrolle bzw. einer Infektion nur mit dem Wildtyp, siehe Abbildung 3.4. ZVAD-fmk

verhindert durch Hemmung der Caspasen die Induktion von Apoptose. Vermutlich durch die Verhinderung der Porenbildung in der Membran führt dies, wie in Abbildung 3.2. gezeigt, zu einer reduzierten ATP-Freisetzung. Da die Überstände nach Infektion mit dem Wildtyp-Yersinienstamm in Verbindung mit zVAD-fmk, bei verminderter ATP-Freisetzung, trotzdem eine verstärkte Migration induzierten, scheint ATP nicht der einzige chemotaktische Stimulus zu sein. Bei der Yersinieninfektion können also offenbar noch andere proinflammatorische Faktoren freigesetzt werden, die monozytäre Zellen zur Migration anregen.

Die Infektion mit der YopP-negativen Mutante löste nur eine äußerst geringe Migration von THP1-Zellen aus, vergleichbar mit der Negativkontrolle, siehe Abbildung 3.4. YopP ist also sowohl für die Induktion der Apoptose, als auch die damit verbundene Freisetzung von chemotaktisch wirksamen Faktoren bei der Yersinieninfektion essenziell.



**Abbildung 3.4:** ATP als chemotaktischer Stimulus auf Makrophagen. In zwei unabhängigen Migrationsassays wurden Überstände nach Infektion von J774-Makrophagen mit Wildtyp-Yersinien (WA) bzw. der YopP-negativen Mutante (WA-ΔYopP) auf ihren chemotaktischen Einfluss gegenüber THP1-Makrophagen überprüft. Als Negativkontrolle dienten nichtinfizierte Zellen. 50 nMol ATP wurde als Positivkontrolle verwendet.

### 3.2 Yersinien-induzierte IL-1 $\beta$ -Freisetzung und Pyroptose

*Y. enterocolitica* injiziert über sein Typ-III-Sekretionssystem (TTSS) Yop-Effektorproteine in Makrophagen. Bakterielle Sekretionssysteme induzieren bei Makrophagen eine

Inflammasom-Aktivierung, pyroptischen Zelltod und die Freisetzung von IL-1 $\beta$  (Shin und Cornelis, 2007). IL-1 $\beta$  selbst trägt als proinflammatorisches Zytokin zur Einleitung einer Immunantwort gegen eindringende Mikroorganismen bei. Wir stellten uns die Frage, inwieweit ein Zusammenhang zwischen Apoptose, Pyroptose und IL-1 $\beta$ -Produktion bei Yersinien-infizierten Makrophagen besteht. Aus Zellkulturinfektionsmodellen ist bekannt, dass eine Infektion mit *Y. enterocolitica* kaum zu einer IL-1 $\beta$ -Freisetzung führt und auch *in vivo* keine ausgeprägte systemische Entzündungsreaktion nach sich zieht. Möglicherweise kann *Y. enterocolitica* die Erkennung des Sekretionssystems durch eines der Effektorproteine aktiv verhindern. In mehreren Infektionsreihen mit verschiedenen Yop-Mehrfach- und Einzelmutanten sollten die IL-1 $\beta$ -Freisetzung nach Yersinien-Infektion gemessen und die Form des Zelltods bestimmt werden. Die IL-1 $\beta$  Konzentration im Überstand Yersinien-infizierter Makrophagen wurde nach einer Infektionsdauer von 3 h mittels eines ELISAs gemessen.

Die Inflammasom-Aktivierung, die zur Freisetzung von IL-1 $\beta$  führt erfordert zwei verschiedene Signale. Erstes Signal kann beispielsweise LPS von gramnegativen Bakterien sein, welches die Expression von Pro-IL-1 $\beta$  induziert. Um möglichst vergleichbare Versuchsbedingungen zu schaffen, wurden alle Zellen vor der Infektion mit LPS vorstimuliert. Eine gleichzeitige Kontroll-Versuchsreihe ohne Vorstimulation mit LPS zeigte insgesamt eine erniedrigte IL-1 $\beta$  Konzentration im Überstand (Ergebnis nicht gezeigt). Ein zweites Signal aktiviert dann das Inflammasom, welches eine Caspase-1-abhängige Prozessierung von Pro-IL-1 $\beta$  bewirkt, woraufhin reifes IL-1 $\beta$  von der Zelle freigesetzt wird. Das TTSS von gramnegativen Bakterien kann als zweites Signal fungieren.

Zunächst erfolgte eine Infektion mit einer Mutante, die nur ein funktionsfähiges TTSS, jedoch keine Effektorproteine exprimiert. Diese TTSS-positive Mutante WAC-TTSS bewirkte eine erhöhte Konzentration an IL-1 $\beta$  im Überstand, siehe Abb. 3.5, so dass von einer Inflammasom-Aktivierung durch das Sekretionssystem von *Y. enterocolitica* ausgegangen werden kann. Wildtyp-infizierte und nicht infizierte Zellen zeigten dagegen eine fast gleich niedrige und deutlich geringere Konzentration an IL-1 $\beta$  im Überstand als die TTSS-positive Mutante.

Der Unterschied in der IL-1 $\beta$  Freisetzung lässt vermuten, dass Yersinien-Effektorproteine die durch das TTSS induzierte Inflammasom-Aktivierung und die daraus folgende IL-1 $\beta$  Freisetzung modulieren und inhibieren. Wir untersuchten, ob das Effektorprotein YopP, das den MAPK und NF- $\kappa$ B Signalweg moduliert, auch die Caspase-1-abhängige IL-1 $\beta$ -Sekretion

beeinflussen könnte. Allerdings konnte bei einer Infektion mit der YopP-negativen Mutante keine erhöhte IL-1 $\beta$ -Freisetzung gemessen werden. Vielmehr war die Konzentration an gemessenem IL-1 $\beta$  in sehr ähnlichen Bereichen wie die nach Wildtyp-Yersinieninfektion und der nicht infizierten Zellen, siehe Abb. 3.5. Somit konnte die Idee, dass YopP einen Effekt auf die verminderte Inflammasom-Aktivierung haben könnte, weitestgehend ausgeschlossen werden.

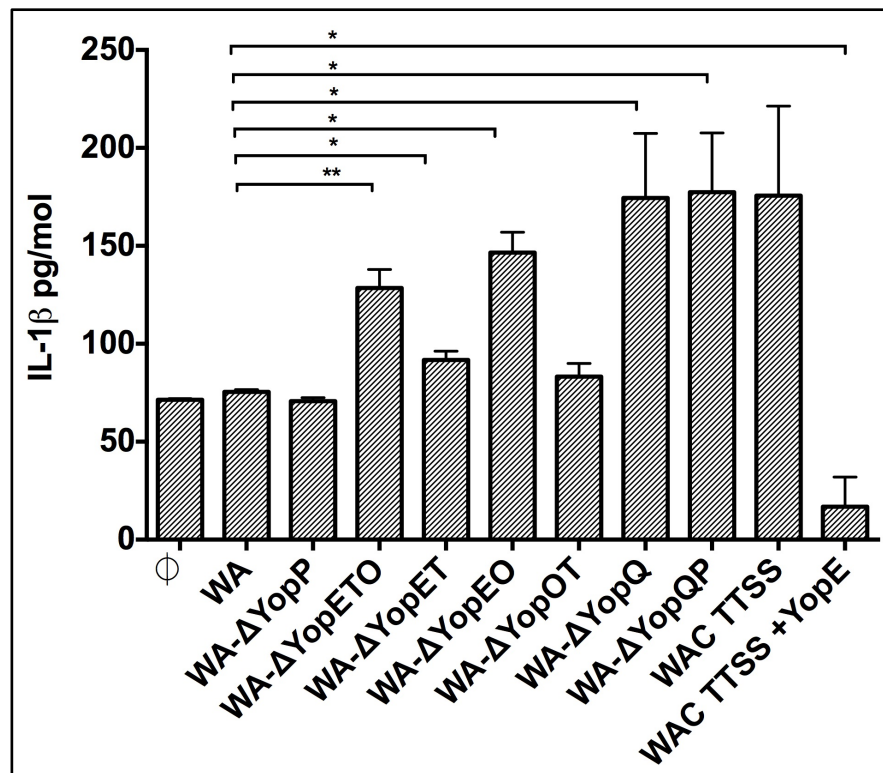
In anderen Systemen wurde bereits beschrieben, dass das Effektorprotein YopE, und in geringerem Maße auch YopT, die durch Caspase-1 vermittelte IL-1 $\beta$ -Sekretion vermindern (Schott et al 2004, Brodsky et al 2010). Deshalb wurden weitere Yop-Mutanten von WA getestet, siehe Abbildung 3.5.

Die Dreifach- und Doppelmутanten WA- $\Delta$ ETO und WA- $\Delta$ EEO bewirkten eine erhöhte IL-1 $\beta$  Konzentration im Überstand, jedoch immer noch niedriger als im Vergleich zu WAC-TTSS. Die gemessenen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen nach Infektion mit den Mutanten WA- $\Delta$ ET und WA- $\Delta$ OT waren nur unwesentlich höher als die Negativkontrolle mit nichtinfizierten Zellen und nach Yersinien-Wildtyp-Infektion. Möglicherweise ist dies als Hinweis auf eine kombinierte Wirkung von YopE und YopO zu deuten.

Die Mutante WAC-TTSS+YopE exprimiert nur das Sekretionssystem und YopE als einziges Effektor-Yop. Mit diesem Stamm ließ sich ein inhibitorischer Effekt von YopE feststellen. Wie in Abbildung 3.5 gezeigt, induzierte diese Mutante eine deutlich geringere IL-1 $\beta$ -Sekretion als die anderen Stämme. Dies spricht dafür, dass YopE die Erkennung des Sekretionssystems beeinflussen und die IL-1 $\beta$ -Produktion hemmen kann, wenn es in großen Mengen produziert wird.

Auch YopK von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* interagiert mit dem TTSS und scheint einer Erkennung des TTSS durch das Immunsystem des Wirts entgegenzuwirken, was eine Aktivierung des Inflammasoms verhindern kann (Brodsky et al., 2010). YopK entspricht YopQ bei *Y. enterocolitica*. Ob YopQ von *Y. enterocolitica* einen ähnlichen Effekt auf die IL-1 $\beta$  Sekretion hat, wie YopK bei *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*, wurde im Weiteren untersucht. In diesen Experimenten bewirkte eine YopQ-negative Mutante eine deutlich höhere IL-1 $\beta$ -Konzentration im Überstand, ähnlich der bei der WAC-TTSS-Mutante gemessenen Konzentration. Zur Analyse, ob der durch diese Mutante induzierte Effekt spezifisch auf YopQ zurückzuführen ist, und nicht durch eine YopP-induzierte Apoptose überlagert wird, wurde eine Mutante, die weder YopQ noch YopP exprimiert (WA- $\Delta$ YopQP), mitgeführt. Diese Mutante kann keine Apoptose auslösen. WA- $\Delta$ YopQP vermittelte eine

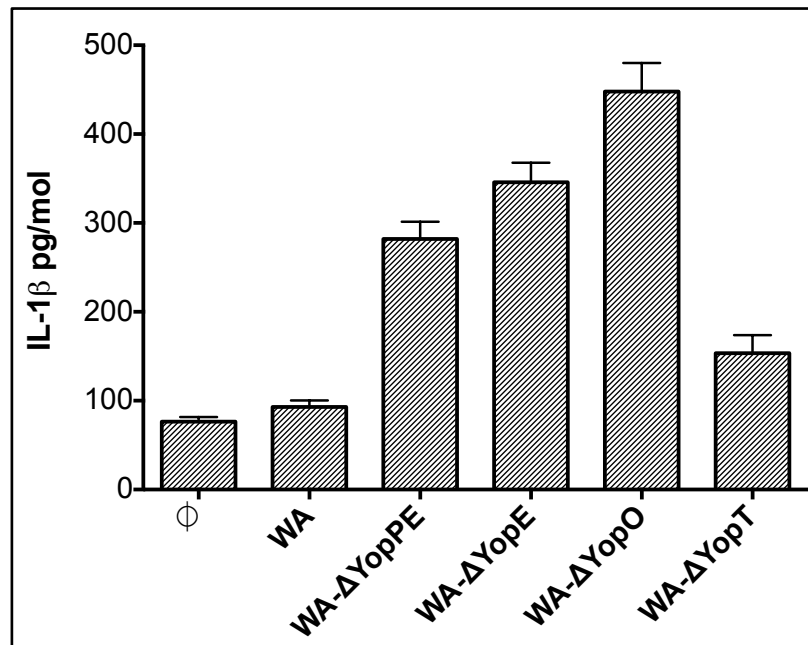
ähnlich hohe IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Überstand wie die Einzelmutante WA- $\Delta$ YopQ. YopQ scheint also spezifisch mit der IL-1 $\beta$ -Produktion interferieren zu können, ein Effekt der unabhängig von YopP und der durch Yersinien ausgelösten Apoptose stattfindet, siehe Abb. 3.5.



**Abbildung 3.5:** IL-1 $\beta$ -Freisetzung ausgelöst durch verschiedene Yop-defiziente Yersinien-Mutanten. J774-Makrophagen wurden in drei Versuchsreihen mit LPS vorstimuliert und mit verschiedenen *Y. enterocolitica* Mutanten infiziert. Die IL-1 $\beta$  Konzentration im Überstand wurde nach einer Infektionsdauer von 3 h mittels ELISA bestimmt. Nicht infizierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Ein Stern entspricht einem signifikanten ( $p < 0.01-0.05$ ) und zwei Sterne einem sehr signifikanten ( $p < 0.001-0.01$ ) Ergebnis.

Um die Ergebnisse mit den Doppel-Mutanten besser einordnen zu können, wurden neben YopQ auch noch mehrere andere Yop-Einzelmutanten auf ihre IL-1 $\beta$  Freisetzung überprüft. Interessant war dabei vor allem zu klären, ob die Mutanten, denen entweder nur YopE oder YopO fehlten, eine stärkere IL-1 $\beta$ -Freisetzung induzierten. In diesen Versuchen zeigte sich die höchste IL-1 $\beta$ -Freisetzung bei der Einzelmutante WA- $\Delta$ YopO. Infektionen mit WA- $\Delta$ YopE und WA- $\Delta$ YopPE führten auch zu einer erhöhten IL-1 $\beta$ -Konzentration, siehe Abbildung 3.6. Dies könnte daraufhin weisen, dass sowohl YopE als auch YopO in die

Inhibierung der IL-1 $\beta$ -Freisetzung und somit die Unterdrückung der proinflammatorischen Immunantwort involviert sind. Möglicherweise vermitteln sie diesen Effekt über eine gemeinsame Inhibition von Rho-GTPasen.



**Abbildung 3.6: IL-1 $\beta$ -Freisetzung bei verschiedenen Yop-Einzelmutanten.** In zwei Versuchsreihen wurden LPS vorstimulierte J774-Makrophagen mit den angegebenen Yersinienstämmen infiziert. Nach 3 h Infektionsdauer wurde die IL-1 $\beta$  Konzentration im Überstand mittels ELISA gemessen. Nicht infizierte Zellen dienten als Negativ-Kontrolle. Die höchste IL-1 $\beta$ -Konzentration liess sich bei der Mutante WA- $\Delta$ O verzeichnen. Auch eine Infektion mit YopE und YopPE-negativen-Mutanten führte zu erhöhten IL-1 $\beta$ -Konzentrationen.

Von weiterem Interesse war, die Form des eingetretenen Zelltodes in Zusammenschau mit der IL-1 $\beta$ -Freisetzung zu analysieren. Aktivierte Caspase-1 induziert sowohl die Prozessierung von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 $\beta$ , als auch Zelltod durch Pyroptose. Unter welchen Voraussetzungen es letztendlich zur Ausführung der Pyroptose kommt ist noch nicht genau geklärt. Somit sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der IL-1 $\beta$ -Freisetzung durch die verschiedenen Yop-Mutanten und der eingetretenen Form des Zelltodes untersucht werden. Durch Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid wurden tote Zellen markiert und deren Form des Zelltods über die Kernmorphologie unterschieden.

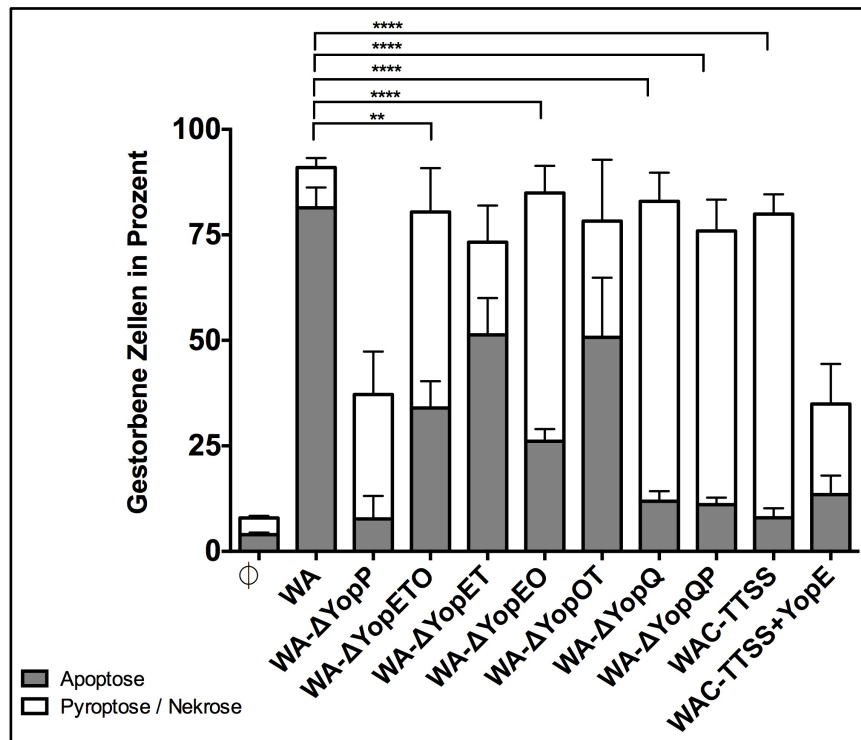
Da Nekrose und Pyroptose unter dem Fluoreszenzmikroskop morphologisch schwer zu trennen sind, wurde in den folgenden Abbildungen 3.7 und 3.8 nur zwischen Apoptose (kondensierter und fragmentierter Zellkern) und Pyroptose bzw. Nekrose (normal große, nicht fragmentierte Zellkerne) unterschieden.

Wie erwartet starben die Wildtypstamm-infizierten Zellen hauptsächlich an der durch YopP vermittelten Apoptose. Stamm WAC-TTSS, der das Sekretionssystem ausbildet, aber keine Effektor-Yops produziert, induzierte hauptsächlich Pyroptose. Genauso wurde in Abwesenheit von YopQ und von YopQ und YopP (YopQP) vor allem Pyroptose induziert. Dies bestätigt einen essenziellen Effekt von YopQ bei der Verhinderung der Pyroptose. Ein Fehlen von YopQ führt unweigerlich zur Pyroptose, was selbst durch die Anwesenheit von YopP nicht in Apoptose umgelenkt werden kann.

Bei den Mutanten WA- $\Delta$ YopETO/ET/OT konnte nicht immer eine einheitliche Todesform definiert werden. Eine erhöhte IL-1 $\beta$ -Freisetzung war nicht automatisch auch mit einer erhöhten Pyroptose-Rate assoziiert. Zwar vermittelten diese Mutanten mehr Pyroptose als der Wildtyp, und weniger Pyroptose als der Stamm, der nur das Sekretionssystem exprimierte, allerdings zeigten sich starke Schwankungen und immer noch hohe Apoptose-Anteile. Aber es kann auch hier vermutet werden, dass einige Yop-Effektorproteine durch Beeinflussung von Rho-GTPasen und dem Aktinzytoskelett die Ausführung der Pyroptose durch aktivierte Caspase-1 zumindest reduzieren.

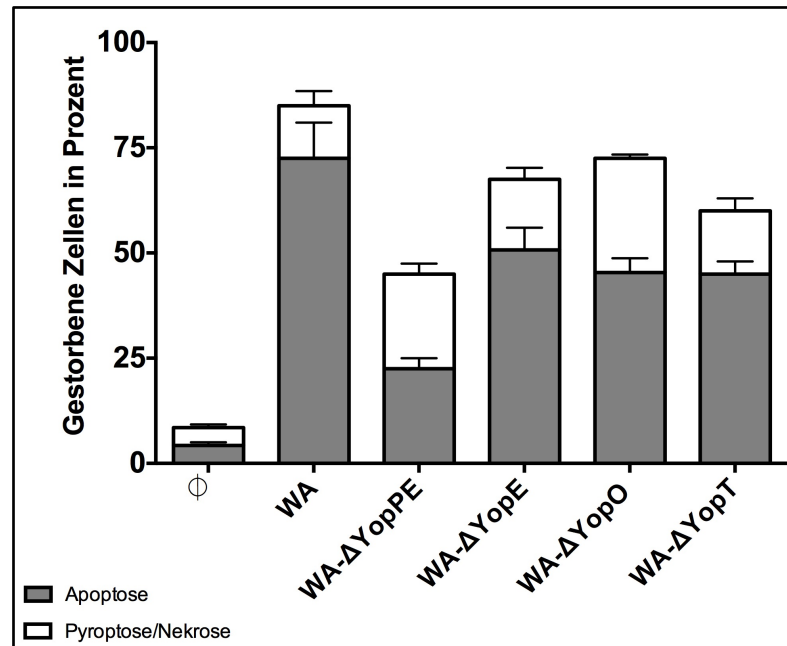
In der Tat hatte eine Infektion mit der Mutante WA- $\Delta$ YopEO eine höhere Pyroptoserate zur Folge. Dies unterstützt in Zusammenschau mit den gemessenen IL-1 $\beta$ -Werten die Hypothese dass YopE und YopO gemeinsam einen Effekt auf die Hemmung von Pyroptose und die IL-1 $\beta$ -Freisetzung ausüben. Tatsächlich war YopE, welches als einzelnes Yop vom Stamm WAC-TTSS+YopE überproduziert wird, in der Lage, die durch WAC-TTSS ausgelöste Pyroptose zu reduzieren, siehe Abbildung 3.7.





**Abbildung 3.7:** Differenzierung des Zelltods zwischen Apoptose und Pyroptose/Nekrose nach Infektion mit verschiedenen Yop-Mutanten. Nach einer Infektionsdauer von 3 h wurden die mit LPS vorstimulierten Makrophagen nach Infektion mit verschiedenen Yop-Kombinationsmutanten mit Propidiumiodid gefärbt und die Anzahl an gestorbenen Zellen, sowie deren Morphologie, wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Grau stellt den Anteil der an Apoptose gestorbenen Zellen dar, weiß den Anteil der an Nekrose / Pyroptose gestorbenen Makrophagen. (Mittelwert aus elf Versuchsreihen). Zwei Sterne entsprechen einem signifikantem Ergebnis von  $p < 0.001-0.01$ . Vier Sterne entsprechen  $p < 0.0001$ .

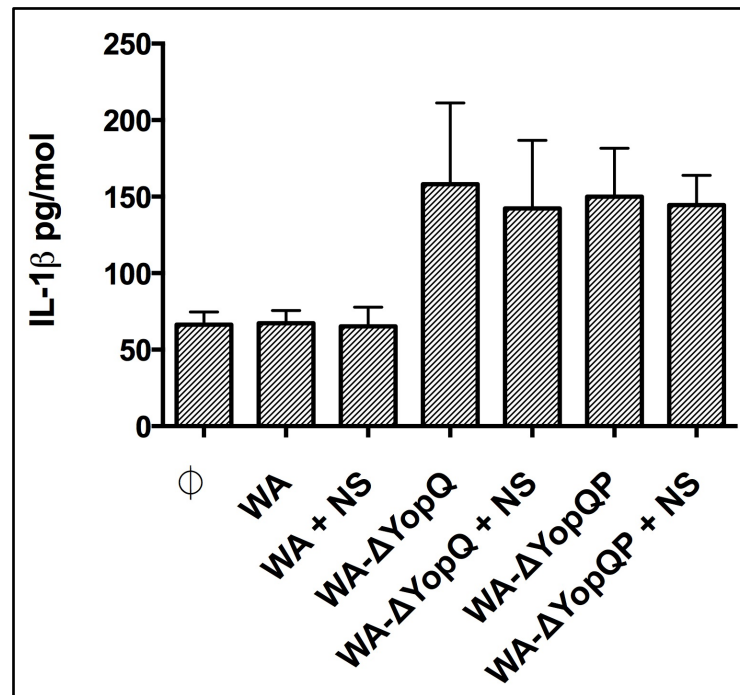
Auch die verschiedenen Einzelmutanten wurden auf die Form des Zelltods untersucht. Es zeigte sich, siehe Abb. 3.8, dass in Abwesenheit von nur YopE, YopO oder YopT bei gleichzeitiger Anwesenheit von YopQ und YopP, wie erwartet, die Pyroptose-Induktion weitreichend kompensiert werden konnte und die Zellen hauptsächlich durch YopP-vermittelte Apoptose starben.



**Abbildung 3.8:** Anzahl der gestorbenen Zellen und Zelltodform nach Infektion mit verschiedenen Yop-defizienten Einzelmutanten. J774 Makrophagen wurden mit LPS vorstimuliert und nach Infektion mit den angegebenen Yersinienmutanten mit Propidiumiodid gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Anzahl der gestorbenen Zellen und die Form des Zelltods bestimmt. Grau zeigt die an Apoptose gestorbenen und Weiß die an Pyroptose / Nekrose gestorbenen Zellen an. (Mittelwert aus zwei Versuchsreihen).

Die Proteinkinase RIP1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von zellulärem Überleben und Zelltod. Vor diesem Hintergrund erschien eine Beteiligung von RIP1 auch bei der Induktion von Pyroptose und der damit einhergehenden IL-1 $\beta$ -Freisetzung möglich. Um einen Zusammenhang abzuklären, wurden Makrophagen bei Infektion mit dem YopQ- und YopQP-negativen Stamm mit dem Inhibitor Nekrostatin-1 behandelt. Nekrostatin-1 blockiert allosterisch die Kinaseaktivität von RIP1 und hemmt dadurch die durch RIP1 induzierte Nekroptose. Möglicherweise werden dadurch aber auch die anderen Zelltodformen beeinflusst.

Die beiden Mutanten WA- $\Delta$ YopQ und WA- $\Delta$ YopPQ induzierten eine vergleichbar hohe IL-1 $\beta$ -Freisetzung. Auch eine Infektion in Anwesenheit des Inhibitors Nekrostatin-1 ergab keine Veränderung bei der IL-1 $\beta$ -Freisetzung, vergleiche Abbildung 3.9. Da sich bei der IL-1 $\beta$ -Freisetzung mit und ohne Nekrostatin-1 keine wesentlichen Unterschiede feststellen ließen, ist ein RIP1 Effekt bei der Pyroptose-Induktion wahrscheinlich nicht anzunehmen.

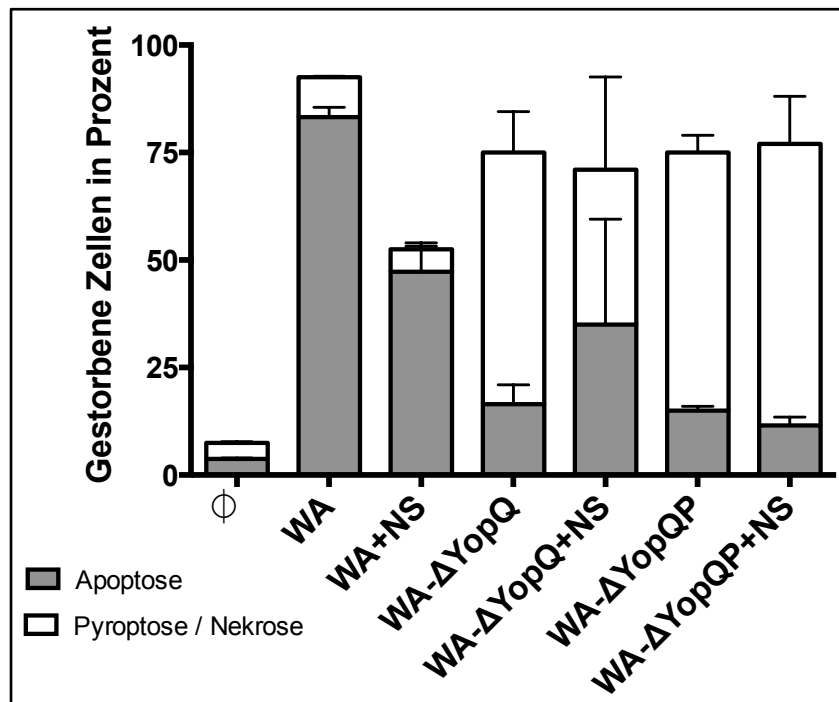


**Abbildung 3.9:** IL-1 $\beta$ -Freisetzung nach Infektion mit der YopQ- und YopQP-defizienten Mutante in Anwesenheit des RIP1-Inhibitors Nekrostatin-1. J774 Makrophagen wurden mit LPS vorstimuliert, dann mit Nekrostatin-1 behandelt und mit dem Wildtyp-Yersinienstamm bzw. den angegebenen Yop-Mutanten infiziert. (Mittelwert aus zwei Versuchsreihen).

Um dies zu untersuchen wurde im Zusammenwirken mit Nekrostatin-1 auch die Form des Zelltods der infizierten Makrophagen bestimmt. Dazu wurden diese nach Infektion mit Propidiumiodid gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, siehe Abbildung 3.10. Im Gegensatz zur IL-1 $\beta$ -Freisetzung induzierte die Mutante WA- $\Delta$ YopQ zusammen mit Nekrostatin-1 zwar weniger Pyroptose als WA- $\Delta$ YopQ ohne Nekrostatin-1, siehe Abbildung 3.10. Allerdings war das Ergebnis starken Schwankungen unterworfen und nicht signifikant, was die Hypothese unterstützt, dass RIP1 nicht an der Pyroptose-Induktion beteiligt ist. Bei der Mutante WA- $\Delta$ YopQP zeigte sich sowohl mit, als auch ohne Nekrostatin-1 jeweils vergleichbar wenig Apoptose und mehr Pyroptose.

Interessanterweise induzierte die Infektion mit dem Wildtypstamm im Zusammenwirken mit Nekrostatin-1 eine wesentlich geringere Anzahl an gestorbenen Zellen als eine Infektion mit dem Wildtypstamm alleine. Hier wurde überwiegend Apoptose induziert, siehe Abbildung 3.10. So kann davon ausgegangen werden, dass RIP1 tatsächlich eine Rolle bei der durch

YopP induzierten Apoptose spielt, da die Verwendung von Nekrostatin-1 die durch YopP ausgelöste Apoptose verringert.



**Abbildung 3.10:** Anzahl der gestorbenen Zellen und Zelltodform nach Infektion mit dem Wildtypstamm bzw. der YopQ- und YopQP-negativen Mutante zusammen mit Nekrostatin-1. Die Zellen wurden mit LPS vorstimuliert und nach einer Infektionsdauer von 3h mit Propidiumiodid gefärbt und die Anzahl der gestorbenen Zellen, sowie die Form des Zelltods wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. (Mittlerwert aus zwei Versuchsreihen).

### 3.3 Interaktion zwischen YopP und RIP1

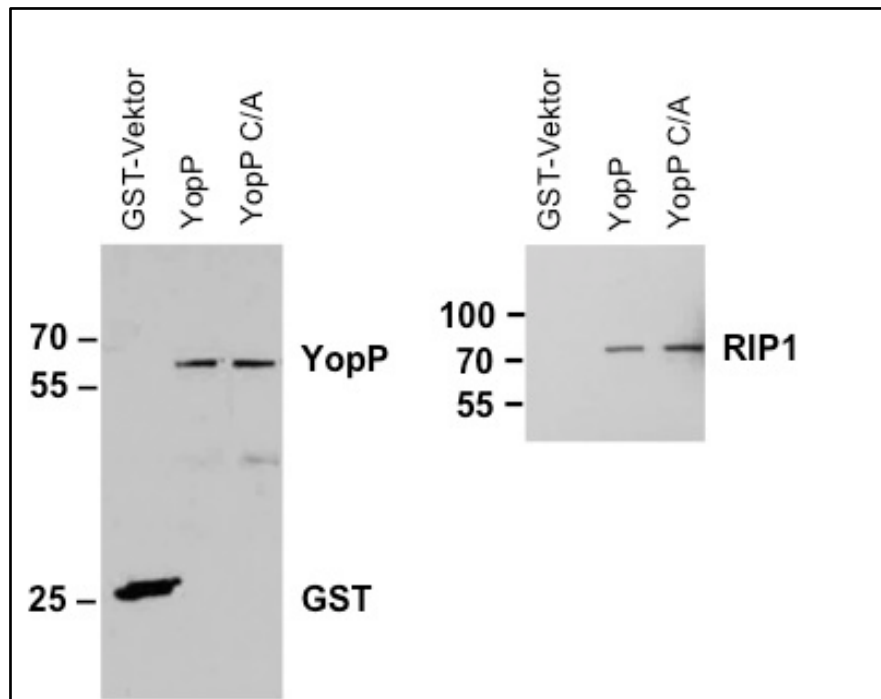
Die in Kapitel 3.1. und 3.2. dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass RIP1 bei der durch Yersinien ausgelösten ATP-Freisetzung und möglicherweise auch bei der Apoptoseinduktion selbst von Bedeutung ist. Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten zudem gezeigt, dass YopP die Phosphorylierung von RIP1 inhibiert. Da YopP/J mit unterschiedlichen Kinasen der MAPKK-Familie und mit IKK $\beta$  interagiert und deren Phosphorylierung inhibiert, war für uns nun von Interesse zu überprüfen, ob YopP möglicherweise auch mit RIP1 interagiert, um so Einfluss auf Funktionen von RIP1, wie dessen Phosphorylierung, die Induktion von Apoptose und die von uns beobachtete ATP-Freisetzung zu nehmen.

Mit Hilfe eines Pulldown-Assays, siehe 2.4.3, wurde eine mögliche Proteinbindung zwischen YopP und RIP1 untersucht. Dazu wurden aktives und inaktives YopP in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert und dabei in Fusion mit GST gebracht, welches mittels Glutathionsepharose in einem einfachen Pulldown-Assay präzipitiert werden kann.

Im katalytischen Zentrum von YopP befindet sich an Position 172 ein Cysteinrest. Dieser wurde durch ein Alanin ausgetauscht. Somit entsteht die Mutante YopP-C172A (C/A) mit einem katalytisch inaktiven YopP, welches in seiner Acetyltransferaseaktivität inhibiert ist.

293-Zellen wurden mit den pYopP bzw. pYopP C/A-GST-Vektoren transfiziert. Ginge YopP eine Interaktion mit RIP1 ein, so könnte RIP1 nach dem Pulldown von GST-YopP und der Aufreinigung der Präzipitate in der SDS-Page im Western-Blot dargestellt werden. Im Western Blot zeigte sich die YopP Bande durch die Fusion mit GST (ca. 26 kDa) bei ungefähr 60 kDa, während RIP1 bei 74 kDa zu erkennen war.

Käme es nun zu einer Interaktion zwischen YopP und RIP1, so sollten beide Banden im Western-Blot des Präzipitats sichtbar werden. Nach Färbung mit dem YopP- und dem RIP1-Antikörper zeigte sich sowohl eine YopP-, als auch eine RIP1-Bande, siehe Abbildung 3.11. Dies bedeutet, dass der Wildtyp und auch die C/A Mutante von YopP mit RIP1 interagieren können. Inwieweit diese Interaktion für die Inhibition der RIP1-Phosphorylierung und die Einbindung von RIP1 in die Apoptose-Induktion und ATP-Freisetzung nach Infektion mit *Yersinien* relevant ist, muss allerdings noch eruiert werden.



**Abbildung 3.11: Interaktion von YopP und RIP1 im Western-Blot.** Abgebildet ist das Ergebnis des Pulldown-Assays im Western-Blot. In diesem Pulldown-Assay wurde nach der Transfektion mit pYopP und der katalytisch inaktiven Mutante pYopP C/A eine Interaktion zwischen YopP und RIP1 nachgewiesen. Dazu wurde der Blot zunächst mit einem RIP1-Antikörper gefärbt (rechts im Bild), danach von dem RIP1-Antikörper befreit und ein zweites Mal mit einem anti-YopP-Antikörper inkubiert (links im Bild). Die RIP1-Bande ist im rechten Blot bei ca. 74 kDa, die YopP-Bande im linken Blot bei ca. 60 kDa zu erkennen. Der verwendete Anti-YopP-Antikörper erkennt auch GST, da zur Herstellung des Antikörpers Kaninchen mit einem GST-YopP-Fusionsprotein immunisiert worden waren.

### 3.4 Abschätzung der Virulenz einer YopP-Punktmutante

Tierinfektions-Modelle mit Mäusen eignen sich zur Erforschung der systemischen Yersiniose, da Nagetiere empfänglich gegenüber Yersinien sind und systemische Verläufe zeigen. YopJ bei *Y. pseudotuberculosis* bzw. YopP bei *Y. enterocolitica* induziert als Virulenzfaktor der Yersinien Apoptose und erleichtert die Etablierung einer systemischen Infektion (Monack et al., 1998).

Studien zum Stellenwert der Virulenz von YopJ/P waren bisher aber nur mit YopJ/P-Knockout-Mutanten durchgeführt, welche komplett YopJ/P defizient waren. Im Gegensatz dazu besaßen wir eine Yersinienmutante, die nur eine Punktmutation in YopP aufwies und somit YopP in katalytisch inaktiver Form exprimierte. Bei dieser Mutante war Cystein 172 gegen Alanin im katalytischen Zentrum von YopP ausgetauscht worden.

Um weitere Erkenntnisse zur Virulenz von YopP zu erlangen, führten wir im Maus-Infektionsmodell ein Pilotexperiment mit dieser Mutante im Vergleich zum Wildtypstamm durch. Acht weibliche Albinomäuse der Inzuchtlinie BALB/c wurden mit dem Yersinien-Wildtypstamm (WA) und der Mutante (C/A) infiziert. So sollte die Bedeutung der katalytischen Aktivität von YopP für die Pathogenität der Yersinien ermittelt werden.

Die Infektion der Mäuse erfolgte wie bei einer menschlichen Yersiniose auf enteralem Weg. So können die Bakterien im Darm die Epithelzellen der intestinalen Mukosa durchdringen und sich in den Peyer-Plaques vermehren. Von hier aus erfolgt nach einer gewissen Infektionsdauer die systemische Dissemination mit Abszessbildung in Leber und Milz.

Generell äußert sich eine Yersinieninfektion bei Mäusen mit zunehmend struppigerem Fell, Apathie, Abmagerung und Veränderungen des Sozialverhaltens. Auch aufgrund der vorgeschriebenen tierschutzrechtlichen Bestimmungen wurden in unserem Infektionsversuch die Bedingungen so gewählt, dass die Mäuse durch die Infektion nicht zu massiv geschädigt wurden, um so auch geringfügige Veränderungen in der Virulenz verzeichnen zu können. Das Gewicht blieb jeweils über den gesamten Infektionszeitraum konstant, es kam zu keinen Begleiterkrankungen oder Auffälligkeiten im Sozialverhalten und es wurden nur geringe Fellveränderungen sichtbar.

Nach einem Infektionszeitraum von einmal drei und einmal sechs Tagen wurden die Mäuse getötet. Die Peyer-Plaques, die Leber sowie die Milz wurden entnommen und homogenisiert. Die Verdünnungen der einzelnen Organhomogenisate wurden durch Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) auf ihren Bakteriengehalt überprüft. Schon bei der Präparation der Tiere gab es deutliche Hinweise auf eine bestehende Infektion. So war der Darm der Tiere übermäßig aufgebläht, gashaltig und mit Flüssigkeit gefüllt.

Die Besiedelung der Peyer-Plaques des Darms als erste Eintrittspforte und Replikationsort der Yersinien stellte einen Indikator für eine erfolgreiche Infektion der Mäuse dar. Während die Peyer-Plaques bei gesunden Tieren nicht sichtbar sind, waren sie bei den infizierten Mäusen stechnadelkopfförmig vergrößert. Teilweise liessen sich auf der Oberfläche von Milz und Leber auch Mikroabzesse erkennen.

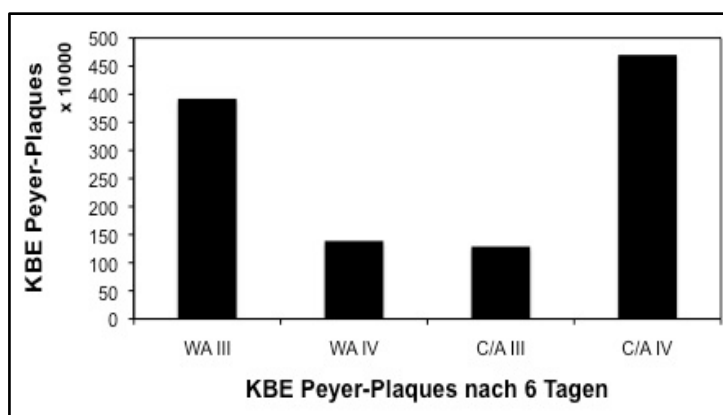
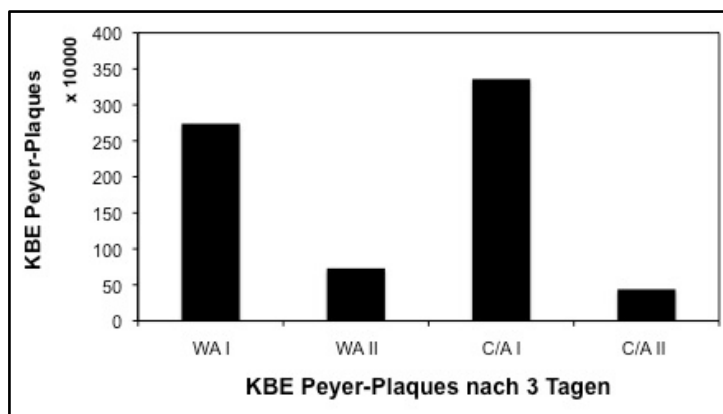
Die Auswertung der Infektionen erfolgte nach dem jeweiligen Organ. Die einzelnen Abbildungen beinhalten die Auswertung jeweils nur eines Organs der infizierten Tiere. Die Bezifferung in den Grafiken bezieht sich somit organspezifisch jeweils auf das gleiche Tier.

Zunächst wurden die Peyer-Plaques auf ihren Bakteriengehalt untersucht, so konnte auch der Erfolg einer Infektion abgeschätzt werden. Hier zeigte sich in beiden Mausgruppen die

höchste Anzahl an Kolonie-bildenden Einheiten, vergleiche Abb. 3.12. Auf Grund der hohen Koloniedichte der Homogenisate war das Auszählen der KBE in den Peyer-Plaques erst ab der dritten Verdünnungsstufe möglich.

Die Infektion mit dem Wildtyp-Yersinienstamm führte nach drei Tagen in den Peyer-Plaques bei einer Maus zu einer hohen Anzahl von Bakterien (WA I), bei einer zweiten Maus konnte eine mittlere Bakteriendichte nachgewiesen werden (WA II). Die Infektion mit der Mutante C/A zeigte ein ähnliches Ergebnis. Bei einer Maus äußerte sich die Infektion sogar durch eine stärkere Besiedlung der Peyer-Plaques als bei einer Infektion mit dem Wildtyp (C/A I).

Über einen längeren Infektionszeitraum nahm in beiden Gruppen die Bakteriendichte in den Peyer-Plaques scheinbar leicht zu (WA III + IV, C/A III + IV). Vermutlich lässt sich dies auf den längeren Infektionszeitraum zurückführen. Insgesamt zeigt sich jedoch kein wesentlicher Unterschied in der Besiedlung der Peyer-Plaques zwischen den Stämmen WA und C/A.



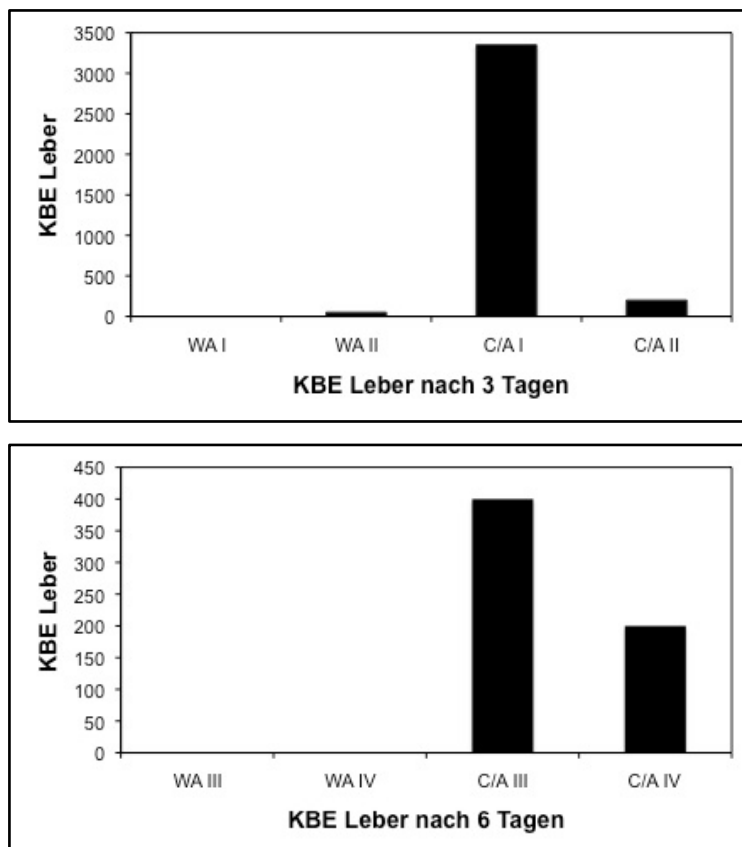
**Abbildung 3.12:**

**Mausmodell: Kolonie-bildende Einheiten (KBE) in den Peyer-Plaques.** Abgebildet sind die KBE in den Peyer-Plaques. Die Infektion erfolgte jeweils mit dem Yersinien-Wildtypstamm (WA) und einer YopP-Mutante (C/A). Oben ist ein Infektionszeitraum von 3 Tagen mit je zwei infizierten Mäusen pro Stamm dargestellt: WA I, II für den Wildtyp und C/A I, II für die YopP-Mutante. Auf der unteren Abbildung ist eine Infektionsdauer von 6 Tagen gezeigt (jeweils III und IV).



Yersinien lassen sich in Leber und Milz erst nachweisen, wenn sie nach Infektion der Peyer-Plaques systemisch disseminieren. In unserm Maus-Infektionsversuch kam es, wie in Abb. 3.13. dargestellt, nur zu einer geringen Besiedlung der Leber. Bei einer dreitägigen Infektionsdauer war bei Infektion mit der Mutante C/A in allen zwei Fällen eine Besiedlung der Leber festzustellen (C/A I, II). Maus C/A I zeigte als Einzige eine sehr hohe Bakteriendichte. Die Infektion mit dem Yersinien-Wildtyp zog nur bei einer Maus eine geringfügige Koloniebildung in der Leber nach sich (WA II).

Auch über einen verlängerten Infektionszeitraum von sechs Tagen konnte beim Wildtypstamm keine vermehrte Koloniebildung in der Leber verzeichnet werden (WA III, IV). Bei den mit der Mutante C/A infizierten Mäusen führte ein längerer Infektionszeitraum immerhin auch bei beiden Mäusen zu Kolonien in der Leber (C/A III, IV), allerdings waren diese in deutlich geringerer Größenordnung zu verzeichnen als bei Maus C/A I nach drei Tagen Infektion. Möglicherweise hatte hier bereits die Eliminierung der Bakterien eingesetzt.



**Abbildung 3.13:**

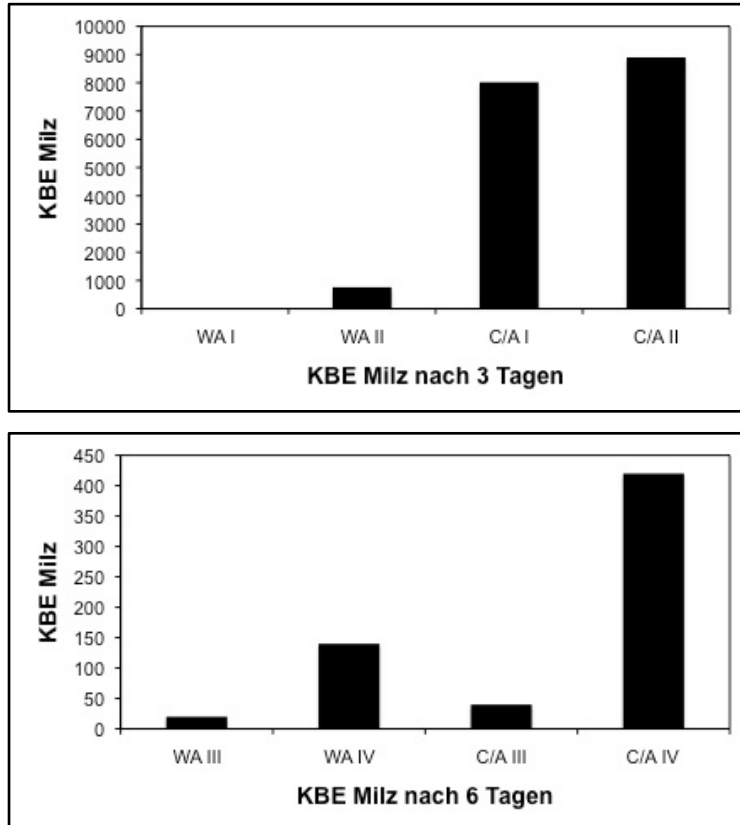
**Mausmodell: Kolonie-bildende Einheiten in der Leber.**

Abgebildet ist die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) aus Homogenisaten der Leber. Je zwei Mäuse wurden mit dem Yersinien-Wildtyp (WA) und mit der YopP-Mutante (C/A) infiziert. Oben ist ein Infektionszeitraum von drei und unten von sechs Tagen dargestellt. Die höchste Bakteriendichte lässt sich bei Infektion mit der Mutante C/A I nach drei Tagen erkennen.

Erstaunlicherweise konnten in dem durchgeführten Infektionsversuch in der Milz deutlich mehr KBE als in der Leber nachgewiesen werden, siehe Abb. 3.14. Dies wird vor allem bei der C/A Mutante schon nach drei Tagen deutlich. Hier zeigte sich z.B. bei Maus C/A II eine bakterielle Besiedlung von über achttausend KBE in der Milz, im Vergleich zu nur zweihundert KBE in der Leber.

Wie in der Leber ließen sich bei Mäusen, die mit der Mutante C/A infiziert worden waren, in der Milz nach einem kürzeren Infektionszeitraum mehr KBE nachweisen als nach einer Infektionsdauer von sechs Tagen.

Vergleichbar zur Leber (Abb. 3.13) waren auch in der Milz bei einem Infektionszeitraum von drei Tagen bei den mit dem Wildtyp infizierten Tieren deutlich weniger KBE zu verzeichnen als bei den mit der Mutante infizierten Tieren. Nach einem Infektionszeitraum von sechs Tagen ließen sich bei den mit dem Wildtypstamm infizierten Tieren Kolonien in der Milz nachweisen, die in der Leber nicht nachgewiesen werden konnten. Insgesamt variierte die Ausprägung der Dissemination stark zwischen den beiden Gruppen, allerdings auch sehr stark innerhalb einer Infektionsgruppe.



**Abbildung 3.14:**

**Mausmodell: Kolonie-bildende Einheiten in der Milz.** Gezeigt ist die Anzahl der KBE aus Homogenisaten der Milz. Es wurden je zwei Mäuse mit dem Yersinien-Wildtypstamm (WA) und der YopP-Mutante (C/A) infiziert. Oben ist ein Infektionszeitraum von drei Tagen, unten ein Infektionszeitraum von sechs Tagen gezeigt.

Schwierig bleibt nun eine eindeutige Beurteilung dieser Ergebnisse im Gesamtzusammenhang. Es ergaben sich erhebliche Unterschiede in der Organbesiedlung jedes einzelnen Tieres, gleichzeitig ergaben sich auch große Schwankungen innerhalb einer Infektionsgruppe, d.h. entweder mit dem Wildtypstamm oder der Mutante C/A. Auch aufgrund der geringen Anzahl an infizierten Mäusen lassen sich die Infektionsergebnisse nur schwer miteinander vergleichen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Maus WA I zwar die höchste Anzahl an KBE in den Peyer-Plaques aufwies, es allerdings zu keiner weiteren Dissemination in Milz oder Leber kam. Maus WA II wies zwar eine geringere Bakteriendichte in den Peyer-Plaques auf, löste aber mit einigen KBE in der Leber und in der Milz eine systemische Dissemination aus. Ein längerer Infektionszeitraum war mit einer etwas höheren Besiedelung der Peyer-Plaques assoziiert. Die KBE in Leber und Milz zeigten aber wechselnde Effekte. Es lässt sich jedoch feststellen, dass es bei der Infektion mit dem Wildtypstamm eher zur Koloniebildung in der Milz als in der Leber kam.

Insgesamt führte die Infektion mit der Mutante C/A in allen Organen zu einer höheren Bakterienbesiedlung als die Infektion mit dem Wildtypstamm. Zu erwarten war eine stärkere Bakterienbesiedlung der Organe von dem Yersinien-Wildtyp. Dass gerade die Mutante C/A mit dem katalytisch inaktiven YopP eine höhere Besiedlungsrate aufwies war überraschend, aber auch interessant. Eine Attenuierung der Virulenz von YopP durch die Punktmutation lässt sich durch das durchgeführte Pilotexperiment mit einer allerdings sehr geringen Fallzahl jedoch nicht belegen. Ob das Einbringen der Punktmutation und die Hemmung der katalytischen Aktivität von YopP möglicherweise tatsächlich zu einer Steigerung der Virulenz von *Y. enterocolitica* führen kann, muss allerdings in zukünftigen Infektionsexperimenten mit größeren Mauszahlen und mehreren unterschiedlich großen Infektionsdosen noch abgeklärt werden.

## 4 DISKUSSION

Im Rahmen von Infektionsprozessen werden zwischen Krankheitserregern und Wirtszellen Signale ausgetauscht, die Einfluss auf die Vitalität von Wirtszellen nehmen können. So können Mikroorganismen zu ihrem Vorteil Zelltod von Wirtszellen hervorrufen oder verzögern. Andererseits wird auch durch die Einleitung von Immunreaktionen die Lebensfähigkeit von Wirtszellen indirekt beeinflusst. Sehr häufig kommt es deshalb bei Infektionsprozessen zu einem Versterben von Wirtszellen. In Abhängigkeit vom Typ der sterbenden Zelle und von der Form des Zelltods ergeben sich dabei unterschiedliche Konsequenzen für die Immunantwort und für den Krankheitsverlauf. Apoptose, Nekrose und Pyroptose sind die drei häufigsten und bekanntesten Zelltodformen, die sich vor allem hinsichtlich ihrer proinflammatorischen Aktivität unterscheiden. Beim nekrotischen Zelltod werden sogenannte DAMPs freigesetzt, welche als Alarmsignale fungieren und Entzündung hervorrufen. In den meisten Fällen ist Nekrose auf einen passiven Zelltod zurückzuführen. Eine Sonderform der Nekrose ist die sogenannte Nekroptose, die in aktiver, regulierter Form ausgeführt wird und von den Aktivitäten der Kinasen RIP1 und RIP3 abhängt (Kaczmarek et al., 2013).

Eine Vielzahl von DAMPs und PAMPs können ferner Pyroptose auslösen. In den meisten Fällen geht Pyroptose mit einer Aktivierung von Caspase-1 und einer daraus resultierenden Inflammasom-Aktivierung einher. Durch die Freisetzung von IL-1 $\beta$  und IL-18 ist Pyroptose auch als proinflammatorischer Zelltod anzusehen (Duprez et al., 2009). Demgegenüber wird Apoptose eher als „stillere“, nicht-entzündlicher Zelltod betrachtet, bei dem sich die Zelle durch Aktivierung des Apoptoseprogramms selbst abbaut ohne Entzündungsreize an seine Umgebung abzusenden. Neuere Daten haben jedoch gezeigt, dass auch apoptotische Zellen immunologisch aktive Signale aussenden können, welche andere Zellen anlocken und aktivieren (Ravichandran, 2011). Diese sogenannten „Find-me“-Signale induzieren Chemotaxis von Phagozyten zu den durch Apoptose sterbenden Zellen, sodass diese frühzeitig gefunden und eliminiert werden können ohne dass ein Schaden für die Umgebung entsteht.

Pathogene Yersinien induzieren Zelltod von Makrophagen durch Apoptose. Dieser Effekt ist auf die Hemmung proinflammatorischer Signalwege (NF- $\kappa$ B, MAPK) durch das *Yersinia* Virulenzprotein YopP (*Y. enterocolitica*) bzw. YopJ (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*)

zurückzuführen. Der NF- $\kappa$ B/MAPK- Signalweg hat eine antiapoptotische Funktion. Sind diese Signalwege beispielsweise durch YopP gehemmt, wird bei gleichzeitiger Anwesenheit eines proapoptotischen Stimulus Apoptose ausgelöst.

Bisher war unklar, welche Bedeutung die Apoptose-Induktion für die Pathogenese der Yersiniose hat. Da nur Makrophagen und dendritische Zellen, aber keine anderen Zelltypen, durch Yersinien-Infektion apoptotisch werden (Ruckdeschel et al., 1997b), könnte die Apoptose-Induktion ein Mechanismus der Immunmodulation durch *Yersinia* sein, der selektiv Zellen der unspezifischen Immunabwehr schädigt, um so den Bakterien einen Überlebensvorteil in der Interaktion mit der Wirtsabwehr zu verschaffen. Interessanterweise wird der Zelltod bei einer Hemmung der NF- $\kappa$ B- und MAPK-Signalwege aber durch einen konservierten Signalweg der unspezifischen Immunität, über die LPS-reaktive TLR4-TRIF-Signalkaskade, aktiviert (Zhang und Bliska, 2003). Dies könnte umgekehrt dafür sprechen, dass es sich bei der Apoptose-Induktion um eine Immunreaktion handelt, die zugunsten des Wirts ausgelöst wird. Um dieser Frage nachzugehen, wurden in dieser Arbeit Untersuchungen durchgeführt, die dazu beitragen sollten herauszufinden, ob bei der Zelltod-Induktion durch Yersinien chemotaktische oder proinflammatorische Signale freigesetzt werden, die für die Wirtsabwehr relevant sein könnten.

Es konnte gezeigt werden, dass durch Apoptose sterbende Thymozyten ATP und UTP Nukleotide freisetzen (Elliott et al., 2009). Diese Nukleotide wirken als chemotaktische Faktoren („*Find-me*“-Signale), die Makrophagen und Monozyten zur Beseitigung der apoptotischen Zellen anlocken. Um herauszufinden, ob auch bei der Apoptose-Induktion durch Yersinien bei Makrophagen solche Signale generiert werden, wurden Yersinien-infizierte J774-Makrophagen auf eine Freisetzung von ATP in das Zellkulturmedium untersucht. Tatsächlich konnte ATP im Zellkulturüberstand in einer Konzentration nachgewiesen werden, welche eine chemotaktische Wirkung auf monozytäre Zellen zulässt. Die ATP-Freisetzung war von der Apoptose-Induktion durch Yersinien abhängig, da nur nach Wildtyp-Yersinien-Infektion, nicht aber nach Infektion mit der YopP-negativen-Mutante, ATP gemessen werden konnte. Auch war der Caspase-Inhibitor zVAD-fmk in der Lage, die ATP-Freisetzung zu hemmen.

Überraschenderweise konnte Carbenoxolon, ein Inhibitor von Pannexin-Kanälen, welche für die Sekretion von ATP bei apoptotischen Zellen verantwortlich gemacht wurden (Chekeni et al., 2010), die ATP-Freisetzung nicht reduzieren. Diese Resultate sprechen dafür, dass ATP bei der Yersinien-induzierten Apoptose bei Makrophagen passiv freigesetzt wird, und nicht

aktiv durch Pannexin-Kanäle sekretiert wird. Nach Apoptoseeinleitung bei Makrophagen kommt es sehr schnell zu einer Durchlässigkeit der Zytoplasmamembran. Infolge dieser Porenbildung wird ATP sehr frühzeitig, vermutlich passiv, in die Umgebung abgegeben. ZVAD-fmk verhindert die durch Caspasen bedingte Zerstörung der Membran und die damit einhergehende ATP-Freisetzung.

YopP konnte in diesen Experimenten durch den IKK $\beta$ -Inhibitor BMS ersetzt werden, um bei gleichzeitiger Infektion mit YopP-negativen Yersinien Apoptose von Makrophagen und eine ATP-Freisetzung auszulösen. Dieses Resultat bestätigt frühere Untersuchungen, die zeigen konnten, dass eine Hemmung der IKK $\beta$ - bzw. NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch BMS oder YopP bei zeitgleich stattfindender Aktivierung des LPS-Rezeptors TLR4 genügt, um Apoptose von Makrophagen zu induzieren (Haase et al 2003). Interessanterweise war Nekrostatin-1, ein Inhibitor der Kinase RIP1, in der Lage, die durch Yersinien ausgelöste ATP-Freisetzung zu hemmen und die Rate an sterbenden Makrophagen zu reduzieren. Dieses Ergebnis weist auf eine Rolle von RIP1 bei der Apoptose-Induktion durch Yersinien hin. RIP1 ist ein zentraler Regulator der Zellvitalität unter unterschiedlichen Zellstressbedingungen. RIP1 kann sowohl zelluläres Überleben, als auch Zelltod durch Apoptose oder Nekrose (Nekroptose) vermitteln (Moriwaki und Chan, 2014). Welcher dieser unterschiedlichen Effekte durch RIP1 bedient wird, hängt maßgeblich von posttranslationalen RIP1-Modifikationen (z.B. Phosphorylierung, Ubiquitinierung) und von der Rekrutierung von Adapterproteinen (z.B. cIAPs, FLIPs) in RIP1-Signalkomplexe ab. Auch im TLR4-TRIF-Signalweg kann RIP1 Einfluss auf das Schicksal der stimulierten Zelle nehmen, sodass eine Einbindung von RIP1 in den Yersinien-induzierten Zelltod von Makrophagen plausibel erscheint.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde analysiert, ob durch Freisetzung von ATP bei Yersinien-infizierten Makrophagen tatsächlich Chemotaxis von phagozytären Zellen in Form eines „*Find-me*“-Signals induziert werden kann. Dafür wurden ATP-haltige Zellkulturüberstände, die von apoptotischen Makrophagen nach Yersinien-Infektion gewonnen wurden, auf ihre Fähigkeit hin untersucht, monozytäre THP1-Zellen in einem Transwell-System zur chemotaktischen Migration anzuregen. Tatsächlich wurde nach Infektion mit Wildtyp-Yersinien, nicht aber nach Infektion mit YopP-negativen Yersinien, die keine Apoptose auslösen, ein chemotaktisches Signal im Zellkulturmedium gemessen. Der apoptotische Zelltod von Makrophagen könnte also für den Wirtsorganismus insoweit von Vorteil sein, dass dabei chemotaktische Reize gesetzt werden, die andere Immunzellen zum Infektionsherd rekrutieren. Es war überraschend, dass die Hemmung der Yersinien-

vermittelten Apoptose mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk das chemotaktische Potential des Zellkulturüberstandes nicht reduzieren konnte, obwohl, wie oben beschrieben, durch zVAD-fmk die ATP-Freisetzung der sterbenden Makrophagen blockiert wurde. Wir folgern daraus, dass von Makrophagen, die infolge der Yersinien-Infektion versterben, nicht nur passiv über eine Zerstörung der Zytoplasmamembran chemotaktische Signale freigesetzt werden, sondern auch aktiv chemotaktische Stimuli ausgesendet werden können. Dafür kämen neben ATP und UTP auch Lysophosphatidylcholin, Sphingosine-1-Phosphat, oder das Fraktalkin CX3CL1 (*chemokine (C-X3-C motif) ligand1*) in Betracht (Ravichandran, 2011). Eine neuere Studie hat gezeigt, dass bei der Fas/CD95-induzierten Apoptose auch aktiv Zytokine und Chemokine, wie IL-6, IL-8, CXCL1, MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) und GMCSF (*granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*), produziert werden und Chemotaxis vermitteln (Cullen et al., 2013). Interessanterweise spielt RIP1 eine Rolle bei der Synthese dieser „Find-me“-Stimuli. Über seine Einbindung in die Yersinien-induzierte Apoptose kontrolliert RIP1 möglicherweise auch bei Yersinien-infizierten Makrophagen eine Produktion solcher chemotaktischer Stimuli, was aber erst in nachfolgenden Studien noch eruiert werden muss.

Im Folgenden interessierte uns, ob der durch Yersinien ausgelöste Zelltod von Makrophagen auch mit einer Freisetzung von IL-1 $\beta$  einhergeht. In der Regel ist eine IL-1 $\beta$ -Freisetzung auf die Aktivierung des sogenannten Inflammasoms zurückzuführen und mit pyroptotischem Zelltod vergesellschaftet. Sekretiertes IL-1 $\beta$  kann eine proinflammatorische Reaktion und eine protektive Immunantwort vermitteln. Induziert wird das Inflammasom und eine damit verbundene IL-1 $\beta$ -Freisetzung durch eine Vielzahl unterschiedlicher DAMPs und PAMPs, unter anderem auch durch bakterielle Typ-III-Proteinsekretionssysteme und durch extrazelluläres ATP. Auch *Yersinia* verfügt über ein Virulenz-assoziiertes Typ-III-Proteinsekretionssystem und setzt bei Apoptose ATP frei. Deshalb erschien es möglich, dass auch Yersinien bei Makrophagen eine Inflammasom-Aktivierung auslösen können (Shin und Cornelis, 2007). Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass Wildtyp-Yersinien bei J774-Makrophagen Apoptose auslösten und der Zelltod nicht mit einer IL-1 $\beta$ -Freisetzung assoziiert war. Es konnten bei den sterbenden Makrophagen auch keine pyroptotischen Merkmale gefunden werden. Im Gegensatz dazu induzierte ein Yersinienstamm, der das Typ-III-Proteinsekretionssystem besitzt, aber keine Effektor-Yops produzieren kann, eine deutliche IL-1 $\beta$ -Sekretion und Pyroptose. Nach Infektion mit der YopP-Mutante, die keine Apoptose auslöst, überlebten die Zellen wiederum größtenteils und es war keine IL-1 $\beta$ -

Produktion zu verzeichnen. *Yersinia* war also in der Lage, eine durch das Typ-III-Sekretionssystem induzierte IL-1 $\beta$ -Freisetzung unabhängig von einer Apoptose-Induktion durch YopP zu unterdrücken. Vorstudien hatten gezeigt, dass Yops von *Yersinia*, die einen Effekt auf Rho-GTPasen ausüben, mit der Aktivierung von Caspase-1 und der Freisetzung von IL-1 $\beta$  interferieren können (Schotte et al., 2004). Eine andere Arbeit hat später eine Rolle von YopK (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) bzw. YopQ (*Y. enterocolitica*) bei der Hemmung der Inflammasom-Aktivierung beschrieben (Brodsky et al., 2010). Um mehr über einen möglichen Effekt von einzelnen Yops auf das Inflammasom zu erfahren, testeten wir eine Reihe von Yop-Mutanten bei J774-Makrophagen auf die Freisetzung von IL-1 $\beta$ . Diese Untersuchungen brachten zu Tage, dass YopQ für die Hemmung von Pyroptose und die damit verbundene IL-1 $\beta$ -Freisetzung bei *Y. enterocolitica* essentiell ist. Bei einem Fehlen von YopQ sterben die meisten Makrophagen durch Pyroptose, ein Effekt der selbst durch die Anwesenheit von YopP nicht zur Apoptose abgewendet werden kann. Der primäre Zelltod, der durch Wildtyp-Yersinien bei Makrophagen induziert wird, ist folglich Pyroptose und YopQ ist notwendig, um diese Form des Zelltods abzuwehren und in eine durch YopP-vermittelte Apoptose zu verkehren. Wie YopQ/K Pyroptose verhindert, ist bisher unklar. Da YopQ/K mit der Translokationspore des Typ-III-Proteinsekretionssystems in der Wirtszellmembran assoziiert ist, maskiert YopQ/K vermutlich ein Erkennungssignal des Typ-III-Proteinsekretionssystems, das sonst die Aktivierung des Inflammasoms einleiten würde (Brodsky et al., 2010). Neben YopQ scheinen aber auch noch YopE und YopO einen hemmenden Einfluss auf die Inflammasom-Aktivierung zu haben. So waren bei Yersinienmutanten, denen YopE und YopO fehlte, auch höhere Raten an Pyroptose und IL-1 $\beta$ -Freisetzung nachweisbar. Das Fehlen von nur einem der beiden Yops hatte keinen klaren Effekt. Aus diesen Experimenten folgerten wir, dass YopE und YopO gemeinsam, möglicherweise über eine Inhibition von Rho-GTPasen, die Inflammasom-Aktivierung negativ beeinflussen können. Später wurden auch noch inhibitorische Einflüsse von YopM von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* auf die Caspase-1-Aktivität und Inflammasom-Aktivierung beschrieben (Chung et al., 2014; LaRock und Cookson, 2012). Es sind also insgesamt mehrere Yops in der Lage, einer Aktivierung des Inflammasoms durch das *Yersinia* Typ-III-Proteinsekretionssystem entgegenzuwirken, wobei YopQ zumindest in unseren Untersuchungen die prominenteste Aktivität ausübt.

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass J774-Makrophagen bei einer Infektion mit *Y. enterocolitica* durch Apoptose sterben. YopQ ist dabei notwendig, um Pyroptose zu



verhindern und eine YopP-vermittelte Apoptose zu ermöglichen. Von den sterbenden J774-Zellen wird kein IL-1 $\beta$  freigesetzt, es werden aber „*Find-me*“-Signale ausgesendet, die andere phagozytäre Zellen rekrutieren. Interessanterweise konnte später in zwei anderen Arbeiten gezeigt werden, dass die Apoptose-Induktion von Yersinien bei Knochenmarksmakrophagen sehr wohl mit einer Produktion proinflammatorischer Zytokine verbunden ist (Philip et al., 2014; Weng et al., 2014). So werden bei primären, aus dem Knochenmark von Mäusen gewonnenen Makrophagen im Zuge der durch Yersinien ausgelösten Apoptose IL-1 $\beta$  und IL-18 freigesetzt. Dieser Effekt ist auch *in vivo* bei Yersinien-infizierten Mäusen nachvollziehbar und scheint für die Etablierung einer protektiven Immunität gegen die Yersiniose wichtig zu sein. Es handelt sich dabei offenbar um einen bisher unbekanntem Weg der Inflammation-Aktivierung, der über eine von RIP1 und Caspase-8 vermittelte Apoptose erfolgt (Philip et al., 2014; Weng et al., 2014). Dieser Weg scheint bei primären Makrophagen, nicht aber bei Makrophagen der J774-Zelllinie durch Yersinien aktiviert werden zu können, da in unserem Infektionsmodell mit J774-Makrophagen kein IL-1 $\beta$  gemessen werden konnte. Unsere Ergebnisse zeigten jedoch, dass RIP1 auch bei J774-Zellen in die Apoptose-Induktion eingebunden ist, da der RIP1-Inhibitor Nekrostatin-1 einen hemmenden Effekt auf die durch Yersinien ausgelöste Apoptose hatte. Die immunmodulatorischen Aktivitäten von YopP/J rufen also über die Kinase RIP1 Apoptose von Makrophagen hervor, die eine schützende Wirkung auf den infizierten Wirtsorganismus zu haben scheint. Wie die RIP1-abhängige, protektive Apoptose durch die Yersinien induziert wird, ist bisher noch unklar. Möglicherweise genügt die Unterdrückung antiapoptotischer Signalwege (NF- $\kappa$ B, MAPK) durch YopP/J, um die RIP1-vermittelte Zytotoxizität zu aktivieren. Andererseits könnte YopP/J auch direkt Einfluss auf RIP1 nehmen. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass YopP die Phosphorylierung von RIP1 unterdrücken kann, was mit der beschriebenen Acetyltransferase-Aktivität von YopP auf zelluläre Kinasen in Zusammenhang stehen könnte. Um mehr über einen möglichen Effekt von YopP auf RIP1 zu erfahren, wurde in dieser Arbeit ein eukaryotischer Expressionsvektor erstellt, der die Expression von YopP in Fusion mit GST in transfizierten Zellen erlaubt. Über die angehängte GST-Sequenz konnte YopP aus zellulären Lysaten präzipitiert, und dabei auf eine Ko-Präzipitation und Interaktion mit RIP1 untersucht werden. Unsere Ergebnisse zeigten, dass sowohl Wildtyp-YopP, als auch inaktives YopP, welches eine Punktmutation im katalytischen Zentrum (YopP-C172A) trägt, in transfizierten 293-Zellen mit RIP1 interagieren kann. In beiden Fällen konnte RIP1 mit YopP ko-präzipitiert werden. Dies gibt einen ersten Hinweis darauf, dass RIP1 tatsächlich

Ziel einer immunmodulatorischen Aktivität von YopP sein könnte. Ob eine Acetylierung von RIP1 stattfindet, und ob die Bindung von YopP an RIP1 in die Apoptose-Auslösung eingebunden ist, muss allerdings in nachfolgenden Studien erst noch geklärt werden.

Zuletzt wurde in dieser Arbeit noch ein Pilotexperiment dazu durchgeführt, ob die Inaktivierung von YopP durch das Einbringen der Punktmutation, bei der das Cystein an Aminosäureposition 172 durch Alanin ersetzt wurde, Einfluss auf die Pathogenität von *Yersinien* hat. Untersuchungen zum Stellenwert der Virulenz von YopP/J im Mausinfektionsmodell waren bis zu diesem Zeitpunkt nur mit YopP/J-Knockout-Mutanten durchgeführt worden, denen YopP/J komplett fehlte. Der komplette Verlust eines Proteins kann bei einer entsprechenden Mutante zu unspezifischen Effekten führen. Die publizierten Ergebnisse mit diesen Stämmen sind nicht eindeutig oder sogar diskrepant (Brodsky und Medzhitov, 2008; Galyov et al., 1994; Lemaître et al., 2006; Monack et al., 1998; Trülzsch et al., 2004; Zheng et al., 2012). Im Gegensatz dazu besaßen wir einen *Yersinien*stamm, welcher ein YopP-Protein exprimiert, das an potentielle Zielmoleküle binden konnte, durch die Punktmutation von Cystein- 172 zu Alanin aber keine Acetyltransferase-Aktivität aufwies und katalytisch inaktiv war. Deshalb versprachen wir uns von der Untersuchung dieses Stamms ein möglichst präzises und spezifisches Ergebnis hinsichtlich der Bedeutung der Aktivität von YopP auf die Virulenz von *Yersinia*. Dies war für uns auch insoweit interessant, weil das von uns untersuchte YopP eine stärkere proapoptotische Aktivität aufweist als andere Isotypen von YopP oder YopJ (Ruckdeschel et al 2001, Zaubermaier et al 2006, Brodsky et al and Medzhitov et al 2008). Die Untersuchung des stärker aktiven YopP könnte möglicherweise einen deutlicheren *in vivo*-Phänotyp hervorbringen als vergleichbare Experimente mit *Yersinien* mit schwächer aktivem YopP oder YopJ. Zur Abschätzung dieser Arbeitshypothese wurde ein Pilotinfektionsexperiment durchgeführt, in dem jeweils vier Mäuse mit unseren Wildtyp-*Yersinien* im Vergleich zu der katalytisch inaktiven YopP-Mutante enteral infiziert wurden. Nach drei bzw. sechs Tagen wurde von jeweils zwei Mäusen die Anzahl der Bakterien in den Peyer-Plaques, und in Leber und Milz bestimmt. Es galt dadurch herauszufinden, ob sich die Bakterienstämme in der Fähigkeit unterscheiden, den Mäusedarm zu infizieren und sich von dort in Leber und Milz auszubreiten. Sowohl der Wildtypstamm, als auch die YopP-Punktmutante konnten die Peyer-Plaques effizient infizieren und es zeigten sich dabei keine gravierenden Unterschiede. Erstaunlicherweise war aber die Ausbreitung der *Yersinien* in Leber und Milz durch die inaktivierende Punktmutation von YopP nicht beeinträchtigt. Im Gegenteil waren sowohl am Tag drei, als auch am Tag sechs etwas mehr

Bakterien nach Infektion mit der YopP-Mutante in Leber und Milz nachweisbar als nach Wildtyp-Yersinien-Infektion. Dieses impliziert, dass die Inaktivierung von YopP die Virulenz von *Yersinia* erhöhen könnte. Dies könnte Ausdruck davon sein, dass die Apoptose-Induktion durch YopP möglicherweise tatsächlich für den Wirt vorteilhaft ist. Wird keine Apoptose ausgelöst, verstärkt sich die Dissemination und die Vermehrung der Bakterien im lymphatischen Wirtsgewebe. Allerdings waren die festgestellten Unterschiede sehr gering ausgeprägt und die Zahl der untersuchten Mäuse sehr klein. Deshalb müssten noch mehr Infektionsexperimente mit unterschiedlichen Infektionsdosen und größeren Mäusezahlen vorgenommen werden, um den Stellenwert der Aktivität von YopP auf die Pathogenität von Yersinien auf Mäuse zu ermitteln. Wie schon in anderen Arbeiten gezeigt (Brodsky und Medzhitov, 2008; Galyov et al., 1994; Lemaître et al., 2006; Monack et al., 1998; Zheng et al., 2012), scheint der von uns untersuchte YopP-Isotyp, trotz seiner stärkeren *in vitro*-Aktivität, *in vivo* aber auch eher einen diskreten Phänotyp zu haben. Offenbar wird das durch unser Pilotexperiment bestätigt, da die Virulenz der YopP-Mutante im Vergleich zum Wildtyp nicht eindeutig differierte.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Pathogene Yersinien induzieren Apoptose bei Makrophagen. Dieser Effekt ist auf das *Y. enterocolitica* Virulenzprotein YopP zurückzuführen. YopP hemmt zentrale Kinasen der unspezifischen Immunität und dadurch proinflammatorische und antiapoptotische Signalwege. Eine gleichzeitige Aktivierung zytotoxischer Signale führt Apoptose der infizierten Makrophagen herbei. Bisher ist unklar, ob die Induktion von Apoptose bei Makrophagen eine Virulenzstrategie der Yersinien ist, oder als Reaktion des Immunsystems anzusehen ist.

Um mehr über die Konsequenzen des Yersinien-induzierten Zelltods zu erfahren, wurden in dieser Arbeit mehrere molekulare und funktionelle Aspekte der Apoptose-Induktion durch Yersinien analysiert. Unsere Untersuchungen zeigten, dass die Induktion von Apoptose bei J774-Mausmakrophagen mit einer Freisetzung chemotaktischer Signale einherging. Bei der Apoptose-Induktion durch Yersinien wurden „*Find-me*“-Signale ausgesendet, die andere phagozytäre Zellen rekrutierten. Dabei scheint die Kinase RIP1 eine Rolle zu spielen. So konnte eine Hemmung der RIP1-Kinaseaktivität die Apoptoserate und die damit verbundene Freisetzung von chemotaktisch wirksamen ATP hemmen. Eine zentrale Funktion von RIP1 bei der Regulation von Zelltod und Zellüberleben ist von anderen Zellstresssituationen bekannt. Unsere Daten sprechen dafür, dass RIP1 auch in die Apoptose-Induktion durch Yersinien bei Makrophagen eingebunden ist. Tatsächlich kann YopP eine direkte Interaktion mit RIP1 eingehen, was in Transfektions- und Präzipitationsexperimenten ermittelt wurde.

Unsere Ergebnisse zeigten weiter, dass Yersinien durch Typ-III-Proteinsekretion primär pyroptotischen Zelltod hervorrufen, der mit einer Freisetzung von IL-1 $\beta$  einhergeht. Diese Form des Zelltods wurde durch transloziertes YopQ verhindert und in eine durch YopP vermittelte Apoptose umgelenkt. Auch YopO und YopE schienen bei der Hemmung von Pyroptose eine Rolle zu spielen. Folglich unterdrücken die immunmodulatorischen Eigenschaften von *Y. enterocolitica* Pyroptose und führen nachfolgend Apoptose von Makrophagen herbei. Möglicherweise wird bei Unterdrückung der proentzündlichen Pyroptose von den infizierten Makrophagen kompensatorisch eine chemotaktisch wirksame Apoptose ausgelöst, die dann auch für den Wirt von Vorteil ist. Ein eindeutiger *in vivo* Phänotyp einer inaktiven YopP-Punktmutante im Vergleich zu Wildtyp-Yersinien konnte in einem Pilot-Mausinfektionsexperiment jedoch nicht ermittelt werden. Dazu müssten noch weitere, umfassendere Untersuchungen durchgeführt werden.

**6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb	Abbildung
Ail	<i>Atachment and Invasin locus</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (Rinderserum Albumin)
cFLIP	<i>cellular Fas-associated-death-domain like IL-1<math>\beta</math>-converting enzyme inhibitory protein</i>
cIAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis</i>
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
Cm	Centimeter
CRP	C-reaktives Protein
CX3CL1	<i>Chemokine (C-X3-C motif) ligand1</i>
DAMP	<i>Danger Associated Molecular pattern</i>
DD	<i>Death Domain</i>
DISC	<i>Death Inducing Signaling Complex</i>
DMEM	<i>Dilbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d-NTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dd-NTP	Didesoxy-Nukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dlubecco's phosphate Buffer Saline</i>
ECL	<i>Enhances chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylen-diamin-teraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked-immunosorbent-assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal Regulated Kinase</i>
ETOH	Ethanol
FasL	Fas Ligand
FADD	<i>Fas-Associated-Death Domain</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , Fötales Rinder Serum

GAP	GTPase aktivierende Proteine
GMCSF	<i>Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GDP	Guanosindiphosphat
h	Stunde
IFN	Interferon
IgA/G/M	Immunglobulin A/G/M
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of <math>\kappa</math>B</i>
IKK	I $\kappa$ $\beta$ Kinase Komplex
IL	Interleukin
Inv	Invasin
IRAK	<i>IL-1 Receptor Associated Kinase</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
Kap	Kapitel
KBE	Kolonie-Bildende Einheit
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysachharid
LRR	Leucin Reiche Sequenz
mA	Milliampere
MAC	<i>Membran Attack Complex</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MBL	Mannan-Bindendes-Lektin
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1)</i>
Min	Minute
Mm	Millimeter
ml	Milliliter
mV	Millivolt
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
Myd88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88</i>

NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NLR	<i>Nod-Like Receptor</i>
NLRP	<i>NOD Like Receptor family, Pyrin domain containing 3</i>
nM	Nanometer
NS	Necrostatin-1
LcrV	<i>Low-calcium-response V antigen</i>
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
PMSF	Pheylmethylsulfonylfluorid
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pYV	<i>Plasmid for Yersinia Virulence</i>
RHIM	<i>RIP homotypic interaction motif</i>
RIP	<i>Receptor Interacting Protein</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
Rpm	<i>Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institut 1640</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOB	<i>Super optimal broth</i>
TAB	<i>TAK 1 Binding Protein</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TAK	<i>TGF-<math>\beta</math>-Activated Kinase</i>
TIR	<i>Toll/IL-1-Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Nekrosis Faktor</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TRADD	<i>TNF Receptor Associated Death Domain</i>
TRAF	<i>TNF Receptor Associated Factor</i>
TRAM	<i>Trif Related Adapter Moecule</i>
TRIF	<i>TIR domain containing adapter inducing interferone <math>\beta</math></i>
TTSS	Typ-III-Sekretionssystem
YadA	Yersinia Adhäsion A
YpkA	Yersinia Proteinkinase A
Ysc	<i>Yop secretion</i>

Yop                      *Yersinia outer protein*



## 7 QUELLENVERZEICHNIS

- Abdul-Sater, A.A., Saïd-Sadier, N., Ojcius, D.M., Yilmaz, O., Kelly, K.A., 2009.** Inflammasomes bridge signaling between pathogen identification and the immune response. *Drugs Today* 45 Suppl B, 105–112.
- Adkins, I., Schulz, S., Borgmann, S., Autenrieth, I.B., Gröbner, S., 2008.** Differential roles of Yersinia outer protein P-mediated inhibition of nuclear factor-kappa B in the induction of cell death in dendritic cells and macrophages. *J. Med. Microbiol.* 57, 139–144.
- Aepfelbacher, M., Trasak, C., Ruckdeschel, K., 2007.** Effector functions of pathogenic Yersinia species. *Thromb. Haemost.* 98, 521–529.
- Aepfelbacher, M., Roppenser, B., Hentschke, M., Ruckdeschel, K., 2011.** Activity modulation of the bacterial Rho GAP YopE: an inspiration for the investigation of mammalian Rho GTPases. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 951–954.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A. & Korkeala, H., 2006.** Molecular epidemiology of Yersinia enterocolitica infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 47(3), S.315–329.
- Aili, M., Isaksson, E.L., Carlsson, S.E., Wolf-Watz, H., Rosqvist, R., Francis, M.S., 2008.** Regulation of Yersinia Yop-effector delivery by translocated YopE. *Int. J. Med. Microbiol.* 298, 183–192.
- Autenrieth, I.B., Firsching, R., 1996.** Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by Yersinia enterocolitica: an ultrastructural and histological study. *J. Med. Microbiol.* 44, 285–294.
- Barz, C., Abahji, T.N., Trülzsch, K., Heesemann, J., 2000.** The Yersinia Ser/Thr protein kinase Ypka/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett.* 482, 139–143.
- Berghe, T.V., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C.J., Brunk, U.T., Declercq, W., Vandenabeele, P., 2010.** Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ.* 17, 922–930.
- Black, D.S., Bliska, J.B., 2000.** The RhoGAP activity of the Yersinia pseudotuberculosis cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol. Microbiol.* 37, 515–527.
- Bockemühl, J., Roggentin, P., 2004.** Enterale Yersiniosen: Klinische Bedeutung, Epidemiologie, Diagnostik und Prävention. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 47, 685–691.
- Bottone, E.J., 1997.** Yersinia enterocolitica: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 257–276.
- Brodsky, I.E. & Medzhitov, R., 2008.** Reduced Secretion of YopJ by Yersinia Limits In Vivo Cell Death but Enhances Bacterial Virulence. *PLoS Pathogens*, 4(5)
- Brodsky, I.E., Palm, N.W., Sadanand, S., Ryndak, M.B., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Bliska, J.B., Medzhitov, R., 2010.** A Yersinia effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system. *Cell Host Microbe* 7, 376–387.
- Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G.N., Martin, M., 2011.** TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J. Dent. Res.* 90, 417–427.

- Bryant, C., Fitzgerald, K.A., 2009.** Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol.* 19, 455–464.
- Bulanova, E., Budagian, V., Orinska, Z., Hein, M., Petersen, F., Thon, L., Adam, D., Bulfone-Paus, S., 2005.** Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells. *J. Immunol.* 174, 3880–3890.
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., Goeddel, D.V., 1996.** TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383, 443–446.
- Chekeni, F.B., Elliott, M.R., Sandilos, J.K., Walk, S.F., Kinchen, J.M., Lazarowski, E.R., Armstrong, A.J., Penuela, S., Laird, D.W., Salvesen, G.S., Isakson, B.E., Bayliss, D.A., Ravichandran, K.S., 2010.** Pannexin 1 channels mediate “find-me” signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 467, 863–867.
- Chen, Z.J., 2005.** Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat. Cell Biol.* 7, 758–765.
- Christofferson, D.E., Yuan, J., 2010.** Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 263–268.
- Chung, L.K. u. a., 2014.** IQGAP1 is important for activation of caspase-1 in macrophages and is targeted by *Yersinia pestis* type III effector YopM. *mBio*, 5(4), S.e01402–01414.
- Cornelis, G.R., 2002a.** *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J. Cell Biol.* 158, 401–408.
- Cornelis, G.R., 2002b.** The *Yersinia* Ysc-Yop “type III” weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 742–752.
- Cornelis, G.R., Boland, A., Boyd, A.P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M.P., Stainier, I., 1998.** The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1315–1352.
- Degterev, A., Hitomi, J., Gemscheid, M., Ch’en, I.L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G.D., Yuan, C., Wagner, G., Hedrick, S.M., Gerber, S.A., Lugovskoy, A., Yuan, J., 2008.** Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat. Chem. Biol.* 4, 313–321.
- Dewoody, R., Merritt, P.M., Houppert, A.S., Marketon, M.M., 2011.** YopK regulates the *Yersinia pestis* type III secretion system from within host cells. *Mol. Microbiol.* 79, 1445–1461.
- Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., 2009.** Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.* 11, 1050–1062.
- El Tahir, Y., Skurnik, M., 2001.** YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 209–218.
- Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J.J., Harden, T.K., Leitinger, N., Ravichandran, K.S., 2009.** Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461, 282–286.
- Fàbrega, A., Vila, J., 2012.** *Yersinia enterocolitica*: pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 30, 24–32.
- Faure, E., Equils, O., Sieling, P.A., Thomas, L., Zhang, F.X., Kirschning, C.J., Polentarutti, N., Muzio, M., Arditi, M., 2000.** Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 275, 11058–11063.
- Festjens, N., Vanden Berghe, T., Cornelis, S., Vandenabeele, P., 2007.** RIP1, a kinase on the crossroads of a cell’s decision to live or die. *Cell Death Differ.* 14, 400–410.
- Fink, S.L., Cookson, B.T., 2005.** Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic

- description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 73, 1907–1916.
- Galyov, E.E., Håkansson, S. & Wolf-Watz, H., 1994.** Characterization of the operon encoding the YpkA Ser/Thr protein kinase and the YopJ protein of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 176(15), S.4543–4548.
- Gaus, K., Hentschke, M., Czymmeck, N., Novikova, L., Trülzsch, K., Valentin-Weigand, P., Aepfelbacher, M., Ruckdeschel, K., 2011.** Destabilization of YopE by the ubiquitin-proteasome pathway fine-tunes Yop delivery into host cells and facilitates systemic spread of *Yersinia enterocolitica* in host lymphoid tissue. *Infect. Immun.* 79, 1166–1175.
- Grassl, G.A., Bohn, E., Müller, Y., Bühler, O.T., Autenrieth, I.B., 2003.** Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion. *Int. J. Med. Microbiol.* 293, 41–54.
- Gröbner, S., Adkins, I., Schulz, S., Richter, K., Borgmann, S., Wesselborg, S., Ruckdeschel, K., Micheau, O., Autenrieth, I.B., 2007.** Catalytically active *Yersinia* outer protein P induces cleavage of RIP and caspase-8 at the level of the DISC independently of death receptors in dendritic cells. *Apoptosis* 12, 1813–1825.
- Herold, G., 2011.** *Innere Medizin 2012*. Herold, Gerd, 844-845
- Van Herreweghe, F., Festjens, N., Declercq, W., Vandenabeele, P., 2010.** Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 1567–1579.
- Hitomi, J., Christofferson, D.E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R.J., Yuan, J., 2008.** Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 135, 1311–1323.
- Hof, H., Dörris, R., 2009.** *Medizinische Mikrobiologie: Immunologie, Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Klinische Infektologie, Hygiene, 4., überarbeitete und erweiterte Auflage.* ed. Thieme, Stuttgart. 394-399
- Hoiczky, 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, 5989–5999.
- Holt, J.G., 1994.** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth. ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Isberg, R.R., Barnes, P., 2001.** Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. *J. Cell. Sci.* 114, 21–28.
- Juris, S.J., Rudolph, A.E., Huddler, D., Orth, K., Dixon, J.E., 2000.** A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9431–9436.
- Keeling, M.J., Gilligan, C.A., 2000.** Bubonic plague: a metapopulation model of a zoonosis. *Proc. Biol. Sci.* 267, 2219–2230.
- Kepp, O., Galluzzi, L., Zitvogel, L., Kroemer, G., 2010.** Pyroptosis - a cell death modality of its kind? *Eur. J. Immunol.* 40, 627–630.
- Khare, S., Luc, N., Dorfleutner, A., Stehlik, C., 2010.** Inflammasomes and their activation. *Crit. Rev. Immunol.* 30, 463–487.
- Kirjavainen, V., Jarva, H., Biedzka-Sarek, M., Blom, A.M., Skurnik, M., Meri, S., 2008.** *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. *PLoS Pathog.* 4, e1000140.
- Labbé, K., Saleh, M., 2008.** Cell death in the host response to infection. *Cell Death Differ.* 15, 1339–1349.
- Lamkanfi, M., Dixit, V.M., 2010.** Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe* 8, 44–54.
- Lamkanfi, M. & Dixit, V.M., 2011.** Modulation of inflammasome pathways by bacterial and

- viral pathogens. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 187(2), S.597–602.
- LaRock, C.N. & Cookson, B.T., 2012.** The *Yersinia* virulence effector YopM binds caspase-1 to arrest inflammasome assembly and processing. *Cell host & microbe*, 12(6), S.799–805.
- Lemaître, N. u. a., 2006.** *Yersinia pestis* YopJ Suppresses Tumor Necrosis Factor Alpha Induction and Contributes to Apoptosis of Immune Cells in the Lymph Node but Is Not Required for Virulence in a Rat Model of Bubonic Plague. *Infection and Immunity*, 74(9), S.5126–5131.
- Leo, J.C., Skurnik, M., 2011.** Adhesins of human pathogens from the genus *Yersinia*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 715, 1–15.
- Li, X., Jiang, S., Tapping, R.I., 2010.** Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine* 49, 1–9.
- Löscher, T., Burchard, G.-D., 2010.** *Tropenmedizin in Klinik und Praxis: mit Reise- und Migrationsmedizin*, 4. kompl. überarbeitete Auflage. ed. Thieme, Stuttgart. 476-479
- Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M., Dixit, V.M., 2006.** Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440, 228–232.
- Martinon, F., Tschopp, J., 2004.** Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 117, 561–574.
- Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M., Tschopp, J., 2004.** RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat. Immunol.* 5, 503–507.
- Meylan, E., Tschopp, J., 2005.** The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem. Sci.* 30, 151–159.
- Miller, V.L., Falkow, S., 1988.** Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.* 56, 1242–1248.
- Monack, D.M., 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, 2127–2137.
- Moriwaki, K. & Chan, F.K.M., 2014.** Necrosis-dependent and independent signaling of the RIP kinases in inflammation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25(2), S.167–174.
- Mosser, D.M., Zhang, X., 2008.** Activation of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol* Chapter 14, Unit 14.2.
- Mukherjee, S., Keitany, G., Li, Y., Wang, Y., Ball, H.L., Goldsmith, E.J., Orth, K., 2006.** *Yersinia* YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* 312, 1211–1214.
- Murray, P.R. (Ed.), 2003.** *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology. 672-683
- Nagata, S., Hanayama, R., Kawane, K., 2010.** Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 140, 619–630.
- Netea, M.G., Simon, A., van de Veerdonk, F., Kullberg, B.-J., Van der Meer, J.W.M., Joosten, L.A.B., 2010.** IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog.* 6, e1000661.
- Von Pawel-Rammingen, U., Telepnev, M.V., Schmidt, G., Aktories, K., Wolf-Watz, H., Rosqvist, R., 2000.** GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol. Microbiol.* 36, 737–748.
- Perry, R.D., Fetherston, J.D., 1997a.** *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 35–66.
- Pezzutto, A., Ulrichs, T., Burmester, G.-R., 2006.** *Taschenatlas der Immunologie:*

- Grundlagen, Labor, Klinik, 2., vollst. überarb. u. aktualis. A. ed. Thieme, Stuttgart.
- Philip, N.H. u. a., 2014.** Caspase-8 mediates caspase-1 processing and innate immune defense in response to bacterial blockade of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(20), S.7385–7390.
- Pierson, D.E., 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, 1846–1852.
- Prentice, M.B., Rahalison, L., 2007.** Plague. *Lancet* 369, 1196–1207.
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R., 2008.** Duale Reihe: Biochemie, 2., aktualisierte Auflage. ed. Thieme, Stuttgart.
- Rathmell, J.C., Thompson, C.B., 1999.** The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 781–828.
- Ravichandran, K.S., 2011.** Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity*, 35(4), S.445–455.
- Rizzo, R., Ferrari, D., Melchiorri, L., Stignani, M., Gulinelli, S., Baricordi, O.R., Di Virgilio, F., 2009.** Extracellular ATP acting at the P2X7 receptor inhibits secretion of soluble HLA-G from human monocytes. *J. Immunol.* 183, 4302–4311.
- Robert-Koch-Institut 2011a:** Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2010. Berlin, 2011. 208-211
- Robert-Koch-Institut 2011b:** Steckbriefe seltener und importierter Infektionskrankheiten. Berlin 2011. 84-85
- Rosqvist, R., Magnusson, K.E., Wolf-Watz, H., 1994.** Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.* 13, 964–972.
- Ruckdeschel, K., Machold, J., Roggenkamp, A., Schubert, S., Pierre, J., Zumbihl, R., Liautard, J.P., Heesemann, J., Rouot, B., 1997a.** *Yersinia enterocolitica* promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase. Correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor-alpha production. *J. Biol. Chem.* 272, 15920–15927.
- Ruckdeschel, K. u. a., 1997b.** Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. *Infection and Immunity*, 65(11), S.4813–4821.
- Ruckdeschel, K., Mannel, O., Richter, K., Jacobi, C.A., Trülzsch, K., Rouot, B., Heesemann, J., 2001.** *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J. Immunol.* 166, 1823–1831.
- Ruckdeschel, K., Pfaffinger, G., Trülzsch, K., Zenner, G., Richter, K., Heesemann, J., Aepfelbacher, M., 2006.** The proteasome pathway destabilizes *Yersinia* outer protein E and represses its antihost cell activities. *J. Immunol.* 176, 6093–6102.
- Ruckdeschel, K., Deuretzbacher, A., Haase, R., 2008.** Crosstalk of signalling processes of innate immunity with *Yersinia* Yop effector functions. *Immunobiology* 213, 261–269.
- la Sala, A., Ferrari, D., Di Virgilio, F., Idzko, M., Norgauer, J., Girolomoni, G., 2003.** Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J. Leukoc. Biol.* 73, 339–343.
- Salaun, B., Romero, P., Lebecque, S., 2007.** Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 37, 3311–3318.
- Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., Haslett, C., 2002.** A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 965–975.

- Schotte, P., Denecker, G., Van Den Broeke, A., Vandenabeele, P., Cornelis, G.R., Beyaert, R., 2004.** Targeting Rac1 by the Yersinia effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta. *J. Biol. Chem.* 279, 25134–25142.
- Schroder, K., Tschopp, J., 2010.** The inflammasomes. *Cell* 140, 821–832.
- Shin, H., Cornelis, G.R., 2007.** Type III secretion translocation pores of Yersinia enterocolitica trigger maturation and release of pro-inflammatory IL-1beta. *Cell. Microbiol.* 9, 2893–2902.
- Stutz, A., Golenbock, D.T., Latz, E., 2009.** Inflammasomes: too big to miss. *J. Clin. Invest.* 119, 3502–3511.
- Sulakvelidze, A., 2000.** Yersiniae other than Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis, and Y. pestis: the ignored species. *Microbes Infect.* 2, 497–513.
- Takeda, K., Akira, S., 2004a.** Microbial recognition by Toll-like receptors. *J. Dermatol. Sci.* 34, 73–82.
- Takeda, K., Akira, S., 2004b.** TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 16, 3–9.
- Takeuchi, O., Akira, S., 2001.** Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int. Immunopharmacol.* 1, 625–635.
- Thomas, L., 2005.** Labor und Diagnose, 6., Aufl. ed. Th-Books. 1652-1655
- Torchinsky, M.B., Garaude, J., Blander, J.M., 2010.** Infection and apoptosis as a combined inflammatory trigger. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 55–62.
- Trülsch, K. u. a., 2004.** Contribution of the Major Secreted Yops of Yersinia enterocolitica O:8 to Pathogenicity in the Mouse Infection Model. *Infection and Immunity*, 72(9), S.5227–5234.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., Kroemer, G., 2010.** Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 700–714.
- Vandenabeele, P., Vanden Berghe, T., Festjens, N., 2006.** Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. *Sci. STKE* 2006, pe44.
- Vaux, D.L., Korsmeyer, S.J., 1999.** Cell death in development. *Cell* 96, 245–254.
- Viboud, G.I., Bliska, J.B., 2001.** A bacterial type III secretion system inhibits actin polymerization to prevent pore formation in host cell membranes. *EMBO J.* 20, 5373–5382.
- Viboud, G.I., Bliska, J.B., 2005.** Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 69–89.
- Di Virgilio, F., 2007.** Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 465–472.
- Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, J.M., Morelli, A., Torboli, M., Bolognesi, G., Baricordi, O.R., 2001.** Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97, 587–600.
- Wang, K., Li, J., Degterev, A., Hsu, E., Yuan, J., Yuan, C., 2007.** Structure-activity relationship analysis of a novel necroptosis inhibitor, Necrostatin-5. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 1455–1465.
- Weng, D. u. a., 2014.** Caspase-8 and RIP kinases regulate bacteria-induced innate immune responses and cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(20), S.7391–7396.
- Yeretssian, G., Labbé, K., Saleh, M., 2008.** Molecular regulation of inflammation and cell death. *Cytokine* 43, 380–390.
- van Zandbergen, G., Solbach, W., Laskay, T., 2007.** Apoptosis driven infection. *Autoimmunity* 40, 349–352.
- Zhang, Y. & Bliska, J.B., 2003.** Role of Toll-Like Receptor Signaling in the Apoptotic

- Response of Macrophages to Yersinia Infection. *Infection and Immunity*, 71(3), S.1513–1519.
- Zhang, Y., Ting, A.T., Marcu, K.B., Bliska, J.B., 2005.** Inhibition of MAPK and NF-kappa B pathways is necessary for rapid apoptosis in macrophages infected with Yersinia. *J. Immunol.* 174, 7939–7949.
- Zheng, Y. u. a., 2012.** YopJ-Induced Caspase-1 Activation in Yersinia-Infected Macrophages: Independent of Apoptosis, Linked to Necrosis, Dispensable for Innate Host Defense. *PLoS ONE*, 7(4).
- Zhou, D., Han, Y., Yang, R., 2006.** Molecular and physiological insights into plague transmission, virulence and etiology. *Microbes Infect.* 8, 273–284.
- Zumbihl, R., Aepfelbacher, M., Andor, A., Jacobi, C.A., Ruckdeschel, K., Rouot, B., Heesemann, J., 1999.** The cytotoxin YopT of Yersinia enterocolitica induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J. Biol. Chem.* 274, 29289–2929.

## 8 DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Klaus Ruckdeschel danke ich für die Bereitstellung des Themas, für die Unterstützung, seine aufmunternde Art und Motivation während der Laborzeit und die Geduld während des Schreibens.

Herrn Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher möchte ich für die Möglichkeit danken, an seinem Institut zu promovieren, sowie für die Bereitstellung der Arbeitsmittel.

Den Arbeitsgruppen Ruckdeschel, Fischer und Rohde danke ich für vielfache fachliche und methodische Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Geschwister und Großeltern. Insbesondere danke ich meinen Eltern Thomas & Ines Fenner, die mir diese Promotion ermöglicht haben. Für ihre Fürsorge, ihr Vertrauen und den Glauben daran, dass diese Arbeit eines Tages fertig werden würde. Für fachliche Unterstützung und hilfreiche Anregungen, sowie das von klein auf geprägte Interesse an der Mikrobiologie.

Simon danke ich für seine Liebe und Geduld, das Verständnis, den Optimismus sowie die stetig neuen geistigen Impulse.

Elena, Miriam und Rahel möchte ich für ihre Freundschaft, die wunderbare gemeinsame Zeit, Aufmunterung in schwierigen Zeiten, zahlreiche Gespräche und ihren Humor danken.



## **9 LEBENSLAUF**

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

## **10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....