

**Untersuchung zur molekularen Pathogenese
Campylobacter jejuni-assoziierter Erkrankungen**

**Interaktion von *C. jejuni*
mit humanen Darmepithelzellen**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin -
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Silvia Eberhardt
aus Ernsdorf

Regensburg 2005

Promotionsgesuch eingereicht am: 01.02.2005

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Norbert Lehn

Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. G. Hauska
1. Gutachter: Prof. Dr. S. Schneuwly
2. Gutachter: Prof. Dr. N. Lehn
3. Prüfer: Prof. Dr. M. Thomm

INHALT

I. Einleitung	1
1. Mikrobiologie von <i>Campylobacter jejuni</i>	1
2. Intestinale Epithelzellen (IEC).....	1
3. Epidemiologie.....	2
4. <i>Campylobacter jejuni</i> -assoziierte Erkrankungen.....	3
4.1 Enterokolitis.....	3
4.2 Guillain-Barré-Syndrom (GBS).....	3
4.3 Gastrointestinale Lymphome.....	4
5. Molekulare Pathogenese der <i>C. jejuni</i> -Infektion.....	4
5.1 Kolonisierung und Invasion von intestinalen Zellen.....	5
5.2 Intrazelluläres Überleben von <i>C. jejuni</i>	6
5.3 Entzündung.....	6
5.4 Unspezifische anti-mikrobielle Immunabwehr (<i>innate immunity</i>).....	7
5.4.1 Das Komplementsystem.....	8
5.4.2 TLR-vermittelte Immunantwort.....	8
5.4.2.1 Geschichtlicher Überblick.....	8
5.4.2.2 TLRs und ihre Liganden.....	9
5.4.3 TLR-vermittelte NFκB-Signalkaskade.....	10
5.5 Einfluss von TGFβ auf die Inflammation.....	13
5.5.1 Funktionen von TGFβ.....	13
5.5.2 TGFβ-Isoformen.....	13
5.5.3 TGFβ-Signalweg.....	13
5.5.3.1 TGFβ-Rezeptor und Smad-Aktivierung.....	13
5.5.3.2 Translokation von Smads.....	14
5.5.3.2.1 Import.....	14
5.5.3.2.2 Export.....	15
5.5.3.3 Einfluss von Trichostatin auf den TGFβ-Signalweg.....	16
5.5.3.4 Einfluss von Kinasen auf den TGFβ-Signalweg.....	16
5.5.4 Verbindung zwischen dem TGFβ- und dem NFκB-Signalweg.....	17
6. Bakterielle Antwort auf humane Immunabwehr.....	18
7. Zielsetzung der Arbeit.....	19

II. Material und Methoden	20
1. Bezugsquellen von Chemikalien und Substanzen	20
2. Zell- und mikrobiologische Untersuchungen	21
2.1 Herkunft verwendeter Zellen	21
2.1.1 Humane Zellen	21
2.1.2 Bakterienzellen	21
2.1.3 <i>C. jejuni</i> -Isolate aus Kotproben	21
2.2 Sterilisation	21
2.3 Kulturmedien	22
2.3.1 Medien für humane Zellen	22
2.3.1.1 <i>Dulbecco's</i> MEM (DMEM)	22
2.3.1.2 RPMI 1640 Medium (RPMI)	22
2.3.2 Medien und Nährböden für Bakterienkulturen	23
2.3.2.1 <i>Campylobacter</i> -Agar-Nährboden (<i>Campylobacter</i> -Selektiv)	23
2.3.2.2 Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Nährboden (WCdent)	24
2.3.2.3 <i>Brucella</i> Bouillon Selektivmedium (BBFCSdent)	24
2.3.2.4 Frischblut-Platten (Columbia-Agar-Basis)	25
2.4 Einfriermedien	25
2.4.1 Konservierung humaner Zellen	25
2.4.2 Konservierung von Bakterienkulturen	25
2.5 Kultivierung von Zellen	26
2.5.1 Humane Zellen	26
2.5.1.1 CaCo-2 Zellen	26
2.5.1.1.1 Wachstum in Zellkulturflaschen	26
2.5.1.1.2 Wachstum in 12-well-Platten	26
2.5.1.1.3 Wachstum auf Deckgläsern	27
2.5.1.2 HT-29 Zellen	27
2.5.1.3 Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC)	27
2.5.1.3.1 Gewinnung von PBMCs	27
2.5.1.3.2 Inkubation von PBMCs	27
2.5.1.4 Primäre intestinale Epithelzellen (prim IEC)	28
2.5.2 Bakterienzellen	28
2.5.2.1 <i>Campylobacter jejuni</i>	28
2.5.2.1.1 Wachstum auf Platten	28

2.5.2.1.2 Wachstum in Flüssigkultur.....	28
2.5.2.2 <i>Helicobacter pylori</i>	29
2.5.2.3 <i>Shigella flexneri</i>	29
2.5.2.4 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	29
2.6 Bestimmungen der Zellzahlen.....	29
2.6.1 Bestimmung der Zellzahl humaner Zellen.....	29
2.6.2 Bestimmung der Bakterienzellzahl.....	29
2.6.2.1 Bestimmung der Gesamtzellzahlen.....	29
2.6.2.2 Bestimmung der Lebend-Zellzahlen.....	30
2.6.2.3 Bestimmung der Infektionskurve.....	30
2.7 Konservierung verwendeter Zellen.....	30
2.7.1 Konservierung humaner Zelllinien.....	30
2.7.2 Konservierung von Bakterien.....	31
2.8 Auftauen.....	31
2.8.1 Auftauen humaner Zelllinien.....	31
2.8.2 Bakterienzellen.....	31
2.9 Infektionsversuche.....	31
2.9.1 Adhärenzassay.....	32
2.9.2 Invasionsassay.....	32
2.9.3 Infektionsassay für Array-Analysen.....	32
2.9.4 Infektionsassay für Proteinisolierung.....	33
2.10 Einwirkung von Hitzestress.....	33
2.11 Einwirkung von pH-Stress.....	33
3. Molekularbiologische Untersuchungen.....	34
3.1 Verwendete Lösungen und Puffer.....	34
3.1.1 Diethylpyrocarbonat (DEPC).....	34
3.1.2 TE-Puffer.....	34
3.1.3 TBE-Puffer.....	34
3.1.4 Agarosegel-Auftragspuffer.....	35
3.2 Isolierung von Nukleinsäuren.....	35
3.2.1 Isolierung humaner RNA aus CaCo-2 Zellen.....	35
3.2.2 Isolierung bakterieller RNA aus <i>C. jejuni</i>	35
3.2.3 Isolierung bakterieller DNA aus Geflügel-Kotproben.....	35
3.3 RNA-Konzentrationsbestimmung.....	36

3.4 Gelelektrophorese.....	36
3.5 Identifizierung von <i>C. jejuni</i> -DNA aus Kotproben mittels <i>nested</i> PCR.....	36
3.6 Expressionsanalyse mit Mikroarrays.....	36
3.6.1 Humane Mikroarrays.....	36
3.6.1.1 Prinzip.....	36
3.6.1.2 Datenanalyse.....	37
3.6.2 Bakterielle Mikroarrays.....	38
3.6.2.1 Prinzip.....	38
3.6.2.2 Datenanalyse.....	39
3.7 Funktionelle Expressionsanalyse.....	39
3.8 RT-PCR.....	40
3.8.1 Durchführung.....	40
3.8.2 Datenanalyse.....	40
4. Proteinbiochemische Untersuchungen.....	41
4.1 Puffer und Lösungen.....	41
4.1.1 Denaturierender Lysepuffer.....	41
4.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gel.....	41
4.1.2.1 Trenngel-Puffer.....	41
4.1.2.2 Trenngel.....	41
4.1.2.3 Sammelgel-Puffer.....	41
4.1.2.4 Sammelgel.....	42
4.1.3 Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffer.....	42
4.1.4 Probenauftragspuffer.....	42
4.1.5 Ponceau S-Lösung.....	42
4.1.6 Coomassie-Färbung.....	43
4.1.6.1 Coomassie-Lösung.....	43
4.1.6.2 Entfärbelösung für Coomassie-Färbung.....	43
4.2 Protein-Isolierung.....	43
4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	43
4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
4.5 Färbung von Proteinen.....	44
4.5.1 Färbung im Polyacrylamid-Gel.....	44
4.5.2 Färbung auf Nitrozellulose (NC)-Membranen.....	45

5. Immunologische Untersuchungen.....	45
5.1 Puffer und Lösungen.....	45
5.1.1 Western Blot.....	45
5.1.1.1 Kathodenpuffer.....	45
5.1.1.2 Anodenpuffer.....	45
5.1.1.3 <i>Phosphate buffered Saline</i> (PBS).....	46
5.1.1.4 T-PBS.....	46
5.1.1.5 Blockierungspuffer.....	46
5.1.2 ELISA.....	46
5.1.3 Aktin-Färbung.....	46
5.1.3.1 Fixierungslösung.....	46
5.1.3.2 Permeabilisierungslösung.....	47
5.1.3.3 Blockierungspuffer (Färbung).....	47
5.1.3.4 Waschpuffer.....	47
5.2 Verwendete Substanzen.....	47
5.2.1 primäre Antikörper.....	47
5.2.2 sekundäre Antikörper.....	47
5.2.3 Zytokine.....	47
5.3 Western Blot.....	48
5.4 ELISA.....	49
5.4.1 Verwendete ELISA-Kits.....	49
5.4.2 Durchführung.....	49
5.4.2.1 NFκB-ELISA.....	49
5.4.2.2 Weitere ELISA.....	50
5.5 Immunhistologische Färbung.....	50
III. Ergebnisse.....	51
1. Methodische Vorversuche.....	51
1.1 Auswahl eines geeigneten <i>Campylobacter jejuni</i> -Isolates.....	51
1.2 Untersuchung des Adhärenz- und Invasionsverhaltens von <i>C. jejuni</i> , ATCC 33291.....	52
1.3 Bestimmung der Infektionskurve.....	53
1.4 Untersuchung der Morphologie von infizierten CaCo-2 Zellen.....	54
2. Untersuchung der veränderten Genregulation nach Kontakt mit <i>C. jejuni</i>	55
2.1 Auswertung von Mikroarray-Daten.....	55

2.1.1 Allgemeine Übersicht.....	55
2.1.2 Ausgewählte biologische Genfunktionen.....	58
2.1.2.1 Entzündungsregulierende Gene.....	58
2.1.2.2 Gene, die Zellproliferation und Tumorentstehung regulieren.....	59
2.1.2.3 Apoptose-regulierende Gene.....	61
2.2 Untersuchung ausgewählter Regulationen auf Proteinebene.....	62
2.2.1 Regulation der Entzündung.....	62
2.2.1.1 Untersuchung der Freisetzung von NFκB.....	62
2.2.1.2 Untersuchung weiterer pro-inflammatorischer Mediatoren.....	64
2.2.1.2.1 Interleukin-12 (IL-12).....	64
2.2.1.2.2 Interleukin-18 (IL-18).....	64
2.2.1.2.3 Interferon gamma (IFNγ).....	65
2.2.2 Regulation des apoptose-regulierenden Komplexes AP-1.....	66
2.2.3 Regulation der Proliferation und der Tumorentstehung.....	67
2.2.3.1 Untersuchung der Regulation von VEGF.....	67
2.2.3.2 Untersuchung des Einflusses von LAMP3 auf bakterielle Invasion.....	67
3. Untersuchung der anti-inflammatorischen Regulation.....	68
3.1 Untersuchung der Sekretion von TGFβ.....	68
3.2 Einfluss von TGFβ auf die Invasion von <i>C. jejuni</i>	69
3.2.1 Einfluss von TGFβ-1 und TGFβ-2 auf Invasion von <i>C. jejuni</i>	69
3.2.2 Einfluss von TGFβ sowie eines Antikörpers gegen TGFβ auf die Invasion von <i>C. jejuni</i>	70
3.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Einflusses von <i>C. jejuni</i> sowie von TGFβ auf das Zytoskelett.....	73
3.3 Einfluss von TGFβ auf Invasion weiterer Bakterien im Vergleich zur Invasion von <i>C. jejuni</i>	74
3.4 Einfluss weiterer Modulatoren.....	75
3.4.1 Einfluss auf die Invasion von <i>C. jejuni</i>	75
3.4.2 Einfluss von LMB auf Invasion unterschiedlicher Bakterien.....	76
3.4.3 Einfluss auf Invasion weiterer Bakterien im Vergleich zu der Invasion von <i>C. jejuni</i>	77
4. Untersuchung der veränderten Genexpression von <i>C. jejuni</i> nach Induktion von Stress.....	78
4.1 Auswertung bakterieller Mikroarray-Daten.....	78
4.2 Überprüfung ausgewählter Gene mittels RT-PCR.....	80

4.3 Bestimmung der Regulation auf funktioneller Ebene.....	80
5. Bestimmung der <i>C. jejuni</i> -Infektionsrate des Geflügels von Bauernhöfen...	81
IV. Diskussion	83
1. Molekulare Mechanismen der Interaktion von <i>C. jejuni</i> mit Darmepithelzellen.....	83
1.1 NFκB.....	84
1.2 Rolle von TLR.....	85
1.3 Mögliche Beeinflussung der unspezifischen Immunabwehr.....	86
1.4 Rolle von Zytokinen und Chemokinen.....	87
1.4.1 Interleukine IL-8 und IL-12.....	87
1.4.2 Interleukin IL-18.....	88
1.4.3 Chemokine.....	89
1.4.4 Interferon IFNγ.....	90
2. TGFβ als therapeutisches Agens?.....	91
2.1 Produktion von TGFβ.....	91
2.2 Einfluss von TGFβ auf bakterielle Invasion.....	92
3. Untersuchung der veränderten Genexpression von <i>C. jejuni</i> nach Induktion von Stress.....	94
V. Zusammenfassung	96
VI. Abkürzungen	97
VII. Literatur	100
VIII. Anhang	112
1. Humane Mikroarrays.....	112
1.1 Hochregulierte Gene.....	112
1.2 Herunterregulierte Gene.....	115
2. Bakterielle Mikroarrays.....	117
2.1 Hochregulierte Gene.....	117
2.2 Herunterregulierte Gene.....	118

I. EINLEITUNG

1. Mikrobiologie von *Campylobacter jejuni*

Bakterien der Gattung *Campylobacter*, wie z.B. *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) oder *C. coli* sind gramnegative, nicht sporenbildende Spirillen von etwa 1,5 - 6 µm Länge und 0,2 - 0,5 µm Breite. Sie bewegen sich mit Hilfe ihrer polar lokalisierten Geißeln. Die Kultivierung kann ausschließlich unter mikroaerophilen (3 - 10% O₂) sowie kapnophilen Bedingungen (3 - 15% CO₂) erfolgen. Für ein optimales Wachstum braucht *C. jejuni*, wie auch *C. coli*, Temperaturen von 42°C, eine Tatsache, die bei der selektiven Anreicherung dieser Keime aus Stuhlproben genutzt werden kann. Beide Spezies sind auch als Durchfallerreger relevant.

2. Intestinale Epithelzellen (IEC)

Für eine effektive Resorption von Nährstoffen besitzen die Schleimhäute des Verdauungstraktes eine besonders große Oberfläche (etwa 400 m²) sowie ein dünnes Epithel. Die Zellen dieses Epithels sind polarisiert, d.h. sie unterscheiden sich in ihrem Aufbau an den jeweiligen Polen der Zelle. Die Polarisierung der Zellen resultiert aus der besonderen Lage der intestinalen Epithelzellen (IEC) zwischen dem Bindegewebe und dem Darmlumen.

Den luminalen Abschnitt der Zellmembran nennt man apikale Zellmembran, den der Basalmembran zugewandten basale Zellmembran. Die übrigen beiden Seiten werden als laterale Zellmembranen bezeichnet.

Eine der Aufgaben von Darmepithelzellen ist es zu verhindern, dass bestimmte Stoffe aus dem Darmlumen ins Gewebe gelangen. Dies geschieht durch spezielle Verbindungen der Zellen untereinander, sog. *tight junctions*. Diese ermöglichen auch, dass die apikale Zellmembran einen anderen Aufbau bzw. eine andere Proteinzusammensetzung der Membran aufweist, als die übrigen Seiten der Zellmembran, was für den Transport der Nährstoffe vom Darm in den Körper von Bedeutung ist. Die apikale Zellmembran der intestinalen Epithelzellen weist besondere Strukturmerkmale, die sog. Mikrovilli auf. Unter Mikrovilli versteht man fingerförmige Fortsätze der Zellen, welche unbeweglich sind und der Oberflächenvergrößerung dienen, was eine verbesserte Resorption zur Folge hat.

Die besonders große Oberfläche des Verdauungstraktes sowie das dünne Darmepithel ermöglichen es jedoch auch pathogenen Organismen, die Barriere zu überwinden, in das Gewebe einzudringen und dieses zu schädigen.

3. Epidemiologie

Durch Bakterien der Gattung *Campylobacter* ausgelöste Infektionen sind weltweit verbreitet. Wie in vielen anderen Ländern zeigt sich auch in Deutschland, dass *Campylobacter* und *Salmonella* die beiden häufigsten bakteriellen Enteritiserreger sind. Die Gesamtinzidenz der *Campylobacter*-Infektionen in Deutschland lag 2003 bei 58 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner, Tendenz zunehmend. In einigen Bundesländern ist die Inzidenz inzwischen höher als bei den *Salmonella*-Infektionen (RKI, 2001). In den Vereinigten Staaten und in Großbritannien übertrifft die jährliche Inzidenz der *Campylobacter*-Infektionen zahlenmäßig die durch andere Enteropathogene verursachten Infektionen bereits seit Jahren (Tauxe, 2001; Überblick bei Butzler, 2004).

Von den in Deutschland gemeldeten *Campylobacter*-Erkrankungen (n=38.334) mit Angaben zur Spezies entfielen 84,4% auf *Campylobacter jejuni*, 12,2% auf *C. coli*, 1,6% auf *C. jejuni/C. coli* (nicht differenziert), 1,5% auf *C. lari* und 0,3% auf übrige *Campylobacter* Spezies (RKI, 2004). Wie bei den Salmonellosen trat eine saisonale Häufung im Sommer und Herbst auf. Die höchsten altersspezifischen Inzidenzen zeigten sich bei den 1- bis 4-jährigen Kindern. Ein weiterer Inzidenzgipfel fiel bei den 20 - 29-jährigen auf. Diese Beobachtungen konnten auch in anderen Ländern Europas bestätigt werden (RKI, 2004).

Die hauptsächlichen Erregerreservoirs sind warmblütige Wild-, Nutz- und Heimtiere. *Campylobacter* wird als kommensaler Bestandteil der intestinalen Flora von Wild- und Hausgeflügel angesehen (Smibert, 1969; Fernie und Park, 1977; Blaser et al., 1978; Smibert, 1978). Des Weiteren kann der Erreger aber auch im Darmtrakt anderer Säugetiere wie Hunde, Katzen, Schweine oder Rinder vorkommen, ohne dass diese klinische Symptome einer Erkrankung zeigen (Zusammenfassung siehe Butzler, 2004). Die durch *Campylobacter* verursachte Infektion, die so genannte Campylobacteriose, ist wie die Salmonellose eine im Wesentlichen durch Nahrungsmittel übertragene Erkrankung. Mehrere Studien zeigten, dass unzureichend erhitztes oder rekontaminiertes Geflügelfleisch und die daraus hergestellten Produkte die Hauptinfektionsquelle darstellen (Deming et al., 1987; Hood et al., 1988; RKI, 2001). Weitere Infektionsquellen bilden nicht pasteurisierte Milch, kontaminiertes, nicht gechlortes Trinkwasser, rohes Hackfleisch

sowie erkrankte Hundewelpen und Katzen. Eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch kommt wegen der geringen Infektionsdosis von mindestens 500 Keimen überwiegend bei Kindern vor. Darüber hinaus können Infektionen beim Baden in kontaminierten Oberflächengewässern auftreten (Übersicht in RKI, 2001).

4. Campylobacter jejuni-assoziierte Erkrankungen

4.1 Enterokolitis

Die Infektion mit *C. jejuni* führt in der Regel zu einer Enterokolitis (Übersichten in Butzler und Skirrow, 1979; Walker et al., 1986; RKI, 2001). Häufig können 12 - 24 h vor dem Auftreten der enteritischen Symptome Kopfschmerzen, Fieber bis zu 40°C, Muskel- und Gelenkschmerzen sowie Müdigkeit bestehen. Die häufigsten Symptome der Campylobacteriose, die 2 - 10 Tage andauern kann, sind Abdominalschmerzen bzw. -krämpfe, Fieber, Müdigkeit sowie wässrige und blutige Diarrhoen. Das Blut im Stuhl der Patienten deutet auf eine kolorektale Entzündung hin. Auch bei der Endoskopie des Darmes, der Sigmoidoskopie oder Koloskopie, konnten diffuse entzündliche Veränderungen der Dickdarmschleimhaut beobachtet werden (Übersicht bei Butzler, 2004).

4.2 Guillain-Barré-Syndrom (GBS)

Etwa zwei Wochen nach dem Abklingen der Symptome einer Campylobacteriose können seltene, dennoch folgeschwere Komplikationen auftreten, insbesondere Autoimmunerkrankungen im Bereich des Nervensystems. Es handelt sich dabei um das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) mit seinen verschiedenen Varianten. Ein Viertel bis ein Drittel der GBS-Patienten entwickelt die Erkrankung nach einer Infektion mit *C. jejuni*. Es handelt sich hier um die Variante der akuten motorischen axonalen Neuropathie (AMAN; Kuwabara et al., 2004). Dabei induzieren *Campylobacter*-Lipooligosaccharide im Sinne eines molekularen Mimikry die hochtitrige Bildung von IgG-Antikörpern gegen das GMI-Gangliosid der peripheren Nerven (Godschalk, 2004; Yuki et al., 2004). Diese Antikörper rekrutieren Makrophagen in den periaxonalen Raum der Nerven, die das Axon attackieren und eine Wallersche Degeneration auslösen. Klinisch ist eine sich schnell entwickelnde Lähmung beider Beine zu beobachten, die im weiteren Verlauf aufsteigt und auch die Arme, den Rumpf mit der Atemmuskulatur sowie Gesichts-, Schlund und gelegentlich Augenmuskulatur betreffen kann. Ein weiteres Symptom des GBS ist der Verlust der Muskeleigenreflexe.

4.3 Gastrointestinale Lymphome

Anatomisch werden primäre gastrointestinale Lymphome wie auch andere extranodale Lymphome als lymphozytäre Tumoren definiert, deren Hauptmasse extranodal, d.h. außerhalb des Lymphknoten gelegen ist und deren Behandlung sich auf dieses extranodale Areal richtet (Isaacson, 1994). Lymphome, die sich innerhalb des physiologischen mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes, *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*, ausbilden, nennt man MALT-Lymphome. Die Klassifizierung von Isaacson unterscheidet bei MALT-Lymphomen niedrig- und hochmaligne Formen (Übersicht in Hiller et al., 2001). Diese Lymphome treten überwiegend im Magen auf, wo sie meist als Folge einer chronischen *Helicobacter*-Gastritis entstehen (Hussell et al., 1993). Die immuno-proliferative Dünndarmerkrankung, die sog. *immunoproliferative small intestinal disease* (IPSID), fast nur im mittleren Osten vorkommend und nur selten den Magen betreffend, gehört zu den B-Zell-MALT-Lymphomen. Es handelt sich dabei um ein niedrigmalignes Lymphom mit polypöser Schleimhautaufwerfung durch lympho-plasmazelluläre Infiltrate mit Bildung von *Alpha*-Schwerketten (*Alpha*-Schwerketten-Krankheit). Nach längerem Verlauf ist der Übergang in ein hochmalignes Lymphom offenbar häufig (aus Hiller et al., 2001). Bei den Analysen von Gewebeproben aus IPSID-Patienten wurde in 5 von 7 untersuchten Proben die Anwesenheit von *Campylobacter jejuni* detektiert (Lecuit et al., 2004). Daraus folgert die Arbeitsgruppe von Lecuit, dass *C. jejuni* möglicherweise eine ähnliche Rolle in der IPSID spielt, wie sein naher Verwandter *H. pylori* in gastritischen MALT-Lymphomen. In den letzteren reagiert das von Lymphom-Zellen produzierte Immunglobulin nicht direkt mit *H. pylori*, sondern mit einer Vielzahl von Antigenen. Die T-Zellen innerhalb des Lymphoms interagieren dagegen mit *H. pylori* und induzieren somit die Zytokinproduktion, die das Wachstum lymphatischer B-Zellen stimuliert (Du et al., 1996; Übersicht in Parsonnet und Isaacson, 2004).

5. Molekulare Pathogenese der *C. jejuni*-Infektion

Im Unterschied zu vielen anderen bakteriellen Enteritis-Erregern sind die molekularen Mechanismen, die an der Pathogenese der *Campylobacter*-Infektion beteiligt sind, immer noch wenig erforscht, was zum Teil am Fehlen eines der humanen Infektion entsprechenden Tiermodells liegt (Blaser et al., 1983; Fox, 1991). Die bisherigen Erkenntnisse stammen überwiegend aus *in vitro* Untersuchungen an Zelllinien, zu denen unter anderem die intestinale Zelllinie INT407 und die Kolon-Karzinomzelllinie CaCo-2 gehören. Diese beiden Zelllinien werden wegen ihrer intestinalen Herkunft sowie ihrer

Fähigkeit, Mikrovilli und wie im Falle von CaCo-2, Polarität und *tight junctions* auszubilden, bevorzugt verwendet (Everest et al., 1992; Konkel et al., 1992; Maruyama und Katsube, 1994; Bras und Ketley, 1999).

Die durch *Campylobacter* verursachte Schädigung des Darmepithels entsteht entweder direkt durch Invasion der Zellen und/oder Produktion von Toxinen, wie etwa des *cytolethal distending toxins* (CDT; Übersicht bei Wassenaar, 1997) oder aber indirekt durch Initiierung einer inflammatorischen Zellantwort (Übersicht in Wooldridge und Ketley, 1997).

5.1 Kolonisierung und Invasion von intestinalen Zellen

Wie durch C. Fearnley (Vet. Laboratory Ag., Weybridge, beschrieben in Bereswill und Kist, 2002) gezeigt, ist die Invasion der humanen Wirtszellen ein wichtiger Pathogenitätsmechanismus von *C. jejuni*. Einige Faktoren, die daran beteiligt sind, konnten mittlerweile in *C. jejuni* identifiziert werden. Für die Bindung an die intestinalen Epithelzellen (IECs) ist das Protein CadF erforderlich. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion dieses Proteins mit den IECs die bakterielle Internalisierung verstärkt (Konkel et al., 1997). Ebenfalls wichtig für eine vollständige bakterielle Invasion sind das von Hu untersuchte Protein Cjp29 und das Genprodukt Udg, dessen Funktion durch Golden identifiziert wurde (Übersicht in Bereswill und Kist, 2002). Im Jahre 1999 gelang es ein weiteres Protein, das CiaB, in Zusammenhang mit der bakteriellen Invasion zu bringen (Konkel et al., 1999). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die maximale Sekretion von CiaB nur dann die maximale Internalisierung zur Folge hat, wenn die Gene für die Synthese von Flagellen intakt sind. Ein weiterer Virulenzfaktor von *C. jejuni* ist das Flagellum, das zusammen mit der charakteristischen Spirillenform, dem Bakterium eine hohe Motilität verleiht. *C. jejuni*-Mutanten mit einem inaktiven Flagellum wiesen eine verminderte Adhäsions- und Invasionsfähigkeit auf (Nachamkin et al., 1993; Wassenaar et al., 1993). Einen weiteren, sehr früh erkannten Pathogenitätsfaktor stellen die Lipooligosaccharide (LOS) von *C. jejuni* dar, die dem Bakterium während der Kolonisierung als Adhäsine dienen (McSweegan und Walker, 1986). Neben den LOS wurde eine zweite Oberflächenstruktur als Adhäsine identifiziert. Es handelte sich dabei um das Lipoprotein JlpA, welches die Adhärenz an die Epithelzellen vermittelt (Jin et al., 2001). Die Mutation im Genlokus *peb1A* eines *Campylobacter jejuni*-Stammes führte zu verminderten Interaktionen dieses Bakteriums mit Epithelzellen sowie einer gehemmten intestinalen Kolonisierung, was darauf hin deutet, dass auch Peb1A eine Rolle in der Adhärenz spielt (Pei et al., 1998).

Der Infektionsweg von *C. jejuni* in die humanen Zellen konnte trotz dieser Untersuchungen jedoch bisher nicht genau bestimmt werden. Es wird angenommen, dass *Campylobacter* mit Hilfe einer Aktin-Polymerisierung in die humane Zelle gelangt. Dies konnte bereits bei anderen invasiven Pathogenen beobachtet werden. Die Inhibition der Aktin-Polymerisierung hemmte bei diesen Untersuchungen gleichzeitig auch die Invasion dieser Bakterien (Konkel et al., 1992; Grant et al., 1993).

Für die Beteiligung von Aktin am Eindringen von *Campylobacter* in humane Zellen spricht außerdem die Tatsache, dass an Stellen bakterieller Adhärenz auf der Zelloberfläche zugleich auch eine Ansammlung von kondensiertem Aktin zu beobachten ist (De Melo et al., 1989; Konkel et al., 1992). Die Infektion entsteht also durch Aufnahme von *C. jejuni* in die Zelle mittels aktin-vermittelter Einstülpung der Membran (Übersicht in Wooldridge und Ketley, 1997).

Neben dem direkten, transzellulären Weg, die intestinale Barriere zu durchbrechen, konnte bei *C. jejuni* und *C. coli* die Translokation entlang der polarisierten Membran beobachtet werden. Auch wenn *C. jejuni* auf beiden Infektionswegen in die IECs gelangt, wird postuliert, dass nur der parazelluläre Weg, auf dem die epithelialen Barrieren passiert werden, Gewebeschädigungen und Inflammation begünstigen kann (Everest et al., 1992).

5.2 Intrazelluläres Überleben von *C. jejuni*

Nach der Invasion wird *C. jejuni* überwiegend in membrangebundenen Vakuolen eingeschlossen (De Melo et al., 1989; Konkel et al., 1992; Russell et al., 1993). Dennoch konnten sowohl *in vivo* (Russell et al., 1993) als auch *in vitro* (Konkel et al., 1992) intrazelluläre, freischwimmende Bakterien identifiziert werden. In den ersten sechs Stunden kommt es zu einer stetigen Reduktion der Anzahl lebender, intrazellulärer Keime, bis nach 36 h nur noch vereinzelte Bakterien zu beobachten sind (De Melo et al., 1989).

5.3 Entzündung

Bereits vor über 20 Jahren wurde die Verbindung zwischen *C. jejuni* und Darm-erkrankungen sowie der dadurch hervorgerufenen Entzündung erkannt (Gurian et al., 1983; Humphrey et al., 1986; Black et al., 1988). Diese Beobachtungen resultierten hauptsächlich aus histologischen Untersuchungen. Erst im Jahre 1999 wurden die inflammatorischen Vorgänge auf molekularer Ebene untersucht. Erstmals wurde berichtet, dass *C. jejuni* in der Lage ist, die Interleukin-8 (IL-8) Freisetzung zu induzieren (Hickey et al., 1999). Zusätzlich wurde gezeigt, dass dies auf zwei voneinander unabhängigen Signalwegen

geschieht. Um die IL-8 Sekretion zu induzieren sind zum einen die Adhärenz und/oder die Invasion der Bakterien erforderlich, zum anderen kann diese Wirkung auch durch den Einfluss des Zytotoxins CDT erzielt werden (Hickey et al., 2000). *Campylobacter jejuni* sowie eine daraus isolierte, niedermolekulare Fraktion induzieren außerdem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa B* (NFκB; Mellits et al., 2002). Des Weiteren wurde beobachtet, dass das Oberflächenprotein JlpA (vgl. I.4.1) eine erhöhte Freisetzung von NFκB in humanen Epithelzellen initiieren kann (Jin et al., 2003).

Darüber hinaus induziert *C. jejuni* in der Monozyten-Zelllinie THP-1 eine Reihe proinflammatorischer Zytokine und Chemokine. Hierzu gehörten die Interleukine IL-1α, IL-1β, IL-6 und IL-8 sowie der Tumor Nekrose Faktor (TNF). Diese Immunantwort konnte sowohl durch lebende als auch durch abgetötete Bakterien ausgelöst werden und war unabhängig von dem Toxin CDT (Jones et al., 2003). In einer Untersuchung der intestinalen Zelllinie INT407 nach Stimulation mit *C. jejuni* wurden die bis dahin veröffentlichten Daten zum Teil bestätigt. Die zuvor für Monozyten beobachtete Induktion der TNF-Sekretion nach Kontakt mit *C. jejuni* konnte ebenfalls für die intestinalen Zellen gezeigt werden (Jones et al., 2003). Zusätzlich wurde die Induktion verschiedener zuvor nicht untersuchter Zytokine und Chemokine beobachtet. Das am stärksten induzierte Zytokin war Interferon gamma (IFNγ), gefolgt von Interleukinen IL-10 und IL-4 (Al-Salloom et al., 2003). Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte auch die Induktion von Chemokinen in den intestinalen INT407 Zellen nach Kontakt mit *C. jejuni*. Diese Stimulation führte zur erhöhten Freisetzung von IL-8, *macrophage-inflammatory protein-1 beta* (CCL4) und *monocyte-chemoattractant protein-1* (CCL2), nicht aber von *macrophage-inflammatory protein-1 alpha* (CCL3) oder CCL5 (Bakhiet et al., 2004).

5.4 Unspezifische anti-mikrobielle Immunabwehr (*innate immunity*)

Das menschliche Immunsystem agiert auf zwei Hauptebenen, die sich vor allem hinsichtlich ihrer Aktivierungszeit und ihrer Lernfähigkeit unterscheiden (zusammengefasst in Paul, 1998). Die Effektorsysteme der unspezifischen Immunität, die direkt nach Eindringen eines pathogenen Organismus aktiviert werden, umfassen zirkulierende Moleküle und Leukozyten. Die erworbene, adaptive Immunität zeichnet sich durch die Generierung und Aktivierung von antigenspezifischen T- und B-Zellen aus (Übersicht in Friese et al., 2000).

5.4.1 Das Komplementsystem

Ein wichtiger Faktor der unspezifischen Immunabwehr ist das Komplementsystem, eine Klasse von Effektorproteinen, welche die Wirkung von Antikörpern ergänzen, also komplementieren (Übersicht in Janeway, 1999). Das Komplementsystem wird durch die Komplementkomponente C3 reguliert. Da dieses Molekül innerhalb kürzester Zeit die Bildung von mehreren Millionen aktiver C3b-Molekülen induziert, ist die autokatalytische Bildung von C3b und die Beladung von Fremdkörper-Oberflächen der wichtigste Schritt der Komplementaktivierung (Übersicht in Friese et al., 2000). Die durch das Komplementsystem vermittelten Entzündungsmechanismen der Wirtszellen umfassen drei unterschiedliche Wege (Rother et al., 1997; Morgan und Harris, 2003). Zum einen führt die Aktivierungskaskade zur Bildung und Freisetzung von potenten Entzündungsmediatoren, den so genannten anaphylaktischen Peptiden C3a und C5a (Gallin et al., 1992). Des Weiteren werden körperfremde oder veränderte körpereigene Partikel durch die Beladung mit C3b für die Phagozytose vorbereitet, dieser Vorgang trägt den Namen Opsonisierung. Phagozyten können mit ihren spezifischen Membranrezeptoren oberflächengebundenes C3b erkennen, sich an die markierten Partikel anlagern, diese aufnehmen und abbauen. Der dritte Weg der Aktivierung der Komplementkaskade führt zum Aufbau des Membranangriffskomplexes, welcher zur Bildung von Poren in der Zellmembran und somit zur Lyse von pathogenen Bakterien führt (Übersicht in Friese et al., 2000).

5.4.2 TLR-vermittelte Immunantwort

5.4.2.1 Geschichtlicher Überblick

Die ersten Erkenntnisse über die Funktion der *Toll-like* Rezeptoren (TLR) wurden aus Studien über die *Toll*-Rezeptoren der Fruchtfliege *Drosophila* gewonnen (Anderson et al., 1985). Lemaitre und seine Mitarbeiter beobachteten 1996, dass der *Toll*-Rezeptor in *Drosophila* für die Detektion und Abwehr von Pilzinfektionen verantwortlich ist. In Säugetieren induziert der TLR die Expression von Genen, die an der Ausbildung einer inflammatorischen Immunantwort beteiligt sind (Medzhitov et al., 1997). Bisher konnten zehn humane TLRs identifiziert werden. Bis auf den TLR8 und TLR10 wurde bei allen anderen TLRs eine Beteiligung an der Erkennung mikrobieller Komponenten nachgewiesen (Übersicht in Takeda und Akira, 2004a und 2004b).

5.4.2.2 TLRs und ihre Liganden

Die Hauptliganden für TLR2 sind unter anderem bakterielle Bestandteile wie Lipoproteine, Lipoteichonsäuren oder Peptidoglykane. Der Erkennungsmechanismus von pathogenen Organismen wird durch die Interaktion von TLR2 mit TLR6 oder TLR1 aktiviert (Underhill und Ozinsky, 2002). Der *Toll-like* Rezeptor 3 (TLR3) ist an der Erkennung doppelsträngiger, viraler Ribonukleinsäure (RNA) beteiligt (Alexopoulou et al., 2001).

Der am besten untersuchte *Toll-like* Rezeptor ist TLR4. Sein Hauptligand ist das Lipopolysaccharid (LPS) aus der Zellmembran gramnegativer Bakterien. Die Erkennung von LPS durch TLR4 bedarf jedoch weiterer Moleküle. Lipopolysaccharide lagern sich im Serum an das LPS-Bindungsprotein (LBP) und treten dann als LPS-LBP-Komplex mit CD14 in Kontakt. Beim CD14 handelt es sich um ein Glykosylphosphatidylinositol-verankertes Molekül, welches bevorzugt durch Monozyten/Makrophagen sowie neutrophile Granulozyten exprimiert wird. Ein weiteres an der Erkennung von LPS beteiligtes Molekül ist MD-2. Hierbei tritt das sezernierte Protein MD-2 mit der extrazellulär lokalisierten Region des TLR4 in Wechselwirkung (Übersicht in Takeda und Akira, 2003). Die Bindung dieses Proteins verstärkt die Antwort der Zelle auf LPS (Shimazu et al., 1999; Überblick in Takeda und Akira, 2003).

Für die Aktivierung des *Toll-like* Rezeptors 5 (TLR5) reicht dagegen ein einziger spezifischer Ligand aus. Es handelt sich dabei um das Flagellin, ein Bestandteil des bakteriellen Flagellums (Hayashi et al., 2001). Die Untersuchung an Bakterien, welchen die Flagellen fehlten, zeigte dass sie TLR5 nicht aktivieren konnten (Übersicht in Takeda und Akira, 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass TLR5 ausschließlich auf der basolateralen, nicht jedoch auf der apikalen Seite der intestinalen Epithelzellen exprimiert wird (Gewirtz et al., 2001). Dies steht möglicherweise im direkten Zusammenhang mit dem bevorzugten Infektionsweg pathogener Organismen (vergleiche dazu I.5.1; Takeda und Akira, 2003).

Hemmi et al. (2002) konnten eine Aktivierung von TLR7-präsentierenden Zellen durch kleine anti-virale Bestandteile wie Imidazoquinoline nachweisen, doch bleibt der natürliche Ligand weiterhin unklar. Andererseits verdeutlicht diese Studie jedoch, dass synthetische Komponenten, welche die TLR-Familie aktivieren, potentiell für die Behandlung von Infektionskrankheiten verwendet werden könnten (Übersicht in Takeda und Akira, 2003).

Ein weiterer Vertreter der TLR-Familie, das TLR9 bindet spezifisch bakterielle Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenzen. Die aktiven Sequenzen innerhalb der

bakteriellen DNA enthalten nicht methylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide, die sog. CpG-Motive. Synthetische Oligonukleotide mit diesen Sequenzen zeigten ähnliche immunostimulatorische Wirkung wie genomische DNA aus Bakterien (Yamamoto et al., 1994). Die DNA-Motive mit einem zentralen CG Dinukleotid (CpG-Motive) ligieren mit dem TLR9 und werden endosomal bzw. lysosomal internalisiert (Hacker et al., 1998). Ahmad-Nejad et al. zeigten 2002, dass TLR9 in den endosomal/vakuolar/vesikulären Kompartimenten, nicht jedoch, wie andere TLRs auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden kann.

5.4.3 TLR-vermittelte NF κ B-Signalkaskade

Strukturell gesehen sind die TLRs Transmembranerezeptoren, die aus einer extrazellulären leucinreichen Domäne (LRR) und einer zytoplasmatischen Toll/IL-1-Rezeptor- (TIR-) Domäne bestehen (Übersicht in Takeda und Akira, 2004a und 2004b).

Die Bindung von spezifischen Liganden (siehe I.5.4.2.2) an die *Toll-like* Rezeptoren initiiert eine Konformationsänderung der intrazellulären TIR-Domäne, was die Rekrutierung des myeloiden Differenzierungsmarkers 88 (MyD88) zur Folge hat. Im nächsten Schritt interagiert das Adaptermolekül MyD88 über seine N-terminale Todesdomäne (*death domain*) mit der Serin-Threonin-IL1-R assoziierten Kinase (IRAK) und bindet diese an den Rezeptorkomplex. Anschließend erfolgen eine Autophosphorylierung von IRAK und das Lösen vom Rezeptorkomplex, dem eine Rekrutierung an ein weiteres Adapterprotein, den TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) folgt. Die TRAF6-induzierte Signaltransduktion kann in zwei Richtungen verlaufen:

Zum einen kann es zu einer Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) kommen, zu denen p38, *extracellular related kinase* (ERK) und eine c-jun NH2-terminale Kinase (JNK) gehören. Diese Aktivierung resultiert in der Induktion des Transkriptionsfaktors AP-1. Je nach Aktivierung der MAP-Kinasen kommt es zur Phosphorylierung von c-Jun, c-Fos und ATF, Untereinheiten des AP-1-Komplexes, welcher die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine im Zellkern initiiert.

Ein zweiter von TRAF6 ausgehender Signalweg führt zur Translokation des NF κ B-Komplexes in den Nukleus. Der NF κ B-Komplex besteht aus Dimeren der Untereinheiten p65/p50, auch RelA und NF κ B1 genannt. Im inaktiven Zustand ist NF κ B mit dem inhibitorischen Protein I κ B im Zytoplasma assoziiert. Bei Stimulation der Zellen kommt es zur Aktivierung des I κ B Kinase- (IKK)- Komplexes, welcher I κ B phosphoryliert und

dessen Ubiquitinierung und Proteinabbau einleitet. Der Abbau von I κ B hat die Demaskierung des nukleären Lokalisationssignals (NLS) von NF κ B und die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Nukleus zur Folge. Die NF κ B-abhängige Transkription bewirkt die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (zusammengefasst durch Takeda und Akira, 2004a und 2004b; siehe auch Abb.1).

Damit die Transkriptionsfaktoren an die DNA binden können, bedarf es jedoch post-translationaler Modifikationen, zu denen unter anderem Phosphorylierung und Histonazetylierung gehören. Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Saccani zeigen, dass auch die Bindung des Transkriptionsfaktors NF κ B von dem jeweiligen Phosphorylierungs- und Azetylierungsstatus des Chromatins abhängig ist (Saccani et al., 2001; Saccani et al., 2002; Saccani und Natoli, 2002). Die Histonazetylierung wird durch zwei antagonistisch wirkende Enzyme reguliert: die Histonazetyltransferase (HAT), deren Aufgabe die Azetylierung ist und die Histondeazetyltransferase (HDAC), welche die Azetylgruppen wieder entfernt (Cheung et al., 2000; Jenuwein und Allis, 2001; Horn und Peterson, 2002). Die Azetylierung von chromosomalen Histonen lockert die Struktur des Promotors eines Zielgens, wodurch eine erhöhte Affinität des Chromatins zu Transkriptionsfaktoren erreicht wird (Grunstein, 1997).

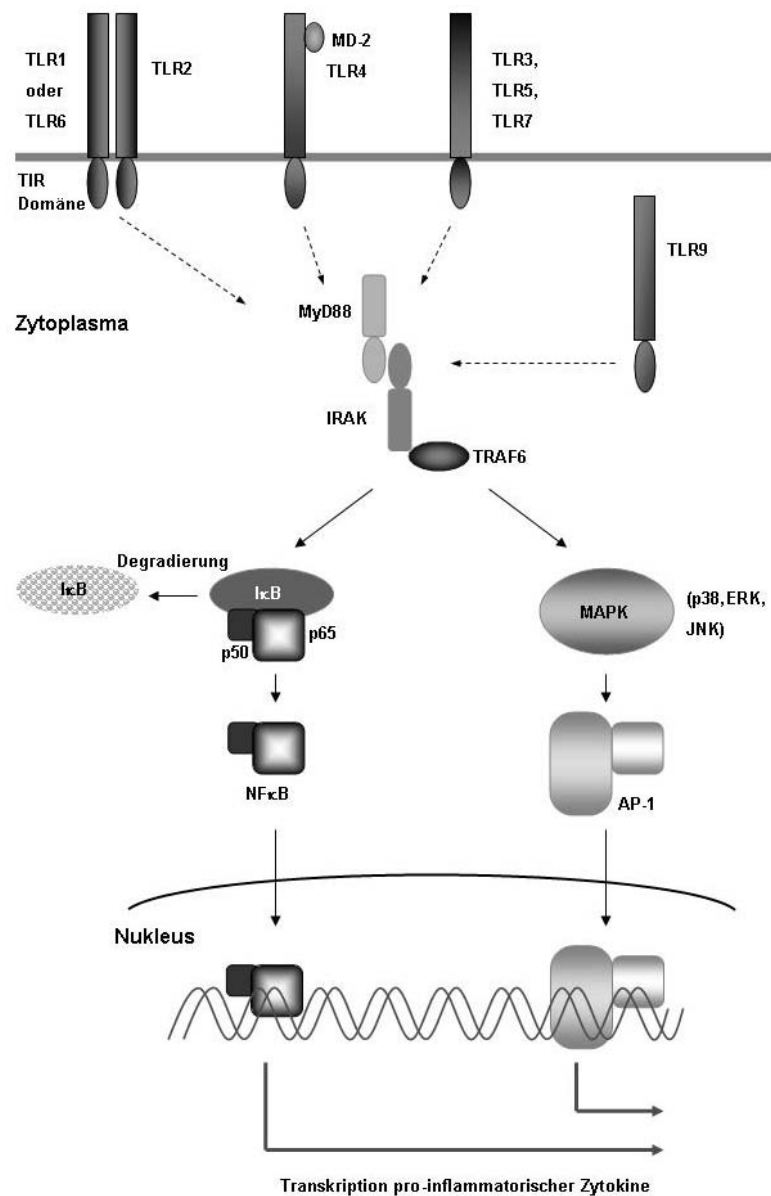


Abb. 1: Der TLR-Signalweg (in Anlehnung an Kandmilla et al., 2003; Kopp und Medzhitov, 2003; Takeda und Akira, 2004a und 2004b). Der aktivierte TLR assoziiert über seine intrazelluläre TIR-Domäne mit MyD88. MyD88 interagiert im weiteren Schritt mit IRAK, was zur Aktivierung von TRAF6 führt. Anschließend wird der IKK-Komplex aktiviert. Dies resultiert in der Phosphorylierung bzw. Degradierung von IκB, was die nukleäre Translokation von NFκB zur Folge hat. Je nach Aktivierung der MAP-Kinasen p38, ERK oder JNK kann es auch zur Phosphorylierung der Subeinheiten von AP-1 kommen. Das entstandene Homo- bzw. Heterodimer aus diesen Untereinheiten bewirkt, wie auch die NFκB-abhängige Transkription, die Produktion pro-inflammatorischer Zytokin-mRNA im Zellkern.

5.5 Einfluss von TGF β auf die Inflammation

5.5.1 Funktionen von TGF β

Mitglieder der *Transforming Growth Factor Beta* (TGF β)- Familie, zu der außer TGF β selbst unter anderem auch die *bone morphogenetic proteins* (BMPs) und Aktivine gehören, sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. Sie können die Adhäsion, Differenzierung, Migration sowie die damit einhergehende mitogene Aktivität der Zellen beeinflussen. In der Karzinogenese ist die Rolle von TGF β zweigeteilt: im frühen Stadium des Tumorwachstums wirkt es wachstumshemmend, während in der späten Phase das Wachstum gefördert wird. Auch die wundheilende Wirkung von TGF β wurde in Publikationen belegt. Darüber hinaus zeigt TGF β pro-apoptotische und immunsuppressive Eigenschaften (Überblick bei Derynck und Zhang, 2003).

5.5.2 TGF β -Isoformen

Es wurden drei Isoformen von TGF β identifiziert: TGF β -1 (Derynck et al., 1988), TGF β -2 (de Martin et al., 1987; Madisen et al., 1988) und TGF β -3 (Derynck et al., 1988). Obwohl alle drei Isoformen Affinität zu den gleichen Rezeptoren zeigen und *in vitro* gleiche zelluläre Effekte induzieren, sind sie während der Embryogenese unterschiedlich exprimiert (Überblick in Roberts und Sporn, 1992). Diese Expression wird durch die Induktion spezifischer Promotoren reguliert (Überblick in Roberts, 1998).

5.5.3 TGF β -Signalweg

5.5.3.1 TGF β -Rezeptor und Smad-Aktivierung

Der funktionelle TGF β -Rezeptorkomplex besteht aus je zwei Transmembran-Serin-Threonin-Kinasen des Typs I und II. Die Bindung von TGF β an den Rezeptor des Typs II (R-II) initiiert eine Rekrutierung und Phosphorylierung des Rezeptors von Typ I (R-I), was zur Formation eines Rezeptorkomplexes führt. Der aktivierte Rezeptor R-I phosphoryliert im nächsten Schritt die Proteine Smad2 und Smad3. Diese beiden rezeptor-regulierten (R-Smad) Proteine rekrutieren anschließend ein weiteres Protein, Smad4. Dies führt zu einer Translokation des R-Smad-Smad4-Komplexes in den Nukleus, wo die Regulation der Transkription der TGF β -Zielgene erfolgt. Die Bindung von R-Smads an den aktivierten Rezeptorkomplex wird durch die Proteine Smad6 und Smad7 inhibiert. Es konnte beobachtet werden, dass diese beiden inhibitorischen Smads (I-Smads) die Ubiquitin-

Ligasen, Smad *ubiquitination regulatory factor 1* (Smurf1) und Smurf2 rekrutieren. Dies führt anschließend zu einer Induktion der Ubiquitinilierung und daraus resultierendem Abbau von R-Smads (Überblick bei Derynck und Zhang, 2003; Shi und Massagué, 2003; siehe auch Abb. 2).

5.5.3.2 Translokation von Smads

5.5.3.2.1 Import

Die rezeptor-aktivierten R-Smads sind ohne Ligandenstimulation im Zytoplasma lokalisiert, während Smad4 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorkommt (Watanabe et al., 2000; Xiao et al., 2001; Inman et al., 2002). Dies ist darauf zurückzuführen, dass das nukleäre Lokalisationssignal (NLS), das im aktivierten Zustand den Kernimport induziert, bei Smad4 konstitutiv exprimiert wird.

Die Proteine Smad1 und Smad3 verfügen ebenfalls über die konservierte NLS-Region, die jedoch nicht konstitutiv exprimiert wird (Xiao et al., 2001). Erst durch die Phosphorylierung der R-Smads und die daraus resultierende Konformationsänderung wird diese Region so exponiert, dass sie eine Bindung mit dem kerntransport-vermittelnden Protein Importin eingehen kann. Diese Bindung führt zum Import von Smad1 und Smad3 in den Zellkern (Xu et al., 2000; Kurisaki et al., 2001).

Der Kernimport von Smad2 kann auch Importin-unabhängig stattfinden. Hierzu bedarf es einer weiteren Interaktion von Smad2 mit den Proteinen der Kernhülle, den sog. Nukleoporinen (Xu et al., 2002).

Smad6 und Smad7 sind in manchen Zellen auch ohne Einwirkung von TGF β sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert (Itoh et al., 2001; Hanyu et al., 2001). Der Weg von Smad7 in den Zellkern ist bisher noch nicht aufgeklärt. Nachdem es beschrieben wurde, dass Smad7 im Zellkern mit Smurf1 und Smurf2 interagiert (Kavsak et al., 2000; Ebisawa et al., 2001), mutmaßte die Arbeitsgruppe von Tajima (2003), dass der Import des Smad7-Smurf1/2-Komplexes in den Zellkern möglicherweise, ähnlich den R-Smads durch Induktion von Smurf-NLS zustande kommt.

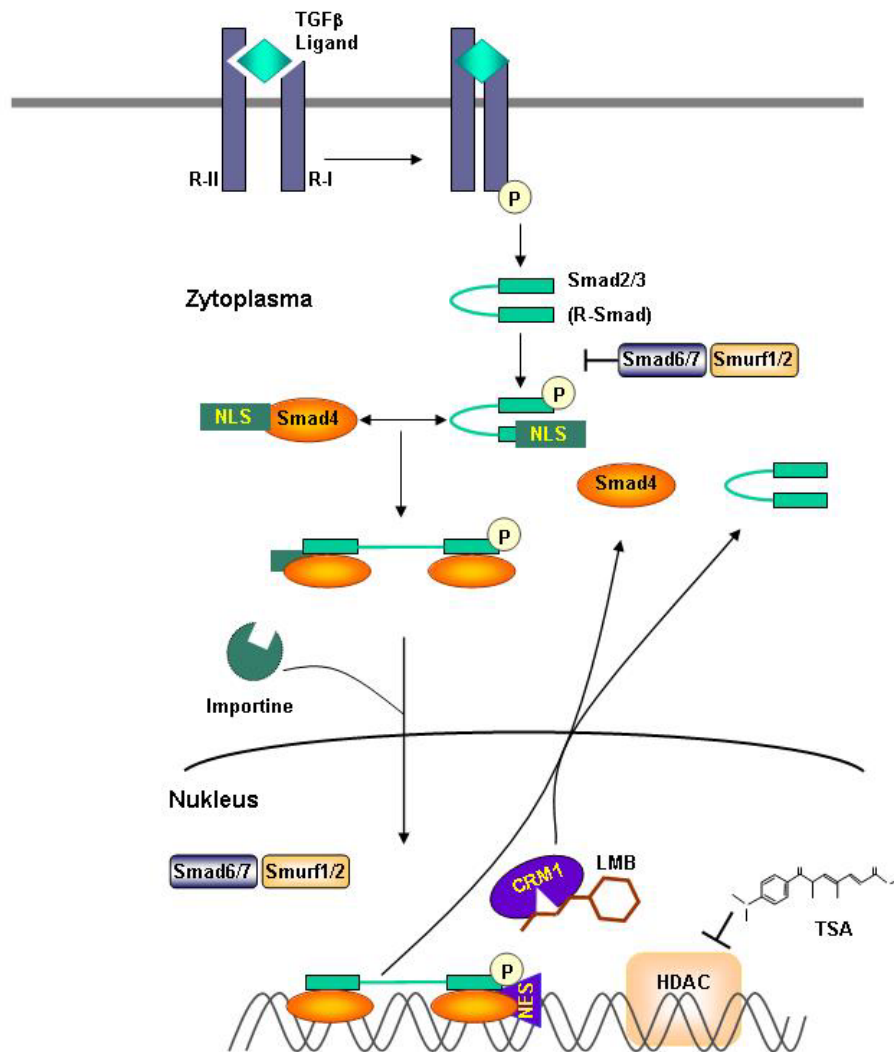


Abb. 2: Der zelluläre Signalweg von TGFβ ist sehr komplex: TGFβ bindet an seinen membranständigen Typ-2-Rezeptor (R-II) und ermöglicht dadurch die Anlagerung des Typ-1-Rezeptors (R-I). An diesen Rezeptor-Komplex binden die so genannten Rezeptor-Smad-Proteine (R-Smads; Smad2 und Smad3) und werden durch den Typ-1-Rezeptor phosphoryliert. Die phosphorylierten R-Smad-Proteine bilden einen Komplex mit einem weiteren Protein, dem Smad4. Nach dem Importin-vermittelten Kernimport lagern sich die aktivierten R-Smads an DNA-Promotoren und/oder Transkriptionsfaktoren an und steuern Transkriptionsprozesse, so lange bis sie dephosphoryliert werden. Anschließend dissoziieren sie und werden mittels des CRM1-Komplexes ins Zytoplasma zurücktransportiert (Einzelheiten siehe Text). Die inhibitorischen Proteine (Smad6 und Smad7) bilden einen Komplex mit den Smurf1/2-Proteinen und können dann die Anlagerung der R-Smads an den Rezeptorkomplex oder an Smad4 antagonisieren (verändert nach Derynck und Zhang, 2003).

5.5.3.2.2 Export

Für den Transport aus dem Zellkern ist eine Interaktion der nukleären Exportsignal-(NES)- Domäne der Smads mit dem Kerntransportrezeptor (CRM1) erforderlich. Sowohl Smad4 als auch die R-Smads können auf diesem Wege den Zellkern verlassen (Watanabe et al., 2000; Inman et al., 2002; Xu et al., 2002). Für Smad7 wurde gezeigt, dass der Export

nur über die Bildung eines Smad7-Smurfl/2-Komplexes zustande kommt, da Smurfl im Gegensatz zu Smad7 die für den Export erforderliche NES-Domäne exprimiert (Tajima et al., 2003).

Bei Smad2 und Smad3 konnte durch Behandlung mit Leptomycin B (LMB) auch ein zweiter, rezeptorunabhängiger Transportweg ins Zytoplasma nachgewiesen werden (Inman et al., 2002). LMB lagert sich nämlich an den CRM1-Rezeptor und bewirkt durch seine Hemmung eine Akkumulation von Smad4 und Smad7 im Zellkern, nicht jedoch von Smad2 und Smad3.

5.5.3.3 Einfluss von Trichostatin auf den TGF β -Signalweg

Neben der Wirkung von Trichostatin A (TSA), eines HDAC Inhibitors auf die Expression von TGF β , beeinflusst TSA auch die Expression der Smad-Proteine. Nach Zugabe von TSA wurde eine Veränderung in der Expression von Smad2/3, Smad4 sowie Smad7 beobachtet (Rombouts et al., 2002). Auch die Wirkung des inhibitorischen Smad6-Proteins lässt sich durch TSA beeinflussen. Hier konnte gezeigt werden, dass TSA die repressive Wirkung von Smad6 aufhebt, was darauf hin deutet, dass HDACs am inhibitorischen Effekt von Smad6 maßgeblich beteiligt sind (vgl. I.5.5.3; Bai und Cao, 2002).

Darüber hinaus wurde beobachtet, dass TSA auch ohne Zugabe von exogenem TGF β eine starke stimulatorische Wirkung auf den TGF β -Signalweg ausübt (Rombouts et al., 2002).

5.5.3.4 Einfluss von Kinasen auf den TGF β -Signalweg

Neben der oben beschriebenen Regulation durch exogenes TGF β kann die Smad-Aktivität auch durch eine Reihe von Kinasen induziert werden. Die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) und die Proteinkinase C können sowohl die Kerntranslokation als auch die Bindung der Smad3/4-Komplexe an die DNA beeinflussen und somit den TGF β -Signalweg regulieren (Yakymovych et al., 2001; Massagué, 2003). Darüber hinaus kann die Serin-Threonin-Proteinkinase B auch direkt mit den nicht-phosphorylierten Smad3-Proteinen interagieren, wodurch es zu einer Hemmung der Phosphorylierung und somit der Translokation kommt (Conery et al., 2004).

Andere Signalwege können den TGF β -Signalweg Smad-unabhängig induzieren. Hierzu gehören unter anderem die Komponenten des MAPK-Signalweges, wie p38, ERK und JNK (Muller et al., 2002; Massagué, 2003; Masszi et al., 2003).

5.5.4 Verbindung zwischen dem TGF β - und dem NF κ B-Signalweg

Wie bereits dargestellt, induziert *C. jejuni* sowie einige seiner Komponenten in den humanen Zellen den NF κ B-Signalweg und verschiebt somit das im gesunden Gewebe bestehende Gleichgewicht in Richtung Entzündungsreaktion (vgl. I.5.3 und I.5.5.3). Die Wiederherstellung des intrazellulären Gleichgewichtes ist dann über eine Initiierung des anti-inflammatorisch wirkenden TGF β -Signalweges möglich. Dies wurde bereits für kommensale enteritische Bakterien gezeigt, die sowohl den NF κ B- als auch den TGF β -Signalweg *in vivo* induzierten (Haller et al., 2003).

Zu den wichtigen gemeinsamen Regulationen des TGF β - sowie des NF κ B-Signalweges gehören neben der posttranslationalen Modifikation über HDAC auch die inhibitorische Regulation über Smad7 (Bitzer et al., 2000; Haller et al., 2003; Überblick in Monteleone et al., 2004). In der gesunden Darmschleimhaut induziert TGF β die Produktion von I κ B, eines Inhibitors des NF κ B-Signalweges und somit auch eines Inhibitors der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (s. Abb. 3A). Auf der anderen Seite kann TGF β nur dann den NF κ B-Signalweg regulieren, wenn Smad7 inhibiert ist. Ein defekter TGF β -Signalweg aufgrund von erhöhten Smad7-Konzentrationen in der Darmschleimhaut führt zu einer vermehrten Aktivität des NF κ B-Signalweges (s. Abb. 3B) und ist mit der Persistenz und Expansion der mukosa-assoziierten Entzündung in der Darmschleimhaut bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert (Überblick in Monteleone et al., 2004).

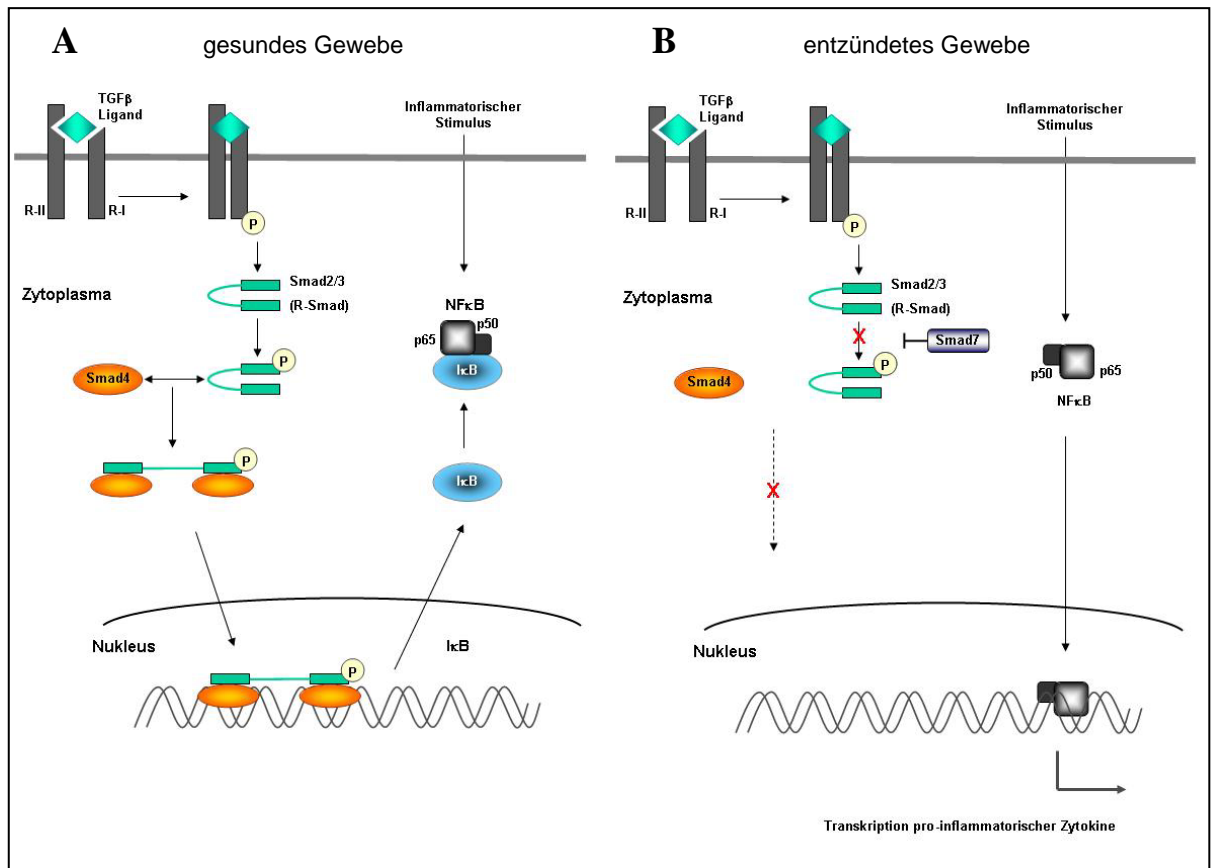


Abb. 3 Der TGF β -Signalweg im gesunden (A) und entzündeten (B) Gewebe der Mukosa (Monteleone et al., 2004). **A:** In gesundem Gewebe stimuliert TGF β die Induktion von I κ B, eines Inhibitors des NF κ B-Komplexes, wodurch die Transkription der NF κ B-induzierten pro-inflammatorischen Gene inhibiert wird. **B:** Im entzündeten Gewebe dagegen, exprimieren Mukosa-Zellen so hohe Konzentrationen an Smad7, dass TGF β den NF κ B-Signalweg nicht mehr inhibieren kann. Es kommt zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine.

6. Bakterielle Antwort auf humane Immunabwehr

Mikroorganismen, die einen Wirt besiedeln, unterliegen einer Vielzahl von Stressfaktoren. Neben der Veränderung von Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffpartialdruck sind sie den Abwehrmechanismen des Wirts ausgesetzt. Insbesondere ist hier die Phagozytose, in deren Verlauf die Bakterien mit einer Reihe toxischer Effektoren, wie reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen, niedrigem pH-Wert, Eisenmangel oder lysosomalen Enzymen konfrontiert sind, zu erwähnen. Unter diesen Bedingungen ermöglicht eine vermehrte Synthese der so genannten Hitzeschock- (HSP) oder Stressproteine zusammen mit weiteren zellulären Mechanismen die Aufrechterhaltung basaler Zellfunktionen und somit das Überleben des Erregers im Wirtsorganismus.

Die HSP-Familie besteht meist aus konstitutiv exprimierten sowie aus stress-induzierbaren Proteinen. Die konstitutiv exprimierten HSP, vor allem HSP60/GroEL, HSP70/DnaK und

HSP90 sind an der korrekten Faltung denaturierter Proteine, am Transport von Proteinen durch Membranen und am Zusammenbau oligomerer Proteinstrukturen beteiligt und werden daher zur Gruppe der molekularen Chaperone gerechnet (Übersichten in Georgopoulos und Welch, 1993; Hartl, 1996). Unter Stressbedingungen werden neben Chaperonen auch Proteine, wie Lon und Clp vermehrt synthetisiert, zu deren Aufgabe die ATP-abhängige Hydrolyse von degradierten Proteinen gehört (Chung und Goldberg, 1981; Hwang et al., 1987; Übersicht in Gottesmann und Maurizi, 1992).

7. Zielsetzung der Arbeit

Um die molekulare Pathogenese *Campylobacter jejuni*-assoziierter Erkrankungen zu verstehen, ist es notwendig die Interaktion zwischen Wirt und Bakterium zu untersuchen. Hierzu sollten drei Themenbereiche zum einen mittels Genexpressionsstudien und zum anderen durch zellbiologische Untersuchungen bearbeitet werden.

Im ersten Schritt sollte die veränderte mRNA-Produktion von humanen intestinalen Epithelzellen nach Kontakt mit *C. jejuni* auf molekularer Ebene analysiert werden. Anhand dieser Untersuchung sollten anschließend Gene identifiziert werden, die an der Modulation von Entzündungen beteiligt sein könnten. Dabei wird in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Stempfl (KFB, Regensburg) die Methode der cDNA-Mikroarray-Analyse angewendet. Anschließend sollten ausgewählte Ergebnisse der Mikroarray-Untersuchungen auch auf Proteinebene untersucht werden. Diese Analyse soll mit Hilfe spezifischer *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISAs) und der Western-Blot-Methode erfolgen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Einfluss von Zytokin TGF β auf die, mit *C. jejuni* infizierten humanen Zellen untersucht werden. Es sollte überprüft werden, ob TGF β seine entzündungshemmende Wirkung auch in der intestinalen bakteriellen Inflammation entfalten und sich somit für potentielle Therapie eignen kann. Darüber hinaus sollte die Wirkung von TGF β auf das Aktin-Zytoskelett und somit auf die Invasion bzw. das Überleben der Bakterien in humanen Zellen anhand von Infektionsassays untersucht werden.

Der dritte Themenbereich dieser Arbeit ist der Charakterisierung veränderter Genexpression von *Campylobacter jejuni* nach Einfluss von Stressfaktoren, wie erhöhter Temperatur oder gesenktem pH-Wert gewidmet, um mögliche weitere Pathogenitätsfaktoren des Bakteriums zu identifizieren.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Bezugsquellen von Chemikalien und Substanzen

Substanz	Bezugsquelle
Agar	Difco/Becton Dickinson, Heidelberg
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
APS	Bio-Rad, München
β -Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
Brilliant Blue G (Coomassie)	Sigma, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
<i>Brucella</i> Broth	Difco/Becton Dickinson, Heidelberg
BSA	PAA Laboratories, Linz, Österreich
dent (VTCA)	Abtek Biologicals Ltd, Liverpool, UK
DEPC	Sigma, Steinheim
DMEM	Biochrom, Berlin
EDTA	Serva, Heidelberg
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
FCS	Biochrom, Berlin
Gentamicin	Sigma, Steinheim
L-Glutamin (100x)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Lysozym	Amersham/Pharmacia Biotech, Freiburg
NEAA	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Steinheim
Pferde-/ Schafblut	Oxoid, Wesel
RPMI-Medium	Biochrom, Berlin
SDS	Boehringer, Mannheim
Selektivnährböden	Oxoid, Wesel
Supplement für Nährböden	Oxoid, Wesel
TEMED	Bio-Rad, München
Tris	USB, Cleveland, USA
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Linz, Österreich

Alle anderen Substanzen wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Merck, Darmstadt in p.a. Qualität bezogen.

2. Zell- und mikrobiologische Untersuchungen

2.1 Herkunft verwendeter Zellen

2.1.1 Humane Zellen

Name	Herkunft	ATCC Nr.
CaCo-2	Kolon-Karzinom Zelllinie	HTB-37
HT-29	Adenokarzinom Zelllinie	HTB-38
PBMC	Blutzellen	---
prim IEC	primäre intestinale Epithelzellen	---

2.1.2 Bakterienzellen

Name	Stamm	isoliert aus	ATCC Nr:	interne Uni-R Nr:
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	Fäzes	33291	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	84-25	Liquor	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	84-66	Fäzes	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	84-77	Zyste am Ovar	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	84-100	Urin	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	Isolat 10	Fäzes/ Huhn	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	Isolat 11	Fäzes/ Huhn	-	-
<i>Helicobacter pylori</i>	J 99	-	700824	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-	# 1435
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	# 1957

2.1.3 *C. jejuni*-Isolate aus Kotproben

Die Probennahme erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Manfred Biebl von der Firma Profos (Regensburg) in der Region Oberpfalz, vorzugsweise Regensburger Umgebung. Von jedem Bauernhof wurde eine Hühnerkot-Probe von ca. 25 ml genommen und zunächst meist 1 - 2 Tage bei 4°C aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben mit PBS vermengt und weiterverarbeitet.

2.2 Sterilisation

Die Sterilisation der Medien, Stammlösungen und Pipettenspitzen erfolgte, soweit nicht anders angegeben 20 min bei 121°C und 200 kPa Druck unter feuchter Hitze in einem

Autoklaven (Varioklav[®], H+P Labortechnik, Oberschleißheim). Glasgeräte wurden durch vierstündige, trockene Hitze (200°C) in einem Wärmeschrank (WTB binder, Tuttlingen) sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen, wie z.B. Antibiotika wurden sterilfiltriert (0,22 µm; Millex[®]-GP; Millipore, Bedford, USA).

2.3 Kulturmedien

2.3.1 Medien für humane Zellen

2.3.1.1 *Dulbecco's MEM (DMEM)*

DMEM:

FCS	10% (v/v)
L-Glutamin	1% (v/v)
NEAA	1% (v/v)

DMEM	500 ml
------	--------

Das fötale Kälberserum (FCS) wurde inaktiviert, indem es 1 h bei 56°C im Wasserbad (T-Lauda; Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG., Lauda-Königshofen) erwärmt wurde. Nach dem Abkühlen wurde das FCS sterilfiltriert, bis zur Verwendung, genauso wie L-Glutamin, bei -20°C aufbewahrt und vor der Herstellung des DMEM-Mediums zusammen mit allen anderen Komponenten auf 37°C gebracht. Das DMEM-Medium wurde anschließend, wie oben beschrieben, zusammengesetzt und bei 4°C gelagert.

2.3.1.2 *RPMI 1640 Medium (RPMI)*

RPMI:

FCS	10% (v/v)
L-Glutamin	1% (v/v)

RPMI	500 ml
------	--------

Das RPMI-Medium wurde analog zu DMEM-Medium (s. II.2.3.1.1) hergestellt und gelagert.

2.3.2 Medien und Nährböden für Bakterienkulturen

2.3.2.1 *Campylobacter*-Agar-Nährboden (*Campylobacter*-Selektiv)

Art.-Nr. CM 739

Campylobacter-Agar-Basis, blutfrei

Nährbouillon Nr. 2	25,0 g
Bakteriologische Kohle	4,0 g
Casein-Hydrolysat	3,0 g
Natriumdesoxycholat	1,0 g
Eisen (II)-sulfat	0,25 g
Natriumpyruvat	0,25 g
Agar	12,0 g
<hr/>	
H ₂ O _{bidest}	ad 1000ml
pH 7,4 +/-0,2	

CCDA-Selektiv-Supplement (Art.-Nr. SR 155)

Cefoperazon	32 mg
Amphotericin B	10 mg

Campylobacter-Agar-Basis-Medium ad 1000ml

Die *Campylobacter*-Agar-Basis wurde blutfrei in H₂O_{bidest} suspendiert. Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 +/-0,2 wurde das Medium 15 min bei 121°C autoklaviert und auf 50°C abgekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe von CCDA-Selektiv-Supplement. Hierzu wurden die angegebenen Mengen zunächst aseptisch in 4 ml H₂O_{bidest} gelöst, bevor sie dann zu abgekühlter *Campylobacter*-Agar-Basis zugegeben wurden. Das hergestellte Medium wurde in sterile Plastikpetrischalen zu je ca. 20 - 25 ml gegossen. Die Oberfläche der erstarrten Platten wurde entweder über Nacht bei 37°C oder zwei bis drei Tage bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Danach wurden die Platten bei 4°C in Plastikbeuteln aufbewahrt.

2.3.2.2 Wilkins-Chalgren-Anaerobier-Nährboden (WCdent)

Art.-Nr. CM 619

WC-Nährboden

Caseinpepton	10,0 g
Gelatinepepton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Glucose	1,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
L-Arginin	1,0 g
Natriumpyruvat	1,0 g
Menadion (Vitamin K ₃)	0,5 mg
Kaliumnitrat	0,2 g
Hämin	5,0 mg
Agar	10,0 g

H₂O_{bidest} ad 1000ml

pH 7,1 +/-0,2

10% Pferdeblut (v/v)

Dent (VTCA)-Selektiv-Supplement (Art.-Nr. IS/ HP2-B)

Vancomycin	10 mg
Trimethoprim	5 mg
Cefsulodin	5 mg
Amphotericin	5 mg

WC-Medium ad 1000ml

Nach dem Auflösen des WC-Nährbodens in H₂O_{bidest} erfolgte die Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,1 +/-0,2. Anschließend wurde das Medium 15 min bei 121°C autoklaviert und auf 50°C abgekühlt. Dann erfolgte die aseptische Zugabe von 10% defibriniertem Pferdeblut und Dent-Selektiv-Supplement. Die WCdent-Platten wurden gegossen und gelagert, wie unter II.2.3.2.1 beschrieben.

2.3.2.3 Brucella Bouillon Selektivmedium (BBFCSdent)BB

Casein (in Pankreas verdaut)	10,0 g
tierisches Gewebe (peptisch verdaut)	10,0 g
Dextrose	1,0 g
Hefeextrakt	2,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Natriumbisulfid	0,1 g
Agar	15,0 g

H₂O_{bidest} ad 1000ml
FCS 8% (v/v)

Dent-Selektiv-Supplement siehe II.2.3.2.2

Das Medium wurde nach Angaben des Herstellers aufgelöst, autoklaviert und auf 50°C abgekühlt. Anschließend erfolgte die aseptische Zugabe von fötalem Kälberserum (FCS) und dem Dent-Selektiv-Supplement. Das Medium wurde bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

2.3.2.4 Frischblut-Platten (Columbia-Agar-Basis)

Columbia-Agar-Basis

Spezial-Nährsubstrat	23,0 g
Stärke	1,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Agar-Agar	13,0 g
<hr/>	
H ₂ O _{bidest}	ad 1000ml
pH 7,3 +/-0,2 bei 25°C	
8% Schafblut (v/v)	

Das Medium wurde hergestellt, autoklaviert und abgekühlt wie unter II.2.3.2.1 beschrieben. Nach anschließender Zugabe von Schafblut wurden die Platten gegossen und gelagert analog zu II.2.3.2.1.

2.4 Einfriermedien

2.4.1 Konservierung humaner Zellen

DMEM (ohne Supplemente)	50% (v/v)
FCS	40% (v/v)
DMSO	10% (v/v)
<hr/>	

Das Einfriermedium wurde erst unmittelbar vor der Verwendung hergestellt. Bis dahin erfolgte die Lagerung von DMSO bei RT, DMEM bei 4°C und FCS bei -20°C (vgl. II.2.3.1.1).

2.4.2 Konservierung von Bakterienkulturen

FCS	90% (v/v)
Glyzerin	10% (v/v)
<hr/>	

Das Einfriermedium wurde aus sterilfiltriertem FCS und Glycerin hergestellt, à 0,8 ml in Kryoröhrchen (Corning Costar, Bodenheim) aliquotiert und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.5 Kultivierung von Zellen

2.5.1 Humane Zellen

2.5.1.1 CaCo-2 Zellen

2.5.1.1.1 Wachstum in Zellkulturflaschen

Adhärente Zellen wurden einmal wöchentlich in einer 250 ml- Kulturflasche (Corning Costar, Bodenheim) passagiert. Dazu wurde das Medium vollständig abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit DPBS-Puffer (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien) gewaschen. Danach erfolgte das Ablösen der Zellen durch Zugabe von 2 - 3 ml Trypsin/EDTA und eine 5 - 10 Minuten lange Inkubation bei 37°C. Nach Kontrolle des Ablösevorgangs unter dem Mikroskop Leitz Fluovert (Leitz, Wetzlar) wurden die Zellen in 10 ml DMEM-Medium (s. II.2.3.1.1) aufgenommen und bei 1200 Upm für 5 min in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Corning Costar, Bodenheim) abzentrifugiert (Zentrifuge Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde vollständig abgesaugt. Die Zellen wurden durch Zugabe von 10 ml DMEM und mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in Einzelzellsuspension gebracht. Anschließend wurden die Zellen in einer neuen Zellkulturflasche, mit vorgelegtem DMEM 1:10 verdünnt. Das Endvolumen in einer 250 ml Kulturflasche betrug 10 ml. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und bei 5% CO₂ in einem Begasungsbrutschrank (Kendro Heraeus, Hanau).

2.5.1.1.2 Wachstum in 12-*well*-Platten

Die abtrypsinierte Einzelzellsuspension (s. II.2.5.1.1.1) wurde 1:5 im DMEM-Medium verdünnt, à 1 ml in 12-*well*-Platten (Corning Costar, Bodenheim) verteilt und drei Tage, wie oben beschrieben (s. II.2.5.1.1.1) inkubiert. Am Vortag des Versuches wurde das Medium gegen DMEM ohne Supplement ausgetauscht. Nach einer anschließenden 14 - 16-stündigen Inkubation wurden die CaCo-2 Zellen für Infektions-Versuche verwendet.

2.5.1.1.3 Wachstum auf Deckgläsern

Um die CaCo-2 Zellen färben zu können, wurden sie zunächst, wie unter II.2.5.1.1.1 beschrieben, in Suspension gebracht und auf runde Deckgläser (Roth, Karlsruhe), die in einer 12-*well*-Platte vorgelegt waren, passagiert. Die Deckgläser, die einen Durchmesser von 18 mm aufwiesen, wurden zuvor in einem Becherglas, abgedeckt mit Alufolie, im Wärmeschrank sterilisiert (vgl. II.2.2). Die Verdünnung sowie Kultivierung der Zellen erfolgte nach der unter II.2.5.1.1.2 beschriebenen Methode.

2.5.1.2 HT-29 Zellen

Die HT-29 Zelllinie wurde sowohl in Zellkulturflaschen als auch in 12-*well*-Platten analog zu den CaCo-2 Zellen inkubiert (s. II.2.5.1.1).

2.5.1.3 Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC)

2.5.1.3.1 Gewinnung von PBMCs

Die Gewinnung von PBMCs aus *Buffy-Coat*-Konserven gesunder Spender (Blutspendedienst, Rotes Kreuz, Regensburg) erfolgte durch Dichte-Gradienten-Zentrifugation über Ficoll-Trennlösung. Die Blutkonserven wurden in 50 ml Röhrchen überführt. Durch Zentrifugation bei 3000 Upm, 7 min bei 22°C wurde das Blut in feste und flüssige Bestandteile getrennt. Das Plasma wurde abgenommen und jedes Röhrchen wurde mit DPBS/Heparin (Liquemin®; Roche, Mannheim), nach Anleitung des Herstellers versetzt. Nach dem Resuspendieren erfolgte ein vorsichtiges Unterschichten mit 10 ml Ficollreagenz (Lymphoprep; Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norwegen) und die Zentrifugation, 40 min bei 1500 Upm und 22°C ohne Bremse. Die in der Interphase gesammelten PBMCs wurden abgenommen und zweimal in 1mM EDTA/DPBS gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und die benötigte Menge an PBMCs in RPMI-Medium (s. II.2.3.1.2) einmal gewaschen, in Einzelzellsuspension gebracht und in eine 12-*well*-Platte à 1 ml pipettiert. Die Zellsuspension wurde sofort weiter für Infektionsversuche verwendet.

2.5.1.3.2 Inkubation von PBMCs

Die PBMCs wurden in RPMI-Medium bei 37°C und 5% CO₂ in einem Begasungsbrutschrank inkubiert (vgl. II.2.5.1.1.2).

2.5.1.4 Primäre intestinale Epithelzellen (prim IEC)

Die Isolierung von primären intestinalen Epithelzellen erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Johannes Grossmann (Grossmann et al., 1998). Die so gewonnenen Zellen wurden dreimal mit DPBS gewaschen und in KSF-Medium (*keratinocyte serum-free medium*; Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe) in Einzellsuspension gebracht. Die Infektionsversuche wurden unmittelbar nach der Herstellung der Zellsuspension durchgeführt.

2.5.2 Bakterienzellen

2.5.2.1 *Campylobacter jejuni*

2.5.2.1.1 Wachstum auf Platten

Campylobacter jejuni wurde für die Stammhaltung zweimal wöchentlich mit einer Impföse auf WCdent-Platten (s. II.2.3.2.2) überimpft. Da die Agarkonzentration dieser Platten niedriger war, konnten die Bakterienkolonien leichter von den Platten abgenommen werden. Für die Infektionsversuche wurden *Campylobacter*-Selektiv-Platten verwendet (s. II.2.3.2.1). Durch die höhere Agarkonzentration dieser Platten blieben die *Campylobacter*-Kolonien auf der Platte haften, ohne Schlieren zu bilden und konnten somit eindeutig identifiziert werden. Die beimpften Platten wurden in einem Metalltopf (Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen) mit einem feuchten Papiertuch, um der Austrocknung der Platten vorzubeugen, verschlossen. Nach dem Evakuieren wurde der Topf mit dem *Campylobacter*-Gasgemisch (15% CO₂, 5% O₂, 80% N₂; Messer, Griesheim) befüllt. Anschließend wurden die im Topf befindlichen Bakterien in einem Brutraum bei 37°C, soweit nicht anders angegeben, 3 - 4 Tage inkubiert.

2.5.2.1.2 Wachstum in Flüssigkultur

Als Starterkultur diente hierfür ein, 24 h auf WCdent Platten vorinkubierter *Campylobacter*-Rasen. Davon wurde in BBFCSdent (s. II.2.3.2.3) eine Verdünnung mit der, bei 600 nm gemessenen optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,1 hergestellt. Diese Bakterienkultur wurde in eine Zellkulturflasche überführt (Corning Costar, Bodenheim) und in einem Metalltopf stehend fest verankert. Anschließend wurde der Metalltopf in einem Laborschüttler KS 501 digital (IKA[®]-Werke GmbH & CO. KG, Staufen) befestigt und über Nacht bei ca. 150 - 160 Upm geschüttelt. Die Inkubation wurde beendet, wenn die OD₆₀₀ der Kultur zwischen 0,8 und 1,1, noch in der logarithmischen Wachstumsphase lag.

2.5.2.2 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori wurde auf WCdent-Platten kultiviert und wie unter II.2.5.2.1.1 beschrieben inkubiert.

2.5.2.3 *Shigella flexneri*

Das Bakterium *Shigella flexneri* wurde auf Frischblut-Platten (s. II.2.3.2.4) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C in einem Begasungsbrutschrank bei 5% CO₂ inkubiert.

2.5.2.4 *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus wurde analog zu *S. flexneri* kultiviert (s. II.2.5.2.3).

2.6 Bestimmungen der Zellzahlen

2.6.1 Bestimmung der Zellzahl humaner Zellen

Die adhärenen Zellen wurden zur Bestimmung der Zellzahl zunächst, wie unter II.2.5.1.1.1 beschrieben, in Einzelzellsuspension gebracht. Vier Volumen dieser Zellsuspension wurden mit einem Volumen einer 0,5%igen Trypanblau-Lösung versetzt. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer (pro Großquadrat: 1 mm² Fläche und 0,1 mm Kammertiefe, Blaubrand®; Brand GmbH & Co, Wertheim) durch Auszählen von mindestens vier Großquadraten bestimmt. Anschließend wurde die Gesamtzellzahl wie folgt berechnet:

$$\text{Anzahl der Zellen/Großquadrat} \times 1,25 \text{ (Verdünnung)} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Wenn nicht anders angegeben, wurde immer die Zahl der lebenden, d.h. ungefärbten Zellen bestimmt. Die toten Zellen hingegen wurden durch Trypanblau angefärbt und konnten als solche identifiziert werden.

2.6.2 Bestimmung der Bakterienzellzahl

2.6.2.1 Bestimmung der Gesamtzellzahlen

Um die Zellkonzentration zu bestimmen, wurden die Bakterien entweder von einer WCdent-Platte (s. II.2.5.2.1.1) abgenommen und in DPBS resuspendiert oder direkt als Aliquot aus BBFCSdent-Kultur (s. II.2.5.2.1.2) entnommen und, soweit nicht anders angegeben, auf OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt. Die Gesamtzellzahl wurde aus etwa 20 µl dieser Suspension in einer Thoma Zählkammer (Blaubrand, Wertheim) bestimmt. Das Volumen

eines Kleinquadrates betrug 5×10^{-8} ml (zusammengesetzt aus der Fläche von $0,0025 \text{ mm}^2$ und einer Tiefe von $0,02 \text{ mm}$). Somit ergab sich folgender Berechnungsfaktor:

$$\text{Anzahl der Zellen/Kleinquadrat} \times 2 \times 10^7 = \text{Bakterien/ml}$$

2.6.2.2 Bestimmung der Lebend-Zellzahlen

Da die Gesamtzellzahlbestimmung keine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Bakterien erlaubte, wurde die Bestimmung lebender Bakterienzahlen mittels einer Verdünnungsreihe vorgenommen. Hierzu wurde die Bakteriensuspension, wie unter II.2.6.2.1 beschrieben, auf OD_{600} von 1,0 eingestellt, in dezimalen Schritten ($50 \mu\text{l}$ und $450 \mu\text{l}$) in DPBS verdünnt und als 10^6 , 10^7 , 10^8 und 10^9 Verdünnungen auf Platten mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert. Nach einem Tag (*S. flexneri*, *V. parahaemolyticus*) bzw. 3 - 4 Tagen (*C. jejuni*, *H. pylori*) wurden die Kolonien auf den Platten ausgezählt. Die Zellzahl wurde anschließend aus dem Durchschnittswert aller Verdünnungen ermittelt und als *colony forming units* (cfu) pro ml angegeben. Die Versuche wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

2.6.2.3 Bestimmung der Infektionskurve

Zur Untersuchung des Infektionsverhaltens von *C. jejuni* wurde zu gegebenen Zeitpunkten nach Infektion die Anzahl der lebenden CaCo-2 Zellen bestimmt (vgl. II.2.6.1). Gleichzeitig wurde der Einfluss dieser Bakterienkonzentration auf die CaCo-2 Zellen untersucht. Die Anzahl der Bakterien pro humane Zelle wurde mit Hilfe der *multiplicity of infection* (MOI) ausgedrückt.

2.7 Konservierung verwendeter Zellen

2.7.1 Konservierung humaner Zelllinien

Zellen der humanen Zelllinien CaCo-2 und HT-29 wurden angezogen und abtrypsiniert (s. II.2.5.1.1.1). Nach der Bestimmung der Zellzahl (s. II.2.6.1) und anschließender Zentrifugation wurde das Pellet von je 10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (s. II.2.4.1) resuspendiert und rasch auf 2 ml- Kryoröhrchen (Corning Costar, Bodenheim) verteilt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte zunächst für 24 h in einem Kryobehälter (Nalgene, Hereford, Großbritannien) mit einer Abkühlrate von ca. $1^\circ\text{C}/\text{min}$ bei -80°C . Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Lagerpositionen:

CaCo-2	Halter 10; Schublade 10
HT-29	Halter 11; Schublade 01

2.7.2 Konservierung von Bakterien

C. jejuni-Bakterienrasen wurde von einer WCdent-Platte (s. II.2.5.2.1.1) abgenommen, in je 0,8 ml Einfriermedium (s. II.2.4.2) resuspendiert und anschließend bei -80°C gelagert.

Lagerposition:

<i>Campylobacter jejuni</i>	
alle Stämme und Isolate	Schublade L, Bakterienstämme

2.8 Auftauen

2.8.1 Auftauen humaner Zelllinien

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend vorsichtig in 3 ml DMEM-Medium (s. II.2.3.1.1) aufgenommen und resuspendiert. Zur Entfernung des DMSO-haltigen Einfriermediums wurden die Zellen in ein Zentrifugeröhrchen, mit vorgelegten 8 ml DMEM, 5 min bei 1200 Upm abzentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet in DMEM resuspendiert und in eine 250 ml- Zellkulturflasche überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie bereits unter II.2.5.1.1.1 beschrieben.

2.8.2 Bakterienzellen

Die eingefrorenen Bakterien (s. II.2.7.2) wurden mit einer Impföse abgenommen, sofort auf WCdent-Platten ausgestrichen und inkubiert, wie unter II.2.5.2.1.1 beschrieben. Falls die restliche Menge im Kryoröhrchen nicht angetaut war, wurde das Röhrchen anschließend zur weiteren Verwendung wieder bei -80°C gelagert.

2.9 Infektionsversuche

Alle nachfolgenden Versuche wurden, soweit nicht anders angegeben in Triplikaten durchgeführt.

2.9.1 Adhärenzassay

Eine CaCo-2 Zellkultur in einer 12-*well*-Platte (s. II.2.5.1.1.2) wurde, soweit nicht anders angegeben, mit 25 µl einer Bakteriensuspension in DPBS OD₆₀₀ 3,0 infiziert. Aus der zum Beginn der Infektion bestimmten CaCo-2 Zellzahl von ca. 5×10^5 Zellen pro *well* und der infizierten Menge an *Campylobacter* von ca. 5×10^7 cfu/ml ergab sich eine MOI von 100. Nach dreistündiger Inkubation im Begasungsbrutschrank wurde der Überstand abgenommen und für ELISA-Untersuchungen bei -80°C eingefroren. Die humanen Zellen wurden dreimal mit vorgewärmten DPBS gewaschen und durch Zugabe von 0,5 ml 0,1% Triton X-100 in eiskaltem DPBS lysiert. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurden die Zellysate 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt und ausplattiert. Die Auswertung des Versuches erfolgte wie unter II.2.6.2.2 beschrieben.

Für die Untersuchung des Einflusses von Mediatoren des TGFβ-Signalweges wurden der Kerntransport-Inhibitor Leptomycin B (LMB) und der HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) verwendet. Beide Substanzen wurden vor der Infektion mit *C. jejuni* zugegeben:

LMB in Konz. 20 nM, 2,5 h vor der Infektion und

TSA in Konz. 3,3 nM, 2 h vor der Infektion. Nach der entsprechenden Vorinkubation wurden die Zellen infiziert und inkubiert wie oben beschrieben.

2.9.2 Invasionsassay

CaCo-2 Zellen wurden infiziert, inkubiert und gewaschen wie beim Adhärenzassay beschrieben (s. II.2.9.1). Nach dem dritten Waschschrift erfolgte eine 1,5-stündige Inkubation der Zellen im DMEM-Medium, versetzt mit 100 µg/ml Gentamicin. In diesem Schritt wurden alle externen, an den humanen Zellen adhärierenden Bakterien abgetötet, während die invadierten Bakterien von dieser Wirkung nicht betroffen waren. Anschließend erfolgte die Abnahme des Überstands, das dreimalige Waschen der Zellen mit vorgewärmten DPBS und die Lyse der Zellen (vgl. II.2.9.1). Die hergestellten Verdünnungen der Zellysate, 1:10 und 1:100, wurden genauso wie das unverdünnte Aliquot ausplattiert, inkubiert und anschließend ausgewertet (vgl. II.2.6.2.2).

2.9.3 Infektionsassay für Array-Analysen

Um genügend RNA zu erhalten, wurde die abtrypsinierte Einzelzellsuspension (s. II.2.5.1.1.1) 1:3 im DMEM-Medium in einer 720 ml- Zellkulturflasche verdünnt. Das Gesamtvolumen in einer Kulturflasche betrug 20 ml. Die Inkubation mit anschließendem

Mediumwechsel erfolgte wie unter II.2.5.1.1.2 beschrieben. Für den Infektionsassay wurden die CaCo-2 Zellen mit 200 µl einer Bakteriensuspension in DPBS OD₆₀₀ 3,0 versetzt und über Nacht im Begasungsbrutschrank inkubiert. Als Negativkontrolle diente eine nicht infizierte Zellkultur. Zusätzlich zum Infektionsassay wurde hier auch ein Adhärenz- und Invasionsassay (vgl. II.2.9.1 und II.2.9.2) durchgeführt, aus dem man entnehmen konnte, ob Adhärenz und Invasion erfolgreich stattfanden.

2.9.4 Infektionsassay für Proteinisolierung

Die Infektion der CaCo-2 Zellen erfolgte analog zu der unter II.2.9.3 beschriebenen Methode.

2.10 Einwirkung von Hitzestress

Das Protokoll für Durchführung der Hitzeschockversuche (Thies et al., 1999a) wurde wie folgt modifiziert: Die Kultivierung von *Campylobacter* erfolgte in zwei Zellkulturflaschen, zusätzlich wurde eine nicht infizierte Kulturflasche als Negativkontrolle vorbereitet. Alle Flaschen wurden über Nacht schüttelnd inkubiert (s. II.2.5.2.1.2). Anschließend erfolgte die Messung der optischen Dichte OD₆₀₀, um die Wachstumsphase der Kultur zu überprüfen. Bei OD₆₀₀ zwischen 0,8 und 1,1 handelt es sich um eine Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase. Eine Flasche mit Bakterienkultur wurde in der Aussparung einer Styropor-Platte befestigt und 20 min im Wasserbad (GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) bei 48°C inkubiert, gelegentlich wurde die Kulturflasche leicht geschüttelt. Die Inkubation der nicht wärmebehandelten Bakterienkultur erfolgte 20 min bei 37°C. Anschließend wurden beide Kulturen in 50 ml Zentrifugeröhrchen à 25 ml verteilt, mit 25 ml eines *RNAprotectTM Bacteria Reagents* (Qiagen, Hilden), zur RNA-Stabilisierung versetzt, 5 s gevortext, 5 min auf Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 min bei 4000 Upm abzentrifugiert. Nach dem Abnehmen der Überstände wurden die Pellets bis zur RNA-Isolierung bei -80°C eingefroren.

2.11 Einwirkung von pH-Stress

Campylobacter-Kultur wurde angesetzt und inkubiert wie unter II.2.5.2.1.2 beschrieben. Anschließend wurde die Bakterienkultur auf zwei Zentrifugengefäße à 50 ml verteilt und 20 min lang bei 4000 Upm abzentrifugiert. Während der Zentrifugation erfolgte die Einstellung des pH-Wertes von BBFCSdent mit rauchender HCl (37%) auf 3,5. Nach der

Zentrifugation wurden die Pellets der Negativkontrolle und der zu untersuchenden Probe in 25 ml neutralen BBFCSdent bzw. in BBFCSdent bei pH 3,5 resuspendiert. Die Inkubation der Bakterien erfolgte 7 min bei RT. Anschließend wurden beide Proben mit 25 ml *RNAprotect™ Bacteria Reagent* versetzt und nach einer Inkubation 20 min bei 4000 Upm abzentrifugiert. Die Pellets wurden, wie bei Hitzeschockversuchen (vgl. II.2.10) bei -80°C gelagert.

3. Molekularbiologische Untersuchungen

3.1 Verwendete Lösungen und Puffer

3.1.1 Diethylpyrocarbonat (DEPC)

<u>DEPC-Wasser:</u>	
DEPC	0,1% (v/v)
<hr/>	
H ₂ O _{bidest}	500 ml

Die Lösung wurde über Nacht bei 37°C in einem Schüttelschrank (GFL, Burgwedel) inkubiert, autoklaviert und bis zur Verwendung bei RT aufbewahrt.

3.1.2 TE-Puffer

<u>TE:</u>	
Tris-HCl	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM
<hr/>	
DEPC-Wasser	500 ml

pH 8,0

3.1.3 TBE-Puffer

<u>TBE:</u>	
Tris	90 mM
Borsäure	90 mM
EDTA pH 8,0	2 mM
<hr/>	
DEPC-Wasser	500 ml

pH 8,0

3.1.4 Agarosegel-Auftragspuffer

Auftragspuffer (6x)

Glycerin	50% (v/v)
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylencyanol FF	0,25% (w/v)
EDTA pH 8,0	1 mM

H₂O_{bidest}

Der Auftragspuffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

3.2 Isolierung von Nukleinsäuren

3.2.1 Isolierung humaner RNA aus CaCo-2 Zellen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturmaterial (s. II.2.9.3) wurde das *RNeasy[®] Midi Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Zellen wurden hierfür nach Abnehmen des Mediums und einmaligem Waschen mit DPBS, wie unter II.2.5.1.1.1 beschrieben, abtrypsiniert, in Einzelzellsuspension gebracht und 5 min bei 1800 Upm zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet mit RLT-β-Mercaptoethanol-Puffer (s. Protokoll von Qiagen) resuspendiert. Weitere Schritte erfolgten nach Anleitung des Herstellers.

3.2.2 Isolierung bakterieller RNA aus *C. jejuni*

Zur Gewinnung von RNA wurde *Campylobacter jejuni* in Flüssigkultur, wie unter II.2.5.2.1.2 beschrieben, gezüchtet, 15 min bei 4000 Upm abzentrifugiert und im TE-Puffer (s. II.3.1.2) mit 1 mg/ml Lysozym aufgenommen. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung nach Anleitung des Herstellers (*RNeasy[®] Midi Kit*; Qiagen, Hilden). Um die vorhandene DNA zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau (*RNase-Free DNase Set*, Qiagen, Hilden) gemäß des Qiagen-Protokolls durchgeführt. Die RNA wurde im mitgelieferten RNase-freien Wasser eluiert und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.3 Isolierung bakterieller DNA aus Geflügel-Kotproben

Die Gewinnung der DNA wurde unter Zuhilfenahme eines *QIAamp[®] DNA Stool Mini Kits* für die Isolierung bakterieller DNA aus Stuhlproben, entsprechend der Anleitung des Herstellers, durchgeführt (Qiagen, Hilden). Die DNA wurde anschließend im mitgelieferten AE-Puffer eluiert und bei -20°C aufbewahrt.

3.3 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von RNA wurde spektrofotometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm Wellenlänge bestimmt (Ultrospec 3000; Pharmacia Pfizer, Karlsruhe). Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entsprach 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der RNA konnte aus dem Verhältnis der Absorptionen gemessen bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) ermittelt werden und lag in der Regel zwischen 1,8 und 2,1.

3.4 Gelelektrophorese

Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA wurde anhand der beiden ribosomalen Banden im 1%-igen (w/v) Agarosegel überprüft. Hierfür wurde das Gel aus Agarose und TBE-Puffer (s. II.3.1.3) hergestellt, kurz in der Mikrowelle aufgeköcht, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, für spätere Detektion versetzt und in eine horizontale Gelkammer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) gegossen. Nach dem Abkühlen wurde das Gel horizontal um 90° in der Kammer gedreht und mit TBE-Puffer bedeckt. Die RNA-Proben wurden mit Auftragspuffer (s. II.3.1.4) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 90 Volt. Die anschließende Detektion der Banden wurde auf einem UV-Tisch mit Hilfe eines Gel-Dokumentations-Systems (LTF Labortechnik, Wasserburg/B) vorgenommen.

3.5 Identifizierung von *C. jejuni*-DNA aus Kotproben mittels *nested* PCR

Die *nested*-PCR wurde nach Bang et al. (2002) in Zusammenarbeit mit Dr. Udo Reischl aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Regensburg durchgeführt. Die dafür benötigten *C. jejuni*-spezifischen *Primer* entsprachen denen aus Bang et al. (2002) und wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie modifiziert (persönliche Mitteilung von Dr. Udo Reischl).

3.6 Expressionsanalyse mit Mikroarrays

3.6.1 Humane Mikroarrays

3.6.1.1 Prinzip

Um die veränderte Genexpression humaner intestinaler Epithelzellen nach Kontakt mit *Campylobacter jejuni* zu untersuchen, wurden Expressionsanalysen von infizierten und nicht infizierten Zellen mit DNA-Mikroarrays durchgeführt und miteinander verglichen. Die Analysen wurden als Auftragsarbeit an das, der Universität Regensburg angeschlossene Kompetenzzentrum für Fluoreszenz Bioanalytik (KFB) vergeben und dort

von Dr. Thomas Stempfll durchgeführt. Verwendet wurden GeneChip[®] Arrays (HG-U133 A) der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA), die Sonden für ca. 14500 Gene enthalten. Die Prozessierung der aus dem Probenmaterial isolierten RNA (vgl. II.3.2.3) erfolgte nach dem von Affymetrix vorgegebenen Protokoll und unter Verwendung der empfohlenen Kits (vgl. GeneChip[®] Expression Analysis Manual, rev3, section 2). Hierbei wurde die zelluläre RNA zunächst durch reverse Transkription in einzelsträngige, dann in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese diente anschließend als Vorlage für eine *in vitro*-Transkription zur Synthese biotin-markierter cRNA. Die cRNA wurde fragmentiert und auf dem Chip sequenzspezifisch mit den dort aufgebrauchten DNA-Oligonukleotiden hybridisiert. Die Detektion erfolgte im Anschluss durch die Bindung eines Phycoerythrin-gekoppelten Streptavidin/Streptavidin-Antikörper-Komplexes, dessen Fluoreszenzsignal mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanners gemessen wurde. Die Menge an emittiertem Licht ist der Menge an gebundenen cRNA-Fragmenten proportional.

3.6.1.2 Datenanalyse

Die Array-Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Affymetrix[®] Microarray Suite 5.0 Software (MAS; Affymetrix 2001, Microarray Suite User Guide, Version 5; <http://www.affymetrix.com/support/technical/manuals.affx>). Als Kriterien für die Qualität der Hybridisierungen wurden u.a. die mittlere Signalintensität sowie das Verhältnis der Signalintensitäten von 3'- und 5'-gelegenen Sonden der Kontrollgene β -Aktin und GAPDH überprüft. Weiterhin wurden das Hintergrundsignal (*Background*), entstanden durch unspezifische Bindung oder Autofluoreszenz der Arrayoberfläche, und das "Rauschen" (*Noise*), bedingt durch Unterschiede in der Digitalisierung der Signale durch den Scanner, untersucht. Jede Transkript-Variante wird auf dem Array durch 11 sog. *Probe Pairs* repräsentiert, wobei jedes *Probe Pair* aus einem *perfect match*-Oligonukleotid (PM: 25-mer mit 100%-iger Übereinstimmung mit dem zu testenden Transkript) und einem *mismatch*-Oligonukleotid (MM: 25-mer mit einem Basenaustausch an der zentralen Position 13) besteht. Für die Berechnung der Signalintensität eines *Probe Sets*, d.h. der Summe aller 11 *Probe Pairs*, wurde der MAS 5 Algorithmus verwendet. Hierbei wird für jedes *Probe Pair* ein Differenzwert PM-MM ermittelt und aus den so erhaltenen Werten mit Hilfe eines Tukey-Biweight-Verfahrens ein robuster Mittelwert (*Signal*) generiert (vgl. Affymetrix, GeneChip Expression Analysis, Data Analysis Fundamentals; http://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/data_analysis_fundamentals_manual.pdf). Ein weiterer von MAS 5 errechneter Wert ist die *Signal Log Ratio* (SLR). Sie wird unabhängig

von *Signal* ermittelt und entspricht zahlenmäßig dem Logarithmus (zur Basis 2) des *Fold Change* bei paarweisen Vergleichen. Ein SLR von 1 entspricht damit einer 2-fachen Aktivierung, ein SLR von -1 einer 2-fachen Verringerung der Transkriptmenge gegenüber der jeweiligen Kontrolle. *Probe Sets*, die vom MAS 5-Algorithmus auf beiden Arrays als nicht detektierbar (*absent*, A) oder im paarweisen Vergleich als unverändert (*not changed*, NC) gewertet wurden, wurden genauso wie *Probe Sets*, die eine geringe Signalveränderung ($-1 < \text{SLR} < +1$) zeigten, herausgefiltert.

Insgesamt wurden drei Mikroarray-Analysen durchgeführt. Dennoch lieferten nur die beiden letzten Untersuchungen auswertbare, da miteinander übereinstimmende, Ergebnisse. Im ersten Mikroarray konnten dagegen kaum Veränderungen in der Genexpression detektiert werden.

3.6.2 Bakterielle Mikroarrays

3.6.2.1 Prinzip

Um die veränderte Genregulation von *C. jejuni* nach Einfluss von Stressfaktoren, wie Erniedrigung des pH-Wertes oder Erhöhung der Temperatur, zu untersuchen, wurden *C. jejuni*-spezifische Mikroarrays der Firma MWG (Ebersberg) verwendet. Wie bei humanen Arrays (vgl. II.3.6.1.1), wurde auch hier die Durchführung und Auswertung durch Dr. Thomas Stempfl, KFB Regensburg, vorgenommen. Der *C. jejuni*-spezifische Mikroarray wies 1648 unterschiedliche *Spots* mit 50-mer langen Oligonukleotiden auf. Dies erlaubt die Detektion aller 1633 bekannten *C. jejuni*-Gene (Gesamtsequenz veröffentlicht durch Parkhill et al., 2000). In Vorversuchen wurde zunächst die Optimierung des Protokolls (MWG Array-Application Guide, Rev. April 2004) vorgenommen. Dabei wurden die Ergebnisse einer direkten Fluoreszenz-Markierung von cDNA, in der Cy-3- bzw. Cy-5-dCTP während der reversen Transkription eingebaut wurden, mit denen einer indirekten Markierung, bei welcher der Einbau von Aminoallyl-dUTP mit anschließender chemischer Kopplung von aktivierten Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte, verglichen. Schließlich wurde für alle Mikroarrays das indirekte *Labeling* verwendet. Hierfür wurden 30 - 40 µg Gesamt-RNA mit dem SuperScriptII-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) und unter Verwendung von *Random Primers* (Invitrogen) revers transkribiert. Das aminoallyl-modifizierte dUTP und das unmarkierte dTTP wurden dabei im Verhältnis 6:1 zugegeben. Nach der Aufreinigung der aa-cDNA (Microcon YM-30; Millipore, Schwalbach) erfolgte die Kopplung mit NHS-Cy3 bzw. NHS-Cy5 (*CyDye post-labeling reactive dye pack*; Amersham, Freiburg). Der Entfernung des nicht eingebauten Farbstoffs (*NucleoSpin Extract Kit*; Macherey-Nagel,

Düren) folgte anschließend die fotometrische Messung der Einbauraten. Gleiche Mengen der beiden Reaktionsprodukte wurden kombiniert und im mitgelieferten Hybridisierungspuffer (MWG Biotech, Ebersberg) über Nacht bei 42°C hybridisiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal je 10 min gewaschen, getrocknet und mit Hilfe eines Laser Scanners (Affymetrix 428; Santa Clara, USA) gemessen.

3.6.2.2 Datenanalyse

Die aus MWG-Arrays gewonnenen Bild-Daten wurden mit Imogene Software (Biodiscovery, El Segundo, USA) ausgewertet. Fehlerhafte oder beschädigte Spots wurden von der software-eigenen Qualitätskontrolle entfernt. Anschließend wurden die so erhaltenen Rohdaten einer Reihe von Normalisierungs- und Modifizierungsschritten unterzogen. Dies erfolgte mit Hilfe des internetbasierten Tools SNOMAD (Standardization and Normalization of MicroArray Data; <http://pevsnerlab.kennedykrieger.org/snomadinput.html>). Im Einzelnen wurden folgende Funktionen von SNOMAD ausgeführt:

- Subtraktion des lokalen Hintergrundsignals
- *Loess*- d.h. nicht-lineare, intensitätsabhängige Normalisierung
- Korrektur der intensitätsabhängigen Varianz und Ermittlung des sog. Z-Scores als varianzunabhängiges Maß für die Stärke der Regulation

(für detaillierte Beschreibung der Methode s. Internetseite).

Gene, deren Regulierung im Bereich $-1 < Z\text{-Score} < +1$ lag, wurden bei nachfolgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt.

3.7 Funktionelle Expressionsanalyse

Die Zusammenfassung der unter 3.6.1 identifizierten, humanen Gene in funktionelle Cluster erfolgte mit Hilfe des Internetprogramms EASE (*The Expression Analysis Systematic Explorer*; <http://david.niaid.nih.gov/david/ease.htm>), Version 2.0. Diese Software verwendete für ihre Klassifizierung das *GeneOntology*-System (<http://geneontology.org>).

Die bakteriellen Gene wurden aufgrund ihres, auf die Funktion hinweisenden Namens geordnet.

3.8 RT-PCR

3.8.1 Durchführung

Die Überprüfung der Expression ausgewählter Gene mittels RT-PCR wurde als Auftragsarbeit an das KFB in Regensburg gegeben und dort von Dr. Thomas Stempfll durchgeführt. Hierzu wurden folgende *Primer* verwendet:

Genname	Primername	Sequenz
<i>trpD</i>	A130trpDFwd:	TTT GTG GAA CAG GTG GAG ATG
	A130trpDRev:	CGA TTT CCG TGT TTG GCT AC
<i>trpE</i>	A130trpEFwd:	CGA GCT TGA AGA TTG CGA TCG
	A130trpERev:	AAA CAA TAC CCG CCC CAC TTG
<i>clpB</i>	A130clpBFwd:	CAACGCCGTTTTCAACCTGT
	A130clpBRev:	ACGCTTTGAAAGTTTAGCTGCG
<i>rpoA</i>	A130rpoAFwd:	TGCTTGGCCTTTTGAGATCG
	A130rpoARev:	CGCCATCAATATGAATCGCAG

Die eingesetzte RNA stammte aus Bakterien, die mit einem Stressreiz, wie Hitzeschock oder niedrigen pH-Werten konfrontiert waren (vgl. II.2.10 und II.3.2.2). Bei *trpD* und *trpE* handelte es sich um zwei Gene, welche die Tryptophansynthese kodieren und deren Expression untersucht wurde. Das Hitzeschockgen *clpB* diente als Positivkontrolle, da seine verstärkte Expression bereits mit anderen Methoden nachgewiesen wurde (Thies et al., 1999b). Die Genexpression von *rpoA* ist laut Alain Stintzi (2003) im untersuchten Bereich unabhängig von der Temperatur und eignete sich als Nullkontrolle.

3.8.2 Datenanalyse

Die Darstellung der Regulation der Genexpression erfolgte hier in *Signal Log Ratio* (SLR)-Werten und wurde nicht wie bisher in n-fache Veränderung, sog. *fold change* umgerechnet (vgl. II.3.6.1.2). Das hatte den Vorteil, dass auf diese Weise die Expression des als Nullkontrolle gewählten Gens *rpoA* (vgl. II.3.8.1) gleich Null gesetzt werden konnte und alle anderen Werte in direkter Relation zu diesem Wert ersichtlich waren.

4. Proteinbiochemische Untersuchungen

4.1 Puffer und Lösungen

4.1.1 Denaturierender Lysepuffer

Lysepuffer:

SDS	1% (w/v)
Tris-HCl pH 7,4	50 mM
EDTA pH 8,0	5 mM
Protease-Inhibitor-Cocktail	1 mM

H₂O_{bidest}

Der Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurde bei -80°C gelagert und vor jeder Verwendung frisch zugegeben.

4.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gel

4.1.2.1 Trenngel-Puffer

Der Trenngel-Puffer bestand aus 1,875 M Tris-Lösung, die auf pH 8,8 eingestellt wurde. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

4.1.2.2 Trenngel

10% Trenngel:

H ₂ O _{bidest}	4 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	3,3 ml
Trenngel-Puffer	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
10% APS	0,1 ml
TEMED	4 µl

Alle Komponenten wurden in der oben genannten Reihenfolge zusammen pipettiert. Zum Schluss erfolgte die Zugabe von TEMED, womit der Start der Polymerisationsreaktion ausgelöst wurde.

4.1.2.3 Sammelgel-Puffer

Beim Sammelgel-Puffer handelte es sich um eine 1,25 M Tris-Lösung, deren pH-Wert 6,8 betrug. Dieser Puffer wurde bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

4.1.2.4 Sammelgel5% Sammelgel:

H ₂ O _{bidest}	3,4 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	0,83 ml
Sammelgel-Puffer	0,63 ml
10% SDS	0,05 ml
10% APS	0,05 ml
TEMED	5 µl

Die Herstellung des Sammelgels erfolgte analog zu der des Trenngels (s. II.4.1.2.2).

4.1.3 Tris-Glycin-Elektrophorese-PufferLaufpuffer (5x):

Tris-Base	25 mM
Glycin	250 mM
SDS	0,5% (v/v)

H₂O_{bidest}

Nach der Einstellung des pH-Werts auf 8,3 wurde der Laufpuffer bei RT gelagert.

4.1.4 ProbenauftragspufferAuftragspuffer (5x):

Tris pH 6,8	60 mM
Glycerin	25% (v/v)
SDS	4% (v/v)
β-Mercaptoethanol	715 mM
Bromphenolblau	0,1% (w/v)

H₂O_{bidest}

Der Puffer wurde bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

4.1.5 Ponceau S-LösungPonceau S-Lösung (10x):

Ponceau S	26,3 mM
Trichloressigsäure	1,84 M
Sulfosalicylsäure	1,18 M

H₂O_{bidest}

4.1.6 Coomassie-Färbung

4.1.6.1 Coomassie-Lösung

Coomassie-Lösung:

Brilliant Blue G (Coomassie)	2,5% (w/v)
Methanol	45% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)

H₂O_{bidest}

Die Lösung wurde filtriert und bei RT aufbewahrt.

4.1.6.2 Entfärbelösung für Coomassie-Färbung

Coomassie-Entfärber:

Methanol	30% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)

H₂O_{bidest}

4.2 Protein-Isolierung

Die infizierten CaCo-2 Zellen sowie ihre Negativkontrollen wurden, wie unter II.2.9.4 beschrieben, inkubiert. Die anschließende Protein-Isolierung erfolgte mit Hilfe des *Nuclear Extract Kits* der Firma Active Motif (Rixensart, Belgien). Hierzu wurde der Zell-Monolayer gewaschen, vom Flaschenboden abgeschabt und durch Zentrifugation (5 min, 1200 Upm) pelletiert. Um die zytoplasmatische Fraktion zu erhalten, wurde das Zellpellet im hypotonischen Puffer (im Kit enthalten) inkubiert und nach Anleitung des Herstellers zentrifugiert. Der Überstand, der die zytoplasmatische Proteinfraction beinhaltetete, wurde bei -80°C eingefroren, während das Pellet im *Complete Lysis Buffer* (s. Kit) lysiert wurde. Nach der 30-minütigen Inkubation und der anschließenden Zentrifugation wurde der, die Kernfraktion enthaltende Überstand ebenfalls bei -80°C eingefroren.

4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mittels eines kolorimetrischen Testes bestimmt, bei dem ein wasserlöslicher purpurfarbener Komplex entstand. Dieser Test basierte auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch die Peptidbindungen von Proteinen und der anschließenden Chelatbildung mit Bichinonsäure. Hierfür wurde ein Assay mit 96-well-Mikrotiterplatten (*BC Assay*; Uptima/Interchim, Montlucon Cedex, Frankreich) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die aufgetragene Probenmenge wurde von 25 µl auf 5

µl für Zellkultur-Überstand und 1 µl für die zytoplasmatische und Kern-Fraktion gemäß dem Herstellerprotokoll reduziert. Die Messung der Farbreaktion erfolgte in einem ELISA-Plattenlesegerät (Emax precision microplate reader, Molecular Devices, München) bei 590 nm, die anschließende Auswertung wurde mit dem SOFTmax[®]-Programm (Molecular Devices) durchgeführt.

4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung denaturierter Proteine erfolgte mittels einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit vertikalen Gelen (Laemmli, 1970). Hierzu wurde eine Protean II Elektrophorese-Kammer (Mini Protean II Cell; Bio-Rad, Hercules, USA) mit Glasplatten der Größe 7,3 cm x 10,2 cm (innere Glasplatte) bzw. 8,3 cm x 10,2 cm (äußere Glasplatte) und 0,75 mm Platzhaltern verwendet. Nachdem alle Komponenten gemischt wurden (s. II.4.1.2.2), wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten, bis ca. 2 cm unter den Rand eingefüllt und sofort mit Isobutanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isobutanol abgeschüttet, das Gel mit H₂O_{bidest} gründlich gespült, und anschließend mit Sammelgel überschichtet (s. II.4.1.2.4). Dann wurde der Probenkamm zwischen die Glasplatten für ca. 1 h eingebracht. Nach der Entfernung des Kammes und Spülen der Probenkammern mit H₂O_{bidest} wurde das Gel in die Gelkammer eingespannt und mit dem Laufpuffer vollständig bedeckt. Die Proteinproben wurden mit Auftragspuffer (s. II.4.1.4) versetzt und für 6 min im Wasserbad aufgeköcht. Die anschließende Elektrophorese erfolgte zunächst bei einer Spannung von 115 V bei maximaler Stromstärke, nach Einwandern der Proben in das Trenngel wurde die Spannung auf 140 V erhöht. Der Lauf wurde beendet, wenn der mitgeführte Proteinstandard (10 - 250 kDa, Precision Plus Protein[™] Standards; Bio-Rad, München) eine ausreichende Auftrennung anzeigte. Das Gel konnte anschließend gefärbt oder direkt für den Proteintransfer auf Membranen verwendet werden.

4.5 Färbung von Proteinen

4.5.1 Färbung im Polyacrylamid-Gel

Die Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel wurden mittels Coomassie-Färbung detektiert. Hierfür wurde das Gel in Coomassie-Lösung (s. II.4.1.6.1) gebracht und unter Schwenken auf einem Universalschüttler (WS-10; Edmund Bühler, Hechingen) für ca. 30 min gefärbt. Danach erfolgten mehrere Waschschrte in Entfärbungslösung (s. II.4.1.6.2) bis zum gewünschten Entfärbungsgrad des Hintergrunds. Um die Entfärbung zu beschleunigen

wurde die Lösung bis auf ca. 40 - 45°C in der Mikrowelle (privileg 8017; Quelle, Fürth) erwärmt.

4.5.2 Färbung auf Nitrozellulose (NC)-Membranen

Um auf NC-Membranen transferierte Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden sie ca. 10 min in Ponceau S-Lösung (s. II.4.1.5) geschwenkt und anschließend sofort mit H₂O_{bidest} ausgewaschen. Der Transfererfolg konnte so bei Bedarf auch dokumentiert werden.

5. Immunologische Untersuchungen

5.1 Puffer und Lösungen

Alle folgend aufgeführten Puffer wurden bei 4°C gelagert.

5.1.1 Western Blot

5.1.1.1 Kathodenpuffer

Kathodenpuffer:

1 M Tris pH 9,4	2,5% (v/v)
DL-Norleucin	40 mM

H₂O_{bidest}

5.1.1.2 Anodenpuffer:

Anodenpuffer A:

1 M Tris pH 10,4	2,5% (v/v)
Methanol	20% (v/v)

H₂O_{bidest}

Anodenpuffer B:

1M Tris pH 10,4	30% (v/v)
Methanol	20% (v/v)

H₂O_{bidest}

5.1.1.3 Phosphate buffered Saline (PBS)PBS (10x):

NaCl	1,37 M
KCl	27 mM
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	43 mM
KH ₂ PO ₄	14,7 mM

H₂O_{bidest}

5.1.1.4 T-PBST-PBS:

Tween [®] -20	0,1% (v/v)
------------------------	------------

PBS

5.1.1.5 BlockierungspufferBlockierungspuffer:

Magermilchpulver	3% (w/v)
------------------	----------

T-PBS

5.1.2 ELISAELISA-Blockierungspuffer:

BSA	1% (w/v)
Saccharose	5% (w/v)
Natriumazid	0,05%

PBS

5.1.3 Aktin-Färbung**5.1.3.1 Fixierungslösung**Paraformaldehyd (PFA):

PFA	1% (w/v)
-----	----------

PBS	50 ml
-----	-------

Die entsprechende Menge an PFA wurde abgewogen und in 45 ml, in der Mikrowelle vorgewärmte PBS-Lösung gegeben. Die vollständige Auflösung des PFA erfolgte mittels eines Magnetrührers (IKA-Combimag Ret; IKA[®]-Werke GmbH & CO. KG, Staufen), bei ca. 70°C. Anschließend wurde die Lösung mit PBS bis zum Erreichen des Endvolumens aufgefüllt und bei 4°C aufbewahrt.

5.1.3.2 Permeabilisierungslösung

Triton X-100 0,1% (v/v)

PBS

5.1.3.3 Blockierungspuffer (Färbung)

BSA 1% (w/v)

PBS

5.1.3.4 Waschpuffer

Tween[®]-20 0,05% (v/v)

PBS

5.2 Verwendete Substanzen**5.2.1 primäre Antikörper**

Name	Bezugsquelle	Herkunft	Verdünnung
β-Aktin	Sigma, Steinheim	Kaninchen (<i>rbt</i>)	1: 5000
Anti-TGFβ 1-3	R&D Systems, Wiesbaden	Maus (<i>ms</i>)	1: 500
CD 63	BD PharMingen, Heidelberg	Maus (<i>ms</i>)	1: 1000
c-jun AP1	Calbiochem/ Merck, Darmstadt	Kaninchen (<i>rbt</i>)	1: 20
FosB	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	Ziege (<i>gt</i>)	1: 300
VEGF	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	Kaninchen (<i>rbt</i>)	1: 300

Antikörper gegen oben genannte Moleküle, wie z.B. gegen TGFβ werden im Folgenden als (beispielsweise TGFβ)-Antikörper bezeichnet.

5.2.2 sekundäre Antikörper

Name	Bezugsquelle	Spezifität	Endkonz.
HRP AK	Chemicon, Hofheim	<i>anti gt</i>	1: 5000
HRP AK	Chemicon, Hofheim	<i>anti rbt</i>	1: 15000

5.2.3 Zytokine

Name	Bezugsquelle	Herstellung
TGFβ-2	tebu-bio GmbH, Offenbach	rekombinantes Protein
IFN _γ	Chemicon, Hofheim	rekombinantes Protein

5.3 Western Blot

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen (s. II.4.4) auf eine NC-Membran erfolgte zwischen zwei Graphitplatten der Immunoblot-Transferapparatur (Renner GmbH, Darmstadt) mit Hilfe der "semi-dry"- Blotting Methode. Hierfür wurden auf die untere Platte (Kathode) sechs in Kathodenpuffer (s. II.5.1.1.1) getränkte Filterpapiere (Quickdraw[®] medium thickness; Sigma, Steinheim) und darauf das, vom Sammelgel getrennte SDS-PAGE-Trenngel gelegt. Auf das Gel wurde die NC-Membran (Protran BA85; Schleicher & Schuell, Dassel) gelegt, dann folgten weitere drei Filterpapiere, die ebenso wie die Membran zuvor in Anodenpuffer A (s. II.5.1.1.2) getränkt wurden. Abschließend wurden sechs mit Anodenpuffer B (s. II.5.1.1.2) befeuchtete Filterpapiere aufgelegt. Sowohl die Filterpapiere als auch die NC-Membran waren vorher auf die Größe des Gels zugeschnitten worden. Auf die letzte Lage Filterpapier wurde die obere Graphitplatte (Anode) gelegt. Der anschließende Transfer erfolgte bei konstant $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche.

Nach dem Transfer der Proteine auf die NC-Membran wurde diese für mindestens 1 h in Blockierungspuffer auf einem Universalschüttler (WS-10; Edmund Bühler, Hechingen) sanft geschwenkt, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation für mindestens 2 h bei RT meistens jedoch über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper in Blockierungspuffer (s. II.5.1.1.5). Nach dreimaligem Waschen in T-PBS für 10 min wurde für 1 h bei RT mit sekundärem Antikörper inkubiert und wiederum dreimal mit T-PBS gewaschen. Danach wurde die Membran für wenige Minuten im Dunkeln mit Aktivierungslösungsgemisch (Mischungsverhältnis 1:1, SuperSignal[®] West Pico Luminol Solution; Pierce/Perbio, Bonn) bedeckt. Nach der Entfernung der Lösung wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm ECL; Amersham Biosciences, Freiburg) aufgelegt und je nach gewünschter Bandenintensität, ca. 10 - 15 min exponiert bevor er im M35 X-OMAT *Processor* (Eastman Kodak; Rochester, New York, USA) entwickelt wurde. Im Anschluss konnte die Membran kurz in T-PBS gewaschen und danach für ca. 10 min von gebundenen Antikörpern befreit werden (Re-Blot Plus; Chemicon, Hofheim). Durch einen Blockierungsschritt von mindestens 2 h wurde eine zweite Immunfärbung gegen ein weiteres Antigen ermöglicht. Auf diese Weise konnte beispielsweise die Expression eines Haushaltgens (hier β -Aktin) als Vergleichs-Standard für aufgetragene Konzentration bestimmt werden.

5.4 *Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)*

5.4.1 Verwendete ELISA-Kits

Name	Bezugsquelle
IFN γ	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
IL-12	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
IL-18	Bender MedSystems Diagnostics GmbH, Wien, Österreich
TGF β -1	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
TGF β -2	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
NF κ B	Active Motif, Rixensart, Belgien

5.4.2 Durchführung

In allen durchgeführten ELISA-Untersuchungen wurden die Überstände in Duplikaten gemessen.

5.4.2.1 NF κ B-ELISA

Die Detektion des Transkriptionsfaktors NF κ B erfolgte mittels einer, mit immobilisierten Oligonukleotiden beschichteten 96-*well* Platte. Diese Oligonukleotide trugen die NF κ B-*Consensus*-Sequenz und erlaubten somit eine spezifische Bindung der im Zellextrakt vorhandenen aktiven Form von NF κ B. Primäre Antikörper, die der Detektion dienen, erkennen Epitope auf p50, p52, p65, c-Rel und Rel-B Molekülen jedoch nur, wenn NF κ B aktiviert und an die immobilisierten Oligonukleotide gebunden ist. Die absolute Quantifizierung der detektierten Moleküle konnte nicht vorgenommen werden, da hier, laut Anleitung des Herstellers, lediglich eine Konzentration von 5 μ g/*well* des Raji-Zellextraktes als Positivkontrolle bzw. reines Reagenziengemisch (sog. blank) als Negativkontrolle eingesetzt wurden. Aus diesem Grund erfolgte die Darstellung der relativ gemessenen Konzentrationen der Proben in Einheiten der Optischen Dichte (OD). Um falsch-positive Ergebnisse durch unspezifische Bindung auszuschließen, wurden zusätzliche Kompetitionsversuche durchgeführt. Hierzu wurden die vorbeschichteten Platten zunächst mit wildtyp-(wt) Oligonukleotiden bzw. mit mutierten Oligonukleotiden inkubiert, bevor in jedes *well* der Zellextrakt pipettiert wurde. Bei einer spezifischen Bindung konnten die freien Bindestellen mit wt-Oligonukleotiden so abgedeckt werden, dass keine weitere Bindung des aktiven Transkriptionsfaktors aus dem Zellextrakt mehr möglich war. Somit wurden auch im ELISA-Plattenlesegerät keine Moleküle detektiert

(Negativkontrolle). Bei der Vorbehandlung der *wells* mit nicht an NF κ B-bindenden mutierten Oligonukleotiden vor der Zugabe des Zellextraktes konnte dagegen eine deutliche Reaktion beobachtet werden (Positivkontrolle). Nur bei eindeutigen Ergebnissen aus den Kompetitionsansätzen wurden die Ergebnisse der Zellextrakte alleine, d.h. ohne Vorinkubation der *wells* mit wt- bzw. mutierten Oligonukleotiden gewertet.

5.4.2.2 Weitere ELISA

Für IL-12 ELISA wurden 96-*well*-Mikrotiter-Platten (Nunc, Wiesbaden) nach Anleitung des Herstellers vorbeschichtet. Bei allen anderen ELISA-Kits handelte es sich bei den 96-*well*-Mikrotiter-Platten um bereits vorbeschichtete Platten. Anschließend konnten alle Platten sofort, nach dem mitgelieferten Protokoll verwendet werden.

5.5 Immunhistologische Färbung

Die auf Deckgläsern gewachsenen CaCo-2 Zellen wurden, wie unter II.2.9.1 beschrieben, infiziert und inkubiert. Anschließend wurde der Monolayer zweimal mit vorgewärmten PBS vorsichtig gewaschen und für 15 min bei RT in 1ml PFA (s. II.5.1.3.1) fixiert. Die Aktin-Färbung wurde mit Hilfe des *Actin Cytoskeleton and Focal Adhesion Staining Kits* (Chemicon, Hofheim) durchgeführt. Nach zweimaligem vorsichtigem Waschen des Monolayers mit Waschpuffer (II.5.1.3.4) erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit Triton X-100 (vgl. II.5.1.3.2) für 15 min. Anschließend erfolgte erneutes Waschen und Blockieren der unspezifischen Bindungen für 30 min bei RT im Blockierungspuffer (s. II.5.1.3.3). Nach dreimaligem Waschen je 10 - 15 min wurde das FITC-konjugierte 1:1000 verdünnte Phalloidin zugegeben. Ab diesem Schritt wurde lichtgeschütztes Arbeiten erforderlich. Im Anschluss an die 45 - 50-minütige Inkubation wurden die Zellen dreimal vorsichtig gewaschen, 5 min in 1:500 verdünntem DAPI inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Anschließend erfolgte das Eindecken der Zellen mit je 10 μ l *ProLong*[®] *Antifade* Reagenz (MoBiTec, Göttingen). Abbildungen der Präparate wurden an einem Olympus BX51-Mikroskop (Olympus Biosystems, Planegg) mit angeschlossener Kamera (ColorView; Soft Imaging System, Münster) und unter Verwendung der analySIS-Software (Soft Imaging System) angefertigt.

III. ERGEBNISSE

1. Methodische Vorversuche

In den Vorversuchen sollte ein *Campylobacter jejuni*-Stamm gefunden werden, dessen Adhärenz- und Invasionsfähigkeit deutlich nachweisbar ist. Außerdem sollte der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen des gewählten Bakterienstammes im zeitlichen Verlauf untersucht werden, um die geeignete Infektionszeit und -konzentration als konstante Parameter für weitere Versuche festzulegen. Dieser zeitliche Infektionsverlauf sollte zusätzlich auch morphologisch unter Mikroskop beobachtet werden, um den Zustand der infizierten Zellen optisch zu bestimmen.

1.1 Auswahl eines geeigneten *Campylobacter jejuni*-Isolates

Um den für weitere Untersuchungen geeigneten *C. jejuni*-Stamm zu finden, wurde das Invasionsverhalten der zur Verfügung stehenden Isolate ATCC 33291, 84-25, 84-66, 84-77, 84-100 sowie der beiden Hühner-Isolate 10 und 11 überprüft (s. Abb. 4). Hierzu wurden humane Kolon-Karzinom Zellen der Linie CaCo-2 mit dem jeweiligen Bakterium infiziert und drei Stunden lang inkubiert. Anschließend erfolgte eine 1,5-stündige Behandlung mit 100 µg/ml Gentamicin, was die Abtötung der adhären, extrazellulären Bakterien zufolge hat (vgl. II.2.9.1). Die Isolate 84-25, 84-66, 84-77, 84-100 (freundlicherweise von Prof. Blaser zur Verfügung gestellt) sowie das Isolat 10 zeigten trotz eines guten Wachstums auf Platten, eine deutlich geringere Invasionsfähigkeit in die humanen CaCo-2 Zellen als das Isolat 11 und der Stamm ATCC 33291. Bei einem der Stämme, 84-66, konnte sogar überhaupt keine Invasionsfähigkeit nachgewiesen werden. Das aus Hühnerkot frisch isolierte *C. jejuni*-Isolat 11 invadierte in die CaCo-2 Zellen besser als die oben beschriebenen Stämme. Die beste Invasion zeigte jedoch der *C. jejuni*-Stamm ATCC 33291, so dass alle nachfolgenden Untersuchungen mit diesem Bakterium durchgeführt wurden.

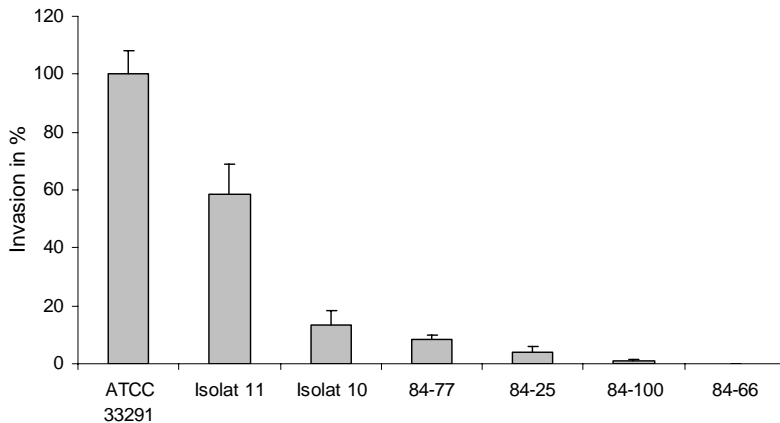


Abb. 4: Darstellung der Invasionsfähigkeit unterschiedlicher *Campylobacter jejuni*-Stämme in die humane CaCo-2 Zelllinie. (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

1.2 Untersuchung des Adhärenz- und Invasionsverhaltens von *C. jejuni*, ATCC 33291

Zur Bestimmung der Adhärenz- und der Invasionsfähigkeit des *C. jejuni* Stammes ATCC 33291 wurden diese Bakterien zunächst drei Stunden mit der CaCo-2 Zelllinie, wie unter II.2.9.1 und II.2.9.2 beschrieben, inkubiert. Die adhärenenten Bakterien konnten sofort im Anschluss an die Inkubation durch Lyse der humanen Zellen in 0,5 ml 0,1% Triton X-100 gewonnen werden, während für die Untersuchung der invadierten Bakterien vor der Zelllyse eine Behandlung der adhärenenten Zellen mit Gentamicin erforderlich war. Für beide Versuche wurden die Mittelwerte von vier unabhängigen Untersuchungsreihen von Zellen der Passagen 7, 10, 26 und 32 zu je drei Ansätzen (Daten nicht gezeigt) als *colony forming units* (cfu) pro ml zusammengefasst und in der Tabelle 1 dargestellt. Bei einer Infektion mit MOI 100 betrug die durchschnittliche Anzahl der adhärenenten Bakterien pro ml etwa 910.000 Zellen (s. Tab.1, Mittelwert), was eine MOI von 2 ergab. Demnach hafteten an jede humane Zelle im Durchschnitt zwei Bakterien an. Bei einer Vergleichsuntersuchung der Invasion zeigte sich, dass nur etwa 1,6% der adhärenenten Bakterien auch wirklich in die Zelle eindringen (vgl. Tab. 1).

Passage:	7	10	26	32	Mittelwert
Adhärenz (cfu/ml)x1000	719 \pm 114	414 \pm 123	532 \pm 82	1.976 \pm 631	910 \pm 721
Invasion (cfu/ml)x1000	13 \pm 1	5 \pm 2	20 \pm 2	21 \pm 9	14 \pm 7
Anteil der adhärenenten Bakterien (cfu), die invadierten in %	1,79	1,15	3,72	1,09	1,62

Tab. 1: Untersuchung der Adhärenz- und Invasionsfähigkeit von *C. jejuni* Stamm ATCC 33291 in humane CaCo-2 Zelllinien der Passagen 7, 10, 26 und 10. Die Anzahl der adhärenierenden bzw. invadiierenden Bakterien wurde als *colony forming units* (cfu) pro ml x1000 dargestellt. Die invadierten Bakterien wurden zusätzlich noch in % der adhärenierenden Bakterien ausgedrückt. (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

1.3 Bestimmung der Infektionskurve

Für die Bestimmung der Infektionskurve, in welcher der zeitliche Verlauf des Absterbens der Zellen nach Infektion dargestellt ist, wurde eine MOI von 2.000, 200, 100 oder 20 eingesetzt. Sowohl eine Erhöhung der Bakterienkonzentration als auch eine Verlängerung der Inkubationszeit mit *C. jejuni* führten zum verstärkten Absterben der infizierten humanen Zellen (s. Abb. 5). Nach etwa 4 h begannen die CaCo-2 Zellen, die mit einer MOI von 2.000 und 200 infiziert wurden, abzusterben, während die CaCo-2 Zellen, infiziert mit MOI's von 100 und 20, weitere 2 h inkubiert werden konnten, ohne dass sich ihre Anzahl deutlich verringerte. Noch deutlichere Unterschiede im Einfluss der MOI auf das Sterben der humanen Zellen wurden 11 h nach Beginn der Infektion beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt wurden bereits 83% der mit MOI 2.000 und 76% der mit MOI 200 infizierten Zellen abgetötet. Auch die mit MOI 100 infizierten Zellen zeigten eine relativ hohe, etwa 60%-ige Sterblichkeit. Lediglich nach Infektion mit einer geringen Bakterienkonzentration (MOI 20) blieben nach 11 h im Vergleich zu den nicht infizierten immer noch 69% der Zellen vital. Nach einer weiteren Inkubation von insgesamt 27 h verringerte sich die Viabilität der CaCo-2 Zellen auf ca. 3% bei MOI 2.000 bzw. etwa 11% bei allen anderen Zellkulturen (Daten nicht gezeigt). Alle nachfolgenden Infektionsversuche wurden deshalb mit einer MOI 100 durchgeführt. Diese Bakterienkonzentration erlaubte einerseits eine längerfristige Durchführung von Versuchen mit lebensfähigen Zellen. Andererseits zeigte sie dennoch einen nachweisbaren Einfluss auf die untersuchten humanen Zellen.

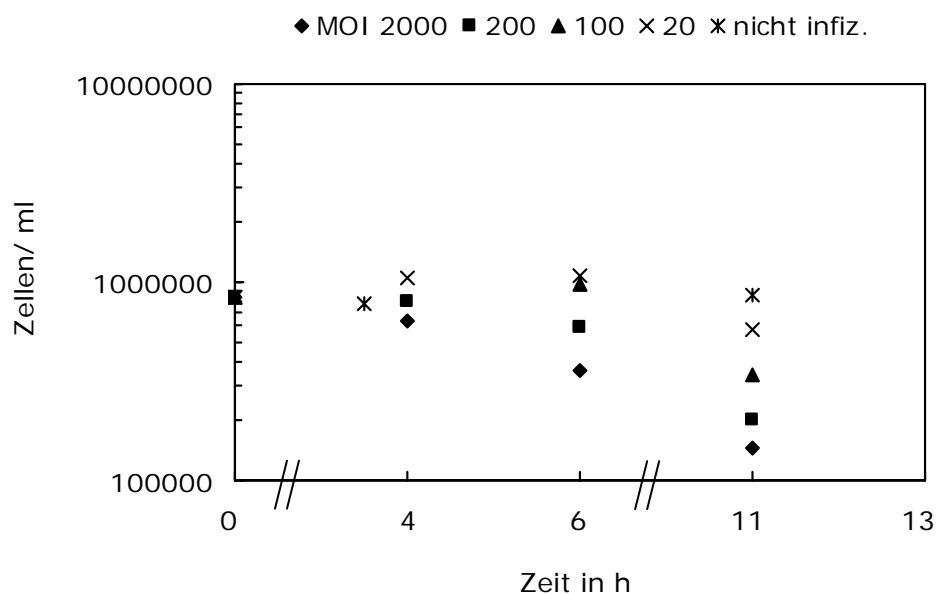


Abb. 5: Infektionskurve von CaCo-2 Zellen, die mit unterschiedlichen *multiplicities of infection* (MOI) des Bakteriums *Campylobacter jejuni* behandelt wurden.

1.4 Untersuchung der Morphologie von infizierten CaCo-2 Zellen

Die mit einer MOI von 100 infizierten CaCo-2 Zellen wurden nach 12 h, 20 h und 36 h unter dem Mikroskop beobachtet und fotografiert (Abb. 6, A-D). Neben der Bestimmung der Lebend-Zellzahlen (vgl. III.1.3) wurde auch der Einfluss von *C. jejuni* auf die Morphologie der Zellen verfolgt. Nach ca. 12 h konnten, im Gegensatz zu den Ergebnissen aus III.1.3 noch keine Veränderungen in der Morphologie der infizierten Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Erst nach ca. 20 h wurde der Unterschied zu den nicht infizierten Zellen (s. Abb. 6 A) sehr deutlich. Die Form der einzelnen Zellen im Monolayer löste sich auf und es konnte nur noch ein amorphes Bild der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet werden (s. Abb. 6 B). Gleichzeitig wurde ein Ablösen des Zellmonolayers sichtbar. Nach 36 h löste sich der Zellmonolayer vom Plattenboden komplett ab und trieb lose im Medium (s. Abb. 6 C und D). Die anschließende Zellfärbung mit Trypanblau (vgl. II.2.6.1) zeigte, dass nahezu alle Zellen zu diesem Zeitpunkt tot waren.

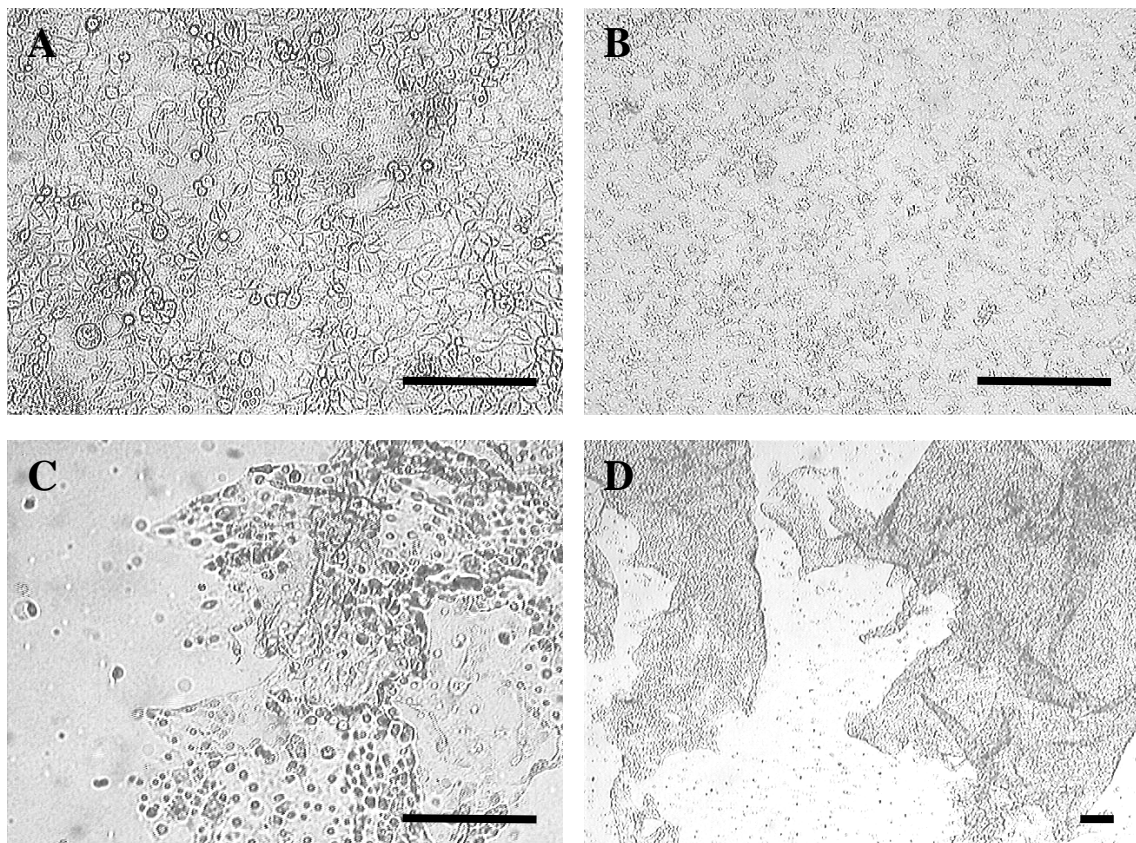


Abb. 6: Phasenkontrast-Aufnahmen der humanen Kolon-Karzinom Zelllinie CaCo-2; **A:** unbehandelte Zellen; **B:** Zellen nach einer 20-stündigen Infektion mit *C. jejuni*; **C:** Zellmonolayer nach 36 h Infektion mit *C. jejuni*; **D:** lose treibender CaCo-2 Zellmonolayer nach 36 h Infektion mit *C. jejuni*; Maßstabsmarke: 1 mm.

2. Untersuchung der veränderten Genregulation nach Kontakt mit *C. jejuni*

Eine Untersuchung der Genregulation von infizierten humanen Zellen im Vergleich zu den nicht infizierten Zellen sollte Hinweise auf die post-infektiösen Veränderungen der intrazellulären Prozesse liefern. Die veränderte Genexpression von CaCo-2 Zellen nach Kontakt mit *C. jejuni* wurde zunächst anhand von Mikroarray-Daten untersucht (s. VIII.1: humane Mikroarrays) und teilweise anschließend mit weiteren molekularbiologischen bzw. biochemischen Methoden analysiert. Die als Kontrolle zusätzlich durchgeführten Infektionsassays zeigten eine mit den nachfolgenden Infektionsversuchen übereinstimmende Adhärenz und Internalisierung (Daten nicht gezeigt).

2.1 Auswertung von Mikroarray-Daten

2.1.1 Allgemeine Übersicht

Die EASE-unterstützte Analyse der Mikroarray-Daten zeigte, dass im Vergleich zur Kontrolle, die durch nicht infizierte Zellen repräsentiert wurde, 66 Gene signifikant, d.h. ≥ 2 -fach hochreguliert und 46 Gene (≤ -2 -fach) herunterreguliert waren. Davon konnte jedoch nur einem Anteil von 80 Genen eine definierte Funktion zugeordnet werden. Die Abbildung 7 gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung und Regulation bestimmter Gencluster.

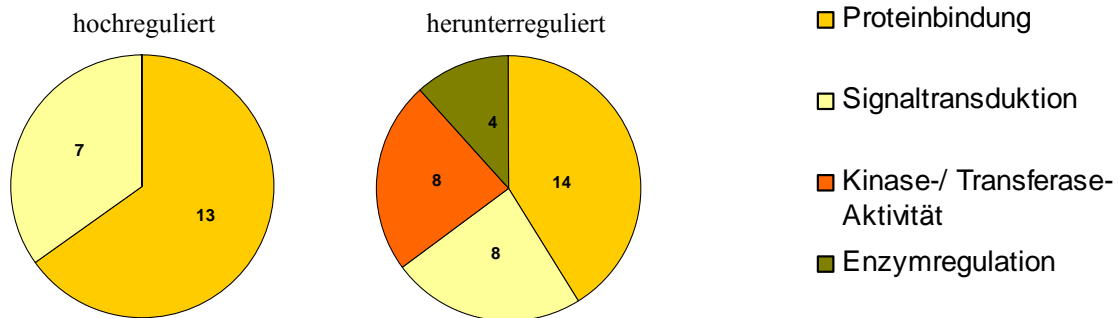
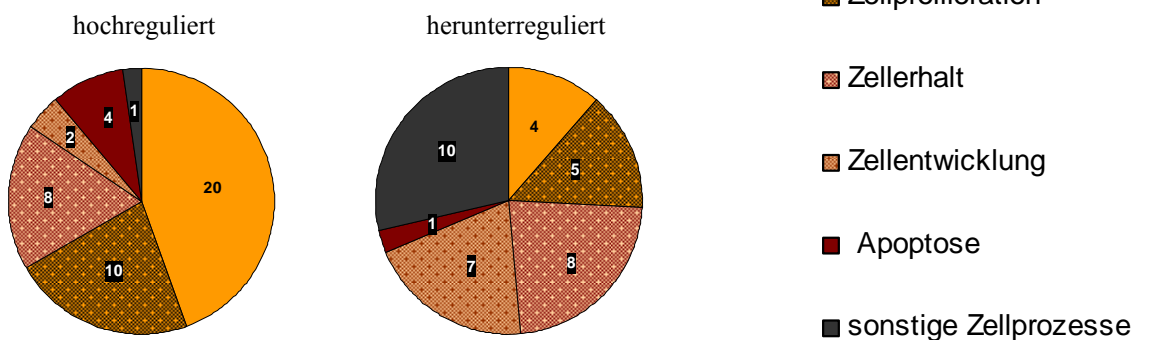
A: Molekulare Funktion**B: Biologische Funktion**

Abb. 7: Darstellung der aus Mikroarray-Ergebnissen erhaltenen, signifikant regulierten Gene, getrennt nach **A:** molekularer bzw. **B:** biologischer Funktion. Gesamtanzahl der untersuchten Gene 80, davon 45 hoch- und 35 herunterreguliert. Zahlen in den Kreissegmenten gaben die Anzahl der jeweils regulierten Gene an.

Mit Hilfe von *GeneOntology* (GO) wurde zunächst eine Anordnung aller regulierten Gene nach Funktion in molekulare und biologische Cluster durchgeführt (vgl. II.3.7; Abb. 7; Gene mit Angabe der Expressionswerte sind unter VIII.1 zusammengefasst). Dabei kann ein Gen sowohl einem Cluster mit molekularer als auch mit biologischer Funktion angehören.

Zu den molekularen Funktionen gehörten zelluläre Prozesse wie Proteinbindung, Signaltransduktion, Enzymaktivitäten von Kinasen und Transferasen sowie die Enzymregulation.

Unter dem Sammelbegriff „Proteinbindung“ wurden Gene zusammengefasst, deren Gene für Rezeptorproteine wie C1QR1 oder FGFR2 kodierten. Auch Wachstumsfaktoren, zu den das IGFBP7 oder der Vertreter der TGF β -Subfamilie NRTN zählten, wurden hierzu eingeordnet. Eine weitere Gruppe, die unter „Proteinbindung“ zusammengefasst war, machten Gene der

Homeobox-Familie aus, mit den Vertretern: *pax7*, *barx2* und *hoxa10*. Die Expression dieser Gene wurde in den durchgeführten Mikroarrays nach Kontakt mit *C. jejuni* herunterreguliert. Alle hochregulierten Gene, deren Genprodukte an Proteinbindung beteiligt waren, gehörten der Klasse der Zytokine bzw. Chemokine an.

Die zweitgrößte Anzahl von Genen konnte unter der molekularen Funktion Signaltransduktion zusammengefasst werden. Auch hier wurden für Rezeptorproteine kodierende Gene gefunden. Sowohl hochregulierte Gene wie *ifngr1*, *gpcr5a*, *gpr109b*, *tnfrsf10b* als auch herunterregulierte Gene wie z.B. *adcyap1r1* waren vertreten. Weitere Genprodukte waren an der Signaltransduktion indirekt, durch Wechselwirkung mit Rezeptorproteinen beteiligt. Hierzu gehört z.B. IL-1RAP, welches einen Komplex mit dem IL-1-Rezeptor bildet.

Die Kinase- und Transferase-Aktivitäten wurden in der dritten Gruppe der molekularen Funktionen zusammengefasst. Die Genexpression aller Vertreter dieser Klasse, zu der u.a. Adenylatkinase *ak1*, BMP2-inducible Kinase *bmp2k* genauso wie die Transferasen *mat1a* und *dnmt3l* zählten, war herunterreguliert.

Auch die Gene der vierten Gruppe: *hapip*, *snx26*, *gm2a* und *cyfip2*, die an der Enzymregulation beteiligt sind, wurden in den Mikroarray-Daten ausschließlich unter den herunterregulierten Genen gefunden. Sie kodieren für Proteine, die durch Protein-Protein-Interaktionen als Kofaktoren von Enzymen agieren.

Gene, die für biologische Funktionen kodieren, wurden in der Abbildung 7 B dargestellt.

Den größten Anteil an biologischen Funktionen der Zelle machten Gene aus, welche für die Immunantwort der Zelle sowie Entzündung kodieren.

Zum zweiten großen Cluster gehörte eine ganze Reihe von Genen, welche die Proliferation, Zellhomöostase sowie die Entwicklung der Zellen beeinflussen. Ihre Zusammengehörigkeit zu einer übergeordneten Gengruppe wird in der Abbildung 7 B durch gepunktete Darstellung der jeweiligen Kreissegmente verdeutlicht.

Die Funktion der fünf apoptose-regulierenden Gene wurde unter dem Sammelbegriff „Apoptose“ zusammengefasst.

Alle drei großen Gengruppen werden anschließend (s. III.2.1.2) genauer erläutert. Weitere Gene mit einer biologischen Funktion, wie z.B. die herunterregulierten Kinasen oder Transferasen oder das einzige hochregulierte Gen *optn* wurden unter sonstigen biologischen Zellprozessen zusammengefasst.

2.1.2 Ausgewählte biologische Genfunktionen

Die anhand von Mikroarray-Ergebnissen detektierte Genregulation wurde, wie in Abb.7 dargestellt, in funktionelle Cluster zusammengefasst. Die darin am häufigsten vertretenen Gene kodierten für die Entzündung, Zellproliferation und -homöostase sowie die Apoptose.

2.1.2.1 Entzündungsregulierende Gene

Die meisten der signifikant regulierten Gene kodieren für die zelluläre Antwort auf biotische Stimuli und somit auch für die daraus resultierende Entzündungsreaktion (vgl. dazu auch 2.1.1). Für genauere Untersuchung wurden alle signifikant regulierten Gene (vgl. auch II.3.6.1.2) in der Abbildung 8 zusammengefasst, die dazugehörigen n-fachen Veränderungen in der Expression befinden sich in der Tabelle 2. Es konnte eine starke, im Durchschnitt siebenfache Regulation von Genen, die an der Immunabwehr gegen Eindringlinge wie Viren, Bakterien oder Parasiten beteiligt sind, beobachtet werden (s. Abb. 8).

Die stärkste Expression zeigte Diubiquitin (*ubd*), dessen Genprodukt neben der Proteolyse und Peptolyse auch eine Rolle bei der Immunantwort auf mikrobielle Infektionen spielt.

Das ebenfalls stark hochregulierte Gen *c3* kodiert für das Komplement-Protein C3, welches das zentrale Molekül des Komplementsystems darstellt.

Auch das Genprodukt C1QR1, dessen Expression im Mikroarray-Versuch die stärkste negative Regulierung zeigte, ist ein Teil des Komplementsystems. Die Herunterregulation seiner Genexpression dürfte mit einer Abschwächung der Phagozytosefunktion verbunden sein (Nepomuceno und Tenner, 1998).

Zu den hochregulierten Zytokinen und Chemokinen, deren Genprodukte eine anti-mikrobielle Wirkung aufweisen, gehörten *ccl20*, *cxcl10*, *il-8*, *il-12A*, *cxcl1*, *ifngr1*, *cxcl2* und *cxcl3*.

Auch die Expression von *socs2* des Gens einer Familie von negativen Regulatoren verschiedener Zytokin- und Signaltransduktionswege wurde nach der Infektion mit *C. jejuni* hochreguliert.

Für ein weiteres hochreguliertes Gen *ptgs2* wurde bereits gezeigt, dass seine Hochregulation u.a. durch Einwirkung von LPS induziert werden konnte (Übersicht in Hwang, 2001).

Bei dem Genprodukt TFF1 handelte es sich um ein stabiles, in der gastrointestinalen Mukosa exprimiertes Protein, welches zum Schutz und zur Stabilisierung der Mukosa sowie zur Heilung des Epithels beitragen kann (Dignass et al., 1994; Kindon et al., 1995).

Des Weiteren wurde eine erhöhte Expression der NFκB-Komponenten *nfkβ2*, *nfkβia* und *relB* sowie der für die Rezeptoren TNFRSF11B und TNFRSF10B kodierenden Gene beobachtet.

Auch die inflammatorischen Gene, die für das Glykoprotein CEACAM5 und den Transkriptionsfaktor COPEB kodieren, zeigten eine erhöhte Genexpression.

Zu den wenigen herunterregulierten Genen gehörten neben dem Transkriptionsfaktor *pax7* noch die für die zytoplasmatische Epoxid-Hydrolase EPHX2 und das zytoplasmatische FMR1-interagierende Protein CYFIP2 kodierenden Gene.

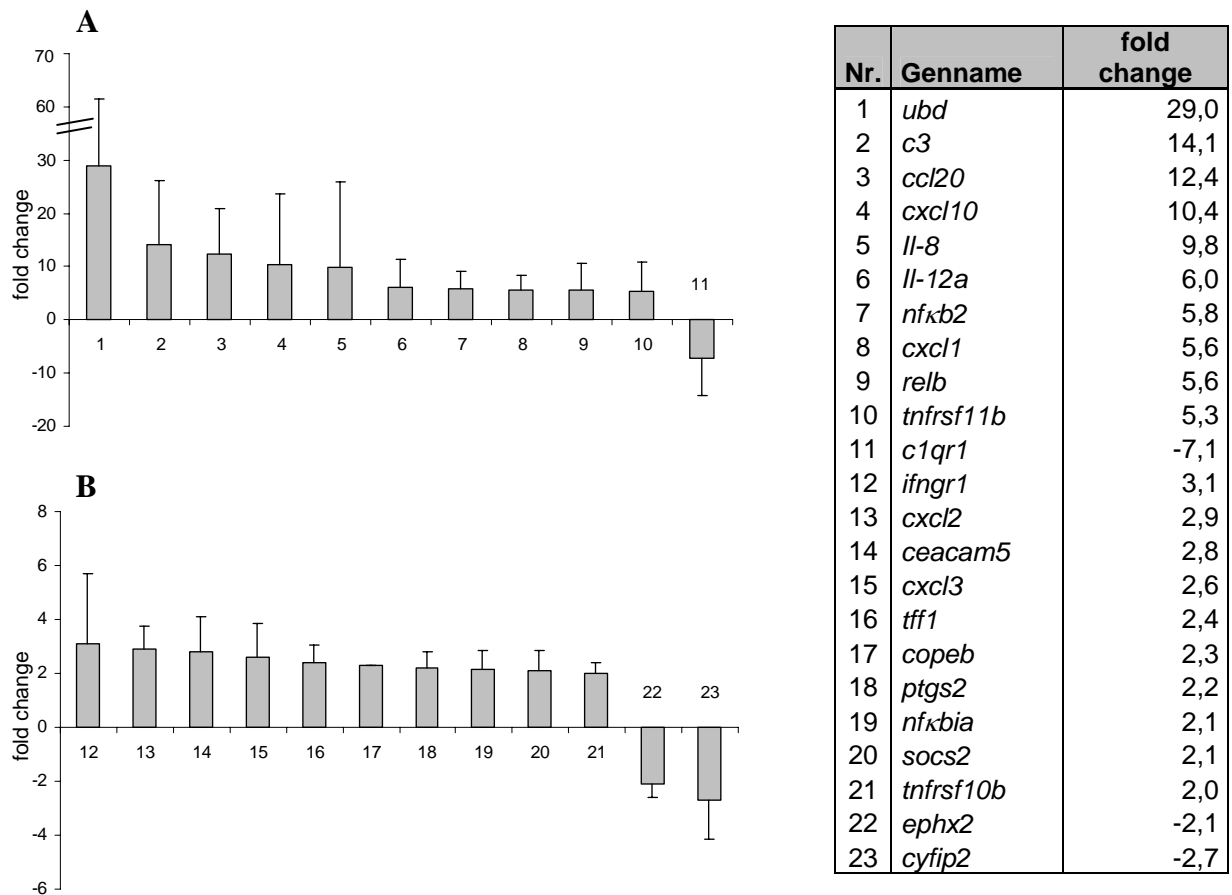


Abb. 8: Grafische Darstellung der aus Array-Daten identifizierten und an der Inflammation beteiligten Gene. Die vertikale Achse stellte die n-fache Expressionsveränderung (*fold change*) von Genen aus infizierten CaCo-2 Zellen im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen dar. **A:** Gene mit $5 < \text{fold change} < -5$ **B:** Gene mit $5 > \text{fold change} > -5$; (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

Tab. 2: Zusammenfassung der aus Mikroarray-Daten erhaltenen Gene, die an inflammatorischen Prozessen in der Zelle beteiligt waren und deren n-fachen Expressionsveränderung (*fold change*).

2.1.2.2 Gene, die Zellproliferation und Tumorentstehung regulieren

Ein großer Teil der in Mikroarray-Untersuchungen signifikant regulierten Gene kodiert für Proliferation, Zellhomöostase und Differenzierung von Zellen (vgl. III.2.1.1 und Abb. 7 B). Diese Gene können durch unkontrollierte Expression die Entstehung und das Wachstum von

Tumoren verursachen. Erst kürzlich ergaben sich erste Hinweise auf den Einfluss von *C. jejuni* auf Tumorbildung (Lecuit et al., 2004; s. auch I.4.3).

Aus den Mikroarray-Daten konnten 43 sowohl hoch- als auch herunterregulierte Gene identifiziert werden, die an der Proliferation und Homöostase von Zellen beteiligt sind (Übersicht siehe Abb. 9 und Tabelle 3).

Für viele dieser Gene wurde eine onkogene Funktion nachgewiesen. Hierzu gehören unter anderem die hochregulierten Transkriptionsfaktoren *atf3*, *jun*, *copeb* sowie die Komponenten des Transkriptionsfaktors NFκB: *relb*, *nfkb2* und *nfkb1a*.

Die Transkriptionsfaktoren *hoxa10* und *pax7* beeinflussen ebenso wie die Wachstumsfaktoren *igfbp7* und *nrtm* die Proliferation und den Zellerhalt durch ihre negative Regulation.

Die Expression des angiogenese-induzierenden Wachstumsfaktors VEGF oder der Vertreter der TGF-Familie *areg* und *tieg* wurde nach bakterieller Infektion hochreguliert.

Die Regulation der für die Rezeptoren kodierenden Gene *tnfrsf11b* und *c1qr1* und des Gens für den Liganden FLT3LG können ebenfalls mit Proliferationsvorgängen assoziiert sein. Neben einer 5,3-fachen Hochregulation von *tnfrsf11b* konnte eine starke negative Regulation der Gene *c1qr1* und *flt3lg* beobachtet werden.

Darüber hinaus wurde eine starke Hochregulierung der für Zytokin- und Chemokin-Aktivität kodierenden *cxcl10*, *il-8*, *il-12a* und *cxcl1* sowie des negativen Regulators verschiedener Zytokin- und Signaltransduktionswege *socs2* identifiziert.

Der Kontakt mit *C. jejuni* initiierte neben der Genexpression der beiden hochregulierten Kinasen HK2 und CLK1 und der herunterregulierten Kinasen AK1 und MAP3K8 auch eine Hochregulation einer ganzen Reihe von Genen weiterer Enzyme, wie der Phosphatase DUSP6, der Translokase TIMM8A und der Synthetase PTGS2. Die Expression der Gene, die für Hydrolase EPHX2 sowie Methyltransferase-like DNMT3L kodieren war herunterreguliert. Weitere Gene, deren Genprodukte einen Einfluss auf das Zell- und Tumorwachstum ausüben, waren die Tumorsuppressor-Gene *rbl2* und *rai3* sowie die Onkogene *lim*, *myc* und ein melanom-assoziiertes Gen *lamp3*. Zu dieser Gruppe gehörten sowohl hoch- als auch herunterregulierte Gentranskripte (s. Tab. 3).

Schließlich wurden noch weitere Gene identifiziert, die an der Proliferation und Homöostase von Zellen beteiligt sein dürften. Hierzu gehören die hochregulierten Gene *rgc32*, *ier3*, *tff1*, *cspg2* sowie die herunterregulierten Gene *fga*, *plxnc1*, *snx26* und *dzip1* (Übersicht siehe Abb. 9 und Tabelle 3).

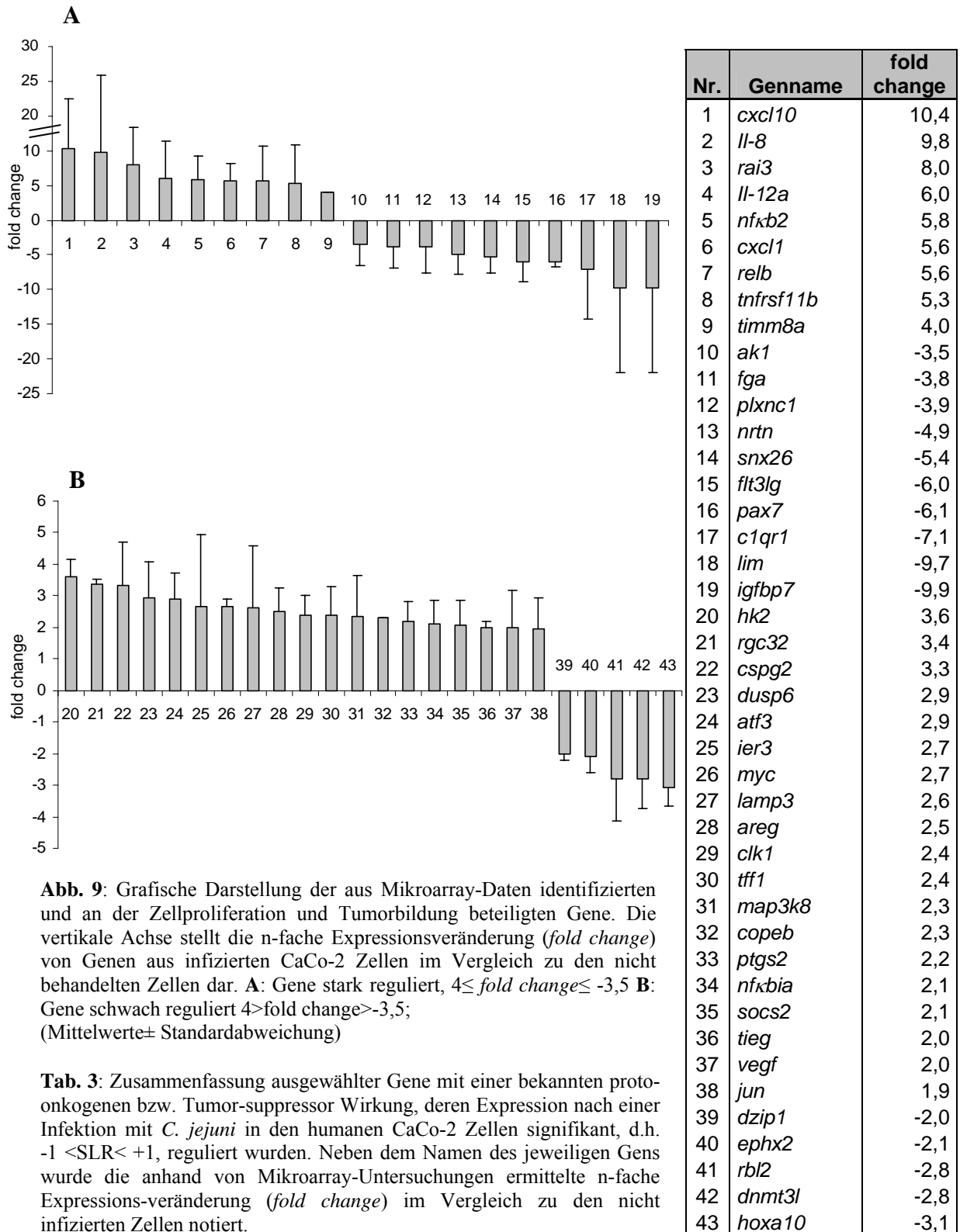


Abb. 9: Grafische Darstellung der aus Mikroarray-Daten identifizierten und an der Zellproliferation und Tumorbildung beteiligten Gene. Die vertikale Achse stellt die n-fache Expressionsveränderung (*fold change*) von Genen aus infizierten CaCo-2 Zellen im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen dar. **A:** Gene stark reguliert, $4 \leq \text{fold change} \leq -3,5$ **B:** Gene schwach reguliert $4 > \text{fold change} > -3,5$; (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

Tab. 3: Zusammenfassung ausgewählter Gene mit einer bekannten proto-onkogenen bzw. Tumor-suppressor Wirkung, deren Expression nach einer Infektion mit *C. jejuni* in den humanen CaCo-2 Zellen signifikant, d.h. $-1 < \text{SLR} < +1$, reguliert wurden. Neben dem Namen des jeweiligen Gens wurde die anhand von Mikroarray-Untersuchungen ermittelte n-fache Expressions-veränderung (*fold change*) im Vergleich zu den nicht infizierten Zellen notiert.

2.1.2.3 Apoptose-regulierende Gene

Aufgrund einiger Literaturhinweise auf die *C. jejuni*-vermittelte Induktion der Apoptose in den intestinalen Epithelzellen (Russell et al., 1993; Zhu et al., 1999; Siegesmund et al., 2004;

III.2.1.1) wurde die Genexpression von CaCo-2 Zellen nach Kontakt mit *C. jejuni* hinsichtlich der Apoptose-Induktion genauer untersucht. Anhand von Mikroarray-Daten wurden jedoch lediglich vier signifikant hochregulierte Gene, die in erster Linie am Apoptose-Signalweg beteiligt sind, identifiziert (vgl. II.3.6.1.2). Neben den Genen *bnip3* und *stk17a*, deren Produkte eine Induktion der Apoptose initiieren, wurden zwei anti-apoptotische Transkripte, *tnfaip3* und *birc3* nachgewiesen. Im Durchschnitt konnte eine 2,7-fache Hochregulation der Genexpression beobachtet werden, was im Vergleich zu der Genexpression der entzündungs- bzw. wachstumsregulierenden Gene relativ gering erscheint (vgl. III.2.1.2.1 und III.2.1.2.2).

In mehreren Studien wurde beobachtet, dass auch das Aktivator-Protein 1 (AP-1), welches ein Heterodimer aus Jun und Fos bildet, in zahlreichen Zelllinien Apoptose induzieren konnte (Ham et al., 1995; Preston et al., 1996; Bossy-Wetzel et al., 1997). Die Mikroarray-Datenanalysen der Genexpression von *jun* und *fos* konnten in unserem Fall jedoch nur eine geringe Hochregulation von 1,94-fach bei *jun* und 1,46-fach bei *fos* zeigen.

2.2 Untersuchung ausgewählter Regulationen auf Proteinebene

Anhand von Mikroarray-Daten wurden alle regulierten Gene nach ihrer Funktion in Clustern zusammengefasst. Dabei kodierten die meisten Gene für drei Funktionen: Entzündung, Proliferation einschließlich Tumorwachstum und Apoptose. Um zu überprüfen, ob diese Regulation ausschließlich auf die molekulare Ebene beschränkt ist oder aber sich bis zu der Proteinregulation fortsetzt, wurde die Konzentration ausgewählter Proteine stellvertretend für die jeweiligen funktionellen Cluster untersucht.

2.2.1 Regulation der Entzündung

2.2.1.1 Untersuchung der Freisetzung von NFκB

Die Kern- und zytoplasmatischen Proteinfractionen von infizierten und nicht infizierten humanen CaCo-2 Zellen wurden in einem ELISA-Test auf ihre Konzentration der Komponenten des NFκB-Komplexes: p50, p52, p65, c-Rel und RelB untersucht. Gleichzeitig wurden eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle zum Ausschließen unspezifischer Proteinbindungen durchgeführt (vgl. II.5.4.2.1). Nur die Bindung der Untereinheiten p50 und p65 des NFκB-Komplexes konnte eindeutig identifiziert werden (s. Abb. 10 A und B). Alle anderen Komponenten wurden gar nicht detektiert oder banden unspezifisch (Daten nicht gezeigt). Die aktiven Untereinheiten von NFκB, p50 (s. Abb. 10 A) und p65 (s. Abb. 10 B) konnten sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma detektiert werden, wobei im Zytoplasma

ein etwas höherer Anteil beider Komponenten zu finden war. In beiden Fällen war jedoch in den Überständen der infizierten Zellen die Konzentration von p50 und p65 um etwa 30% höher als in den Überständen der nicht infizierten Zellen.

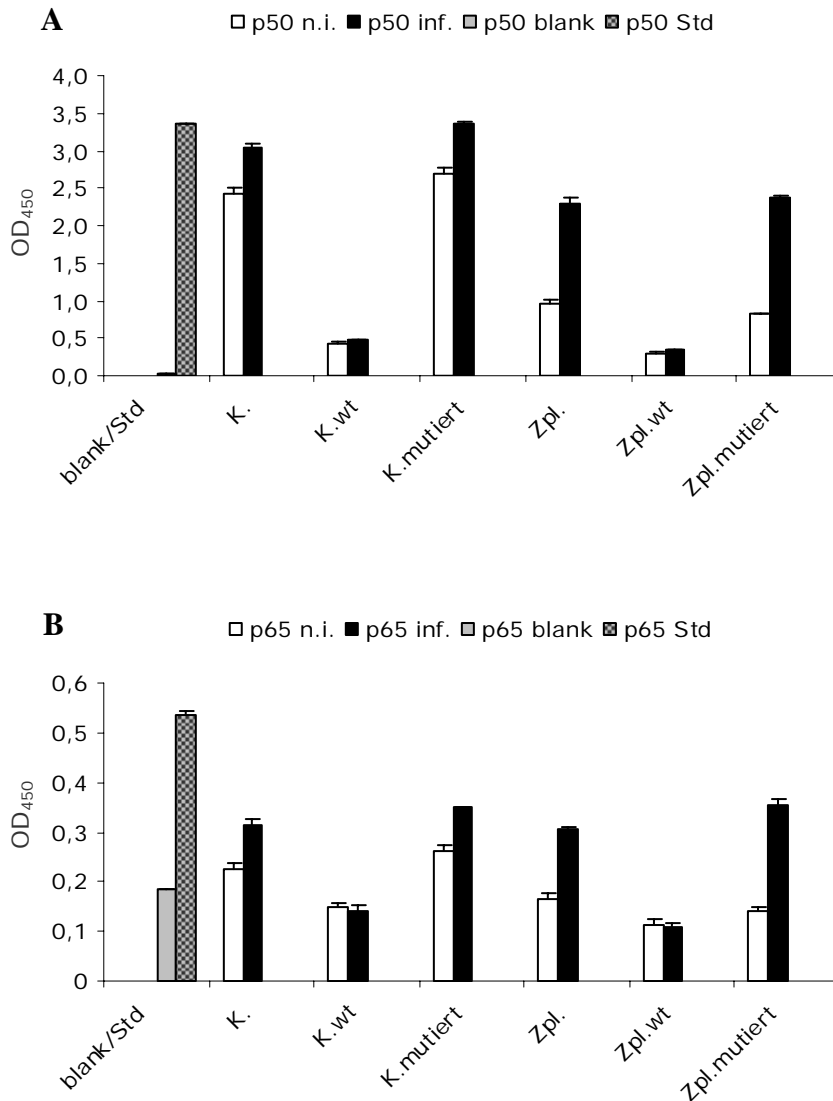


Abb. 10: Einfluss von *C. jejuni* auf die Freisetzung bzw. Aktivierung von NF κ B-Komponenten, gemessen aus den zytoplasmatischen (**Zpl.**) und Kern-Proteinfraktionen (**K.**) von infizierten (**inf.**) und nicht infizierten (**n.i.**) CaCo-2 Zellen; **A:** p50; **B:** p65; **blank:** Nullkontrolle; **Std:** Standard; Messung der Optischen Dichte (OD) von 5 μ g/well des Kernextraktes isoliert aus Raji Zellen als Positivkontrolle; **wt:** vor der Zugabe und Messung der jeweiligen Proteinfraktionen erfolgte eine Behandlung der *wells* mit wildtyp Oligonukleotiden der zu messenden Komponente als Negativkontrolle für die Bindungsspezifität; **mutiert:** Vorbehandlung der *wells* mit mutierten Oligonukleotiden als Positivkontrolle für spezifische Bindung. (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

2.2.1.2 Untersuchung weiterer pro-inflammatorischer Mediatoren

Da die Kolonellen zwar die Freisetzung von Zytokinen induzieren können, jedoch nicht in der Lage sind, alle Zytokine selbst zu produzieren, wurden die Untersuchungen der Zytokinproduktion mit Hilfe von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) durchgeführt.

2.2.1.2.1 Interleukin-12 (IL-12)

Die nach 12 h, 24 h und 48 h Inkubation mit *C. jejuni*, LPS bzw. PBS abgenommenen Überstände von humanen PBMCs wurden auf ihre IL-12 Konzentration untersucht (vgl. II.2.9.4). In drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurde beobachtet, dass die Infektion der PBMCs mit *C. jejuni* zu einer verstärkten Freisetzung von IL-12 führte. Die Behandlung der PBMCs mit LPS zeigte dagegen eine kaum nachweisbare Wirkung (s. Abb. 11). Nach einer 24-stündigen Infektion mit *C. jejuni* stieg die freigesetzte IL-12 Konzentration im Vergleich zu der Menge nach 12 h gering an, während es nach 48 h zu einem leichten Rückgang der Freisetzung kam. Trotz der Schwankungen der gemessenen IL-12 Konzentration in Abhängigkeit von den jeweiligen Blutproben, konnte in allen durchgeführten Versuchen der hier dargestellte zeitliche Verlauf der IL-12 Freisetzung gefunden werden.

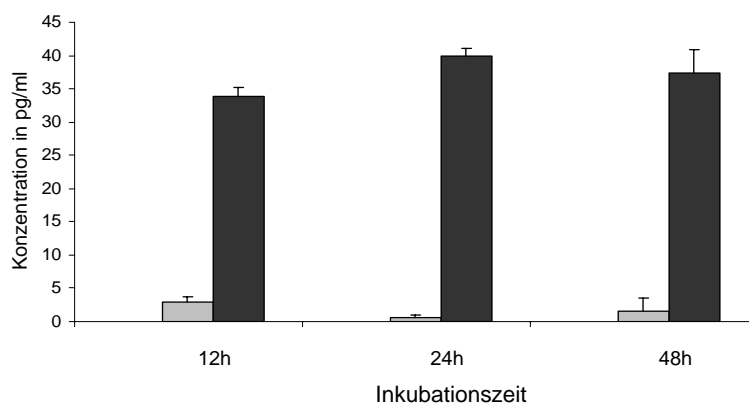


Abb. 11: IL-12 Freisetzung durch PBMCs nach Inkubation mit PBS, LPS oder *C.jejuni*. Nachweisgrenze 7,8 pg/ml (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

2.2.1.2.2 Interleukin-18 (IL-18)

Da es Hinweise auf die IL-18 Freisetzung nicht nur durch PBMCs, sondern auch durch CaCo-2 Zellen gab (Takeuchi et al., 1999; Paulukat et al., 2001; Kalina et al., 2002), wurden die nachfolgenden Versuche parallel mit beiden Zellarten durchgeführt.

Nach einer 12 h, 24 h bzw. 48 - 50 h andauernden Inkubation der PBMCs oder der CaCo-2 Zellen mit *C. jejuni*, LPS und PBS wurden ihre Überstände auf die IL-18 Konzentration untersucht. Bereits nach 12 h konnte eine verstärkte Freisetzung von IL-18 durch PBMCs

nach Kontakt mit *C. jejuni* beobachtet werden, während LPS und PBS keine Wirkung auf diese Zellen zeigten (s. Abb. 12 A). Mit fortschreitender Zeit erhöhte sich die freigesetzte IL-18 Konzentration im Überstand weiter, bis sie nach 48 h auf etwa 200% des nach 12 h freigesetzten IL-18 stieg (s. Abb. 12 A). Auch hier, ähnlich wie bei Untersuchungen der IL-12 Produktion, schwankte die gemessene Konzentration an IL-18, abhängig von der jeweiligen Blutkonserven. Die Tendenz der drei durchgeführten Versuche war jedoch annähernd gleich und wurde in der Abb. 12 A, als Daten eines Versuches, stellvertretend dargestellt.

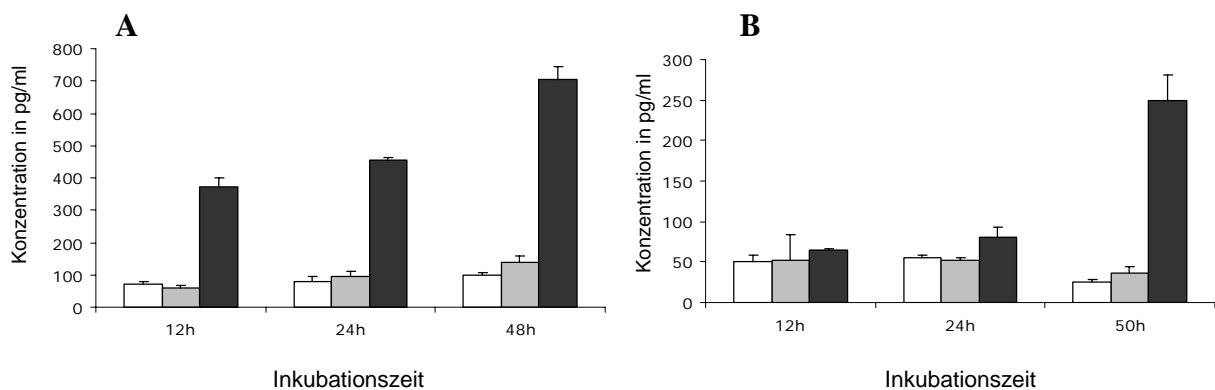


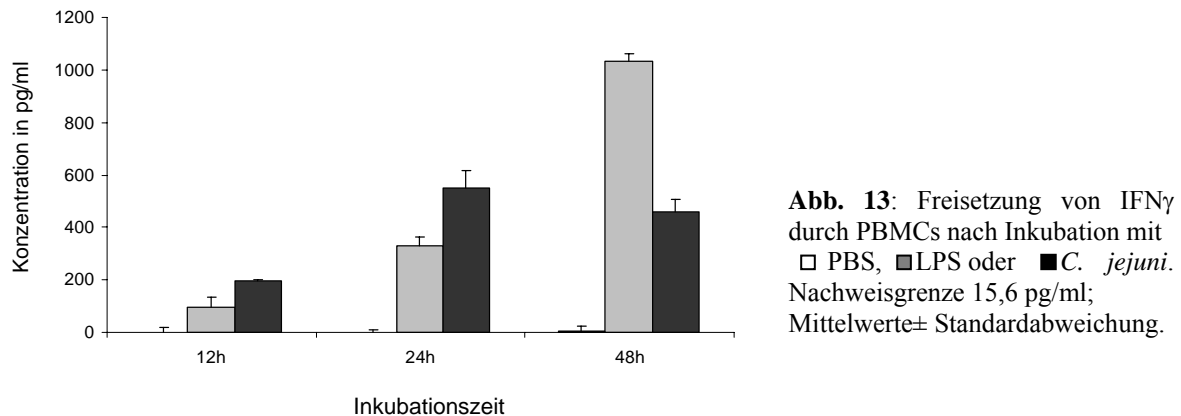
Abb. 12: Freisetzung von IL-18 nach Inkubation mit □ PBS, ■ LPS oder ■ *C. jejuni*; **A:** durch PBMCs; **B:** durch CaCo-2 Zellen. Nachweisgrenze 78,1 pg/ml; Mittelwerte± Standardabweichung.

Die zusätzlich verwendeten CaCo-2 Zellen setzten 12 h nach Kontakt mit *C. jejuni*, im Vergleich zu den PBMCs, sehr geringe Konzentrationen an IL-18 frei (s. Abb. 12 B). Auch nach 24 h stieg die Konzentration an IL-18 im Überstand nur sehr schwach an und unterschied sich von den, mit LPS bzw. PBS behandelten Proben kaum. Erst nach 50 h konnte ein starker Anstieg in der IL-18 Konzentration gemessen werden. Zu diesem Zeitpunkt waren jedoch die CaCo-2 Zellen bereits vom Plattenboden abgelöst und trieben als Teile des Monolayers lose im Überstand (vergleiche dazu auch die Ergebnisse von III.1.3 und III.1.4). Dieser IL-18 Anstieg ist also nicht direkt auf die Induktion durch *C. jejuni*, sondern auf das Absterben der humanen Zellen zurückzuführen.

2.2.1.2.3 Interferon gamma (IFN γ)

Überstände von PBMCs, die nach einer 12 h, 24 h bzw. 48 h dauernden Inkubation mit *C. jejuni*, LPS oder PBS als Negativkontrolle abgenommen wurden, wurden in einem weiteren Versuch auf die IFN γ -Konzentration hin untersucht. Es konnte hier beobachtet werden, dass bereits nach 12 h Inkubation mit *C. jejuni* etwa 200 pg/ml an IFN γ sezerniert

wurden, im Gegensatz zu den PBS-behandelten Zellen, bei denen kein IFN γ im Überstand nachweisbar war (s. Abb. 13). In den ersten 24 h Inkubation mit *C. jejuni* kam es zu einem rascheren IFN γ -Anstieg als nach Inkubation mit LPS. Die starke stimulatorische Wirkung von *C. jejuni* klang 48 h nach Beginn der Infektion wieder ab (vgl. Abb. 13). Im Gegensatz dazu kam es zu diesem Zeitpunkt in den, mit LPS-behandelten PBMCs zu einem weiteren Anstieg an IFN γ (s. Abb. 13).



2.2.2 Regulation des apoptose-regulierenden Komplexes AP-1

Da in Mikroarray-Untersuchungen die Expression der beiden für Komponenten des pro-apoptotischen Transkriptionskomplexes AP-1 kodierenden Gene *jun* und *fos* nach Infektion mit *C. jejuni* sehr schwach hochreguliert war (s. III.2.1.2.3), wurde hier zusätzlich ihre Regulation auf Proteinebene überprüft (s. Abb. 14). Mittels Western-Blot konnte eine erhöhte Expression von *jun* in infizierten Zellen lediglich in der Zytoplasmafraktion detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde eine deutlich verstärkte Expression von *fos* nach der Infektion mit *C. jejuni* in der Zellkern-Fraktion beobachtet. Während dessen kam es in der zytoplasmatischen Proteinfraction der infizierten Zellen zu einer Abnahme von Fos.

Da Fos-Proteine jedoch nur mit Mitgliedern der Jun-Familie heterodimerisieren können, um transkriptionell aktive Komplexe zu bilden (Angel und Karin, 1991), deutet die Abwesenheit der Jun-Proteine im Zellkern darauf hin, dass dort kein aktiver pro-apoptotischer Transkriptionskomplex (AP-1) vorhanden ist.

Proteinfraktionen aus

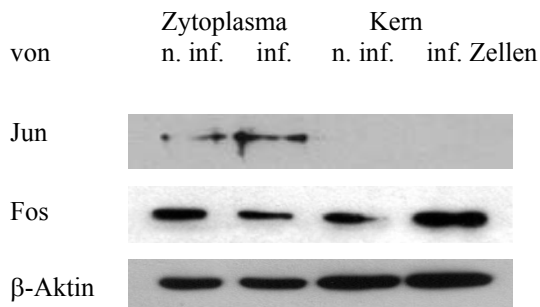


Abb. 14: Western-Blot-Untersuchungen der zytoplasmatischen und der Kern-Proteinfraktionen aus infizierten (**inf.**) sowie nicht infizierten (**n.inf.**) CaCo-2 Zellen auf ihre Expression der *jun*- und *fos*-Gene. Die Expression des Haushaltgens β -aktin wurde hier als Kontrolle für die Konzentration aufgetragen.

2.2.3 Regulation der Proliferation und der Tumorentstehung

2.2.3.1 Untersuchung der Regulation von VEGF

Die Veränderungen in der Expression eines der wichtigsten Faktoren der Angiogenese, des Genproduktes VEGF, nach Kontakt mit *C. jejuni* wurden mittels eines Western-Blots untersucht. Die VEGF-Expression zeigte die Anwesenheit von mindestens drei verschiedenen Isoformen (Chavand et al., 2001). Eine aus den Array-Daten vorgegebene, zweifache Hochregulierung der Expression nach bakterieller Infektion konnte jedoch auf der Proteinebene nicht bestätigt werden (s. Abb. 15).

Proteinfraktionen aus

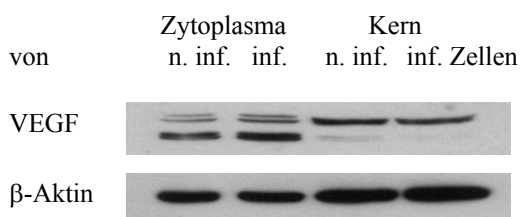


Abb. 15: Western-Blot-Untersuchungen der zytoplasmatischen und der Kern-Proteinfraktionen aus infizierten (**inf.**) sowie nicht infizierten (**n.inf.**) CaCo-2 Zellen auf ihre Expression von VEGF. Die Expression des Haushaltgens β -aktin wurde hier als Kontrolle für die Konzentration aufgetragen.

2.2.3.2 Untersuchung des Einflusses von LAMP3 auf bakterielle Invasion

Außer seiner Rolle in der Tumorentstehung ist das im Mikroarray 2,6-fach hochregulierte LAMP3-Genprodukt am lysosomalen Transport beteiligt. Da vermutet wird, dass *Campylobacter* auf lysosomalen Wege in humane Zellen transportiert werden könnte, ist es möglich, dass dieser Vorgang die Interaktion mit LAMP3 erfordert. Um den Einfluss eines anti-LAMP3 Antikörpers (anti-CD63) auf die bakterielle Invasion bzw. auf das Überleben der Bakterien innerhalb der Zelle zu untersuchen (vgl. auch II.5.2.1), wurden humane CaCo-2

Zellen eine Stunde mit 0,5 µg/ml des Antikörpers vorinkubiert, bevor sie 3 h mit *C. jejuni* infiziert wurden (genauer s. II.2.9.1). Anschließend erfolgte die Untersuchung der Adhärenz und der Anwesenheit von *Campylobacter jejuni* in humanen Zellen (vgl. II.2.9.1 und II.2.9.2). Ein Einfluss von anti-CD63 auf die Adhärenz konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Internalisierung bzw. die Überlebensrate von *C. jejuni* in CaCo-2 Zellen stieg dagegen nach der Zugabe des CD63-Antikörpers um etwa 30 % an (s. Abb. 16).

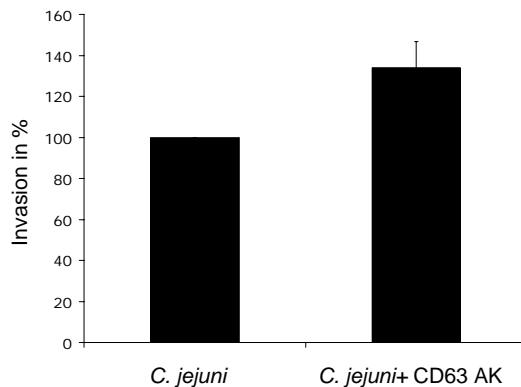


Abb. 16: Veränderungen in der Internalisierung von *C. jejuni* in die humanen CaCo-2 Zellen nach einstündiger Vorbehandlung mit 0,5 µg/ml des CD63-Antikörpers. (Mittelwerte± Standardabweichung)

3. Untersuchung der anti-inflammatorischen Regulation

In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass *C. jejuni* die Expression NFκB-induzierter pro-inflammatorischer Gene sowie die Proteinexpression inflammatorischer Moleküle, wie IL-12, IL-18 und IFNγ aktiviert. Von diesen Beobachtungen ausgehend, sollte die Rolle des anti-inflammatorischen Zytokins TGFβ auf das intrazelluläre Gleichgewicht der infizierten intestinalen Epithelzellen untersucht werden.

3.1 Untersuchung der Sekretion von TGFβ

Um den Einfluss von *C. jejuni* auf die TGFβ-Produktion zu überprüfen, wurde dieses, im Überstand von infizierten und nicht infizierten humanen intestinalen Epithelzellen befindliche Zytokin aktiviert und auf ihre TGFβ-1 und TGFβ-2 Konzentration mittels ELISA-Verfahrens untersucht. Es wurde beobachtet, dass Überstände aus infizierten Zellen eine etwa 10-fach höhere Konzentration an TGFβ-1 aufweisen. Dies war unabhängig davon, ob eine Zelllinie (s. Abb. 17 A) oder primäre intestinale Epithelzellen (s. Abb. 17 B) infiziert wurden. Der große Unterschied zwischen den detektierten TGFβ-Konzentrationen lässt sich durch die unterschiedliche Zellzahl erklären. Die Infektion wurde nämlich zum einen mit 5×10^5 CaCo-2 Zellen und zum anderen mit etwa 2×10^2 primärer IEC pro well durchgeführt.

TGF β -2 konnte mittels des spezifischen TGF β -2 ELISA nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

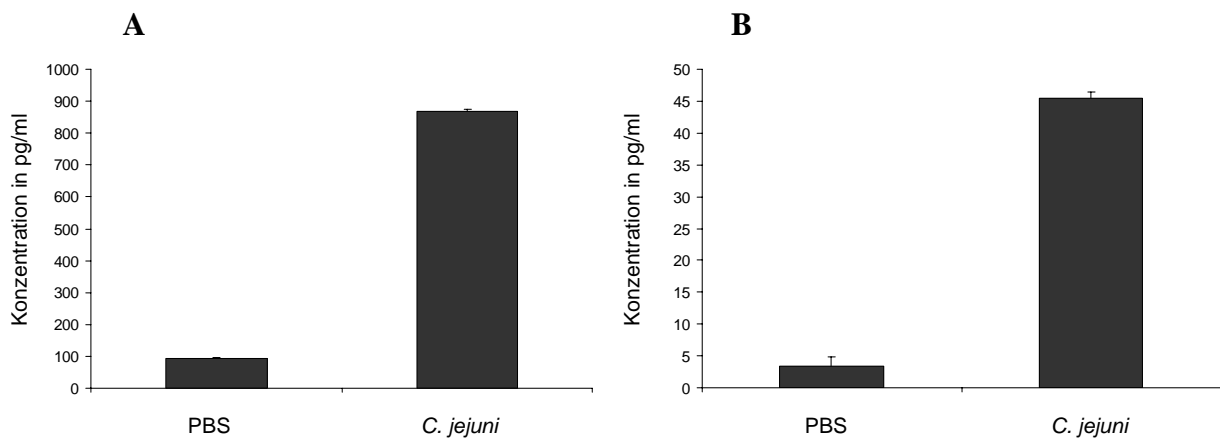


Abb. 17: Freisetzung von TGF β -1, gemessen aus dem Überstand **A:** einer CaCo-2 Zelllinie; **B:** von primären intestinalen Epithelzellen. Nachweisgrenze 31,2 pg/ml; Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.2 Einfluss von TGF β auf die Invasion von *C. jejuni*

Die Produktion von TGF β durch intestinale Epithelzellen nach Infektion mit *C. jejuni* weist auf eine Induktion der anti-inflammatorischen Wirkung hin. Um zu überprüfen, ob TGF β auch einen direkten Einfluss auf die bakterielle Adhärenz und/oder Internalisierung hat, wurden die nachfolgenden Versuche durchgeführt.

3.2.1 Einfluss von TGF β -1 und TGF β -2 auf Invasion von *C. jejuni*

In einem Vorversuch wurde zunächst der Einfluss von TGF β -1 sowie TGF β -2 auf eine bakterielle Invasion untersucht. Hierzu erfolgte die Optimierung der erforderlichen TGF β -Konzentration (s. Abb. 18) und anschließend der Vorinkubationszeit (s. Abb. 19). Wie aus der Abbildung 18 A und B ersichtlich, führte die eingesetzte TGF β -Konzentration von 20 ng/ml zu der effektivsten Invasion von *C. jejuni* und wurde für alle nachfolgenden Versuche beibehalten. Die Wirkung von TGF β -1 auf die Invasion von *C. jejuni* in humanen CaCo-2 Zellen ist sehr ähnlich der von TGF β -2 (vgl. Abb. 18 A und B; weitere Daten nicht gezeigt). Alle nachfolgenden Versuche wurden ausschließlich mit dem TGF β -2 Molekül durchgeführt.

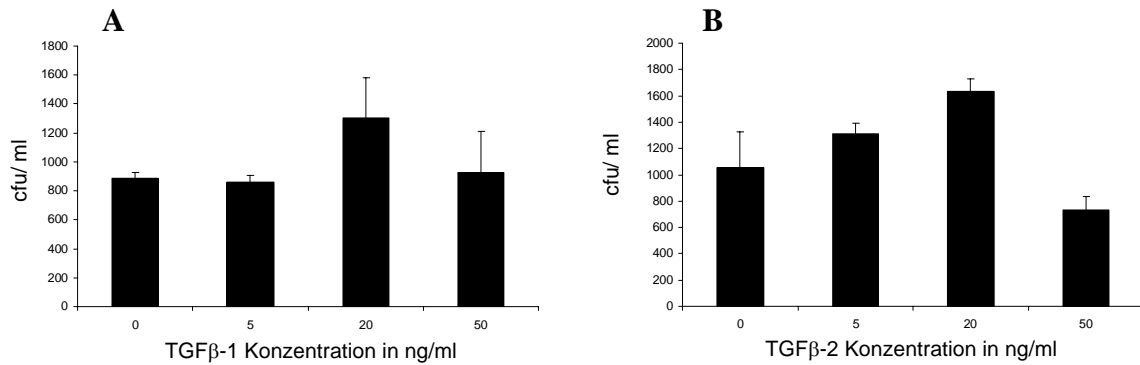


Abb. 18: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von **A:** TGFβ-1 und **B:** TGFβ-2 auf die Invasion von *C. jejuni* in die CaCo-2 Zellen. Messung im Triplikate; Mittelwerte± Standardabweichung

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss von TGFβ auf die Invasion nach unterschiedlich langen Vorinkubationszeiten der CaCo-2 Zellen mit TGFβ untersucht. Der stärkste Einfluss von TGFβ auf die Invasion wurde erzielt, wenn die Zugabe von TGFβ zwischen 30 min vor bis 30 min nach der Infektion der Zellen mit *C. jejuni* erfolgte (s. Abb. 19). In allen nachfolgenden Versuchen wurden die humanen Zellen wenige Minuten vor der Zugabe von *C. jejuni* mit TGFβ versetzt.

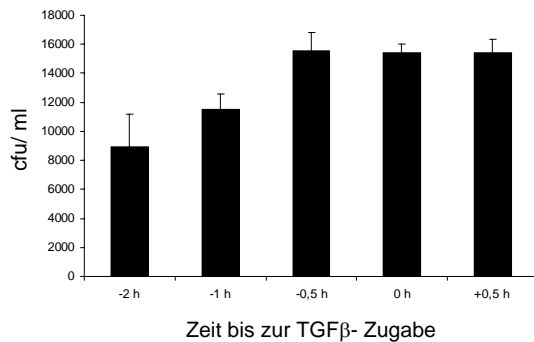


Abb. 19: Untersuchung des Einflusses von Vorinkubationsdauer der CaCo-2 Zellen mit TGFβ auf die Invasion von *C. jejuni*. (Mittelwerte± Standardabweichung)

3.2.2 Einfluss von TGFβ sowie eines Antikörpers gegen TGFβ auf die Invasion von *C. jejuni*

Der Einfluss von TGFβ sowie eines Antikörpers gegen TGFβ (im Folgenden TGFβ-Antikörpers) auf das Adhärenz- und Invasionsverhalten von *C. jejuni* wurde zusätzlich in Abhängigkeit vom Alter der verwendeten CaCo-2 Zellen untersucht. Hierfür wurden relativ junge Zellen der Teilung 7 mit Zellen aus den Versuchen III.3.1.1, die bereits 35-mal passagiert wurden, verglichen.

Die Adhärenz von *C. jejuni* an die humanen Zellen wurde in diesen Versuchen, unabhängig vom Alter der Zellen, von TGF β nicht beeinflusst. Auch die Zugabe von bis zu 10 $\mu\text{g/ml}$ des TGF β -Antikörpers führte nicht zu einer reproduzierbaren Beeinflussung der Adhärenz (Daten nicht gezeigt).

Bei der Untersuchung der Invasion zeigte sich, dass diese durch TGF β in Abhängigkeit vom Alter der Zellen beeinflusst wurde. Während TGF β die *C. jejuni*-Invasion der 7-mal passagierten Zellen beinahe nicht modulierte (s. Abb. 20 A), erhöhte sich die Invasion der mit TGF β -behandelten Zellen der Passage 35 in etwa um das Vierfache (s. Abb. 20 B). Während für Zellen der siebten Passage erst ab einer TGF β -Antikörper Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ eine Verminderung der *C. jejuni*-Invasion nachweisbar war (s. Abb. 20 A), ließ sich die Invasion der Zellen der 35-ten Passage bereits mit TGF β -Antikörper Konzentrationen um etwa 1 ng/ml erheblich vermindern. Eine Behandlung der CaCo-2 Zellen sowohl mit TGF β als auch mit dem TGF β -Antikörper führte zur Hemmung der Invasion in Zellen der älteren Passage 35 im Vergleich zu den Zellen, die nur mit TGF β behandelt wurden (s. Abb. 20 B). Diese Wirkung konnte in den Zellen der Teilung 7 nicht beobachtet werden (s. Abb. 20 A). Da der Einfluss von TGF β auf Zellen der Passagen 30 - 35 am stärksten nachweisbar war, wurden für alle nachfolgenden Versuche Zellen dieser Passagen verwendet.

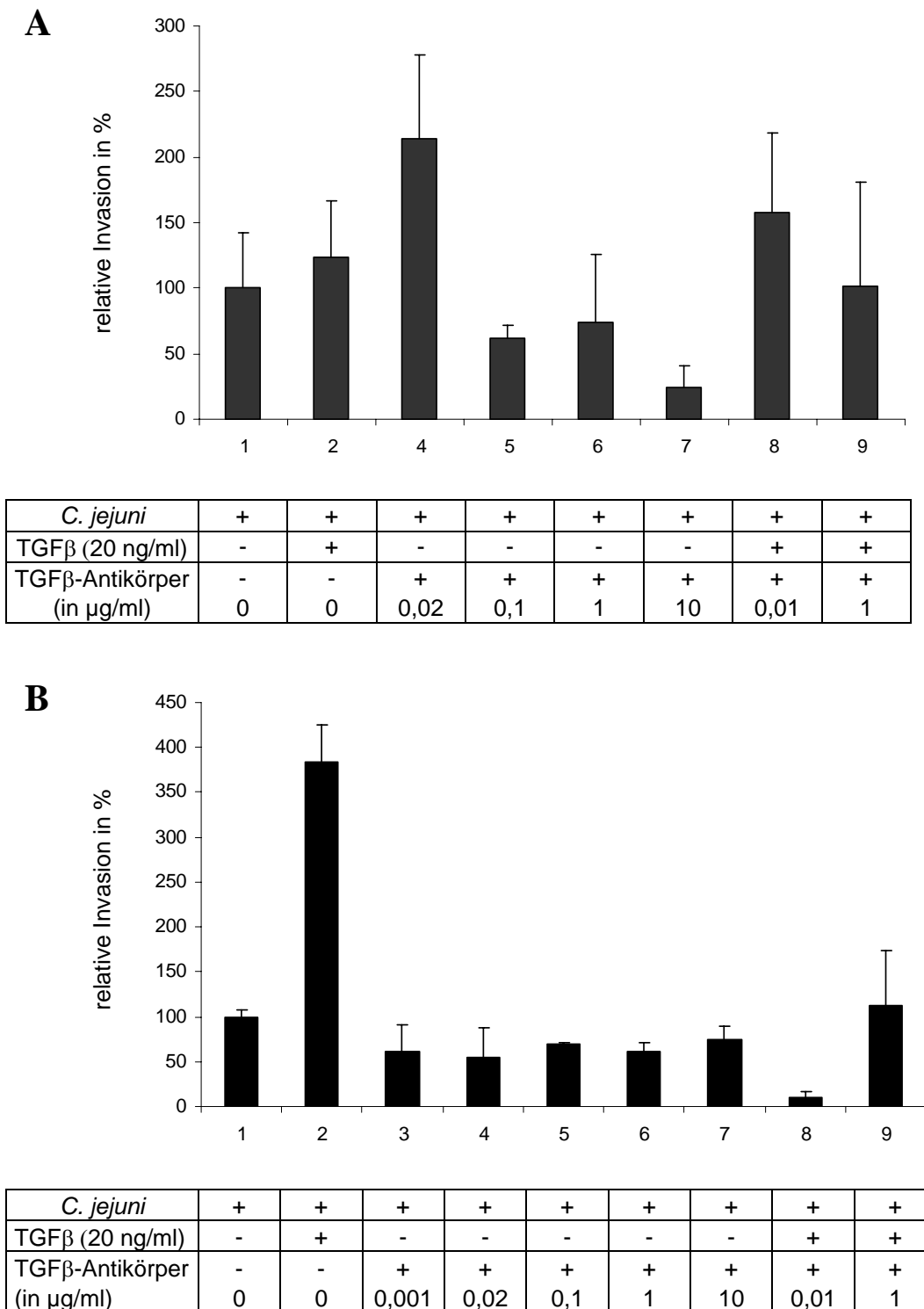


Abb. 20: Einfluss von TGFβ sowie des TGFβ-Antikörpers auf die Invasion der CaCo-2 Zellen durch *C. jejuni*. **A:** Zellen der Passage 7; **B:** Zellen der Passage 35; Invasion von *C. jejuni* **1:** allein; **2:** mit 20 ng/ml TGFβ; **3:** mit 1 ng/ml des TGFβ-Antikörpers; **4:** mit 20 ng/ml des TGFβ-Antikörpers; **5:** mit 100 ng/ml des TGFβ-Antikörpers; **6:** mit 1 µg/ml des TGFβ-Antikörpers; **7:** mit 10 µg/ml des TGFβ-Antikörpers; **8:** mit 10 ng/ml des TGFβ-Antikörpers und 20 ng/ml TGFβ; **9:** mit 1 µg/ml des TGFβ-Antikörpers und 20 ng/ml TGFβ. (Mittelwerte± Standardabweichung)

3.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Einflusses von *C. jejuni* sowie von TGF β auf das Zytoskelett

Da vermutet wird, dass *C. jejuni* bei seiner Internalisierung in humane Zellen die Komponenten des Zytoskeletts, insbesondere das Aktin nutzt, wurde dieses angefärbt, um die möglichen *C. jejuni*-assoziierten Veränderungen aufzuzeigen. Die Färbung von Aktinfilamenten der CaCo-2 Zellen erfolgte durch fluoreszenzgekoppeltes Phalloidin (s. II.5.5), welches eine hohe Affinität zum Aktin zeigt und dadurch feste Komplexe damit eingeht. Da auch TGF β auf die Bildung der Aktinfilamente wirkt, wurde der Einfluss von *C. jejuni* und/oder TGF β auf die Aktinfilament-Anordnung untersucht (s. Abb. 21). Die anschließende Färbung mit dem kernspezifischen DAPI-Farbstoff erlaubt die Identifizierung der humanen Zellkerne sowie der Bakterien (Färbung nicht gezeigt). Anhand der Darstellung dieser Zellkerne konnte man auf den Zustand der Zellen schließen, so dass bereits lysierte Zellen nicht untersucht wurden. Die unbehandelten CaCo-2 Zellen zeichneten sich durch relativ symmetrisch geordnete Aktinfilamente aus, die durch die Kopplung von Phalloidin an einen roten Farbstoff sichtbar gemacht wurden (s. Abb. 21 A). Nach Infektion mit *C. jejuni* löste sich diese Ordnung zunehmend auf. Die Form der Zellen blieb zwar erhalten, das Innere nahm jedoch eine mehr oder weniger amorphe Gestalt an (s. Abb. 21 B und vergleiche III.1.2). Die Behandlung der CaCo-2 Zellen mit TGF β allein zeigte, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (vgl. Abb. 21 A) eine verstärkte Bildung des Aktinskeletts in diesen Zellen (s. Abb. 21 C). Nach Inkubation mit *C. jejuni* und Behandlung mit TGF β wurde ein Aktinfilament-Muster beobachtet, das dem nach der Infektion mit *C. jejuni* allein ähnelte (s. Abb. 21 D).

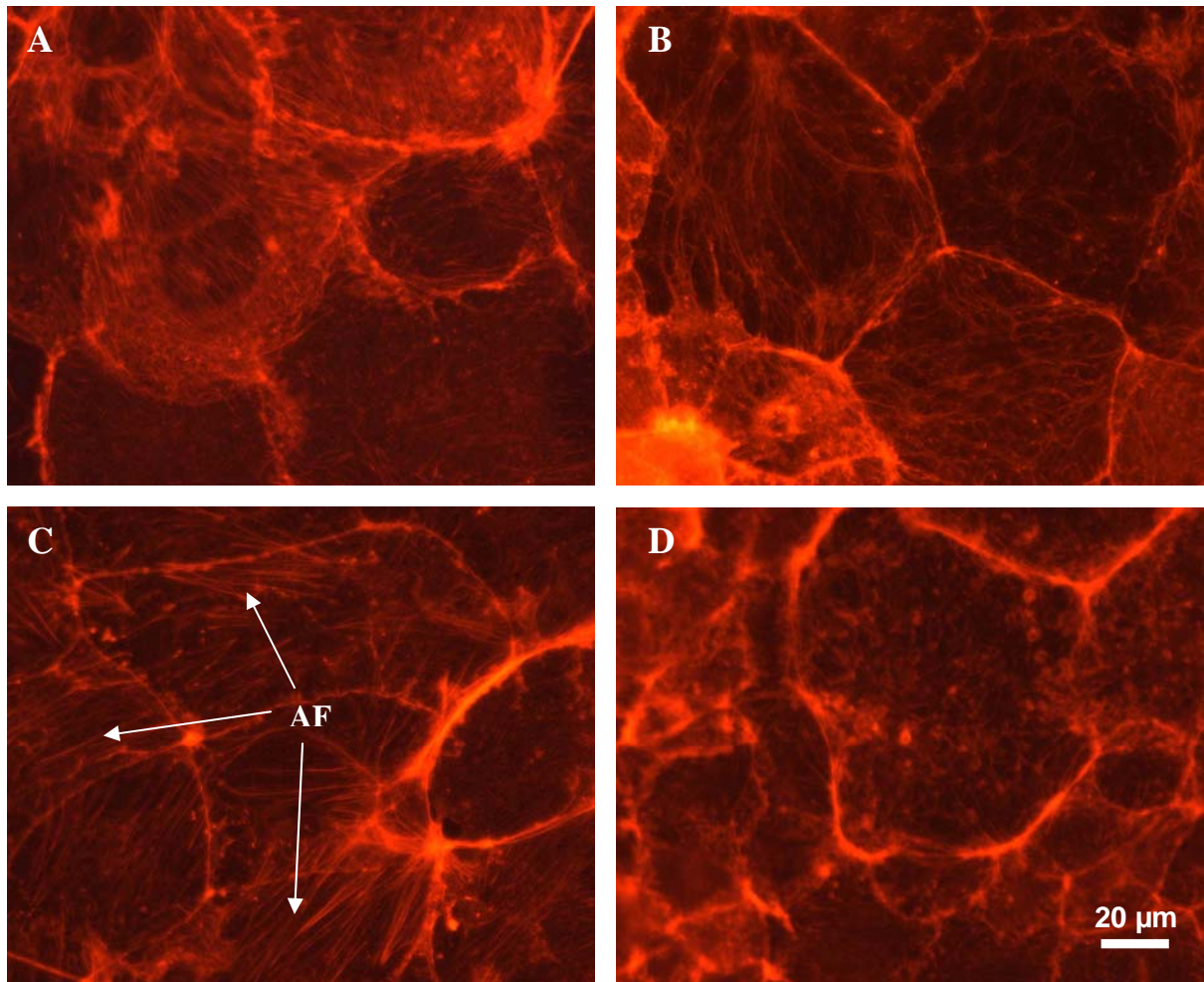


Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CaCo-2 Zellen, deren Aktinfilamente mit FITC-konjugiertem Phalloidin angefärbt wurden. **A:** Zellen unbehandelt; **B:** Zellen infiziert mit *C. jejuni*; **C:** Zellen nach Zugabe von TGFβ; **D:** Zellen nach Zugabe von TGFβ und *C. jejuni*; Die Aktinfilamente (AF) sind mit Pfeilen markiert; Maßstabsmarke: 20 μm.

3.3 Einfluss von TGFβ auf Invasion weiterer Bakterien im Vergleich zur Invasion von *C. jejuni*

Nach der Bestimmung der induzierenden Rolle von TGFβ auf die *C. jejuni*-Invasion (s. III.3.2.2) sollte in einem weiteren Versuch untersucht werden, ob dieser Einfluss auch bei anderen Bakterien nachweisbar ist. In Abbildung 22 wurde der Einfluss von TGFβ auf Invasion von vier verschiedenen Bakterienarten dargestellt. Neben *Campylobacter jejuni* wurden die invasiven Bakterien *Shigella flexneri* und *Vibrio parahaemolyticus* sowie der als nicht invasiv-geltender *Campylobacter*-verwandte *Helicobacter pylori* verwendet. Ähnlich wie bei *C. jejuni* konnte nach Behandlung der CaCo-2 Zellen mit TGFβ auch bei *S. flexneri*

eine verstärkte Invasion beobachtet werden, während sich das Bakterium *Vibrio parahaemolyticus* wie der nicht-invasive *H. pylori* verhielt und eine relativ geringe Erhöhung der Invasion nach Zugabe von TGF β zeigte (Abb. 22).

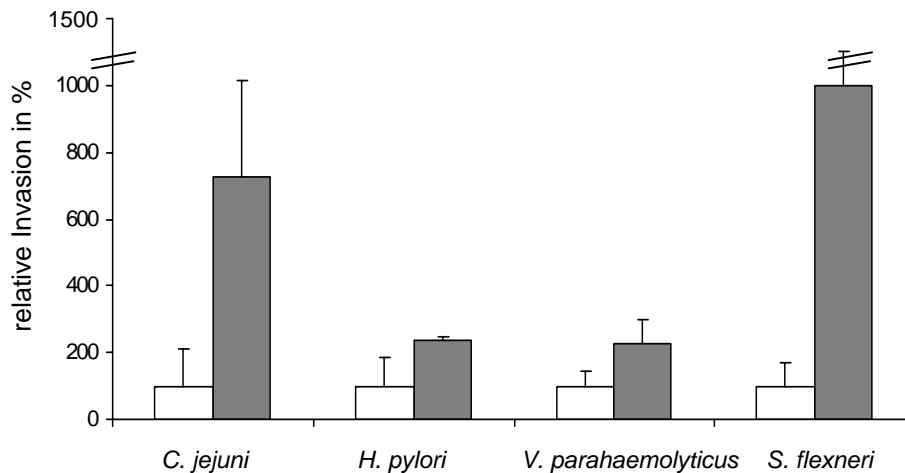


Abb. 22: Einfluss von TGF β auf Invasion unterschiedlicher Bakterien in CaCo-2 Zellen □ Invasion von Bakterien, gesetzt zu 100%; ■ Invasion von Bakterien nach zusätzlicher Behandlung der Zellen mit TGF β . (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

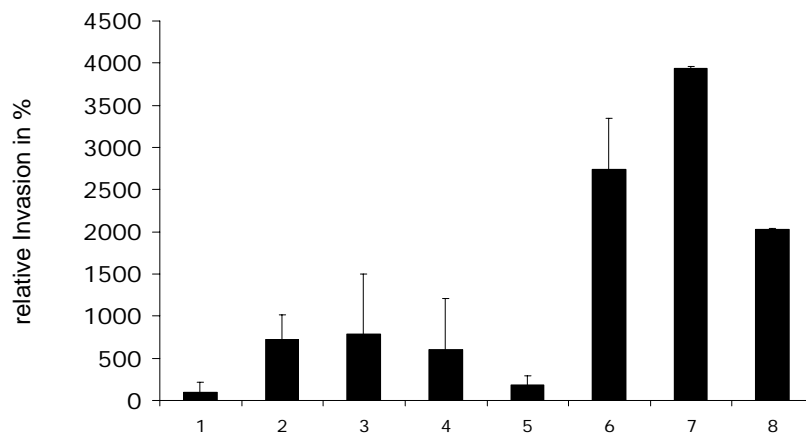
3.4 Einfluss weiterer Modulatoren

Der TGF β -induzierte Signalweg kann durch unterschiedliche Modulatoren beeinflusst werden. Hierzu gehören unter anderem der Kerntransportinhibitor Leptomycin B (LMB) sowie der Inhibitor der Histondeacetylase Trichostatin A (TSA), deren Zugabe eine Verstärkung des TGF β -Signalweges initiiert.

3.4.1 Einfluss auf die Invasion von *C. jejuni*

Da TGF β die bakterielle Invasion induziert (s. III.3.2.2 und III.3.3), gilt es zu untersuchen, ob die Modulatoren des TGF β -Signalweges LMB und TSA ebenfalls diese Induktion beeinflussen können. Nach einer 2,5 h andauernden Vorinkubation der humanen CaCo-2 Zellen mit 20 nM LMB erhöhte sich die Invasion von Bakterien, während LMB alleine keine Wirkung auf die Invasion zeigte (s. Abb. 23). Auch TSA, welches 2 h vor der Infektion in Konzentration von 3,3 nM zugegeben wurde, konnte die bakterielle Invasion etwa so stark wie die Behandlung mit TGF β beeinflussen. Die zusätzliche Zugabe von TGF β verstärkte jedoch die Invasion nicht weiter (s. Abb. 23). Dennoch erzielte eine Kombinationsbehandlung

der CaCo-2 Zellen mit LMB und TSA die höchste Verstärkung der Invasion, die durch eine zusätzliche TGF β -Behandlung nicht mehr weiter erhöht werden konnte (s. Abb. 23).



<i>C. jejuni</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
TGF β (20 ng/ml)	-	+	+	-	-	+	-	+
TSA (3,3 nM)	-	-	+	+	-	-	+	+
LMB (20 nM)	-	-	-	-	+	+	+	+

Abb. 23: Einfluss weiterer Modulatoren des TGF β -Signalweges auf die Invasion der CaCo-2 Zellen durch *C. jejuni*. **1:** allein; **2:** mit 20 ng/ml TGF β ; **3:** mit 20 ng/ml TGF β und 3,3 nM TSA; **4:** mit 3,3 nM TSA; **5:** mit 20 nM LMB; **6:** mit 20 ng/ml TGF β und 20 nM LMB; **7:** mit 3,3 nM TSA und 20 nM LMB; **8:** mit 20 ng/ml TGF β , 3,3 nM TSA und 20 nM LMB. (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

3.4.2 Einfluss von LMB auf Invasion unterschiedlicher Bakterien

Die Vorbehandlung der CaCo-2 Zellen mit LMB führte bei Zugabe von TGF β während der Infektion zu einer Verstärkung der Invasion von *C. jejuni* (s. Abb. 24 A). Die Invasion aller übrigen untersuchten Bakterien wurde durch diese Behandlung gehemmt (s. Abb. 24 A und B).

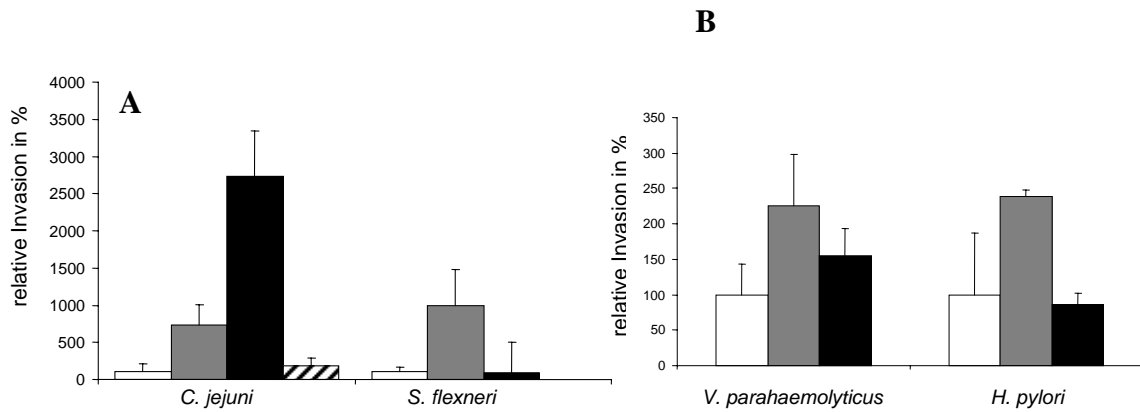


Abb. 24: Einfluss von TGFβ, LMB sowie einer Kombinationsbehandlung der beiden Moleküle auf die Invasion der CaCo-2 Zellen durch unterschiedliche Bakterien; **A:** *C. jejuni* und *S. flexneri* **B:** *V. parahaemolyticus* und *H. pylori*. □ Invasion unbehandelter Zellen ■ Invasion nach Behandlung mit TGFβ ■ Invasion nach Behandlung mit TGFβ und LMB ▨ Invasion nach Behandlung mit LMB (Mittelwerte± Standardabweichung)

3.4.3 Einfluss auf Invasion weiterer Bakterien im Vergleich zu der Invasion von *C. jejuni*

Da die stärkste Invasionszunahme von *C. jejuni* durch die Behandlung der Zellen mit TSA und LMB erreicht werden konnte, wurde auch die Invasion weiterer Bakterien (vgl. III.3.2) daraufhin untersucht. Diese Untersuchung zeigte, dass auch die Invasion von *S. flexneri* durch die Vorinkubation mit LMB und TSA gesteigert werden konnte. Die Invasion von *V. parahaemolyticus* wurde dagegen genauso wie die von *H. pylori* durch diese Vorbehandlung kaum beeinflusst (s. Abb. 25).

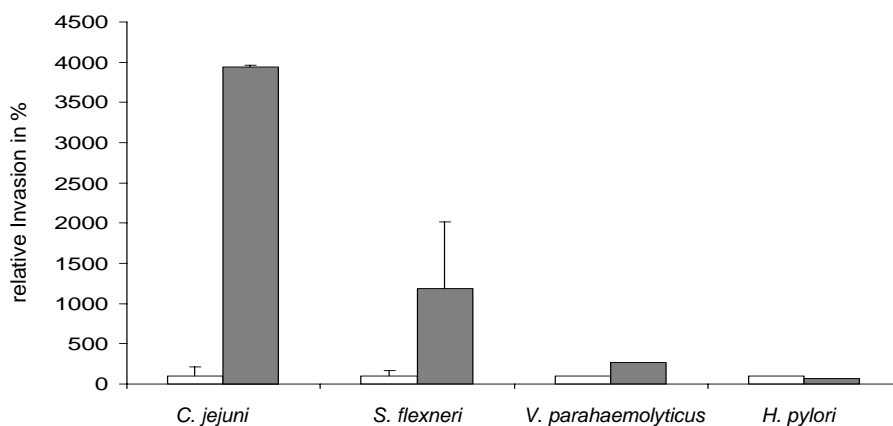


Abb. 25: Einfluss der CaCo-2 Zellbehandlung mit LMB und TSA auf die Invasion unterschiedlicher Bakterien: *C. jejuni*, *S. flexneri*, *V. parahaemolyticus* und *H. pylori*. □ unbehandelte Zellen: ■ mit LMB und TSA behandelte Zellen. (Mittelwerte± Standardabweichung)

4. Untersuchung der veränderten Genexpression von *C. jejuni* nach Induktion von Stress

Von der Untersuchung der veränderten Genexpression von *C. jejuni* nach Kontakt mit humanen intestinalen Epithelzellen erwarteten wir die Identifizierung möglicher Pathogenitätsfaktoren oder Mechanismen, die an den Bakterien-Wirt-Interaktionen, insbesondere an der Entstehung und Beeinflussung entzündlicher Mechanismen beteiligt waren. Wegen der geringen Anzahl von internalisierten Bakterien (vgl. III.1.2) konnte die Untersuchung des Stresseinflusses, den die humanen Zellen in Bakterien induzieren, nicht durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurden andere Stressfaktoren gewählt, nämlich Hitzeschock und das Absenken des pH-Wertes im Medium. Da die Einwirkung von pH-Stress relativ großen Schwankungen unterlag, erfolgten die Stress-Untersuchungen überwiegend mit Bakterien, die erhöhten Temperaturen von 48°C ausgesetzt waren. Um den Einfluss von Hitzestress auf die bakterielle Genexpression zu untersuchen, wurden Mikroarray-Datenanalysen durchgeführt. Lediglich die Expression ausgewählter Gene mittels RT-PCR wurde zusätzlich auch nach Einfluss niedriger pH-Werte analysiert.

4.1 Auswertung bakterieller Mikroarray-Daten

Mit Hilfe der Mikroarray-Datenanalyse konnten 51 *C. jejuni*-Gene identifiziert werden, die im Vergleich zur Kontrolle signifikant, d.h. mit einem Z-Score (s. II.3.6.2.2) ≥ 1 hoch-, und 49 Gene mit dem Z-Score ≤ -1 herunterreguliert waren (s. VIII.2: bakterielle Mikroarrays). Sie wurden nach ihren Funktionen in Genclustern zusammengefasst. Hierzu gehörten Gene, die für Proteine mit enzymatischen, ribosomalen, putativ periplasmatischen oder hypothetischen Funktionen kodieren. Außerdem fanden sich in dieser Gruppe Gene, die für bekannte Hitzeschock-, Bindungs-, Transport-, Membran- und Transmembranproteine sowie die am Tryptophan-Signalweg beteiligten Genprodukte kodieren (s. Abb. 26). Weitere Gene, die für unterschiedliche Produkte, wie z.B. für einen putativen Zwei-Komponenten Regulator oder ein kleines hydrophobes Protein kodieren, wurden in der Abbildung als sonstige Funktionen dargestellt.

Die Expression der für Hitzeschockproteine und für Tryptophan-Synthese kodierenden Gene war hochreguliert, während die Expression der für Membran-, Transmembran-, Transportproteine sowie für putative periplasmatische und ribosomale Proteine kodierenden Gene ausschließlich herunterreguliert war. Die in anderen Clustern zusammengefassten Gene zeigten nach Infektion mit *C. jejuni* eine unterschiedliche Regulation, hierzu gehörten sowohl hoch- als auch herunterregulierte Gene.

Etwa $\frac{1}{3}$ aller hochregulierten und $\frac{1}{4}$ aller herunterregulierten Gene kodierten für Enzyme wie Kinasen, Dehydrogenasen oder Hydrolasen. Etwa den gleichen Anteil nahmen Gene ein, deren Produkte als hypothetische oder putative Proteine bezeichnet wurden (s. Abb. 26).

Einen weiteren Anteil an den hochregulierten Genen machten Gene des Tryptophan (Trp)-Operons: *trpE*, *trpD*, *trpF*, *trpA*, *trpB* sowie das an der Regulation der Tryptophansynthese beteiligte Enzym *shikimatase* Kinase (AroK; Ely und Pittard, 1979) aus. Der Z-Score von *trpE* betrug 2,86, der von *trpD* 2,16, von *trpF* 1,94. Die zwei weiteren Gene des Trp-Operons *trpA* und *trpB* wurden mit dem Z-Score 0,73 beurteilt. Diese Werte resultierten aus der Verrechnung von Ergebnissen von drei Array-Doppelbestimmungen. Da jedoch in einer der Messungen bei beiden Genen eine schwache Regulation detektiert wurde, konnten die Z-Score Werte der parallelen Messung von 1,87 bzw. 1,91 den Mittelwert nicht mehr erhöhen. Diese Daten lassen vermuten, dass die tatsächliche Regulation der *trpA*- und *trpB*-Gene möglicherweise höher als 0,73 ist und der Regulation der übrigen *trp*-Gene (s. oben) entspricht.

Unter den ersten 23 am stärksten hochregulierten Genen befanden sich auch sechs Gene, die bereits mit anderen Methoden als Hitzeschockgene identifiziert wurden. Es handelte sich dabei um Gene des Genclusters *hrcA-grpE-dnaK-hspR* (Bucca, 1997; Thies et al., 1999a), das Gen *clpB* (Thies et al., 1999b) und *cbpA* (Ueguchi et al., 1994). Diese Gene eigneten sich daher sehr gut als interne Kontrolle der Mikroarray-Detektion.

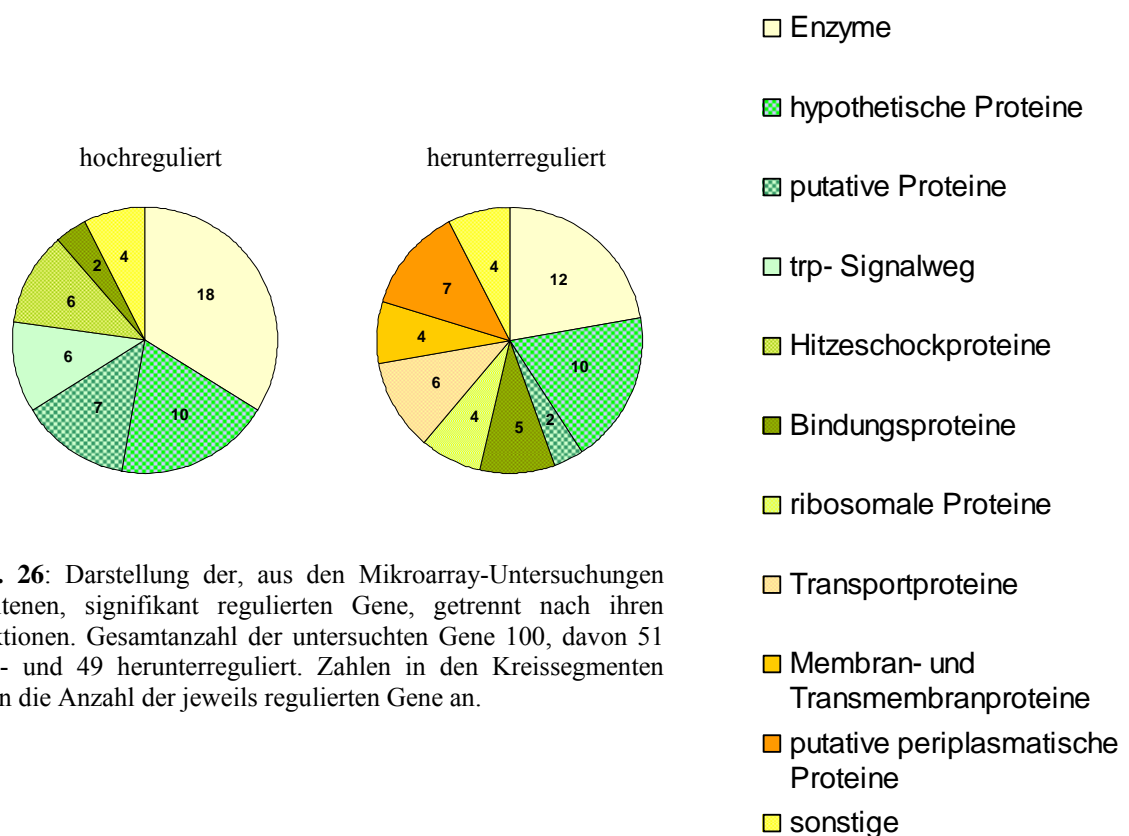


Abb. 26: Darstellung der, aus den Mikroarray-Untersuchungen erhaltenen, signifikant regulierten Gene, getrennt nach ihren Funktionen. Gesamtanzahl der untersuchten Gene 100, davon 51 hoch- und 49 herunterreguliert. Zahlen in den Kreissegmenten gaben die Anzahl der jeweils regulierten Gene an.

4.2 Überprüfung ausgewählter Gene mittels RT-PCR

Da die sehr energieaufwändige Tryptophansynthese durch Hitzeschock transkriptionell induziert wurde, erfolgte die Überprüfung dieser Regulation zusätzlich noch mit einer weiteren Methode, mit der RT-PCR. Die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigten die aus den Mikroarray-Analysen gewonnenen Daten. Neben der eindeutigen Regulierung des als Kontrollgen verwendeten *clpB*, war die Regulation der ausgewählten *trpD* und *trpE* Gene auch mit dieser Methode detektierbar (s. Abb. 27). In einer weiteren RT-PCR wurde die veränderte Genexpression von *C. jejuni* nach pH-Stress mittels einer 7-minütigen Inkubation im BBFKSdent-Medium bei pH 3,5 untersucht. Hier zeigte sich, im Gegensatz zu den wenig aussagekräftigen Mikroarray-Daten, dass diese Art von Stress ebenfalls die Expression der für Tryptophansynthese kodierenden Gene induziert (s. Abb. 27).

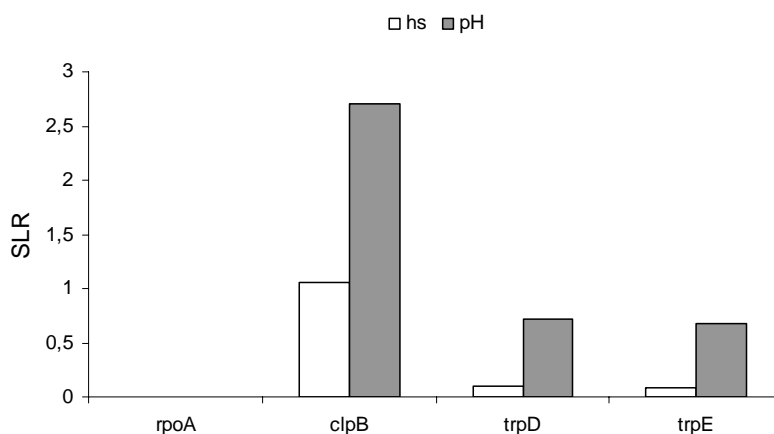


Abb. 27: Expression ausgewählter *C. jejuni* Gene nach einer 20-minütigen Inkubation bei 48°C (Hitzeschock) oder einer Einwirkung eines niedrigen pH-Wertes von 3,5 (7 min, Raumtemperatur), detektiert mittels RT-PCR. Signal Log Ratio (SLR).

4.3 Bestimmung der Regulation auf funktioneller Ebene

Da das Zytokin IFN γ den Trp-Abbau in den humanen Zellen induziert und somit eine essentielle Aminosäure, das Tryptophan, den invadierten Bakterien entzieht (Überblick in Carlin et al., 1989), wurde der Einfluss von IFN γ auf die Invasion bzw. das interne Überleben von *C. jejuni* getestet. Hierzu wurden CaCo-2 Zellen mit drei IFN γ -Konzentrationen von 500, 1000 und 3000 Units pro ml versetzt und anschließend wie üblich (vgl. II.2.9.2) mit *C. jejuni* infiziert. Der Einfluss von IFN γ auf die Invasion bzw. auf das Überleben von *C. jejuni* innerhalb der humanen Zellen wurde in der Abbildung 28 dargestellt. Bereits bei der Inkubation der CaCo-2 Zellen mit 500 Units IFN γ wurden im Vergleich zu unbehandelten

Zellen etwa 30 - 36% der intrazellulären Bakterien weniger detektiert. Diese Internalisierungs- bzw. Überlebensrate der Bakterien konnte durch Zugabe von erhöhten IFN γ -Konzentrationen von 1000 und 3000 Units nicht weiter gesenkt werden (s. Abb. 28).

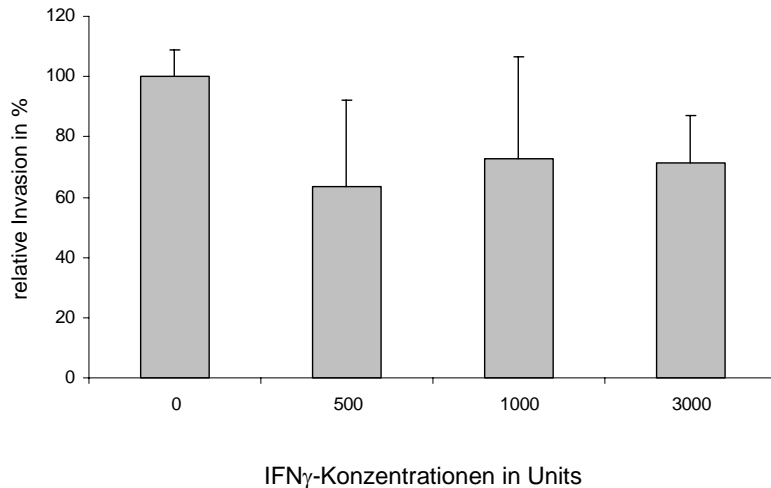


Abb. 28: Einfluss von 500, 1000 und 3000 Units IFN γ auf die Invasion bzw. auf das Überleben von *C. jejuni* innerhalb von humanen CaCo-2 Zellen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

5. Bestimmung der *C. jejuni*-Infektionsrate des Geflügels von Bauernhöfen

Die Untersuchung von Geflügel aus Süddeutschland, überwiegend aus der Oberpfalz ergab, dass in etwa 57% aller untersuchten Bauernhöfe, Hühner mit dem Durchfallerreger *Campylobacter jejuni* infiziert waren (s. Abb. 29 A). Diese Daten entstanden aus Untersuchungen von 30 Hühner-Kotproben mittels *nested*-PCR (vgl. II.3.5).

In den drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit unterschiedlichen Chargen zeigten sich bei zwei Untersuchungen Infektionsraten von 50% und bei einer von 70%. Gleichzeitig wurde versucht aus diesen Proben *C. jejuni* zu isolieren, was allerdings nur in sieben Fällen zu einer *C. jejuni*-Reinkultur führte. Mit diesen Isolaten wurden, wie unter II.2.9 beschrieben Infektionsassays durchgeführt. Alle untersuchten Bakterienisolate besaßen Adhärenz- und Invasionsfähigkeit bezüglich humaner CaCo-2 Zellen, allerdings in geringerem Ausmaß, als für den ATCC 33291 *C. jejuni*-Stamm nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Im Rahmen dieser Untersuchung wurden auch 12 Proben aus verschiedenen Hühnerfarmen auf das Vorkommen der *C. jejuni*-DNA im Kot überprüft. Drei der 12 untersuchten Proben erwiesen sich als positiv (s. Abb. 29 B).

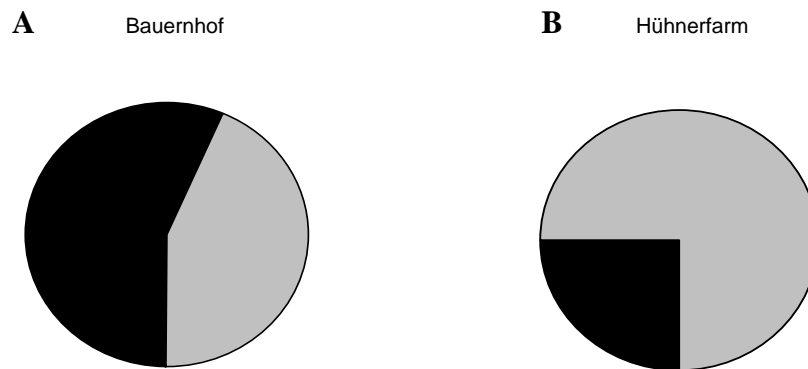


Abb. 29: Bestimmung der *C. jejuni*- Infektionsrate von Geflügel; **A:** aus Bauernhöfen, n=30; **B:** aus Hühnerfarmen, n= 12. ■ infiziert □ nicht infiziert

Die Ergebnisse dieser regionalen Untersuchung bestätigen die Daten des Robert Koch Instituts, wonach eine hohe Anzahl an Hühnern in Deutschland infiziert ist und eine Infektionsquelle für den Menschen darstellt (RKI, 2001 und RKI, 2004).

IV. DISKUSSION

1. Molekulare Mechanismen der Interaktion von *C. jejuni* mit Darmepithelzellen

Die bisher veröffentlichten Untersuchungen über die Interaktion von *C. jejuni* mit humanen Wirtszellen konnten zeigen, dass *C. jejuni* auf zwei Wegen in die Darmschleimhaut eindringt. Neben der direkten transzellulären Internalisierung, die eine Aktin-Polymerisierung (De Melo et al., 1989; Konkel et al., 1992; Grant et al., 1993) erfordert, kann *C. jejuni* aus dem Darmlumen an der lateralen Seite der Epithelzellen, parazellulär translozieren (Everest et al., 1992). Es wird postuliert, dass nur Bakterien, die auf dem parazellulären Internalisierungsweg die epithelialen Barrieren passieren, Gewebeschädigungen und Entzündung initiieren können (Everest et al., 1992).

Direkt nach dem Eindringen eines pathogenen Mikroorganismus wird in humanen Zellen die unspezifische, vom Komplementsystem ausgehende Immunabwehr aktiviert (Übersichten in Paul, 1998 und in Friese et al., 2000), welche unter anderem die Induktion von Entzündungsmechanismen in den Wirtszellen vermittelt (Übersicht in Friese et al., 2000).

An der Induktion von Entzündungsmechanismen sowie an der Detektion und Abwehr von Infektionen sind spezifische Toll-like Rezeptoren (TLRs) beteiligt (Medzhitov et al., 1997; Übersicht in Takeda und Akira, 2004a und 2004b). Die TLRs induzieren die NF κ B-vermittelte Expression von Genen, welche die Ausbildung einer inflammatorischen Immunantwort beeinflusst (Medzhitov et al., 1997).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass *C. jejuni* sowie zwei seiner Komponenten, das Oberflächenprotein JlpA und eine niedermolekulare Fraktion, den NF κ B-induzierten Signalweg aktivieren (Mellits et al., 2002; Jin et al., 2003). Die daraus resultierende *C. jejuni*-assoziierte Entzündungsreaktion der Darmepithelzellen wurde bereits vor über 20 Jahren anhand von histologischen Untersuchungen beschrieben (Gurian et al., 1983; Humphrey et al., 1986; Black et al., 1988).

In der vorliegenden Arbeit galt es, die molekulare Pathogenese *C. jejuni*-assoziiierter Erkrankungen zu untersuchen. Im ersten Schritt wurden hierzu Mechanismen, die möglicherweise an der Interaktion von *C. jejuni* mit humanen Darmepithelzellen beteiligt sein könnten, analysiert.

1.1 NFκB

Um die NFκB-Induktion auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Proteinfractionen aus dem Zytoplasma sowie dem Zellkern von infizierten und nicht infizierten CaCo-2 Zellen hergestellt. Mittels eines spezifischen ELISA-Verfahrens erfolgte die Analyse der Untereinheiten des NFκB-Komplexes *nfkb1* (p50), *nfkb2* (p52), *rela* (p65), *c-rel* und *relb* im Hinblick auf ihre Anwesenheit und Regulation nach Kontakt mit *C. jejuni*. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl NFκB1 (p50) als auch NFκB2 (p52) in der Lage sind, eine Bindung mit RelA (p65) oder RelB einzugehen (Duckett et al., 1993; Bours et al., 1994; Piette et al., 1997). Die von NFκB-Komplex ausgehende Aktivierung der Transkription pro-inflammatorischer Gene wird jedoch durch die inhibitorische Aktivität von IκB (NFκBIA) solange gehemmt, bis der Inhibitor durch Ubiquitinierung markiert und in Proteosomen abgebaut wird.

Die Untersuchungen aus der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Infektion der humanen Epithelzellen mit *C. jejuni* zu einer verstärkten Aktivierung von ausschließlich zwei der NFκB-Untereinheiten, nämlich NFκB1 (p50) und RelA (p65) führt. Diese beiden Untereinheiten wurden bereits in anderen Untersuchungen als Indikator für NFκB-Induktion nach Kontakt mit *C. jejuni* analysiert (Mellits et al., 2002; Fox et al., 2004). Durch die Bildung eines Heterodimers dieser beiden Untereinheiten wird die Transkription pro-inflammatorischer Gene ermöglicht.

Anhand von anschließenden Mikroarray-Untersuchungen konnte die Regulation einer Reihe pro-inflammatorischer, NFκB-induzierter Gene identifiziert werden. Hierzu gehören unter anderem die für Zytokine und Chemokine kodierenden Gene *ccl20* (Imaizumi et al., 2004; Sugita et al., 2004), *cxcl10* (Hiroi und Ohmori, 2003), *il-8* (Linard et al., 2004), *il-12* (Zhu et al., 2004), *cxcl1* (Kim et al., 2002) sowie das Gen für das Enzym PTGS2 (Lee et al., 2004).

Außerdem wurde eine 2,1-fache Hochregulierung des Inhibitors IκB und eine sehr starke, 29-fache, Hochregulierung des für Ubiquitin kodierenden Gens *ubd* detektiert.

Die nur zweifache Hochregulierung des IκB-Gentranskripts im Vergleich zu der fünffachen Hochregulierung der Komponenten des NFκB-Komplexes spricht für das Überwiegen der NFκB-Aktivierung und nicht für die Inhibition dieses Signalweges. Zudem weist die 29-fache Hochregulierung des UBD-Gentranskripts auf eine Verstärkung von Ubiquitinierungsprozessen in der Zelle, die zu einer weiteren Aktivierung des NFκB-Komplexes und einer weiteren Verstärkung der Transkription pro-inflammatorischer Gene führt.

Zusammenfassend zeigen also die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf der Proteinebene eine *C. jejuni*-vermittelte NFκB-Aktivierung, die zur Expression pro-inflammatorischer Gene führt. Die Regulation einiger dieser Gene konnte auf Expressionsebene mittels Mikroarray-Untersuchungen nachgewiesen werden.

1.2 Rolle von TLR

Die *Campylobacter jejuni*-vermittelte Aktivierung der NFκB-induzierten Expression pro-inflammatorischer Gene ähnelt dem, bei anderen Bakterien beobachteten Mechanismus (Mempel et al., 2003; Smith et al., 2003; Bambou et al., 2004; McCaffrey et al., 2004). Dabei spielen die Toll-like Rezeptoren (TLRs) eine entscheidende Rolle.

Zu den TLRs, die bakterielle Bestandteile erkennen, gehören TLR2, TLR4, TLR5 und TLR9. TLR2 ist zusammen mit TLR6 oder TLR1 hauptsächlich an der Erkennung von Lipoproteinen, Lipoteichonsäuren und Peptidoglykanen beteiligt. Da diese Komponenten vorwiegend in der Zellwand grampositiver Bakterien vertreten sind, ist die Spezifität des Toll-like Rezeptors 2 vermutlich auf diese Bakterien begrenzt.

TLR4 erkennt dagegen die für gramnegative Bakterien charakteristische Lipopolysaccharid (LPS)-Struktur. Die Untersuchungen der CaCo-2 Zellen haben jedoch gezeigt, dass diese Zelllinie unempfindlich gegen LPS ist. Darüber hinaus wurde eine positive Korrelation zwischen der Sensitivität der intestinalen Epithelzellen und der TLR4-Expression postuliert (Bocker et al., 2003). Demnach dürften die CaCo-2 Zellen kein TLR4 exprimieren. Da es jedoch zu einer Internalisierung von *C. jejuni*-Bakterien in die CaCo-2 Zellen kommt (vgl. beispielsweise Abb. 4 oder Tabelle 1), müsste diese unabhängig von der Interaktion mit TLR4 geschehen.

Darüber hinaus führte die Inkubation von *C. jejuni* mit PBMCs zu einer von LPS-Stimulation klar unterscheidbaren Kinetik der IFNγ-Ausschüttung (s. Abb. 14). Auch dies könnte dafür sprechen, dass *C. jejuni* einen anderen Rezeptor rekrutiert als den LPS-induzierten TLR4.

Da die Zellwand von *C. jejuni*, nicht wie bei anderen gramnegativen Mikroorganismen aus Lipopoly- sondern lediglich aus Lipooligosaccharidketten aufgebaut ist (Adeyeye et al., 1989), reicht die Länge dieser Ketten möglicherweise nicht aus, um TLR4 zu aktivieren. Die vorliegenden Daten sprechen also eher gegen eine entscheidende Rolle von TLR4 oder TLR2 mit seinen Interaktionspartnern TLR1 oder TLR6, bei der Induktion der pro-inflammatorischen Signalkaskade durch *C. jejuni*.

Im Gegensatz dazu könnte es sich bei TLR5 um den oder einen der Rezeptoren handeln, die für *C. jejuni* vermittelte Induktion der Inflammation verantwortlich sind. Die Aktivierung des

TLR5 erfordert die Bindung von Flagellin, des Hauptbestandteiles des bakteriellen Flagellums (Hayashi et al., 2001). Bakterien ohne intakte Flagellen können TLR5 nicht aktivieren (Übersicht in Takeda und Akira, 2003). Untersuchungen der durch *C. jejuni* ausgelösten Infektionsreaktion zeigten, dass das Flagellum dieses Bakteriums in humanen Zellen einen potenten Virulenzfaktor darstellt (Nachamkin et al., 1993; Wassenaar et al., 1993). Aus einer weiteren Untersuchung ging hervor, dass TLR5 ausschließlich auf der basolateralen, nicht jedoch auf der apikalen Seite der intestinalen Epithelzellen exprimiert wird (Gewirtz et al., 2001), genau dort, wo die bevorzugten Eintrittsstellen von *C. jejuni* in die Zellen lokalisiert wurden (Everest et al., 1992; Takeda und Akira, 2003). Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass TLR5 *C. jejuni* erkennt und durch Bindung des Flagellins aktiviert wird.

Die Rolle von TLR9 ist bisher noch wenig erforscht. Man weiß, dass dieser Rezeptor spezifisch die nicht methylierten CpG-Motive bakterieller Sequenzen bindet und endosomal bzw. lysosomal internalisiert (Yamamoto et al., 1994; Hacker et al., 1998). Es müsste also hier im Weiteren überprüft werden, ob die internalisierten *C. jejuni* nach ihrer Abtötung in der Zelle ihre DNA freisetzen und somit den Rezeptor TLR9 aktivieren können.

Zusammengefasst sprechen die Daten der vorliegenden Untersuchungen gegen eine entscheidende Rolle von TLR4 und TLR2 bei der Invasion von *C. jejuni* und unterstützen indirekt die Hypothese einer besonderen Rolle der Interaktion von Flagellin mit TLR5. Da bisher jedoch keine Hinweise aus der Literatur auf die Interaktion von *C. jejuni* mit Toll-like Rezeptoren bekannt sind, wurde hier zum ersten Mal ein Versuch unternommen, diesen Interaktionspartner von *C. jejuni* zu identifizieren.

1.3 Mögliche Beeinflussung der unspezifischen Immunabwehr

Das Komplementsystem gehört zu den ersten Abwehrmechanismen gegen eingedrungene Bakterien, Viren oder Parasiten. Die C3-Komponente dieses Systems spielt dabei eine Schlüsselrolle. Die Mikroarray-Daten unserer Versuche zeigten, dass die Genexpression von *c3* etwa 14-fach hochreguliert war und somit zu den drei am stärksten regulierten Genen gehörte. Auch die Veränderung der Expression der Komplementkomponente *c1qr1* zählte zu den drei am stärksten regulierten Genexpressionen. Die Expression dieses Gens nach Kontakt mit *C. jejuni* wurde jedoch 7,3-fach herunterreguliert. Da das C1QR1 Protein die Verstärkung der Phagozytose induziert (Nepomuceno und Tenner, 1998), handelte es sich vermutlich bei der Herunterregulierung dieses zellulären Prozesses um einen Schutzmechanismus der humanen Wirtszelle vor der Invasion durch *C. jejuni*.

Diese Daten zeigen, dass es in Darmepithelzellen nach Infektion mit *C. jejuni* zu einer lokalen Synthese pro-inflammatorischer Komponenten des Komplementsystems kommt, und dass *C. jejuni* aber andererseits eine Herunterregulation von Komponenten dieses Systems induzieren kann. Die Herunterregulation der Phagozytose stellt möglicherweise einen zellulären Mechanismus dar, um sich vor *C. jejuni*-Infektionen zu schützen.

1.4 Rolle von Zytokinen und Chemokinen

Der invadierte *Campylobacter jejuni* induzierte eine gesteigerte Expression vieler inflammatorischer Gene, die anhand der Mikroarray-Untersuchungen detektiert werden konnte. Unter den fünfzehn am stärksten, d.h. zwischen 29- und 5-fach hochregulierten Genen, befanden sich zehn, von denen bekannt ist, dass sie an inflammatorischen Vorgängen der Zelle beteiligt sind. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-8, IL-12 sowie IL-18 nach dem Kontakt mit bakteriellen Bestandteilen eine Schlüsselfunktion sowohl der unspezifischen als auch der adaptiven Immunabwehr erfüllt (Übersichten in Dinarello, 1999 und Hornef et al., 2002).

1.4.1 Interleukine IL-8 und IL-12

Die in unseren Versuchen beobachtete Expression des pro-inflammatorischen Mediators Interleukin 8 (IL-8) erhöhte sich in den mit *C. jejuni* infizierten CaCo-2 Zellen in etwa um das 9,8-fache. Bereits 1999 haben Hickey und seine Arbeitsgruppe mittels ELISA-Untersuchungen gezeigt, dass der Kontakt von *C. jejuni* mit den intestinalen Zellen INT407 eine erhöhte IL-8 Freisetzung induziert. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass die Konzentration des produzierten IL-8 von der Infektiosität des jeweilig verwendeten Stammes abhängig ist (Hickey et al., 1999; Hickey et al., 2000). Neben der erhöhten Genexpression von *il-8* wurde in den CaCo-2 Zellen auch eine um das 6-fache erhöhte Expression der Untereinheit A des Interleukins IL-12 detektiert. Die Untereinheit IL-12A (p35) bildet zusammen mit IL-12B (p40) das Heterodimer Interleukin 12 (Wolf et al., 1991).

Eine durch *C. jejuni* induzierte Stimulation der IL-12 Expression wurde auf der Proteinebene aus Untersuchungen der Überstände von PBMCs beobachtet. Die mittels ELISA gemessenen Konzentrationen von IL-12 variierten in Abhängigkeit von den Spender-Blutzellen (PBMCs), so dass eine Quantifizierung des ausgeschütteten IL-12 nicht möglich war. Dennoch stimmte die Verteilung der IL-12 Freisetzung über die gemessene Zeit in allen durchgeführten Versuchen überein. So konnte in den ersten 24 h nach Beginn der Infektion ein IL-12 Anstieg im Überstand festgestellt werden, während nach 48 h die Konzentration von IL-12

abzunehmen begann. Diese Beobachtung wäre mit den erst kürzlich erschienenen Untersuchungen über die Rolle von IL-12 in der frühen anti-mikrobiellen Immunabwehr vereinbar (Weijer et al., 2005).

1.4.2 Interleukin IL-18

Nach Exposition von PMBCs gegenüber *C. jejuni* kam es über 48 h zu einem kontinuierlichen Anstieg der IL-18 Konzentration im Überstand (s. Abb. 13). Diese Kinetik konnte in den humanen intestinalen CaCo-2 Zellen nach Infektion mit *C. jejuni* nicht beobachtet werden. Hier wurde erst 48 h nach Beginn der Infektion eine signifikant erhöhte IL-18 Konzentration gemessen.

Diese rapide Erhöhung der IL-18 Freisetzung nach 48 h lässt sich mit der kompletten Auflösung des Monolayers und dem Absterben der humanen Zellen erklären (vgl. III.1.4). Zu diesem späten Zeitpunkt ist vermutlich das zelluläre Gleichgewicht, welches ursprünglich in Richtung Inflammation tendierte, in Richtung Zelltod verschoben. Diese Vermutung wird auch durch einige Berichte belegt, die zeigen, dass während massiver Apoptose die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-1 β und IL-18 freigesetzt werden (Hogquist *et al.*, 1991; Gu *et al.*, 1997; Miwa *et al.*, 1998).

Trotz der nachgewiesenen Invasionsfähigkeit und einer Aktivierung der IL-18 Produktion in den PBMCs, konnte also der von uns verwendete *C. jejuni*-Stamm keine Freisetzung von IL-18 in den Darmepithelzellen induzieren.

Da es bereits gezeigt wurde, dass die CaCo-2 Zellen die Fähigkeit besitzen, das Interleukin 18 zu produzieren (Takeuchi et al., 1999; Paulukat et al., 2001; Kalina et al., 2002), liegt es vermutlich alleine am *C. jejuni* bzw. seinen Komponenten, dass diese Aktivierung in den intestinalen Epithelzellen nicht induziert wird.

Die erhöhte Produktion von IL-18 wurde in mehreren Studien in Zusammenhang mit der Ausbildung chronischer Darmerkrankungen gebracht (Monteleone et al., 1999; Pizarro et al., 1999; Dinarello und Fantuzzi, 2003). Die immunohistologischen Untersuchungen haben ergeben, dass die Infektion mit *C. jejuni* in keiner Verbindung mit den chronischen Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn oder chronischer ulzerativer Kolitis steht (Blaser et al., 1984; Melby und Kildebo, 1988).

Möglicherweise ist diese Tatsache auf die Unfähigkeit von *C. jejuni* zurückzuführen, in den intestinalen Epithelzellen die IL-18 Produktion zu aktivieren.

1.4.3 Chemokine

Die Mikroarray-Datenanalyse der Genexpression von humanen intestinalen Epithelzellen nach Kontakt mit *C. jejuni* zeigte die vermehrte Expression einer Reihe proinflammatorischer Chemokine. Neben der stark hochregulierten Expression der für Chemokin-Liganden CCL20 und CXCL10 kodierenden Gene, die mit einer 12- bzw. 10-fachen Hochregulation an der Spitze der regulierten Gene standen, gehörten hierzu auch weitere Liganden wie CXCL1 (+5,6), CXCL2 (+2,89) und CXCL3 (+2,61). Für einige dieser Chemokine konnte bereits nachgewiesen werden, dass ihre Expression durch $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ sowie weitere inflammatorische Stimuli hochreguliert wird (Angiolillo et al., 1995; Harant et al., 2001).

Bei den hier detektierten Molekülen handelt es sich um Mitglieder zweier großer Chemokin-Subfamilien, der *alpha* und *beta* Subfamilie. Die Einteilung wurde nach der Anordnung der ersten zwei von vier konservierten Cysteinresten vorgenommen. Wenn zwei Cysteinreste durch eine weitere Aminosäure getrennt werden, entsteht das sog. CXC-Motiv der *alpha* Subfamilie. Chemokine mit dem CC-Motiv, in dem die Cysteinreste direkt nebeneinander liegen, finden sich in der *beta* Subfamilie.

Bis auf einige Ausnahmen interagieren Vertreter der *alpha*-Chemokine mit Neutrophilen, während die Mitglieder der *beta*-Subfamilie auf Monozyten und einige Lymphozyten wirken (Übersicht in Graves und Jiang, 1995). Die Aktivierung von Chemokinen einer einzigen Subfamilie könnte unter Umständen Hinweise auf die Art der aktivierten Zellen liefern. Dieser Fragestellung gingen auch Bakhiet et al. (2004) nach. Ihre immunohistochemischen Untersuchungen zeigten, dass eine Stimulation der intestinalen Zellen der Linie INT407 mit *C. jejuni* neben einer erhöhten Detektion von IL-8, stellvertretend für die *alpha*-Chemokine auch eine erhöhte Expression der *beta*-Chemokine CCL4 und CCL2, nicht aber CCL3 und CCL5 initiiert (Bakhiet et al., 2004).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Mikroarray-Untersuchungen erbrachten keine Hinweise für die Regulation der von Bakhiet immunohistochemisch untersuchten Chemokine CCL2 und CCL5, die Chemokine CCL3 und CCL5 waren auf dem Mikroarray-Chip nicht vertreten. Dennoch zeigen auch die Ergebnisse unserer Arbeit, dass *C. jejuni* sowohl die Expression von *alpha*- als auch *beta*-Chemokinen hochreguliert.

Interessanterweise wurde die Expression von CCL20, CXCL1, CXCL2 und CXCL3, die nach der vorliegenden Arbeit starke positive Regulation zeigten, auch in den koloskopischen Biopsieproben aus entzündlichen Darmerkrankungen stark hochreguliert (Puleston et al., 2005). Für CCL20 und CXCL1 finden sich in der Literatur auch weitere Hinweise auf ihre

Rolle in der Ausbildung entzündlicher Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn oder ulzerative Kolitis (Imada et al., 2001; Kwon et al., 2002; Kaser et al., 2004). Demnach ist CCL20 mRNA sowie sein Genprodukt mehrfach in Morbus Crohn sowie ulzerativer Kolitis erhöht (Kwon et al., 2002; Kaser et al., 2004). Dagegen ist die Expression von CXCL1 und IL-8 nur in Patienten mit aktiver ulzerativer Kolitis, nicht aber mit Morbus Crohn erhöht (Imada et al., 2001).

Diese Erkenntnisse sprechen möglicherweise für Ähnlichkeiten in der Genexpression von Darmzellen nach Kontakt mit *C. jejuni* und bei entzündlichen Darmerkrankungen.

1.4.4 Interferon IFN γ

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *C. jejuni* in den ersten 24 h nach Beginn der Infektion steigende IFN γ -Produktion der PBMCs induziert. Die *C. jejuni*-induzierte Freisetzung von IFN γ wurde auch in der intestinalen INT407-Zelllinie nachgewiesen, ohne jedoch eine Infektionskinetik zu erstellen (Al-Salloom et al., 2003).

Das freigesetzte IFN γ bindet an den IFN γ -Rezeptor (IFNGR) und induziert damit intrazellulär den STAT-Signalweg, indem es mittels Janus-Kinasen (JAKs) das STAT-1 α Protein aktiviert (Übersicht in Han et al., 1999).

STAT-Proteine vermitteln die biologische Wirkung vieler Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone und sind somit an Prozessen wie der Regulation von Zellwachstum und -entwicklung, dem programmierten Zelltod sowie angeborenen und adaptiven Immunantworten beteiligt (Übersicht in Horvath, 2000).

Die Untersuchung der heterodimeren Komplexe von IFN γ mit seinen Rezeptoren führte zu der Erkenntnis, dass nur einer der beiden bekannten Rezeptoren, nämlich der IFNGR1 durch Endozytose in die Zelle und anschließend in den Zellkern transportiert wird. Die Translokation von IFNGR1 in den Zellkern erfordert die Bildung eines Komplexes mit dem Transkriptionsfaktor STAT-1 α . Im Zellkern erkennt das translozierte Dimer spezifische DNA-Elemente und aktiviert die Transkription STAT-induzierter Gene.

Anhand unserer Mikroarray-Daten wurde neben der erhöhten Expression des für den IFNGR1 kodierenden Gens auch eine erhöhte Regulation der u.a. durch STAT induzierten Gene (vgl. Rawlings et al., 2004) *myc* und *socs* beobachtet.

Da die Kolon-Zellen das IFN γ -Zytokin nicht exprimieren können (s. Bocker et al., 2003 und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=unigene>), spricht die 3,1-fache Hochregulation der Expression des IFNG-Rezeptors 1 nach Kontakt mit *C. jejuni* für

eine Verstärkung der Sensitivität der Kolon-Zellen gegenüber dem durch Leukozyten freigesetzten IFN γ .

Zusammengefasst können also die CaCo-2 Zellen, trotz der Unfähigkeit IFN γ zu produzieren, mit Hilfe des IFNG-Rezeptors auf freigesetztes IFN γ reagieren und die Transkription IFN γ -induzierten Gene aktivieren. In humanen PBMCs wurde die stärkste Produktion des IFN γ nach Infektion mit *C. jejuni* in den ersten 24 h beobachtet.

2. TGF β als therapeutisches Agens?

2.1 Produktion von TGF β

Die Untersuchung der TGF β -Produktion durch humane CaCo-2 Darmepithelzellen ergab, dass in den Überständen von Zellen infiziert mit *C. jejuni*, im Vergleich zu nicht infizierten Zellen etwa 10-fach höhere Konzentration an TGF β -1, nicht aber an TGF β -2 detektiert wurde. Darüber hinaus konnte die *C. jejuni* induzierte Freisetzung von TGF β -1 auch in den untersuchten primären intestinalen Epithelzellen (IEC) nachgewiesen werden.

Humanes TGF β , welches in drei Isoformen vorkommt, TGF β 1-3, wird durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Zellen und Organen produziert. Zu den TGF β -1 exprimierenden Zellen gehören im Verdauungstrakt neben den Kolon-, auch Dünndarm- und Magen-Zellen, während TGF β -2 im Darmtrakt nur in den Kolon-Zellen nachgewiesen wurde (UniGene). Da die TGF β -Isoformen in 60 - 80% homolog zueinander sind und ähnliche Funktionen haben (Übersicht in Roberts, 1998), spricht die ausschließliche Freisetzung von TGF β -1 durch CaCo-2 Zellen eher für eine Spezialisierung dieser Zellen auf Produktion nur eines TGF β -Isotyps als Antwort auf die *C. jejuni*-induzierte Infektion.

Die deutlich erhöhte Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins TGF β aufgrund einer Infektion mit *C. jejuni*, die bekanntlich eine starke Entzündung induziert, würde das durch Monteleone et al. (2004) postulierte Gleichgewicht zwischen den pro- und den anti-inflammatorischen Zytokinen beeinflussen. Die bereits beschriebene starke pro-inflammatorische Reaktion der infizierten Zellen zeigt jedoch, dass die Wirkung von TGF β zu schwach ist, um dieses Ungleichgewicht zu kompensieren.

2.2 Einfluss von TGF β auf bakterielle Invasion

Aufgrund der Beobachtungen, dass *C. jejuni* die Produktion von TGF β induziert, wurde der Einfluss des freigesetzten TGF β auf das Bakterium sowie sein Invasionsverhalten untersucht. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Invasionsassays zeigten, dass die Zugabe von rekombinantem TGF β bakterielle Invasion in humane CaCo-2 Zellen verstärkte. Neben *C. jejuni* konnte auch bei *Shigella flexneri* ein deutlicher Einfluss von TGF β auf die Invasion beobachtet werden. In einem weiteren Teilexperiment wurde zusätzlich noch gezeigt, dass eine intrazelluläre Verstärkung des TGF β -induzierten Signalweges durch Modulatoren wie LMB oder TSA eine weitere Erhöhung der Invasion zur Folge hat.

Diese durch TGF β verstärkte Invasion lässt sich vermutlich mit der Induktion von Veränderungen am Zytoskelett der Wirtszelle erklären. Anhand von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen haben wir beobachtet, dass die Aktinfilamente der mit *C. jejuni* infizierten Zellen, eine weniger geordnete bis amorphe Anordnung annahmen, im Vergleich zu den nicht infizierten Zellen. Die Behandlung der CaCo-2 Zellen mit TGF β zeigte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, eine verstärkte Bildung des Aktinskeletts dieser Zellen, die jedoch nach einer gleichzeitigen Infektion mit *C. jejuni* wieder aufgelöst wurde.

Diese Erkenntnisse zeigen also, dass zwei unterschiedliche Stimuli, wie *C. jejuni* und TGF β Veränderungen des Zytoskeletts hervorrufen können.

Eines der Moleküle, das in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts eine wichtige Rolle spielt, ist Rho. Rho-Proteine sind kleine GTP-bindenden Proteine, sog. GTPasen, zu denen neben verschiedenen Rho-Proteinen (RhoA-C, G und F) unter anderem auch Rac 1,2 und Cdc42 gehören (Übersichten in Takai et al., 1995; Machesky und Hall, 1996; Narumiya, 1996). In der GDP-gebundenen Form sind die Rho-Proteine inaktiv und werden erst durch GDP-Phosphorylierung zu GTP aktiviert. Anschließend interagieren sie mit ihren Effektoren und regulieren hierdurch unter anderem das Aktin-Zytoskelett.

Jeder Vertreter der Rho-Familie hat spezifische zelluläre Aufgaben. Am besten untersucht sind bislang Rho, Rac und Cdc42. Rho ist verantwortlich für die Bildung von charakteristischen Zytoskelett-Elementen, sog. „*stress fibers*“ und Adhäsionskomplexen (Ridley und Hall, 1992a), konstitutiv aktiviertes Rac führt zur Ausbildung von Lamellipodien und Membranauffaltungen (*membrane ruffles*; Ridley und Hall, 1992b), Cdc42 induziert die Bildung von Filopodien (Allen et al., 1997; Tapon and Hall, 1997).

Es wird angenommen, dass die Rho-Proteine Cdc42, Rac und Rho sequentiell verschaltet sind. Demnach führt ein aktiviertes Cdc42 zu einer Aktivierung von Rac, welches seinerseits Rho aktivieren kann (Kozma et al., 1995; Nobes und Hall, 1995).

Andererseits ist bekannt, dass pathogene Mikroorganismen bzw. ihre Produkte in Wechselwirkung mit dem Zytoskelett der Wirtszellen treten, um die Vorgänge der Adhäsion, Invasion sowie Migration zu beeinflussen (Übersicht in Gruenheid und Finlay, 2003). Bereits 1988 wurde gezeigt, dass Toxine aus *Clostridium difficile* eine Aktin-Depolarisierung induzieren (Ottlinger und Lin, 1988). Etwa 10 Jahre später wurde in *Escherichia coli* der *cytotoxic necrotizing* Faktor (CNF) als Auslöser erhöhter Bildung von *stress fibers* identifiziert (Gerhard et al., 1998). Auch die Interaktionen von Wirtszellen mit Bakterien, wie *Salmonella* oder *Shigella* führen zur Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts. *Salmonella* aktiviert direkt, *Shigella* indirekt die Rho-GTPasen Rho, Cdc42 sowie Rac (Konkel et al., 1992; Grant et al., 1993; Übersicht in Gruenheid und Finlay, 2003).

Auch wenn es bisher keine molekularen Daten über die *C. jejuni*-induzierte Aktin-Polymerisierung in den Darmepithelzellen gibt, ist es sehr wahrscheinlich, dass *C. jejuni* ähnlich wie *Salmonella* oder *Shigella* über die Aktivierung der kleinen Rho-GTPasen Rho, Cdc42 und Rac Veränderungen im Aktinzytoskelett auslöst. Vermutlich erst die Bildung bzw. Umstrukturierung des Zytoskeletts erlaubt *C. jejuni* erfolgreich zu adhären und invadieren. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass auch TGF β Membranauffaltungen sowie Bildung von *stress fibers* beeinflusst. Die Behandlung von Zellen mit TGF β induziert über Cdc42 und RhoA sowie die MAP-Kinase (p38) in den ersten 60 min Membranauffaltungen, während es zu späteren Zeit (gemessen nach 12, 24 und 48 h) zusätzlich auch noch zur Ausbildung von *stress fibers* über die Aktivierung von Smad-Proteinen kommt (Edlund et al., 2002). In beiden Fällen induziert TGF β eine Bildung bzw. Umstrukturierung von Aktinfilamenten, welche offensichtlich die bakterielle Invasion begünstigen kann.

Zusammengefasst deuten also diese Erkenntnisse darauf hin, dass die Invasion von *C. jejuni* die Interaktion mit dem Zytoskelett erfordert. Nach der Infektion von *C. jejuni* mit Aktinfilamenten der Wirtszelle kommt es jedoch während oder kurz nach der Invasion zu einer Zerstörung dieser, was sich optisch in der zunehmenden Auflösung der Zytoskelett-Anordnung äußert (s. Abb. 21 B). Die Zugabe von TGF β führt, vermutlich durch die Aktivierung der kleinen GTPasen Rho und Cdc42 zu einer ausgeprägten Bildung von Aktinfilamenten (s. Abb. 21 C). Diese TGF β -induzierte Aktivierung wirkt sich positiv auf

weitere *C. jejuni* Invasion und lässt sich in unseren Ergebnissen als verstärkte Invasion nachweisen.

3. Untersuchung der veränderten Genexpression von *C. jejuni* nach Induktion von Stress

Um einen Stress in *C. jejuni* zu induzieren, welcher der Stressreaktion von Wirtszellen auf *C. jejuni* ähnelt, wurden Stimuli, wie Hitze- und pH-Schock angewendet.

Bei der Hitzeschockantwort handelt es sich um einen allgemeingültigen Mechanismus, der nicht nur durch Hitze, sondern auch durch eine Vielzahl sonstiger Stressfaktoren ausgelöst werden kann. Die Wahl des pH-Schocks sollte den Weg von *C. jejuni* im Darmtrakt durch das saure Milieu des Magens simulieren.

Die Genexpression von *C. jejuni* nach Einwirkung von Hitzeschock wurde mittels Mikroarray-Untersuchungen analysiert. Es zeigte sich, dass eine Reihe von bekannten Hitzeschock-Genen hochreguliert war. Auch die Expression der, für den Tryptophan (Trp)-Operon kodierenden Gene war erhöht. Die anschließend durchgeführte RT-PCR an zwei der Trp-Gene zeigte, dass beide sowohl nach Einwirkung von erhöhter Temperatur als auch niedrigen pH-Werten hochreguliert waren. Dies hängt vermutlich indirekt mit der unspezifischen Immunabwehr des Wirtsorganismus zusammen.

Die Produktion von IFN γ spielt nicht nur während der Inflammationsprozesse eine wichtige Rolle, sondern ist auch an der anti-mikrobiellen Abwehr beteiligt (Carlin et al., 1989; Murray et al., 1989). Dies ist auf die Wirkung von IFN auf die *Indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO) zurückzuführen. Beim IDO handelt es sich um ein IFN-induziertes Enzym, welches die Umsetzung von Tryptophan zu (Formyl)Kynurenine katalysiert. Nach einer bakteriellen Infektion kommt es also zu einer verstärkten Ausschüttung von IFN γ , welches den IDO-initiierten Abbau von Tryptophan zur Folge hat (Yasui et al., 1986; Übersicht in Taylor und Feng, 1991). Da es sich beim Tryptophan um die wichtigste essentielle Aminosäure von Viren, Bakterien und einigen Parasiten handelt, führt die Minimierung der Tryptophan-Konzentration in der humanen Zelle zu einer Verschlechterung der Überlebens- und Wachstumschancen dieser Organismen (Hayaishi, 1996). Dies belegen auch die Ergebnisse unserer Versuche, in denen gezeigt wurde, dass das Überleben der internalisierten Bakterien nach Zugabe von IFN γ um etwa 20 - 30 % gesenkt wurde (s. Abb. 28).

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal beobachtet werden, dass Stress-Stimuli, wie Hitzeschock oder Senkung des pH-Wertes die Expression der, für Tryptophan-

Synthese kodierenden Trp-Gene im *C. jejuni* induzieren können. Diese Daten deuten darauf hin, dass durch Stress, den die Invasion und humane Immunabwehr in den Bakterienzellen verursacht, die Bakterien gezwungen werden, energieaufwändige zelluläre Prozesse durchzuführen, um in der Zelle zu überleben.

Der Tryptophan-Signalweg könnte möglicherweise ein therapeutisches Angriffsziel bieten, über welches die Abschwächung der bakteriellen Pathogenität bzw. die Stärkung der humanen Immunabwehr erreicht werden könnte.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von *Campylobacter jejuni* mit humanen Epithelzellen untersucht, um Hinweise auf molekulare Pathogenese *C. jejuni*-assoziierter Erkrankungen zu erreichen. Hierzu wurde zunächst die veränderte Genexpression von intestinalen CaCo-2 Epithelzellen nach Infektion mit *C. jejuni* analysiert. Anhand der Mikroarray-Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Stempfl (KFB, Regensburg) Gene detektiert, deren Expression durch den Einfluss von *C. jejuni* signifikant positiv oder negativ reguliert wurde. Die überwiegende Mehrheit der regulierten Gene kodierte für Proteine, die an der Proliferation und am Erhalt von Zellen beteiligt waren.

Einen weiteren großen Anteil aller signifikant regulierten Gene machten Transkripte aus, die in der Immunabwehr involviert waren. Hierzu gehörten unter anderem die Interleukine IL-8, IL-12, IL-18 oder das Zytokin IFN γ . Die *C. jejuni*-induzierte Freisetzung dieser Zyto- und Chemokine konnte auf der Proteinebene, hauptsächlich in den peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) ebenfalls nachgewiesen werden. Die erhöhte Expression dieser, an der Immunabwehr beteiligten Moleküle löste in den infizierten Zellen eine inflammatorische Reaktion aus. Um das stark in Richtung Inflammation verschobene Gleichgewicht der Zelle auszugleichen, wurde das anti-inflammatorische Zytokin TGF β verwendet. Anstatt jedoch der Inflammation sichtbar entgegenzuwirken, erhöhte sich nach Zugabe von TGF β die Invasionsrate verschiedener Bakterien, so dass die erhoffte Wiederherstellung des intrazellulären Gleichgewichts mit Hilfe von TGF β nicht erzielt werden konnte. Die TGF β -induzierte Erhöhung der Invasion ist vermutlich auf die Rho-Cdc42-abhängige Induktion der Mikrofilamentbildung zurückzuführen.

Eine Untersuchung der Genexpression des Bakteriums *C. jejuni* nach Einfluss von Stressfaktoren, wie Hitzeschock oder Senkung des pH-Wertes erlaubte die Identifizierung von Genen, deren Produkte nicht nur stressinduziert reguliert werden, sondern möglicherweise auch der humanen Immunabwehr entgegenwirken. Am Beispiel von Genen, die für die Tryptophansynthese kodieren, ist es in dieser Arbeit gelungen die ersten Hinweise auf die mögliche Antwort von *C. jejuni* auf die humane Immunabwehr zu finden. In diesem Fall würde der Tryptophan-Signalweg ein therapeutisches Angriffsziel bieten, über welches die Abschwächung der bakteriellen Pathogenität bzw. die Stärkung der humanen Immunabwehr erreicht werden könnte.

VI. ABKÜRZUNGEN

α	<i>alpha</i>
β	<i>beta</i>
γ	<i>gamma</i>
κ	<i>kappa</i>
Abb:	Abbildung
AMAN	akute motorische axonale Neuropathie
APS	Ammoniumpersulfat
bidest	zweifach destilliert
BMPs	<i>bone morphogenetic proteins</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCo-2	Kolon-Karzinom Zelllinie
CCL	Chemokin, CC-Motiv, Ligand
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDT	<i>cytolethal distending toxin</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
CpG-	Cytidin-Guanosin-Dinukleotide
CRM	Kerntransportrezeptor
CXCL	Chemokin, CXC-Motiv, Ligand
d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DPBS	<i>Dulbecco's PBS</i>
EASE	<i>The Expression Analysis Systematic Explorer</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular related kinase</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-Dehydrogenase
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
GO	<i>GeneOntology</i>
h	Stunde(n)
HAT	Histonazetyltransferase
HDAC	Histondeazetyltransferase
HSP	Hitzeschockprotein
HT-29	Adenokarzinom Zelllinie
IDO	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IECs	intestinale Epithelzellen
IFN γ	Interferon gamma

IFNGR	IFN γ -Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
INT407	intestinale Zelllinie 407
IPSID	<i>immunoproliferative small intestinal disease</i>
IRAK	IL1-R assoziierten Kinase
I-Smads	inhibitorischen Smads
JAKs	Janus-Kinasen
JNK	c-jun Kinase
kDa	Kilodalton
KFB	Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik
KSF-Medium	<i>keratinocyte serum-free medium</i>
l	Liter
LBP	LPS-Bindungsprotein
LMB	Leptomycin B
LOS	Lipooligosaccharide
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	extrazelluläre leucinreiche Domäne
m	Meter
M	molar
mA	Milliampere
MALT	<i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute(n)
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MyD88	myeloider Differenzierungsmarker 88
N	Normal
NC	Nitrozellulose
NEAA	nicht-essenzielle Aminosäuren
NES	nukleäres Exportsignal
NF κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
OD $_x$	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
p.a.	zur Analyse
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
R-I	TGF β Rezeptor des Typs I
R-II	TGF β Rezeptor des Typs II
RKI	Robert Koch Institut
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Kulturmedium)
R-Smad	rezeptor-regulierten Proteine
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion in Echtzeit
s	Sekunde(n)
s.	siehe

SDS	Natriumdodecylsulfat
SLR	<i>Signal Log Ratio</i>
Smurf1	<i>Smad ubiquitination regulatory factor 1</i>
sog.	so genannt
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TIR-Domäne	zytoplasmatischer Toll/IL-1-Rezeptor
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptoren
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF6	TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Trp	Tryptophan
TSA	Trichostatin A
U	Unit(s)
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v	Volumenanteil
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
w	Gewichtsanteil
WC	Wilkins-Chalgren-Anaerobier-(Nährboden)
wt	wildtyp
z. B.	zum Beispiel
Nukleoside:	A Adenosin
	T Thymin
	G Guanosin
	C Cytosin

Verwendete numerische Kürzel:

k	kilo	10^3
m	milli	10^{-3}
μ	mikro	10^{-6}
n	nano	10^{-9}

VII. LITERATUR

Adeyeye A, Ogunlesi M, Odugbemi T (1989) Studies on the chemical constitution of cell wall lipopolysaccharide from *Campylobacter coli* Labet 227. *Int J Biol Macromol* 11: 145-149

Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H (2002) Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments 1. *Eur J Immunol* 32: 1958-1968

Al Salloom FS, Al Mahmeed A, Ismaeel A, Botta GA, Bakhiet M (2003) *Campylobacter*-stimulated INT407 cells produce dissociated cytokine profiles. *J Infect* 47: 217-224

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3 1. *Nature* 413: 732-738

Allen WE, Jones GE, Pollard JW, Ridley AJ (1997) Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages 1. *J Cell Sci* 110 (Pt 6): 707-720

Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42: 791-798

Angel P, Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation 1. *Biochim Biophys Acta* 1072: 129-157

Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G (1995) Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 182: 155-162

Bai S, Cao X (2002) A nuclear antagonistic mechanism of inhibitory Smads in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 277: 4176-4182

Bakhiet M, Al Salloom FS, Qareiballa A, Bindayna K, Farid I, Botta GA (2004) Induction of alpha and beta chemokines by intestinal epithelial cells stimulated with *Campylobacter jejuni*. *J Infect* 48: 236-244

Bambou JC, Giraud A, Menard S, Begue B, Rakotobe S, Heyman M, Taddei F, Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V (2004) In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal *Escherichia coli* strain 1. *J Biol Chem* 279: 42984-42992

Bang DD, Wedderkopp A, Pedersen K, Madsen M (2002) Rapid PCR using nested primers of the 16S rRNA and the hippuricase (*hip O*) genes to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental samples 1. *Mol Cell Probes* 16: 359-369

Bereswill S, Kist M (2002) Molecular microbiology and pathogenesis of *Helicobacter* and *Campylobacter* updated: a meeting report of the 11th conference on *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms. *Mol Microbiol* 45: 255-262

Bitzer M, von Gersdorff G, Liang D, Dominguez-Rosales A, Beg AA, Rojkind M, Bottlinger EP (2000) A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA 1. *Genes Dev* 14: 187-197

Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP, Blaser MJ (1988) Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis* 157: 472-479

- Blaser M, Cravens J, Powers BW, Wang WL (1978) Campylobacter enteritis associated with canine infection. *Lancet* 2: 979-981
- Blaser MJ, Duncan DJ, Warren GH, Wang WL (1983) Experimental Campylobacter jejuni infection of adult mice. *Infect Immun* 39: 908-916
- Blaser MJ, Hoverson D, Ely IG, Duncan DJ, Wang WL, Brown WR (1984) Studies of Campylobacter jejuni in patients with inflammatory bowel disease 18. *Gastroenterology* 86: 33-38
- Bocker U, Yezersky O, Feick P, Manigold T, Panja A, Kalina U, Herweck F, Rossol S, Singer MV (2003) Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression 2. *Int J Colorectal Dis* 18: 25-32
- Bossy-Wetzel E, Bakiri L, Yaniv M (1997) Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun 1. *EMBO J* 16: 1695-1709
- Bours V, Azarenko V, Dejardin E, Siebenlist U (1994) Human RelB (I-Rel) functions as a kappa B site-dependent transactivating member of the family of Rel-related proteins. *Oncogene* 9: 1699-1702
- Bras AM, Ketley JM (1999) Transcellular translocation of Campylobacter jejuni across human polarised epithelial monolayers. *FEMS Microbiol Lett* 179: 209-215
- Bucca G, Hindle Z, Smith CP (1997) Regulation of the dnaK operon of Streptomyces coelicolor A3(2) is governed by HspR, an autoregulatory repressor protein 2. *J Bacteriol* 179: 5999-6004
- Butzler JP, Skirrow MB (1979) Campylobacter enteritis. *Clin Gastroenterol* 8: 737-765
- Butzler JP (2004) Campylobacter, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect* 10: 868-876
- Carlin JM, Ozaki Y, Byrne GI, Brown RR, Borden EC (1989) Interferons and indoleamine 2,3-dioxygenase: role in antimicrobial and antitumor effects 8. *Experientia* 45: 535-541
- Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, Wolf SF, Young D, Clark SC, Trinchieri G (1991) Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers 2. *J Exp Med* 173: 869-879
- Chavand O, Spilsbury K, Rakoczy PE (2001) Addition of a c-myc epitope tag within the VEGF protein does not affect in vitro biological activity. *Biochem Cell Biol* 79: 107-112
- Cheung WL, Briggs SD, Allis CD (2000) Acetylation and chromosomal functions 3. *Curr Opin Cell Biol* 12: 326-333
- Chung CH, Goldberg AL (1981) The product of the lon (capR) gene in Escherichia coli is the ATP-dependent protease, protease La 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 4931-4935
- Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CM, Jr., Ko TC, Luo K (2004) Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis 2. *Nat Cell Biol* 6: 366-372
- de Martin R, Haendler B, Hofer-Warbinek R, Gaugitsch H, Wrann M, Schlusener H, Seifert JM, Bodmer S, Fontana A, Hofer E (1987) Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-beta gene family 1. *EMBO J* 6: 3673-3677
- De Melo MA, Gabbiani G, Pechere JC (1989) Cellular events and intracellular survival of Campylobacter jejuni during infection of HEp-2 cells. *Infect Immun* 57: 2214-2222

- Deming MS, Tauxe RV, Blake PA, Dixon SE, Fowler BS, Jones TS, Lockamy EA, Patton CM, Sikes RO (1987) Campylobacter enteritis at a university: transmission from eating chicken and from cats. *Am J Epidemiol* 126: 526-534
- Derynck R, Lindquist PB, Lee A, Wen D, Tamm J, Graycar JL, Rhee L, Mason AJ, Miller DA, Coffey RJ (1988) A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3 1. *EMBO J* 7: 3737-3743
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A (2001) TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29: 117-129
- Derynck R, Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling 2. *Nature* 425: 577-584
- Dignass A, Lynch-Devaney K, Kindon H, Thim L, Podolsky DK (1994) Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway 4. *J Clin Invest* 94: 376-383
- Dinarello CA (1999) Interleukin-18. *Methods* 19: 121-132
- Dinarello CA, Fantuzzi G (2003) Interleukin-18 and host defense against infection. *J Infect Dis* 187 Suppl 2: S370-S384
- Du M, Diss TC, Xu C, Peng H, Isaacson PG, Pan L (1996) Ongoing mutation in MALT lymphoma immunoglobulin gene suggests that antigen stimulation plays a role in the clonal expansion. *Leukemia* 10: 1190-1197
- Duckett CS, Perkins ND, Kowalik TF, Schmid RM, Huang ES, Baldwin AS, Jr., Nabel GJ (1993) Dimerization of NF-KB2 with RelA (p65) regulates DNA binding, transcriptional activation, and inhibition by an I kappa B-alpha (MAD-3). *Mol Cell Biol* 13: 1315-1322
- Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, Miyazono K (2001) Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation
1. *J Biol Chem* 276: 12477-12480
- Edlund S, Landstrom M, Heldin CH, Aspenstrom P (2002) Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA 3. *Mol Biol Cell* 13: 902-914
- Ely B, Pittard J (1979) Aromatic amino acid biosynthesis: regulation of shikimate kinase in Escherichia coli K-12 6. *J Bacteriol* 138: 933-943
- Everest PH, Goossens H, Butzler JP, Lloyd D, Knutton S, Ketley JM, Williams PH (1992) Differentiated Caco-2 cells as a model for enteric invasion by Campylobacter jejuni and C. coli. *J Med Microbiol* 37: 319-325
- Fernie DS, Park RW (1977) The isolation and nature of campylobacters (microaerophilic vibrios) from laboratory and wild rodents. *J Med Microbiol* 10: 325-329
- Fox JG (1991) Campylobacter infections and salmonellosis. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 6: 212-218
- Fox JG, Rogers AB, Whary MT, Ge Z, Taylor NS, Xu S, Horwitz BH, Erdman SE (2004) Gastroenteritis in NF-kappaB-deficient mice is produced with wild-type Campylobacter jejuni but not with C. jejuni lacking cytolethal distending toxin despite persistent colonization with both strains 2. *Infect Immun* 72: 1116-1125

- Friese MA, Hellwage J, Skerka C, Zipfel PF (2000) Komplement, ein Effektorsystem der angeborenen Immunität: Regulation durch Reconnectin/FHL-1 und Faktor H *Biospektrum* 5.00 6. Jahrgang: 364-369
- Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R (1992) *Inflammation basic principles and clinical correlates Raven Press, 2nd Edition, New York*
- Georgopoulos C, Welch WJ (1993) Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol* 9: 601-634
- Gerhard R, Schmidt G, Hofmann F, Aktories K (1998) Activation of Rho GTPases by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 increases intestinal permeability in Caco-2 cells 3. *Infect Immun* 66: 5125-5131
- Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL (2001) Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 167: 1882-1885
- Godschalk PC, Heikema AP, Gilbert M, Komagamine T, Ang CW, Glerum J, Brochu D, Li J, Yuki N, Jacobs BC, van Belkum A, Endtz HP (2004) The crucial role of Campylobacter jejuni genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barre syndrome. *J Clin Invest* 114: 1659-1665
- Gottesman S, Maurizi MR (1992) Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets 3. *Microbiol Rev* 56: 592-621
- Grant CC, Konkel ME, Cieplak W, Jr., Tompkins LS (1993) Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of Campylobacter jejuni in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. *Infect Immun* 61: 1764-1771
- Graves DT, Jiang Y (1995) Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med* 6: 109-118
- Grossmann J, Maxson JM, Whitacre CM, Orosz DE, Berger NA, Fiocchi C, Levine AD (1998) New isolation technique to study apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Am J Pathol* 153: 53-62
- Gruenheid S, Finlay BB (2003) Microbial pathogenesis and cytoskeletal function 1. *Nature* 422: 775-781
- Grunstein M (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription 2. *Nature* 389: 349-352
- Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino K, Okamura H, Nakanishi K, Kurimoto M, Tanimoto T, Flavell RA, Sato V, Harding MW, Livingston DJ, Su MS (1997) Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* 275: 206-209
- Gurian L, Klein K, Ward TT (1983) Role of Clostridium difficile and Campylobacter jejuni in relapses of inflammatory bowel disease. *West J Med* 138: 359-360
- Hacker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H (1998) CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* 17: 6230-6240
- Haller D, Holt L, Kim SC, Schwabe RF, Sartor RB, Jobin C (2003) Transforming growth factor-beta 1 inhibits non-pathogenic Gram negative bacteria-induced NF-kappa B recruitment to the interleukin-6 gene promoter in intestinal epithelial cells through modulation of histone acetylation 2. *J Biol Chem* 278: 23851-23860

- Ham J, Babij C, Whitfield J, Pfarr CM, Lallemand D, Yaniv M, Rubin LL (1995) A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death 2. *Neuron* 14: 927-939
- Han Y, Rogers N, Ransohoff RM (1999) Tumor necrosis factor-alpha signals to the IFN-gamma receptor complex to increase Stat1alpha activation 1. *J Interferon Cytokine Res* 19: 731-740
- Hanyu A, Ishidou Y, Ebisawa T, Shimanuki T, Imamura T, Miyazono K (2001) The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor-beta signalling 1. *J Cell Biol* 155: 1017-1027
- Harant H, Eldershaw SA, Lindley IJ (2001) Human macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20/LARC/Exodus/SCYA20 is transcriptionally upregulated by tumor necrosis factor-alpha via a non-standard NF-kappaB site. *FEBS Lett* 509: 439-445
- Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-579
- Hayaishi O (1996) Utilization of superoxide anion by indoleamine oxygenase-catalyzed tryptophan and indoleamine oxidation. *Adv Exp Med Biol* 398: 285-289
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099-1103
- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3: 196-200
- Hickey TE, Baqar S, Bourgeois AL, Ewing CP, Guerry P (1999) Campylobacter jejuni-stimulated secretion of interleukin-8 by INT407 cells. *Infect Immun* 67: 88-93
- Hickey TE, McVeigh AL, Scott DA, Michielutti RE, Bixby A, Carroll SA, Bourgeois AL, Guerry P (2000) Campylobacter jejuni cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 68: 6535-6541
- Hiller E, Zimmermann F, Wiebecke B (2001) Gastrointestinale Lymphome *Manual Gastrointestinale Tumoren*, Tumorzentrum München
- Hiroi M, Ohmori Y (2003) Constitutive nuclear factor kappaB activity is required to elicit interferon-gamma-induced expression of chemokine CXC ligand 9 (CXCL9) and CXCL10 in human tumour cell lines 1. *Biochem J* 376: 393-402
- Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, Chaplin DD (1991) Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 8485-8489
- Hood AM, Pearson AD, Shahamat M (1988) The extent of surface contamination of retailed chickens with Campylobacter jejuni serogroups. *Epidemiol Infect* 100: 17-25
- Horn PJ, Peterson CL (2002) Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription 1. *Science* 297: 1824-1827
- Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S (2002) Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 3: 1033-1040
- Horvath CM (2000) STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals 2. *Trends Biochem Sci* 25: 496-502

- Humphrey CD, Montag DM, Pittman FE (1986) Morphologic observations of experimental *Campylobacter jejuni* infection in the hamster intestinal tract. *Am J Pathol* 122: 152-159
- Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J (1993) The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *Lancet* 342: 571-574
- Hwang BJ, Park WJ, Chung CH, Goldberg AL (1987) *Escherichia coli* contains a soluble ATP-dependent protease (Ti) distinct from protease La. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5550-5554
- Hwang D (2001) Modulation of the expression of cyclooxygenase-2 by fatty acids mediated through toll-like receptor 4-derived signaling pathways. *FASEB J* 15: 2556-2564
- Imada A, Ina K, Shimada M, Yokoyama T, Yokoyama Y, Nishio Y, Yamaguchi T, Ando T, Kusugami K (2001) Coordinate upregulation of interleukin-8 and growth-related gene product-alpha is present in the colonic mucosa of inflammatory bowel 16. *Scand J Gastroenterol* 36: 854-864
- Imaizumi Y, Sugita S, Yamamoto K, Imanishi D, Kohno T, Tomonaga M, Matsuyama T (2002) Human T cell leukemia virus type-I Tax activates human macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 gene transcription via the NF-kappa B pathway 2. *Int Immunol* 14: 147-155
- Inman GJ, Nicolas FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS (2002) SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7 2. *Mol Pharmacol* 62: 65-74
- Isaacson PG (1994) Gastrointestinal lymphoma. *Hum Pathol* 25: 1020-1029
- Itoh F, Asao H, Sugamura K, Heldin CH, ten Dijke P, Itoh S (2001) Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads 1. *EMBO J* 20: 4132-4142
- Janeway CA Jr (1999) Das molekulare Arsenal des Immunsystems *Spektrum der Wissenschaft Spezial: Das Immunsystem*: 26-33
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code 4. *Science* 293: 1074-1080
- Jin S, Joe A, Lynett J, Hani EK, Sherman P, Chan VL (2001) JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol Microbiol* 39: 1225-1236
- Jin S, Song YC, Emili A, Sherman PM, Chan VL (2003) JlpA of *Campylobacter jejuni* interacts with surface-exposed heat shock protein 90alpha and triggers signalling pathways leading to the activation of NF-kappaB and p38 MAP kinase in epithelial cells. *Cell Microbiol* 5: 165-174
- Jones MA, Totemeyer S, Maskell DJ, Bryant CE, Barrow PA (2003) Induction of proinflammatory responses in the human monocytic cell line THP-1 by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 71: 2626-2633
- Kalina U, Koyama N, Hosoda T, Nuernberger H, Sato K, Hoelzer D, Herweck F, Manigold T, Singer MV, Rossol S, Bocker U (2002) Enhanced production of IL-18 in butyrate-treated intestinal epithelium by stimulation of the proximal promoter region 2. *Eur J Immunol* 32: 2635-2643
- Kaser A, Ludwiczek O, Holzmann S, Moschen AR, Weiss G, Enrich B, Graziadei I, Dunzendorfer S, Wiedermann CJ, Murzl E, Grasl E, Jasarevic Z, Romani N, Offner FA, Tilg H (2004) Increased expression of CCL20 in human inflammatory bowel disease 37. *J Clin Immunol* 24: 74-85
- Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL (2000) Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation 1. *Mol Cell* 6: 1365-1375

- Kim JM, Cho SJ, Oh YK, Jung HY, Kim YJ, Kim N (2002) Nuclear factor-kappa B activation pathway in intestinal epithelial cells is a major regulator of chemokine gene expression and neutrophil migration induced by *Bacteroides fragilis* enterotoxin 1. *Clin Exp Immunol* 130: 59-66
- Kindon H, Pothoulakis C, Thim L, Lynch-Devaney K, Podolsky DK (1995) Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein 2. *Gastroenterology* 109: 516-523
- Konkel ME, Mead DJ, Hayes SF, Cieplak W, Jr. (1992) Translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarized epithelial cell monolayer cultures. *J Infect Dis* 166: 308-315
- Konkel ME, Mead DJ, Cieplak W, Jr. (1993) Kinetic and antigenic characterization of altered protein synthesis by *Campylobacter jejuni* during cultivation with human epithelial cells. *J Infect Dis* 168: 948-954
- Konkel ME, Garvis SG, Tipton SL, Anderson DE, Jr., Cieplak W, Jr. (1997) Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* 24: 953-963
- Konkel ME, Kim BJ, Rivera-Amill V, Garvis SG (1999) Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Mol Microbiol* 32: 691-701
- Kopp E, Medzhitov R (2003) Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15: 396-401
- Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts 2. *Mol Cell Biol* 15: 1942-1952
- Kurisaki A, Kose S, Yoneda Y, Heldin CH, Moustakas A (2001) Transforming growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and Ran-dependent manner 1. *Mol Biol Cell* 12: 1079-1091
- Kuwabara S (2004) Guillain-Barre syndrome: epidemiology, pathophysiology and management. *Drugs* 64: 597-610
- Kwon JH, Keates S, Bassani L, Mayer LF, Keates AC (2002) Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3alpha (MIP-3alpha) production in normal colon and inflammatory bowel disease. *Gut* 51: 818-826
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 1. *Nature* 227: 680-685
- Lecuit M, Abachin E, Martin A, Poyart C, Pochart P, Suarez F, Bengoufa D, Feuillard J, Lavergne A, Gordon JI, Berche P, Guillevin L, Lortholary O (2004) Immunoproliferative small intestinal disease associated with *Campylobacter jejuni*. *N Engl J Med* 350: 239-248
- Lee KM, Kang BS, Lee HL, Son SJ, Hwang SH, Kim DS, Park JS, Cho HJ (2004) Spinal NF-kB activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Eur J Neurosci* 19: 3375-3381
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973-983

- Linard C, Marquette C, Mathieu J, Pennequin A, Clarencon D, Mathe D (2004) Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor 6. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58: 427-434
- Machesky LM, Hall A (1996) Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton 3. *Trends Cell Biol* 6: 304-310
- Madisen L, Webb NR, Rose TM, Marquardt H, Ikeda T, Twardzik D, Seyedin S, Purchio AF (1988) Transforming growth factor-beta 2: cDNA cloning and sequence analysis 2. *DNA* 7: 1-8
- Maruyama S, Katsube Y (1994) Adhesion activity of *Campylobacter jejuni* for intestinal epithelial cells and mucus and erythrocytes. *J Vet Med Sci* 56: 1123-1127
- Massague J (2003) Integration of Smad and MAPK pathways: a link and a linker revisited 11. *Genes Dev* 17: 2993-2997
- Masszi A, Di Ciano C, Sirokmany G, Arthur WT, Rotstein OD, Wang J, McCulloch CA, Rosivall L, Mucsi I, Kapus A (2003) Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition 1. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F911-F924
- McCaffrey RL, Fawcett P, O'Riordan M, Lee KD, Havell EA, Brown PO, Portnoy DA (2004) A specific gene expression program triggered by Gram-positive bacteria in the cytosol 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11386-11391
- McSweegan E, Walker RI (1986) Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. *Infect Immun* 53: 141-148
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397
- Melby K, Kildebo S (1988) Antibodies against *Campylobacter jejuni/coli* in patients suffering from campylobacteriosis or inflammatory bowel disease 1. *NIPH Ann* 11: 47-52
- Mellits KH, Mullen J, Wand M, Armbruster G, Patel A, Connerton PL, Skelly M, Connerton IF (2002) Activation of the transcription factor NF-kappaB by *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 148: 2753-2763
- Mempel M, Voelcker V, Kollisch G, Plank C, Rad R, Gerhard M, Schnopp C, Fraunberger P, Walli AK, Ring J, Abeck D, Ollert M (2003) Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor kappaB controlled gene activation by *Staphylococcus aureus* is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent 1. *J Invest Dermatol* 121: 1389-1396
- Miwa K, Asano M, Horai R, Iwakura Y, Nagata S, Suda T (1998) Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nat Med* 4: 1287-1292
- Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Luzzza F, Fusco A, Pallone F (1999) Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease 3. *J Immunol* 163: 143-147
- Monteleone G, Pallone F, MacDonald TT (2004) Smad7 in TGF-beta-mediated negative regulation of gut inflammation. *Trends Immunol* 25: 513-517
- Morgan BP, Harris CL (2003) Complement therapeutics; history and current progress. *Mol Immunol* 40: 159-170
- Muller M, Morotti A, Ponzetto C (2002) Activation of NF-kappaB is essential for hepatocyte growth factor-mediated proliferation and tubulogenesis 13. *Mol Cell Biol* 22: 1060-1072

- Murray HW, Szuro-Sudol A, Wellner D, Oca MJ, Granger AM, Libby DM, Rothermel CD, Rubin BY (1989) Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages. *Infect Immun* 57: 845-849
- Nachamkin I, Yang XH, Stern NJ (1993) Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three-day-old chicks: analysis with flagellar mutants. *Appl Environ Microbiol* 59: 1269-1273
- Narumiya S (1996) The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem (Tokyo)* 120: 215-228
- Nepomuceno RR, Tenner AJ (1998) C1qRP, the C1q receptor that enhances phagocytosis, is detected specifically in human cells of myeloid lineage, endothelial cells, and platelets. *J Immunol* 160: 1929-1935
- Nobes CD, Hall A (1995) Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility 1. *Biochem Soc Trans* 23: 456-459
- Ottlinger ME, Lin S (1988) *Clostridium difficile* toxin B induces reorganization of actin, vinculin, and talin in cultured cells 1. *Exp Cell Res* 174: 215-229
- Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Moule S, Pallen MJ, Penn CW, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, van Vliet AH, Whitehead S, Barrell BG (2000) The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403: 665-668
- Parsonnet J, Isaacson PG (2004) Bacterial infection and MALT lymphoma. *N Engl J Med* 350: 213-215
- Paul W (1998) *Fundamental Immunology Raven Press, 4th Edition, New York*
- Paulukat J, Bosmann M, Nold M, Garkisch S, Kampfer H, Frank S, Raedle J, Zeuzem S, Pfeilschifter J, Muhl H (2001) Expression and release of IL-18 binding protein in response to IFN-gamma 1. *J Immunol* 167: 7038-7043
- Pei Z, Burucoa C, Grignon B, Baqar S, Huang XZ, Kopecko DJ, Bourgeois AL, Fauchere JL, Blaser MJ (1998) Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infect Immun* 66: 938-943
- Piette J, Piret B, Bonizzi G, Schoonbroodt S, Merville MP, Legrand-Poels S, Bours V (1997) Multiple redox regulation in NF-kappaB transcription factor activation. *Biol Chem* 378: 1237-1245
- Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF, Jr., Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, Cominelli F (1999) IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells 14. *J Immunol* 162: 6829-6835
- Preston GA, Lyon TT, Yin Y, Lang JE, Solomon G, Annab L, Srinivasan DG, Alcorta DA, Barrett JC (1996) Induction of apoptosis by c-Fos protein 2. *Mol Cell Biol* 16: 211-218
- Puleston J, Cooper M, Murch S, Bid K, Makh S, Ashwood P, Bingham AH, Green H, Moss P, Dhillon A, Morris R, Strobel S, Gelinas R, Pounder RE, Platt A (2005) A distinct subset of chemokines dominates the mucosal chemokine response in inflammatory bowel disease 2. *Aliment Pharmacol Ther* 21: 109-120
- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA (2004) The JAK/STAT signaling pathway 1. *J Cell Sci* 117: 1281-1283

- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling 49. *Cell* 70: 401-410
- Ridley AJ, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-399
- Robert Koch Institut (2001) aktualisierte Ausgabe von Epidemiologischem Bulletin 35/ 1999
- Robert Koch Institut (2004) Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und public health *Epidemiologisches Bulletin* 31/ 2004: 251-260
- Roberts AB, Sporn MB (1992) Differential expression of the TGF-beta isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues. *Mol Reprod Dev* 32: 91-98
- Roberts AB (1998) Molecular and cell biology of TGF-beta 13. *Miner Electrolyte Metab* 24: 111-119
- Rombouts K, Niki T, Greenwel P, Vandermonde A, Wielant A, Hellemans K, De Bleser P, Yoshida M, Schuppen D, Rojkind M, Geerts A (2002) Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses collagen synthesis and prevents TGF-beta(1)-induced fibrogenesis in skin fibroblasts 1. *Exp Cell Res* 278: 184-197
- Rother K, Till GO, Hänsch GM (1997) The complement system. *Springer Berlin, Heidelberg, New York*
- Russell RG, O'Donnoghue M, Blake DC, Jr., Zulty J, DeTolla LJ (1993) Early colonic damage and invasion of *Campylobacter jejuni* in experimentally challenged infant *Macaca mulatta*. *J Infect Dis* 168: 210-215
- Saccani S, Pantano S, Natoli G (2001) Two waves of nuclear factor kappaB recruitment to target promoters. *J Exp Med* 193: 1351-1359
- Saccani S, Pantano S, Natoli G (2002) p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nat Immunol* 3: 69-75
- Saccani S, Natoli G (2002) Dynamic changes in histone H3 Lys 9 methylation occurring at tightly regulated inducible inflammatory genes 23. *Genes Dev* 16: 2219-2224
- Shi Y, Massague J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus 4. *Cell* 113: 685-700
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189: 1777-1782
- Siegesmund AM, Konkel ME, Klena JD, Mixer PF (2004) *Campylobacter jejuni* infection of differentiated THP-1 macrophages results in interleukin 1 beta release and caspase-1-independent apoptosis 1. *Microbiology* 150: 561-569
- Smibert RM (1969) *Vibrio fetus* var. *intestinalis* isolated from the intestinal content of birds. *Am J Vet Res* 30: 1437-1442
- Smibert RM (1978) The genus *Campylobacter*. *Annu Rev Microbiol* 32: 673-709
- Smith MF, Jr., Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S, Goldberg JB (2003) Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells 8. *J Biol Chem* 278: 32552-32560

- Stintzi A (2003) Gene expression profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth temperature variation 1. *J Bacteriol* 185: 2009-2016
- Sugita S, Kohno T, Yamamoto K, Imaizumi Y, Nakajima H, Ishimaru T, Matsuyama T (2002) Induction of macrophage-inflammatory protein-3 α gene expression by TNF-dependent NF- κ B activation 1. *J Immunol* 168: 5621-5628
- Tajima Y, Goto K, Yoshida M, Shinomiya K, Sekimoto T, Yoneda Y, Miyazono K, Imamura T (2003) Chromosomal region maintenance 1 (CRM1)-dependent nuclear export of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor- β signaling by Smad7 1. *J Biol Chem* 278: 10716-10721
- Takai Y, Sasaki T, Tanaka K, Nakanishi H (1995) Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* 20: 227-231
- Takeda K, Akira S (2003) Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol* 5: 143-153
- 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 M, Okura T, Mori T, Akita K, Ohta T, Ikeda M, Ikegami H, Kurimoto M (1999) Intracellular production of interleukin-18 in human epithelial-like cell lines is enhanced by hyperosmotic stress in vitro 2. *Cell Tissue Res* 297: 467-473
- Tapon N, Hall A (1997) Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton 1. *Curr Opin Cell Biol* 9: 86-92
- Tauxe RV (2001) Food safety and irradiation: protecting the public from foodborne infections. *Emerg Infect Dis* 7: 516-521
- Taylor MW, Feng GS (1991) Relationship between interferon- γ , indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J* 5: 2516-2522
- Thies FL, Karch H, Hartung HP, Giegerich G (1999a) Cloning and expression of the dnaK gene of *Campylobacter jejuni* and antigenicity of heat shock protein 70. *Infect Immun* 67: 1194-1200
- Thies FL, Karch H, Hartung HP, Giegerich G (1999b) The ClpB protein from *Campylobacter jejuni*: molecular characterization of the encoding gene and antigenicity of the recombinant protein. *Gene* 230: 61-67
- Ueguchi C, Kakeda M, Yamada H, Mizuno T (1994) An analogue of the DnaJ molecular chaperone in *Escherichia coli* 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1054-1058
- Underhill DM, Ozinsky A (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection 3. *Curr Opin Immunol* 14: 103-110
- Walker RI, Caldwell MB, Lee EC, Guerry P, Trust TJ, Ruiz-Palacios GM (1986) Pathophysiology of *Campylobacter enteritis*. *Microbiol Rev* 50: 81-94
- Wassenaar TM, van der Zeijst BA, Ayling R, Newell DG (1993) Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression. *J Gen Microbiol* 139 (Pt 6): 1171-1175
- Wassenaar TM (1997) Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin Microbiol Rev* 10: 466-476

- Watanabe M, Masuyama N, Fukuda M, Nishida E (2000) Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal 46. *EMBO Rep* 1: 176-182
- Weijer S, Florquin S, van der PT (2005) Endogenous interleukin-12 improves the early antimicrobial host response to murine *Escherichia coli* peritonitis 2. *Shock* 23: 54-58
- Wooldridge KG, Ketley JM (1997) *Campylobacter*-host cell interactions. *Trends Microbiol* 5: 96-102
- Xiao Z, Liu X, Henis YI, Lodish HF (2000) A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad 3 determines its ligand-induced nuclear translocation 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7853-7858
- Xiao Z, Watson N, Rodriguez C, Lodish HF (2001) Nucleocytoplasmic shuttling of Smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signals 1. *J Biol Chem* 276: 39404-39410
- Xu L, Kang Y, Col S, Massague J (2002) Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus 1. *Mol Cell* 10: 271-282
- Xu W, Angelis K, Danielpour D, Haddad MM, Bischof O, Campisi J, Stavnezer E, Medrano EE (2000) Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type beta transforming growth factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5924-5929
- Yakymovych I, ten Dijke P, Heldin CH, Souchelnytskyi S (2001) Regulation of Smad signaling by protein kinase C 1. *FASEB J* 15: 553-555
- Yamamoto T, Yamamoto S, Kataoka T, Tokunaga T (1994) Ability of oligonucleotides with certain palindromes to induce interferon production and augment natural killer cell activity is associated with their base length. *Antisense Res Dev* 4: 119-122
- Yasui H, Takai K, Yoshida R, Hayaishi O (1986) Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: its possible occurrence in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 6622-6626
- Yuki N, Susuki K, Koga M, Nishimoto Y, Odaka M, Hirata K, Taguchi K, Miyatake T, Furukawa K, Kobata T, Yamada M (2004) Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barre syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11404-11409
- Zhu J, Meinersmann RJ, Hiatt KL, Evans DL (1999) Apoptotic effect of outer-membrane proteins from *Campylobacter jejuni* on chicken lymphocytes 37. *Curr Microbiol* 38: 244-249
- Zhu J, Krishnegowda G, Gowda DC (2004) Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols (GPIs) of *Plasmodium falciparum*: The requirement of ERK, p38, JNK and NF-kappa B pathways for the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide 1. *J Biol Chem*

Nr.	Genreferenz	Bezeichnung	Abkürzung	durchschnittliche n-fache Veränderung	Proteinbindung	Signaltransduktion	Kinase/Transferase	Enzymregulation		Inflammation	Proliferation	Wachstum	Entwicklung	Apoptose	sonstige biol.Funkt.
23	201170_s_at	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	BHLHB2	3,81											
24	36711_at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	MAFF	3,74											
25	202934_at	hexokinase 2	HK2	3,62							x				
26	213988_s_at	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	SAT	3,53											
27	218723_s_at	response gene to complement 32	RGC32	3,37							x				
28	201849_at	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	BNIP3	3,22										x	
29	202644_s_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	TNFAIP3	3,14										x	
30	211676_s_at	interferon gamma receptor 1 /// interferon gamma receptor 1	IFNGR1	3,08		x				x					
31	208893_s_at	dual specificity phosphatase 6	DUSP6	2,94							x				
32	201667_at	gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	GJA1	2,91								x			
33	202672_s_at	activating transcription factor 3	ATF3	2,89											
34	209774_x_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	2,89	x					x					
35	218000_s_at	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	PHLDA1	2,86											
36	201884_at	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	CEACAM5	2,80						x					
37	202643_s_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	TNFAIP3	2,80											
38	204619_s_at	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	2,76									x		
39	201631_s_at	immediate early response 3	IER3	2,68								x			
40	202431_s_at	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	MYC	2,65							x				
41	205569_at	lysosomal-associated membrane protein 3	LAMP3	2,62							x				
42	207850_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CXCL3	2,61	x	x				x					
43	210538_s_at	baculoviral IAP repeat-containing 3	BIRC3	2,54										x	
44	205239_at	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	AREG	2,52	x						x				
45	205009_at	trefoil factor 1 (breast cancer, estrogen-inducible sequence expressed in)	TFF1	2,39	x					x					
46	214683_s_at	CDC-like kinase 1	CLK1	2,39							x				
47	205027_s_at	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	MAP3K8	2,33								x			
48	211603_s_at	ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF) /// ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF)	ETV4	2,32											
49	208961_s_at	core promoter element binding protein	COPEB	2,30						x					

Nr.	Genreferenz	Bezeichnung	Abkürzung	durchschnittliche n-fache Veränderung	Proteinbindung	Signaltransduktion	Kinase/Transferase	Enzymregulation		Inflammation	Proliferation	Wachstum	Entwicklung	Apoptose	sonstige biol. Funkt.
50	201250_s_at	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	SLC2A1	2,25								x			
51	204351_at	S100 calcium binding protein P	S100P	2,23											
52	204818_at	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	HSD17B2	2,22											
53	204748_at	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	PTGS2	2,19						x					
54	207102_at	aldo-keto reductase family 1, member D1 (delta 4-3-ketosteroid-5-beta-reductase)	AKR1D1	2,17											
55	201502_s_at	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NFKBIA	2,13						x					
56	219951_s_at	chromosome 20 open reading frame 12	C20orf12	2,13											
57	202074_s_at	optineurin	OPTN	2,08											x
58	203373_at	suppressor of cytokine signaling 2	SOCS2	2,08	x					x					
59	202149_at	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	NEDD9	2,07		x					x				
60	202693_s_at	serine/threonine kinase 17a (apoptosis-inducing)	STK17A	2,07										x	
61	220232_at	stearoyl-CoA desaturase 4	SCD4	2,04											
62	209295_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	TNFRSF10B	2,02		x				x					
63	202393_s_at	TGFB inducible early growth response	TIEG	2,00							x				
64	211527_x_at	vascular endothelial growth factor	VEGF	1,99	x						x				
65	201464_x_at	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	JUN	1,94								x			
66	202936_s_at	SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal)	SOX9	1,76									x		
Gesamt					13	7	0	0		20	10	8	2	4	1

1.2 Herunterregulierte Gene

Nr.	Genreferenz	Bezeichnung	Abkürzung	durchschnittliche n-fache Veränderung	Proteinbindung	Signaltransduktion	Kinase/Transferase	Enzymregulation		Inflammation	Proliferation	Wachstum	Entwicklung	Apoptose	sonstige biol.Funkt.
1	201162_at	insulin-like growth factor binding protein 7	IGFBP7	-9,85	x						x				
2	221994_at	LIM protein (similar to rat protein kinase C-binding enigma)	LIM	-9,73			x						x		
3	202878_s_at	complement component 1, q subcomponent, receptor 1	C1QR1	-7,13		x				x					
4	218272_at	hypothetical protein FLJ20699	FLJ20699	-6,41											
5	208060_at	paired box gene 7	PAX7	-6,08	x							x		x	
6	210607_at	fms-related tyrosine kinase 3 ligand	FLT3LG	-6,00		x					x				
7	213827_at	sorting nexin 26	SNX26	-5,35				x				x			
8	206588_at	deleted in azoospermia-like	DAZL	-5,21	x										
9	210683_at	neurturin	NRTN	-4,90		x						x			
10	213884_s_at	tripartite motif-containing 3	TRIM3	-4,79	x								x		
11	208575_at	histone 1, H3a	HIST1H3A	-4,71											
12	207151_at	adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary) receptor type I	ADCYAP1R1	-4,57		x							x		
13	206470_at	plexin C1	PLXNC1	-3,86		x							x		
14	207531_at	crystallin, gamma C	CRYGC	-3,84											x
15	205649_s_at	fibrinogen, A alpha polypeptide	FGA	-3,84		x					x				
16	220502_s_at	solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters), member 1	SLC13A1	-3,75								x			
17	208234_x_at	fibroblast growth factor receptor 2 (bacteria-expressed kinase, keratinocyte growth factor receptor, craniofacial dysostosis 1, Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome, Jackson-Weiss syndrome)	FGFR2	-3,56			x								x
18	202587_s_at	adenylate kinase 1	AK1	-3,54			x								x
19	213411_at	a disintegrin and metalloproteinase domain 22	ADAM22	-3,45											
20	205640_at	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1	ALDH3B1	-3,40											x
21	205265_s_at	aortic preferentially expressed protein 1	APEG1	-3,38			x				x				
22	219546_at	BMP2 inducible kinase	BMP2K	-3,30			x								x
23	215991_s_at	KIAA0090 protein	KIAA0090	-3,28											
24	213147_at	homeo box A10	HOXA10	-3,06	x								x		
25	215891_s_at	GM2 ganglioside activator	GM2A	-2,96				x							x
26	220139_at	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like	DNMT3L	-2,81			x						x		
27	212332_at	retinoblastoma-like 2 (p130)	RBL2	-2,80	x						x				
28	205635_at	huntingtin-associated protein interacting protein (duo)	HAPIP	-2,80				x				x			

Nr.	Genreferenz	Bezeichnung	Abkürzung	durchschnittliche n-fache Veränderung	Proteinbindung	Signaltransduktion	Kinase/Transferase	Enzymregulation		Inflammation	Proliferation	Wachstum	Entwicklung	Apoptose	sonstige biol. Funkt.
29	220999_s_at	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2 /// cytoplasmic FMR1 interacting protein 2	CYFIP2	-2,68				x		x					
30	206922_at	variable charge, Y-linked 1B	VCY1B	-2,59	x										
31	218596_at	TBC1 domain family, member 13	TBC1D13	-2,57											
32	207775_at	hypothetical protein MGC4859 similar to HSPA8	MGC4859	-2,45											
33	210419_at	BarH-like homeobox 2	BARX2	-2,32	x										
34	214121_x_at	PDZ and LIM domain 7 (enigma)	PDLIM7	-2,28	x							x			
35	213240_s_at	keratin 4	KRT4	-2,24								x			
36	205227_at	interleukin 1 receptor accessory protein	IL1RAP	-2,18		x				x					
37	213663_s_at	LOC389275	FLJ20152	-2,18	x										x
38	203354_s_at	pleckstrin and Sec7 domain containing 3	PSD3	-2,16		x									x
39	203185_at	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2	RASSF2	-2,13											
40	209368_at	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	EPHX2	-2,10	x					x					
41	203842_s_at	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 3	MAPRE3	-2,09	x										
42	206359_at	suppressor of cytokine signaling 3	SOCS3	-2,05								x			
43	218234_at	inhibitor of growth family, member 4	ING4	-2,03	x										
44	205813_s_at	methionine adenosyltransferase I, alpha	MAT1A	-2,03	x		x								x
45	204557_s_at	DAZ interacting protein 1	DZIP1	-2,00									x		
46	202555_s_at	myosin, light polypeptide kinase	MYLK	-2,00			x								x
Gesamt					14	8	8	4		4	5	8	7	1	10

2. Bakterielle Mikroarrays

2.1 Hochregulierte Gene

Nr.	orf reference	Beschreibung	durchschnittlicher Z-Score	Hitzeschockproteine	hypothetische Proteine	Bindungsproteine	putative Proteine	Enzyme	trp- Signalweg	sonstige
1	cj1383c	hypothetical protein Cj1383c	8,00		x					
2	cj0758	grpE; heat shock protein grpE	7,50	x						
3	cj0757	hrca; putative heat shock regulator	6,74	x						
4	cj0241c	putative iron-binding protein	5,63			x	x			
5	cj1232	hypothetical protein Cj1232	4,56		x					
6	cj0509c	clpb; ATP-dependent CLP protease ATP-binding subunit	4,25	x						
7	cj1386	ankyrin-repeat containing protein	4,07							x
8	cj1632c	putative periplasmic protein	3,85				x			
9	cj0859c	hypothetical protein Cj0859c	3,45		x					
10	cj0058	putative periplasmic protein	3,12				x			
11	cj0320	flih; putative flagellar assembly protein	3,12							x
12	cj1229	cbpa; putative curved-DNA binding protein	2,95	x						
13	cj0345	trpe; putative anthranilate synthase component I	2,86						x	
14	cj0387	arok; shikimate kinase	2,77					x	x	
15	cj0945c	putative helicase	2,68					x		
16	cj0759	dnak; heat shock protein dnaK	2,68	x						
17	cj0641	hypothetical protein Cj0641	2,65		x					
18	cj1042c	putative transcriptional regulatory protein	2,48				x			
19	cj0800c	hypothetical protein Cj0800c	2,39		x					
20	cj1507c	hypothetical protein Cj1507c	2,29					x		
21	cj1190c	putative MCP-domain signal transduction protein	2,29				x			
22	cj1660	putative integral membrane protein	2,29				x			
23	cj1230	hspr; putative heat shock transcriptional regulator	2,23	x						
24	cj1167	ldh; putative L-lactate dehydrogenase	2,20					x		
25	cj0892c	putative periplasmic protein	2,19				x			
26	cj1024c	signal-transduction regulatory protein	2,19					x		
27	cj0484	transmembrane transport protein	2,16							x
28	cj0346	trpd; anthranilate synthase component II	2,16						x	
29	cj0481	putative lyase	2,04					x		
30	cj1107	hypothetical protein Cj1107	2,01		x					
31	cj1497c	hypothetical protein Cj1497c	2,00		x					
32	cj0347	trpf; N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase	1,94						x	
33	cj0716	putative phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	1,87					x		
34	cj1271c	tyrs; tyrosyl-tRNA synthetase	1,70					x		
35	cj0437	sdha; succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	1,57					x		
36	cj1451	dut; putative dUTPase	1,52					x		
37	cj1366c	glms; glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase (isomerizing)	1,49					x		
38	cj0717	hypothetical protein Cj0717	1,42		x					
39	cj1015c	livg; branched-chain amino-acid ABC transport system ATP-binding protein	1,40			x				
40	cj1609	possible sulfate adenyltransferase	1,29					x		
41	cj0401	lyss; lysyl-tRNA synthetase	1,27					x		
42	cj1574c	hypothetical protein Cj1574c	1,27		x					
43	cj1291c	accb; putative biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	1,26					x		
44	cj0765c	hiss; histidyl-tRNA synthetase	1,24					x		
45	cj1081c	thie; thiamin-phosphate pyrophosphorylase	1,11					x		
46	cj1686c	topa; DNA topoisomerase I	1,09					x		
47	cj0804	pyrd; dihydroorotate dehydrogenase	1,05					x		
48	cj1608	possible two-component regulator	1,05							x
49	cj0118	hypothetical protein Cj0118	1,02		x					
50	cj0349	trpa; tryptophan synthase alpha chain	0,73						x	
51	cj0348	trpb; tryptophan synthase beta chain	0,73						x	
		Anzahl der Gene in jedem Gencluster:		6	10	2	7	18	6	4

2.2 Herunterregulierte Gene

Nr.	orf reference	Beschreibung	durchschnittlicher Z-Score	hypothetische Proteine	putative Proteine	putative periplasmatische Proteine	Bindungsproteine	Enzyme	Transportproteine	Membran+Transmembranproteine	ribosomale Proteine	sonstige
1	cj1012c	putative membrane protein	-1,01							x		
2	cj0922c	pebc; ABC-type amino-acid transporter ATP-binding protein	-1,02			x			x			
3	cj1369	putative transmembrane transport protein	-1,03						x	x		
4	cj1058c	guab; inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	-1,04					x				
5	cj0689	acka; acetate kinase	-1,06					x				
6	cj1225	hypothetical protein Cj1225	-1,07	x								
7	cj0628	putative lipoprotein	-1,09		x							
8	cj0426	ABC transporter ATP-binding protein	-1,09			x	x					
9	cj0427	hypothetical protein Cj0427	-1,09	x								
10	cj0899c	thij; 4-methyl-5(beta-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate synthesis protein	-1,11									x
11	cj1292	dcd; possible deoxycytidine triphosphate deaminase	-1,12					x				
12	cj0034c	putative periplasmic protein	-1,13			x						
13	cj0592c	putative periplasmic protein	-1,15			x						
14	cj1300	hypothetical protein Cj1300	-1,16	x								
15	cj0013	ilvd; dihydroxy-acid dehydratase	-1,20					x				
16	cj0900c	small hydrophobic protein	-1,25									x
17	cj1489c	ccoo; cb-type cytochrome C oxidase subunit II	-1,33					x				
18	cj1041c	putative periplasmic ATP/GTP-binding protein	-1,39			x				x		
19	cj0146c	trxb; thioredoxin reductase	-1,43					x				
20	cj0245	rplt; 50S ribosomal protein L20	-1,44								x	
21	cj0473	nusg; putative transcription antitermination protein	-1,47		x							
22	cj0671	dcub; putative anaerobic C4-dicarboxylate transporter	-1,49						x			
23	cj0326	serc; phosphoserine aminotransferase	-1,51					x				
24	cj0239c	nifU protein homolog	-1,51									x
25	cj0854c	putative periplasmic protein	-1,55			x						
26	cj1224	putative iron-binding protein	-1,56				x					
27	cj1177c	gmk; guanylate kinase	-1,59					x				
28	cj1555c	hypothetical protein Cj1555c	-1,59	x								
29	cj1591	rpmj; 50S ribosomal protein L36	-1,65								x	
30	cj0428	hypothetical protein Cj0428	-1,66	x								
31	cj1502c	putp; sodium/proline symporter	-1,68						x			
32	cj0921c	peb1a; probable ABC-type amino-acid transporter periplasmic solute-binding protein	-1,71			x			x			
33	cj1486c	putative periplasmic protein	-2,00			x						
34	cj0471	rpmg; 50S ribosomal protein L33	-2,08								x	
35	cj0429c	hypothetical protein Cj0429c	-2,18	x								
36	cj0911	putative periplasmic protein	-2,47			x						
37	cj1283	ktrb; putative K+ uptake protein	-2,61						x			
38	cj0011c	putative non-specific DNA binding protein	-2,68			x						
39	cj0155c	rpme; 50S ribosomal protein L31	-2,74								x	
40	cj0788	hypothetical protein Cj0788	-3,05	x								
41	cj1210	putative integral membrane protein	-3,12							x		
42	cj0916c	hypothetical protein Cj0916c	-3,21	x								
43	cj0465c	hypothetical protein Cj0465c	-3,25	x								
44	cj0915	putative hydrolase	-3,27					x				
45	cj0917c	csta; carbon starvation protein A homolog	-3,33									x
46	cj0905c	alr; alanine racemase	-3,53					x				
47	cj0971	hypothetical protein Cj0971	-3,60	x								
48	cj1136	putative galactosyltransferase	-3,89					x				
49	cj0412	putative ATP /GTP binding protein	-6,43			x						
		Anzahl der Gene in jedem Gencluster:		10	2	7	5	12	6	4	4	4

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe.

Regensburg, Februar 2005

Silvia Eberhardt

BEDANKEN MÖCHTE ICH MICH bei allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere bei...

...**Herrn Prof. Dr. U. Bogdahn, Herrn Dr. A. Steinbrecher und Herrn Dr. G. Giegerich** für das entgegengebrachte Vertrauen bei der Vergabe dieses Themas, für den großen Freiraum bei dessen Bearbeitung und für die Bereitstellung geistiger und technischer Hilfe.

...**Herrn Prof. Dr. S. Schneuwly** für die Bereitschaft das Erstgutachten zu übernehmen und für die Betreuung und Unterstützung meines nicht immer ganz leichten Falls.

...den Mitarbeitern der Mikrobiologie, der Diagnostik und der Nährbodenküche, insbesondere **Herrn Prof. Dr. N. Lehn, Herrn Dr. W. Schneider-Brachert, Mike Aigner, Dr. Ludwig Deml und Alexander Eckhardt** für die Bereitstellung der Räume und Materialien, stete Hilfe und Unterstützung in allen Lebens- und Laborfragen und die freundschaftliche Atmosphäre, die ich dort immer erlebt habe.

...**Herrn Dr. T. Stempf** für die enorm hilfreiche Unterstützung beim Durchführen und Analysieren der Mikroarray- und RT-PCR-Untersuchungen.

...**Herrn Prof. Dr. M. Blaser** für die Bereitstellung der *C. jejuni*-Stämme und ihrer Mutanten.

...**Herrn Dr. M. Biebl** für die Bereitstellung der Kotproben.

...**Herrn Dr. U. Reischl** für die Identifizierung der isolierten DNA.

...**Frau Kristin Hergert** für die hervorragende Unterstützung, ihr Engagement und das angenehme Arbeitsklima, auf das sie einen erheblichen Einfluss hatte.

...**Anett Dörfelt, Matthias Hornberg, Annette Lohmeier, André Müller, Xiomara Pedre Villareal, Jutta Schipka, Arabel Vollmann**, die gründliche Korrekturleserin **Eva-Maria Störr** und allen anderen Kolleginnen und Kollegen aus der neurologischen Forschungsgruppe und aus dem H3 für die immer selbstverständlich entgegengebrachte Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie das gute Arbeitsklima.

...der **Deutschen Forschungsgemeinschaft**, die im Rahmen des SFB 585 für meine Stelle und die benötigten Forschungsmittel aufkam.

...**Hanns** und meinen **Eltern** für ihre beständige Unterstützung, Aufmunterung und große Geduld.