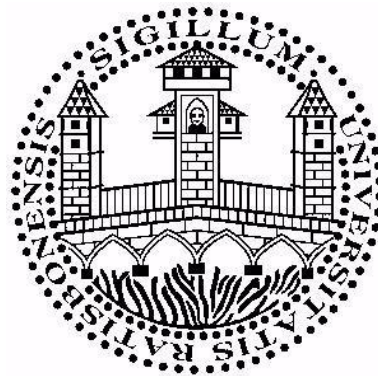


**Dagmar Reithmeier- Rost**

---

**Immunmodulation durch Interaktion des  
*Yersinia enterocolitica* V- Antigens  
mit Rezeptoren des angeborenen  
Immunsystems**

---



**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Universität Regensburg**

**Immunmodulation durch Interaktion des  
*Yersinia enterocolitica* V- Antigens  
mit Rezeptoren des angeborenen  
Immunsystems**

---

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Universität Regensburg 2005**

**vorgelegt von  
Dagmar Reithmeier- Rost  
aus Landshut  
2005**

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Prüfungsausschuß:

Prof. Dr. G. Märkl

Prof. Dr. H. Grobecker

Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Prof. Dr. A. Göpferich

# Publikationsliste

Bislang gingen die Forschungsergebnisse dieser Dissertation in folgende Veröffentlichungen ein:

**Reithmeier-Rost D**, Bierschenk S, Filippova N, Schröder-Braunstein J, Sing A 2004. *Yersinia V* antigen induces both TLR homo- and heterotolerance in an IL-10-involving manner. *Cell. Immunol.* *In press.*

Sing A, **Rost D**, Tvardovskaia N, Roggenkamp A, Wiedemann A, Kirschning CJ, Aepfelbacher M., Heesemann J. 2002. *Yersinia V*-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin-10 mediated immunosuppression. *J. Exp. Med.* 196: 1017-1024.

Sing A, Tvardovskaia N, **Rost D**, Kirschning CJ, Wagner H, Heesemann J. 2003. Contribution of toll-like receptors 2 and 4 in an oral *Yersinia enterocolitica* mouse infection model. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 341-348.

Sing A, **Rost D**, Tvardovskaia N, Roggenkamp A, Geiger AM, Kirschning CJ, Wiedemann A, Aepfelbacher M, Heesemann J. 2003. Mechanisms of *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen. *Adv. Exp. Med. Biol.* 529: 165-167.

Sing A, **Reithmeier-Rost D**, Bouabe H, Bierschenk S, Haase R, Ruckdeschel K, Heesemann J. TLR2-mediated endocytosis of *Yersinia V*-antigen results in its sensing by Nod1. Eingereicht.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>11</b>
1.1	Die Gattung <i>Yersinia</i> .....	11
1.2	Infektion mit Yersinien: Epidemiologie, Pathogenese, Symptomatik und Therapie.....	12
1.2.1	Der Pesterreger <i>Y. pestis</i> .....	12
1.2.2	Die enteropathogenen Yersinien: <i>Y. enterocolitica</i> und <i>Y. pseudotuberculosis</i> .....	13
1.2.2.1	<i>Yersinia enterocolitica</i> .....	13
1.2.3	Unterschiede zwischen <i>Y. pestis</i> und den enteropathogenen Yersinien .	15
1.3	Virulenzfaktoren von Yersinien .....	16
1.3.1	Invasine und Adhäsine .....	16
1.3.2	Typ III- Proteinsekretion und <i>Yersinia</i> - Effektorproteine (Yops) .....	17
1.3.3	<i>Yersinia</i> - Effektorproteine .....	18
1.3.4	Das Virulenz-Antigen (V –Antigen, LcrV).....	21
1.3.4.1	Beteiligung von LcrV an der Regulation des TTSS und an der Sekretion der Yops .....	21
1.3.4.2	Mitwirkung an der Translokation von Yops und der Ausbildung eines Translokationskanals in Zellmembranen .....	22
1.3.4.3	Immunmodulation durch LcrV .....	23
1.3.4.4	Struktur des V- Antigens.....	25
1.3.4.5	Das V- Antigen anderer Pathogene.....	26
1.3.5	Das <i>Yersiniabaktin</i> - Eisenaufnahmesystem .....	27
1.3.6	Weitere Virulenzfaktoren von <i>Y. pestis</i> .....	27
1.4	Aspekte der angeborenen Immunantwort des Wirts bei <i>Yersinia</i> Infektionen .....	28
1.4.1	Zelluläre Abwehr an vorderster Front .....	28
1.4.2	Zytokine als Effektoren der angeborenen Immunantwort:TNF- $\alpha$ und IL-10 als Gegenspieler .....	29
1.4.3	Das TLR- System .....	30
1.4.4	Das Nod- System.....	34
1.4.5	Störung der Makrophagenabwehr durch pathogene Bakterien.....	36
1.4.6	Makrophagendeaktivierung im Rahmen einer TLR- Toleranz.....	37
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNGEN.....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>40</b>
3.1	Bakterienstämme .....	40
3.2	Eukaryotische Zelllinien und Kulturmedien .....	41
3.3	Oligonukleotide und Plasmide.....	41

3.3.1	Oligonukleotide für die Integration von PCR- Produkten in Expressionvektoren.....	41
3.3.2	Ortsspezifische Mutagenese.....	42
3.3.3	Expressionsvektoren und klonierte Gene .....	42
<b>3.4</b>	<b>Enzyme .....</b>	<b>44</b>
3.4.1	Restriktionsenzyme .....	44
3.4.2	Enzyme für die PCR, Ligation und Proteinreinigung bzw. –spaltung .....	44
<b>3.5</b>	<b>Antikörper.....</b>	<b>45</b>
3.5.1	Primäre Antikörper für indirekte Immundetektion nach SDS-PAGE und Western Transfer sowie für Immunpräzipitationen, Immunfluoreszenz- und FACS-Analysen .....	45
3.5.2	Sekundäre Antikörper für Western Transfer- Analysen .....	46
3.5.3	Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen.....	46
<b>3.6</b>	<b>Chemikalien.....</b>	<b>47</b>
<b>3.7</b>	<b>Kits .....</b>	<b>48</b>
<b>3.8</b>	<b>Weitere Materialien .....</b>	<b>48</b>
<b>3.9</b>	<b>Peptide und Proteine .....</b>	<b>49</b>
<b>3.10</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>49</b>
<b>4</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>51</b>
4.1.1	Präparation von DNA.....	51
4.1.1.1	Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> und <i>Y. enterocolitica</i> .....	51
4.1.1.2	Präparation von DNA-Fragmenten nach elektrophoretischer Auftrennung.....	51
4.1.1.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA .....	51
4.1.1.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	52
4.1.2	Visualisierung von DNA .....	52
4.1.2.1	Sequenzierung von DNA .....	53
4.1.3	Enzymatische Behandlung von DNA .....	53
4.1.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	53
4.1.3.2	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	54
4.1.3.3	Ligation .....	54
4.1.3.4	Transformationskontrolle in <i>E. coli</i> mittels PCR.....	55
<b>4.2</b>	<b>Biochemische Methoden.....</b>	<b>55</b>
4.2.1	Expression und Reinigung rekombinanter Proteine mit (His) <sub>6</sub> - Tag.....	55
4.2.1.1	Affinitätschromatographie und Entsalzung .....	55
4.2.1.2	Gelfiltration .....	57
4.2.2	Protein-Analysen .....	58
4.2.2.1	Endotoxintest.....	58
4.2.2.2	MALDI- MS.....	58
4.2.2.3	Proteinquantifizierung .....	58
4.2.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	58

4.2.2.5	Proteintransfer auf Membranen (Western Blot) .....	59
4.2.2.6	Immunologische Detektion (Immunoblot) .....	59
4.2.3	(Ko-)Immunpräzipitationsexperimente zur Analyse von Protein- Protein- Interaktionen .....	60
<b>4.3</b>	<b>Mikrobiologische Methoden.....</b>	<b>61</b>
4.3.1	E.coli.....	61
4.3.1.1	Kultivierung und Stammhaltung von <i>E. coli</i> .....	61
4.3.1.2	Herstellung Calcium-kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen nach Hanahan.....	61
4.3.1.3	Transformation Calcium-kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen .....	62
4.3.2	<i>Y. enterocolitica</i> .....	62
4.3.2.1	Kultivierung und Stammhaltung von <i>Y. enterocolitica</i> .....	62
4.3.2.2	Herstellung elektrokompenter Yersinien .....	63
4.3.2.3	Transformation elektrokompenter Yersinien .....	63
4.3.2.4	Vorbereitung von <i>Yersinia</i> -Stämmen für <i>in vitro</i> Infektionsexperimente .....	63
4.3.2.5	Isolierung von sezernierten Proteinen (Yops) von <i>Y. enterocolitica</i> ..	64
<b>4.4</b>	<b>Zellbiologische und immunologische Methoden .....</b>	<b>64</b>
4.4.1	Gewinnung und <i>in vitro</i> - Stimulation von Peritonealmakrophagen (PPMs) 64	
4.4.2	Gewinnung, Ausdifferenzierung und <i>in vitro</i> - Stimulation von murinen Knochenmarksmakrophagen .....	65
4.4.3	Kultivierung und Stimulation von Mono- Mac-6- Zellen (MM6; Ziegler- Heitbrock).....	65
4.4.4	Kultivierung von HEK- 293- Zellen .....	66
4.4.5	Kultivierung von HeLa-Zellen.....	67
4.4.5.1	Ablösen adhärenter HeLa-Zellen mit Trypsin/EDTA.....	67
4.4.6	Kultivierung von J774A.1 Makrophagen .....	67
4.4.7	Überprüfung der Vitalität von Zellen .....	68
4.4.8	Kryokonservierung von Zellen .....	68
4.4.9	Infektion von HeLa- Zellen bzw. J774A.1- Makrophagen mit <i>Y.</i> <i>enterocolitica</i> .....	68
4.4.10	Färbung des Aktinzytoskeletts mit Rhodamin- Phalloidin .....	69
4.4.11	Immunfluoreszenzfärbungen .....	69
4.4.12	Doppelimmunfluoreszenzfärbung zur Differenzierung von intrazellulären und extrazellulären Yersinien.....	70
4.4.13	Translokation von NF- $\kappa$ B .....	70
4.4.14	FACS- Analysen .....	71
4.4.15	ELISA für Zytokinbestimmungen .....	71
4.4.16	Transfektion von HEK 293- Zellen und Makrophagen .....	71
4.4.16.1	HEPES- Transfektion mit Calciumphosphat .....	71
4.4.16.2	Transfektion mit ExGen 500 .....	72
4.4.17	Bestimmung der NF- $\kappa$ B- abhängigen Luciferaseaktivität.....	72
<b>4.5</b>	<b>Tierversuche .....</b>	<b>73</b>
4.5.1	Mäuse.....	73
4.5.2	Experimentelle Infektion von Mäusen .....	73
4.5.3	Erfassung der Yersinienzahlen in Milz, Leber und Peyer`schen Plaques	74
<b>4.6</b>	<b>Statistische Auswertungen.....</b>	<b>74</b>

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>75</b>
<b>5.1</b>	<b>Unterdrückung der angeborenen Immunantwort durch LcrV- induziertes Interleukin-10</b> .....	<b>75</b>
5.1.1	IL-10- abhängige Makrophagendeaktivierung als Pathomechanismus von LcrV	75
<b>5.2</b>	<b>LcrV führt über CD14 und TLR2 zu Interleukin-10- vermittelter TNF<math>\alpha</math>- Suppression</b> .....	<b>85</b>
5.2.1	CD14/TLR2- abhängige Immunmodulation durch LcrV .....	85
5.2.2	Identifizierung der TLR2- wirksamen Domäne von LcrV.....	89
<b>5.3</b>	<b>Bedeutung der TLR2- vermittelten Immunsuppression durch LcrV im Mausinfektionsmodell</b> .....	<b>92</b>
5.3.1	LcrV mit Punktmutation in der TLR2- aktiven Region (K42Q) verliert immunsuppressorische Aktivität.....	92
5.3.2	Konstruktion einer Yersinien- Mutante mit K42Q- Mutation im LcrV- Gen und Testung <i>in vitro</i> .....	99
5.3.3	Testung der Yersinien- Mutante mit K42Q- Austausch im LcrV im Mausinfektionsmodell.....	106
<b>5.4</b>	<b>Untersuchungen zur Interaktion von LcrV mit Nod- PAMP- Rezeptoren</b> <b>112</b>	
5.4.1	Nod1/2- vermittelte IL-10- Induktion durch LcrV .....	112
5.4.2	TLR2- abhängige Endozytose von LcrV .....	122
5.4.3	Bedeutung der Transportfunktion von TLR2 für die LcrV- vermittelte Nod- Aktivierung .....	126
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>131</b>
<b>6.1</b>	<b>LcrV nutzt Induktion von IL-10 zur Immunevasion</b> .....	<b>132</b>
<b>6.2</b>	<b>LcrV nutzt CD14 und TLR2, Rezeptoren der angeborenen Immunität mit extrazellulärer Erkennungsdomäne, zur Immunevasion aus</b> .....	<b>139</b>
<b>6.3</b>	<b>Lokalisation der TLR2- aktiven Domäne von LcrV</b> .....	<b>143</b>
<b>6.4</b>	<b>Bedeutung der TLR2- vermittelten Immunsuppression bei einer <i>Y. enterocolitica</i>- Infektion im Mausmodell</b> .....	<b>146</b>
<b>6.5</b>	<b>LcrV moduliert die Wirtsimmunantwort über die intrazellulären Rezeptoren des angeborenen Immunsystems Nod1/2</b> .....	<b>150</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b> .....	<b>156</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>159</b>



## Abkürzungen

aa	Aminosäuren (amino acid)
Ail	<i>attachment invasion locus</i>
BLP	bakterielles Lipoprotein (= Pam3Cys)
BHI	<i>brain heart infusion</i>
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CARDIAK	<i>CARD-containing interleukin 1<math>\beta</math>-converting enzyme-associated kinase</i>
CD	Cytochalasin D
CFU	<i>colony forming units</i>
DAP	Diaminopimelinsäure
DN	dominant negativ
EGFP	<i>enhanced Green-fluorescent protein</i>
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
ELAM	<i>Endothelial cell-leukocyte adhesion molecule</i>
EPEC	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GFP	<i>Green-fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HEK 293	<i>human embryonic kidney cells 293</i>
HEK 293-R	mit dem ELAM-Luciferase-Reporter-Plasmid transfizierte HEK 293-Zellen
HPI	<i>high pathogenicity island</i>
HSV	Herpes simplex Virus
IFN	Interferon
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
I $\kappa$ B	Inhibitor von NF- $\kappa$ B
Inv	Invasin
i.p.	intraperitoneal
IRAK	IL-1-Rezeptor-assozierte Kinase
IRF-3	<i>Interferon regulatory factor-3</i>
kb	Kilobase
LAL	<i>Limulus</i> Amöbocyten Lysat
LBP	LPS-Bindungsprotein
LCR	<i>Low Calcium Response</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucin-rich repeats</i>
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCS	multi cloning site
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MD-2	<i>myeloid differentiation-2</i>
MDC	Monodansylcadaverin

---

MDP	Muramyldipeptid
MMTV	<i>mouse mammary tumour virus</i>
MOI	multiplicity of infection
MyD88	<i>myeloid differentiation factor-88</i>
MyfA	<i>mucoïd Yersinia factor A</i>
NACHT	<i>neuronal apoptosis inhibitor protein, CIITA, HET-E and TP1</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
NK-Zellen	<i>natural killer cells</i>
Nod	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OD	optische Dichte
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PAV	<i>Staphylococcus Protein A-LcrV-Fusionsprotein</i>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
Pla	<i>Yersinia pestis plasminogen activator</i>
p.o.	peroral
PPM	<i>proteose peptone- elicited macrophages</i>
PRR	<i>pattern-recognition receptors</i>
RICK	<i>RIP-like CARD-containing domain</i>
RIP2	<i>receptor interacting protein 2</i>
RSV	<i>respiratory syncytial virus</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>sodium dodecylsulfate polyacrylamid gelelectrophoresis</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
TAB	TAK1-Bindeprotein
TAK1	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math>-activated kinase 1</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TICAM	<i>TIR-containing adaptor molecule</i>
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor
TIRP	<i>TIR-containing protein</i>
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
TNF	Tumornekrose-Faktor
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TRAF6	<i>TNF-receptor-associated factor 6</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing IFN<math>\beta</math></i>
TTSS	Typ III-Protein-Sekretions-/Translokationssystem
Yop	<i>Yersinia outer protein</i>
YadA	<i>Yersinia-Adhäsın A</i>
YpkA	<i>Yersinia protein kinase A</i>
Yst	<i>Yersinia heat-stable enterotoxin</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Gattung *Yersinia*

Die Gattung *Yersinia* wurde früher als *Pasteurella* bezeichnet und erhielt 1964 ihren heutigen Namen, der auf den Schweizer Bakteriologen Alexandre Yersin zurückgeht, der 1894 in Hongkong während der 3. Pestpandemie den Pesterreger entdeckte (Winkle 1997). Die Gattung *Yersinia* wird der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet, von der bislang 11 Arten bekannt sind (Frederiksen, 1964). Yersinien sind pleomorphe, gramnegative, fakultativ anaerobe, kokkoide Stäbchenbakterien mit einem Wachstumsoptimum von 28°C, wobei sie sich auch bei 4°C vermehren können. Es sind drei humanpathogene Yersinien bekannt: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* (Brenner, 1979). Während *Y. pestis* der Erreger der Pest ist, stellen *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* die enteropathogenen Vertreter der Gattung dar (Knapp, 1988). *Y. pestis* ist unbeweglich, die enteropathogenen Yersinien hingegen sind bei Anzucht unter 30°C, nicht aber bei 37°C peritrich begeißelt und beweglich.

Yersinien sind als Gattung hinsichtlich biochemischer, mikrobiologischer und pathogenetischer Eigenschaften sehr heterogen. Dadurch lassen sich die zahlreichen taxonomischen Neuordnungen erklären. Erst molekularbiologische Methoden erlaubten eine genauere Abgrenzung des Genus (Übersicht, Heesemann 2001). Trotz dieser Schwierigkeiten werden Yersinien üblicherweise biochemisch mittels der sog. „Bunten Reihe“ differenziert. Die Erfassung des pathogenen Potentials eines Yersinienisolates bzw. epidemiologische Daten erlauben eine weitere Subtypisierung in Biotypen bzw. Serotypen.

So kann die Gattung *Yersinia* in eine nicht-pathogene Gruppe, die Biogruppe 1A, und bezüglich der Mausvirulenz in 2 Gruppen unterschiedlicher Pathogenität eingeteilt werden (Brubaker, 1991; Perry & Fetherston, 1997). Die hochpathogene, mausletale Gruppe umfasst *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* der Biogruppe 1B (letale Dosis  $LD_{50} < 1000$  Yersinien bei parenteraler Gabe). Zur schwachpathogenen, nicht mausletalen Gruppe gehören *Y. enterocolitica* der Biogruppen 2-5 ( $LD_{50} > 10^7$  Yersinien).

## 1.2 Infektion mit Yersinien: Epidemiologie, Pathogenese, Symptomatik und Therapie

### 1.2.1 Der Pesterreger *Y. pestis*

In der Geschichte sind drei Pestpandemien bekannt. Die von Thukydides beschriebene Justinianische Pest (1. Pandemie), der das mittelalterliche Europa verwüstende „Schwarze Tod“ (2. Pandemie) und die 1894 während der 3. Pandemie eindeutig als vom Bakterium *Y. pestis* ausgelöst beschriebene Krankheitswelle, die ca. 12 Millionen Todesopfer forderte (Raoult, 2002 ‚Lancet Infectious Diseases; Wood, 2003; Twigg, 2003; Prentice, 2004). Es existieren allerdings keine eindeutigen Hinweise, dass die ersten beiden Pandemien tatsächlich von *Y. pestis* ausgelöst wurden.

Die auch literarisch vielbeschriebene Pest übt seit kurzem wieder neuen Schrecken auf die Menschen aus, da *Yersinia pestis* zu den potenziell als Biowaffen einsetzbaren Krankheitserregern zählt (Rusmann, 2003).

In einigen Ländern (Vietnam, Madagaskar, Tansania, USA, Teilen der ehem. Sowjetunion) ist die Pest auch heute noch endemisch. Trotz guter antibiotischer Empfindlichkeit kommt es immer wieder zu Ausbrüchen (ca. 2000 jährlich) mit tödlichen Erkrankungen (1994:Surat/Indien, 2003: Oran/Algerien, 2004: Turkmenistan und Usbekistan). Erst kürzlich (Februar 2005) wurde von einem Ausbruch der Lungenpest in der Republik Kongo berichtet. Hunderte von Menschen waren infiziert und 61 davon sind bereits gestorben (WHO 2005).

Das Hauptreservoir von *Y. pestis* sind chronisch infizierte Wildnagetiere. Durch Flöhe wird *Yersinia pestis* von Nagetier zu Nagetier und vom Nager über urbane Rattenpopulationen auf den Menschen übertragen (Heesemann et al. 2001). Dies geschieht durch Regurgitieren von Mageninhalt beim Saugvorgang infizierter Rattenflöhe am Menschen. Von der Eintrittsstelle aus gelangen die Bakterien in die regionalen Lymphknoten, wo sie sich vermehren und nach einer Inkubationszeit von 2-10 Tagen das mit 80-90% der Fälle häufigste Krankheitsbild der Pest, die Beulenpest, hervorrufen können. Die schmerzhafteste Lymphknotenschwellung, die zu geschwürigem, nekrotischem Zerfall der Lymphknoten und septischer Symptomatik führen kann, geht in 25-50% der Fälle in eine meist tödliche Pestsepsis über. Die Lungenpest oder Pestpneumonie tritt als Folge einer Bakteriämie im Verlauf einer

Beulenpest oder nach einer Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch auf. Wegen dieser aerogenen Übertragungsmöglichkeit gilt die Lungenpest als hochinfektiös. Sie ist aufgrund ihres fulminanten Verlaufs in bis zu 100% der Fälle tödlich.

Mikrobiologisch kann in einem L3- Sicherheitslabor die Anzucht aus Blut oder Beuleninspirat erfolgen. Nach der Färbung nach Wayson erscheinen die Gram-negativen Bakterien als bipolare Stäbchen mit sicherheitsnadelförmigem Aussehen. In Speziallaboratorien wird der Erreger auch mit immunologischen Nachweismethoden oder PCR identifiziert (Heesemann, 2001).

Durch die gut wirksame antibiotische Therapie mit Tetracyclinen, Chloramphenicol, Streptomycin und Sulfadiazin in hoher Dosierung ist die Letalität auf 10-14% gesunken.

## **1.2.2 Die enteropathogenen Yersinien: *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis***

### 1.2.2.1 *Yersinia enterocolitica*

*Y. enterocolitica* ist in der Umwelt ubiquitär verbreitet. Für die humanpathogenen Biogruppen scheint das Schwein das Hauptreservoir darzustellen (Bottone, 1997). *Y. enterocolitica* ist biochemisch und serologisch sehr heterogen. Verschiedene Oberflächenantigene lassen 18 O-Serotypen unterscheiden. Die Serotypisierung erfolgt aufgrund von Unterschieden in den LPS-Seitenketten der Bakterien. Das Vorkommen der unterschiedlichen Serogruppen unterliegt einer bestimmten geographischen Verteilung. Während in Europa 80% der Infektionen von *Y. enterocolitica* der Serogruppe O:3 und 15% von Serogruppe O:9 hervorgerufen werden und sporadisch die Serotypen O:5,27 auftreten, werden in Amerika v.a. die Serotypen O:4, O:8, O:13, O:18 und O:21 beobachtet, wobei O:8 dominiert. Diese „amerikanischen“ Serotypen gehören der Biogruppe 1B an. Die humanpathogenen „europäischen“ Serotypen werden den Biogruppen 2-5 zugeordnet. Die Biogruppe 1A umfasst verschiedene nicht- pathogene Serotypen, die in der Umwelt, im Darm von Gesunden oder selten auch als opportunistische Erreger bei Wundinfektionen vorkommen.

Die enteropathogenen *Yersinia* spp., *Y. enterocolitica* bzw. *pseudotuberculosis*, sind nach Salmonellen und *Campylobacter* spp. in Deutschland seit Jahren die dritthäufigste Ursache bakterieller Enteritiden (Robert-Koch-Institut, Epid.Bull. 02/2004).

Eine Infektion erfolgt meist durch Aufnahme von mit Yersinien kontaminiertem Schweinefleisch (durch Schlachtprozeß bedingt), fäkal verschmutztem Wasser oder Milch. Da die Yersinien auch sehr gut bei Kälte wachsen können, sind sie eine der häufigsten über kühl gelagerte kontaminierte Blutprodukte verbreiteten bakteriellen Infektionskrankheiten beim Menschen (Bottone, 1997, 1999, Aleksic u. Bockemühl 1990, Cover u. Aber 1989). Nach einer Inkubationszeit von 7-10 Tagen kommt es zum klinischen Bild der humanen Yersiniose, das sich bei *Y. enterocolitica* und *pseudotuberculosis* ähnelt. Es äußert sich in einer akuten Enteritis mit kolikartigen abdominalen Schmerzen, wässrigem Durchfall, Übelkeit, Erbrechen und Fieber, einer Pseudoappendizitis (mesenteriale Lymphadenitis), Ileitis ("Pseudo-Crohn") und Enterokolitis (Bottone 1997, Hoogkamp-Korstanje u. de Koning 1990). In der Regel verläuft die Yersiniose selbstlimitierend, nur in seltenen Fällen kommt es zur septischen Form mit Abszessbildung in Milz und Leber und hoher Letalitätsrate. Die septische Verlaufsform tritt v.a. bei immundefizienten oder immunsupprimierten Patienten, Patienten mit gestörtem Eisenhaushalt oder Leberzirrhose auf. Chronisch persistierende Yersiniosen sind ebenfalls selten. Als sekundäre immunpathologische Folgeerkrankungen können reaktive Arthritis, Uveitis oder Erythema nodosum auftreten (Winblad 1969, Dequeker et al. 1980). Diagnostisch wird eine Infektion mit enteropathogenen Yersinien zunächst durch Anzucht des Erregers aus Lymphknoten, Blutkultur, Abszesspunktat oder Stuhlproben auf Cefsulodin-Irgarsan-Novobiocin-(CIN) Agar als Selektivmedium erfasst. Dabei kann die Psychrophilie der Yersinien zur Kälteanreicherung genutzt werden. Desweiteren kann eine serologische Diagnose über ELISA, Agglutination oder Immunoblot erfolgen, wobei bei letzterem YopE, YopD und LcrV als starke Antigene fungieren. Da unkomplizierte Fälle von Enteritis unbehandelt abheilen, ist eine antibiotische Therapie fast ausschliesslich bei septischen Verlaufsformen indiziert. Ureidopenicilline, Tetracycline, Cotrimoxazol, Gyrasehemmer oder Cephalosporine der 3. Generation sind Antibiotika der ersten Wahl. Als Kombinationsmöglichkeit werden Aminoglykoside eingesetzt. Ein günstiger Einfluss einer Antibiose auf *Yersinia*-assoziierte Folgeerkrankungen ist nicht erwiesen (Bottone, 1997, Heesemann, 2001).

### 1.2.3 Unterschiede zwischen *Y. pestis* und den enteropathogenen Yersinien

Evolutionsbiologisch haben sich die drei humanpathogenen Yersinien wahrscheinlich zu unterschiedlichen Zeiten aus nicht-pathogenen, in der Umwelt vorkommenden Yersinien entwickelt (Wren, 2003). Nach dem Erwerb des für die Pathogenität verantwortlichen pYV-Plasmids spaltete sich vor 50- 200 Millionen Jahren *Y. enterocolitica* von einer gemeinsamen Vorläuferart ab. Die Trennung von *Y. pestis* bzw. *pseudotuberculosis* erfolgte erst vor 10.000- 40.000 Jahren (Achtmann et al. 2004). *Y. pestis* kann als Subspezies von *Y. pseudotuberculosis* betrachtet werden.

Die Pathogenese der verschiedenen Formen von Yersinieninfektionen wird durch die unterschiedlichen evolutionären Überlebensstrategien von *Y. pestis* und den enteropathogenen Yersinien verständlich. In der Strategie von *Y. pestis* ist es wichtig, dass sich das Bakterium rasch in Wirtsorganen vermehrt, um dann in ausreichender Konzentration in das Blutssystem auszubrechen, von wo aus es durch einen blutsaugenden Floh aufgenommen und so auf weitere Wirte verbreitet werden kann. Mit dieser Strategie geht eine hoch akut verlaufende Erkrankung einher (Lungenpest).

Im Gegensatz dazu liegt es im Sinne der enteropathogenen Yersinien, als Darmpathogene lange im Wirt zu verweilen und durch den Kot an die Umwelt abgegeben zu werden. Daher kann eine enteropathogene Yersiniose als eine eher chronische Infektion betrachtet werden (Brubaker, 2003).

Die „aggressive“ Pathogenität von *Y. pestis* wird sowohl auf den Erwerb pathogenetisch wichtiger Gene, aber auch auf den Verlust bzw. die Inaktivierung von Genen, die für eine intestinale Infektion wichtig sind und die z.B. für Adhäsine und Invasine codieren, zurückgeführt (Wren 2003, Perry et al., 1997, Brubaker, 2003).

## 1.3 Virulenzfaktoren von Yersinien

### 1.3.1 Invasine und Adhäsine

*Y. pestis* und die enteropathogenen Yersinien unterscheiden sich in der Expression von Invasinen und Adhäsinen. Sowohl das 100 kDa grosse Invasin als auch das 41-44 kDa – Protein *Yersinia*- Adhäsine A (YadA) wird nur von enteropathogenen Yersinien exprimiert. Bei *Y. pestis* ist das *inv*-Gen durch eine Insertion, das *yadA*-Gen durch eine Punktmutation inaktiviert. Deshalb zeigt *Y. pestis* keine Darminvasivität (Wren BW. 2003).

Bei den enteropathogenen Yersinien vermitteln die chromosomal codierten äusseren Membranproteine Inv (Invasin) und Ail (attachment invasive locus) die Adhärenz oral aufgenommener Yersinien an M-Zellen der Darmmukosa (spezialisierte Epithelzellen der Peyer'schen Plaques, v.a. im terminalen Ileum vorkommenden Lymphfollikel). Durch Interaktion mit den  $\beta$ 1- Integrinen der M-Zellen wird der Transzytoseprozess der Yersinien in das darunterliegende Gewebe ausgelöst (Brett et al. 1993, Autenrieth u. Firsching 1996, Schulte et al. 2000). Dort vermehren sie sich, bilden Mikrokolonien und Abszesse, disseminieren über Lymphe und Blut und führen so zum Befall von Milz und Leber. Unter sauren Bedingungen wird bei 37°C das Myf-Antigen (mucoid Yersinia factor) exprimiert, das eine fibrilläre Struktur bildet und ebenfalls bei der Adhärenz an das Darmepithel eine Rolle spielen könnte (Iriarte u. Vangotheghem 1993). Das Invasin kann darüberhinaus Epithelzellen zur Produktion chemotaktisch wirksamer Zytokine anregen (Grassl et al. 2003).

Zu den chromosomal codierten Virulenzfaktoren gehört auch das hitzestabile Enterotoxin Yst. Es besitzt Ähnlichkeit mit dem Enterotoxin Sta von *E. coli* und Guanylin, dem endogenen Aktivator der intestinalen Guanylat-Cyclase und induziert so den wässrigen Durchfall bei einer *Y. enterocolitica*- Infektion (Delor u. Cornelis, 1992). Neben den Yops, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll, codiert das Virulenzplasmid auch für das Adhäsine YadA (*Yersinia* adhesin A), ein äusseres Membranprotein. Es weist eine Lollipop-Struktur (Stiel+ Kopf) auf, und vermittelt die Adhärenz an extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen und Fibronectin (Heesemann u. Grüter 1987, Hoiczky et al. 2000). Neben der Rolle als



Kolonisierungsfaktor schützt YadA die Yersinien vor einer Aktivierung des Komplementsystems, indem es Resistenz gegen Opsonierung und Komplementlyse vermittelt.

### 1.3.2 Typ III- Proteinsekretion und *Yersinia*- Effektorproteine (Yops)

Trotz der aufgeführten Unterschiede zwischen *Y. pestis* und den enteropathogenen Yersinien beruht die Pathogenität der drei humanpathogenen *Yersinia* spp. auf dem gemeinsamen Besitz des 70 kB grossen Virulenzplasmids pYV. Plasmidlose Yersinien sind apathogen. Die Hälfte der genetischen Information auf dem Virulenzplasmid dient dem Aufbau eines Typ III-Protein-Sekretions- und Translokationssystems (TTSS), das aus 2 Komponenten besteht, dem Ysc = Yop-Sekretionsapparat und den Yops = *Yersinia* outer proteins (Bleves et al. 2000, Cornelis 1998, 2002 a u. b). 29 Ysc-Proteine bilden ein sogenanntes Injektisom (Cornelis 2002a und 2002b), mit dessen Hilfe sechs bakterielle Effektorproteine (Effektor-Yops) in die eukaryotische Wirtszelle injiziert werden. Diese interferieren dort mit verschiedenen Signalwegen und paralysieren so die Zielzellen („*Yersinia* deadly kiss“ Cornelis 1998, „The tranquillizing injection of *Yersinia* proteins: a pathogen’s strategy to resist host defence“ Aepfelbacher et al. 1999). Ein derartiges TTSS wurde auch bei anderen tier- und humanpathogenen Bakterien wie *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli* (EHEC, EPEC), *Pseudomonas* spp., *Photobacterium luminescens*, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* oder *Bordetella pertussis* beschrieben (Cornelis, 2002a).

Die Nutzung dieses TTSS stellt einen Pathogenitätsmechanismus dar, der es pathogenen Yersinien ermöglicht, sich im Wirtsorganismus ausbreiten zu können. Die Pathogenität von *Y. enterocolitica* ist nicht nur abhängig von diesen plasmidcodierten Virulenzfaktoren, sondern auch von einer Reihe chromosomal codierter (Cornelis G., Laroche Y., 1987).

### 1.3.3 *Yersinia*- Effektorproteine

Yersinien können der Phagozytose durch polymorphkernige Granulozyten (PMNs) und Makrophagen entgehen (Ruckdeschel et al. 1996) und die Wirtszellen so „umprogrammieren“, dass die Immunantwort des Wirtes moduliert und teilweise deaktiviert wird. Die wichtigste Rolle dabei spielen die Yops (*Yersinia* outer proteins). Die auf dem Virulenzplasmid codierten Proteine wurden zunächst als „outer membrane proteins“ beschrieben (Portnoy et al. 1981). 1983 konnten Heesemann et al. zeigen, dass diese bei 37°C und Calciumentzug (*in vitro*) in das Kulturmedium sezerniert werden (Heesemann u. Laufs 1983, Heesemann u. Gross 1986). *In vivo* werden die Effektorproteine in die Wirtszelle transloziert. Calciummangel oder Kontakt mit einer eukaryotischen Wirtszelle und Temperatur kontrollieren die Transkription der *yop*- Gene. Während die Ausbildung der Sekretionsapparate auf der Bakterienoberfläche kontaktunabhängig erfolgt, und die Sekretion der Effektor-Yops abhängig von Temperatur, pH- Wert, Osmolarität und Calciumionenkonzentration ist, wird die Sekretion der Yops strikt kontaktabhängig eingeleitet, nachdem ein Bakterium an eine Eukaryotenzelle angedockt hat (Aepfelbacher et al. 1999, Bleves et al. 2000, Cornelis 1998, 2002 a, 2002b, 2002c). Nach derzeitiger Vorstellung ist ein aus YopB, YopD und LcrV bestehender Translokationsapparat nötig, der in der Zielzelle eine Pore bildet und so dem nadelförmigen Injektisom die Yop- Translokation ermöglicht. Die sechs Effektor-Yops werden schliesslich über den Injektionskanal unter Mitwirkung von für die korrekte Proteinfaltung benötigten Helferproteinen, sog. Chaperonen, in die Wirtszelle transloziert.

YopH, YopE, YopT und YpkA/YopO interagieren mit dem Wirtszellskelett und sollen so eine Phagozytose der Yersinien verhindern (Phagozytoseresistenz). YopP/J hat vorrangig die Aufgabe, eine proinflammatorische Wirtsantwort zu unterdrücken. Noch ungeklärt ist, in welche intrazellulären Regulationsprozesse YopM eingreift.

Im folgenden werden die sechs Effektor- Yops, die als wichtige Virulenzfaktoren beschrieben sind, in ihrer Funktion näher charakterisiert (Aepfelbacher et al. 1999, Bleves et al. 2000, Cornelis 1998, 2002a, 2002b, Juris et al. 2002).

### YopH

Das 51 kDa- Protein ist eine der stärksten bekannten Phosphotyrosinphosphatasen. Nach Injektion in die Wirtszelle dephosphoryliert YopH Proteine, die an fokalen Adhäsionskomplexen beteiligt sind. Dadurch werden die fokalen Adhäsionsregionen in Makrophagen zerstört, was letztlich deren Phagozytosefähigkeit von infizierten Zellen inhibiert. Ausserdem kann der Fc-vermittelte „oxidative burst“ von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten unterdrückt werden (Ruckdeschel et al. 1996). Yop H blockiert durch Dephosphorylierung der Sockkinase Lck auch die T-Zellrezeptor (TCR)- vermittelte Aktivierung von T- Zellen (Gerke et al. 2005).

### YopE

Das 22,9 kDa grosse YopE wirkt als GTPase- aktivierendes Protein (GAP) auf alle drei genannten Rho-GTPasen, die es über seine GTP-hydrolytische Funktion inaktiviert. Somit wird in Phagozyten die Ausbildung von Aktinmikrofilamenten gestört und damit Phagozytoseprozesse beeinträchtigt. YopE wirkt so zytotoxisch und führt zur Ablösung von der extrazellulären Matrix. In Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass YopE überwiegend auf Rac- GTP wirkt ( Andor et al. 2001).

### YopT

YopT (35,5k Da) besitzt eine Cysteinproteaseaktivität, die zur Abspaltung des Cystein- Geranyl- Ankers von RhoA, Rac und Cdc42 führt und so zur Inaktivierung führt. Dies führt zum Abbau von Aktinskelettfasern (Zumbihl et al. 1999). YopT ist also neben YopE ein zweites Zytotoxin, das durch die Zerstörung des Zytoskeletts zur Phagozytoseresistenz der Yersinien beiträgt.

### YopO/YpkA

YpkA (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*) ist das homologe Effektor-Yop zum 81,7 kDa grossen YopO von *Y. enterocolitica*, das eine Serin/Threonin- Proteinkinaseaktivität hat. YopO bindet an RhoA und Rac, phosphoryliert Aktin und sich selbst und

interferiert mit der für die Phagozytose nötigen Signaltransduktionsmaschinerie (Barz et al.2000, Galyov et al. 1993). Die genaue Funktionsweise von YopO ist noch nicht vollständig geklärt.

Zusammenfassend ist die Aufgabe von YopH, YopE, YopT und YopO/YpkA darin zu sehen, phagozytierende Zellen in einem konzertierten Angriff auf deren Aktinzytoskelett zu lähmen und durch Verhinderung von Phagozytose das extrazelluläre Überleben der Yersinien sicherzustellen.

### YopP

YopP (32,5 k Da) von *Y. enterocolitica* reduziert ebenso wie das homologe YopJ (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*) die Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-8 und IL-6.

Die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) und E-selectin wird ebenfalls heruntergefahren. Darüberhinaus induziert YopP/J programmierten Zelltod (Apoptose) in Makrophagen (Mills et al. 1997, Monack et al. 1997, Ruckdeschel et al. 2001). Diese Effekte sind das Resultat einer Blockade der NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B)- Aktivierung und MAPK (mitogen-activated protein kinase)- abhängiger Signalweg in Yersinien- infizierten Zellen. Durch die Inhibierung von MAPK- und NF- $\kappa$ B- Signalwegen unterdrückt YopP/J gleichzeitig die Synthese proinflammatorischer Zytokine, blockiert anti- apoptotische Prozesse und hindert professionelle Phagozyten so vor der Ausübung ihrer Funktionen im Rahmen der angeborenen Immunantwort.

### YopM

Von diesem 41,6 kDa grossen Protein ist der Wirkmechanismus noch nicht aufgeklärt. YopM gelangt nach Infektion in den Zellkern der Wirtszelle, wo ein möglicher Einfluss auf die Gentranskription diskutiert wird. Ausserdem ist es in der Lage, die Thrombozytenaggregation zu hemmen (Cornelis et al.2002a).

### 1.3.4 Das Virulenz-Antigen (V –Antigen, LcrV)

Das 37,5 k Da grosse nicht-lipidierte Protein wurde 1956 durch Burrows entdeckt und hat sich seitdem wegen seiner Multifunktionalität als einer der geheimnisvollsten Virulenzfaktoren der Yersinien erwiesen (Burrows 1956). Aufgrund seiner Multifunktionalität ist die Funktion und Wirkungsweise des V-Antigens durch einfache Gendeletionsanalysen nur schwer zugänglich. Die hohe pathogenetische Bedeutung des LcrV liegt darin begründet, dass es sich in aktiven und passiven Immunisierungsexperimenten als protektives Antigen erwiesen hat (Hill et al. 1997, Leary et al. 1995, Motin et al. 1994, Roggenkamp et al. 1997 u. 1999, Une et al. 1984). Die wichtigste *Y. pestis*- Vakzinepräparation ist neben dem nur bei *Y. pestis* vorhandenen Kapselantigen F1 auch gegen das V- Antigen gerichtet (Anisimov et al. 2004).

LcrV ist ein sezerniertes Protein und ist als *lcrV* auf dem *lcrGVHYopBD* Operon des Virulenzplasmids aller drei humanpathogenen Yersinien codiert (Cornelis et al. 1998). Seine Translokation wie die der Yops wird diskutiert. Ein Vergleich des V-Antigens der drei humanpathogenen Yersinien zeigt eine sehr hohe Aminosäuresequenzidentität. Das V- Antigen kann sich im bakteriellen Zytoplasma und auf der Bakterienoberfläche befinden und über das TTSS sezerniert werden (Fields et al. 1999a, Lee et al. 2000, Pettersson et al. 1999, Skrzypek et al. 1995). LcrV gelangt aber auch durch einen TTSS- unabhängigen Mechanismus in die Wirtszelle (Fields et al. 1999b).

Im folgenden wird auf die drei Funktionen, die für das V- Antigen bislang beschrieben wurden, näher eingegangen.

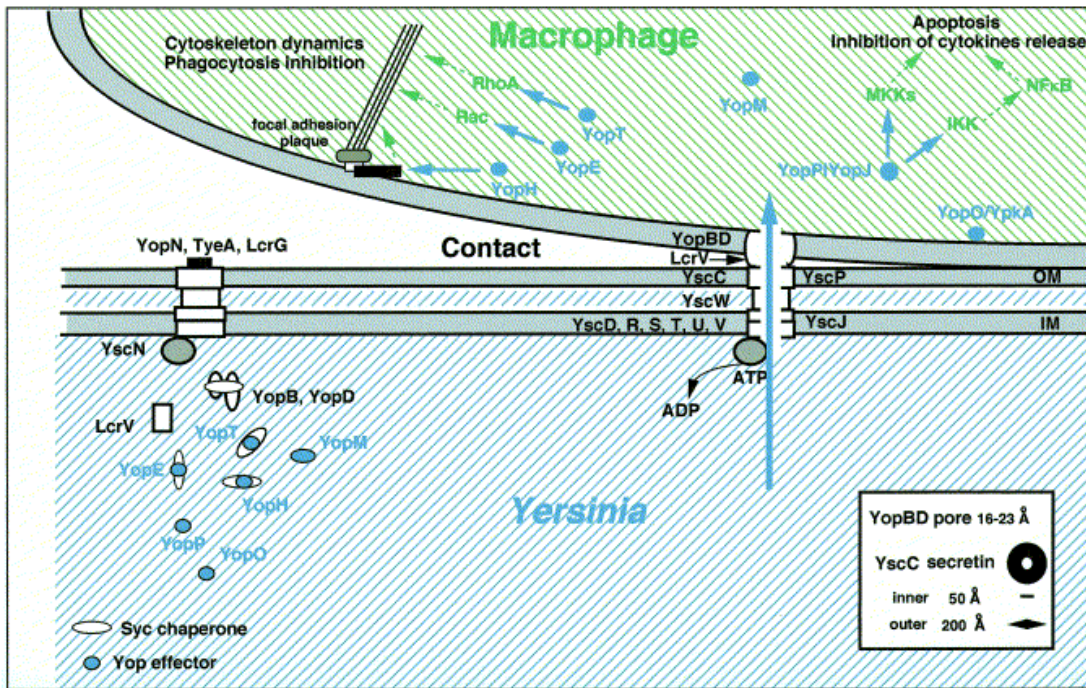
#### 1.3.4.1 Beteiligung von LcrV an der Regulation des TTSS und an der Sekretion der Yops

Die Regulation der Expression der Yops und der Komponenten des Ysc-Apparates konnte durch die Analyse der „Low calcium response“ (LCR) genauer aufgeklärt werden. LCR stellt ein *in vitro*- Phänomen dar, bei dem durch Erhöhung der Temperatur von 26°C auf 37°C und das Entfernen von  $Ca^{2+}$  aus dem Kulturmedium pathogene Yersinien die Vermehrung verlangsamen oder einstellen (*Y. pestis*). Das

physiologische Korrelat dazu stellt der direkte Bakterien- Wirtszellkontakt dar. LcrF (VirF in *Y. enterocolitica*) konnte als positiver transkriptioneller Aktivator identifiziert werden (Brubaker, 2003; Cornelis et al., 1998). LcrV ist bei der Regulation der LCR mitbeteiligt. Es soll mit LcrG interagieren, das in der Modellvorstellung als Repressor einer Yop-Freisetzung fungiert und den Kanal des Ysc- Apparates verschlossen hält, die Ysc- Pore durch das Entfernen von LcrG öffnen und somit den Weg für weitere Yops freigeben (De Bord et al. 2001, Lawton et al. 2002, Matson et al. 2001, Nilles et al. 1997 und 1998).

#### 1.3.4.2 Mitwirkung an der Translokation von Yops und der Ausbildung eines Translokationskanals in Zellmembranen

Während der Begriff Yop- Sekretion die Ausschleusung von Yops aus Yersinien unter *in vitro*- Bedingungen beschreibt, wird unter Yop- Translokation die „Injektion“ der Effektor- Yops in die Wirtszellen (s. Abb. 1) verstanden. Der nadelförmige Injektionsapparat alleine reicht für die Translokation der Yops über die eukaryotische Membran in die Zielzelle nicht aus (Boland et al. 1996, Persson et al. 1995, Pettersson et al. 1999, Rosqvist et al. 1994 und 1995, Sory et al. 1994). Dazu bedarf es eines sogenannten Translokationskomplexes, der aus den Translokator- Yops , YopB, YopD und LcrV gebildet wird. Hierbei reguliert LcrV zum einen die Synthese von YopB und YopD, die vermutlich als Transmembranproteine fungieren (Sarker et al. 1998). Zum anderen kann LcrV zusammen mit YopB (41,8 kDa) und YopD (33,4 kDa) eine Pore in artifiziellen oder eukaryotischen Membranen bilden (Holmström et al. 2001, Neyt et al. 1999, Pettersson et al. 1999, Tardy et al. 1999), obwohl ihm im Gegensatz zu YopB und YopD die hydrophoben Domänen fehlen. Nach aktuellem Forschungsstand scheint das Zusammenspiel von LcrV, YopB und YopD hinreichend für eine Porenbildung in den Zielzellen zu sein, jedoch ist diese Porenbildungsfunktion der drei Translokator- Yops noch nicht vollständig aufgeklärt. Nach einem kürzlich publizierten Modell öffnet der Translokationskomplex die Zielzellmembran dort, wo die Nadel zur Injektion der Effektor- Yops ansetzt (Marenne et al. 2003).



**Abb. 1** Typ III- Protein- Sekretions- und Translokationssystem (TTSS) von *Y. enterocolitica* (nach Bleves, Cornelis 2000)

### 1.3.4.3 Immunmodulation durch LcrV

In den 1990er Jahren konnte die Gruppe von Brubaker zeigen, dass Wildtyp- *Y. pestis* infizierte Mäuse geringere Spiegel an den proinflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  aufwiesen als mit pYV- negativen *Y. pestis* infizierte Mäuse. Die genetische Information für einen TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  supprimierenden Faktor musste also auf dem Virulenzplasmid liegen. Desweiteren konnte die Gabe von rekombinantem TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  einen ansonsten letalen Ausgang einer Infektion mit Pestbakterien verhindern (Nakajima et al. 1993).

Dass sich diese beiden Zytokine auch bei einer enteropathogenen Yersiniose als protektiv für den Wirt erweisen, konnte dadurch gezeigt werden, dass die Injektion von Anti- TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ - Antikörpern eine *Y. enterocolitica*- Infektion drastisch verschlimmerte (Autenrieth et al. 1992). Basierend auf diesen Ausgangsbeobachtungen bestätigte sich, dass das auf dem pYV codierte LcrV für diese letale Immunmodulation von *Y. pestis* verantwortlich sein könnte. Nach einer passiven Immunisierung mit Anti- LcrV- Antiserum zeigten *Y. pestis* infizierte Mäuse

normale TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ - Spiegel und waren daher vor der letalen Infektion geschützt (Motin et al. 1994). Auch eine aktive Immunisierung mit einem *Staphylococcus* Protein A-LcrV- Fusionsprotein (PAV) schützte im Pestmodell gegen eine letale Dosis von Wildtyp-*Y. pestis* durch eine protektive TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Produktion in den Milzen der infizierten Mäuse (Nakajima 1995). Histologisch betrachtet zeigten die passiv oder aktiv geschützten Mäuse eine starke Granulombildung in der Leber (Une et al. 1987). Schliesslich konnte die Gruppe von Brubaker zeigen, dass eine Injektion von rekombinantem LcrV eine Suppression von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  mit gleichzeitiger Induktion von IL-10, einem anti-inflammatorischen Zytokin, auslöst und so Mäuse gegen eine ansonsten tödliche Dosis von LPS schützen kann (Nedialkov et al. 1997).

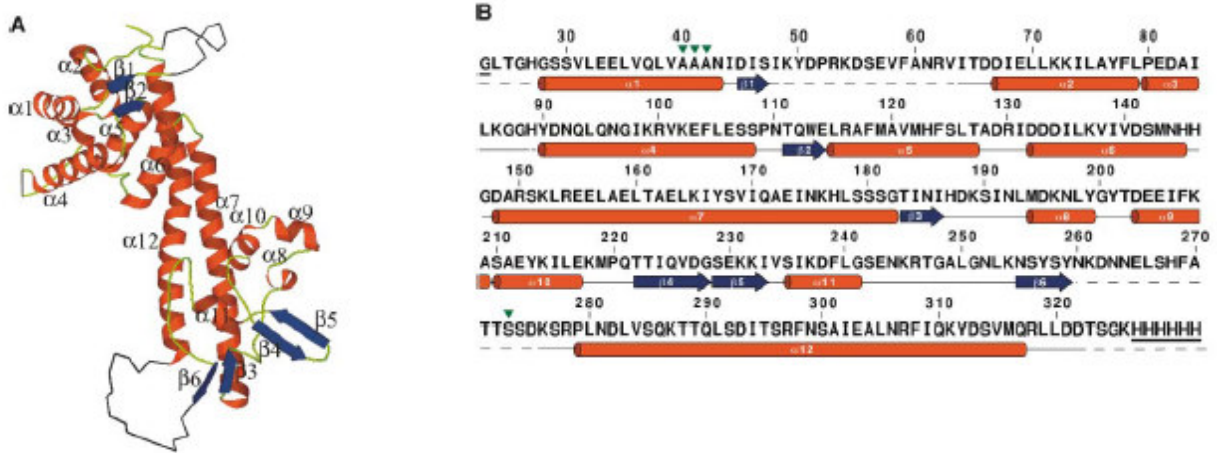
Sing et al. konnten 2002 zeigen, dass eine Vorbehandlung mit rekombinantem LcrV die Fähigkeit von Peritonealmakrophagen aus LPS- nonresponder- Mäusen verringerte, auf Zymosan A hin, TNF- $\alpha$  zu produzieren. Die Makrophagen produzierten nach rLcrV- Stimulation IL-10, welches für die beschriebene TNF- $\alpha$ -Suppression verantwortlich gemacht werden konnte, da diese bei IL-10 -/- Makrophagen fehlte. Auch nach Zugabe von Anti- IL-10- Antikörpern zu LcrV- vorstimulierten humanen Makrophagen (Mono-Mac-6) war keine TNF- $\alpha$ -Suppression mehr zu beobachten. Weiter konnte eine mögliche *in vivo*- Relevanz der immunmodulatorischen Fähigkeit von LcrV, Makrophagen durch IL-10- Induktion und TNF- $\alpha$ - Suppression „umzuprogrammieren“, postuliert werden: nach i. p. Infektion mit *Y. enterocolitica* waren IL10-/- Mäuse im Vergleich zu Wildtyp- Mäusen stärker gegen die Infektion geschützt. Die Überlebensrate der IL-10-/- Mäuse war höher, die Bakterienlast in Milz und Leber geringer als bei den Wildtyp- Mäusen.

Diese Beobachtungen bildeten den Ausgangspunkt für die weitergehenden Untersuchungen zur immunmodulierenden Wirkung von LcrV, die in der vorliegenden Arbeit präsentiert werden.



#### 1.3.4.4 Struktur des V- Antigens

Vor kurzem konnte die Kristallstruktur des V- Antigens von *Y. pestis* aufgeklärt werden (Derewenda et al. 2004). Zur erfolgreichen Kristallisation des Proteins wurden drei nach aussen zeigende benachbarte Aminosäuren (K40, D41 und K42) durch Mutagenese in Alanin umgewandelt. Dadurch fielen die langen Seitenketten weg, wodurch bei der Kristallisation ein besserer intermolekularer Kontakt entsteht (Voraussetzung für Kristallisation). Die ermittelte LcrV- Kristallstruktur führte zu einer Hantelstruktur mit zwei globulären Domänen an den Enden des „Griffs“. Den N-terminalen Teil des Moleküls (AS1-146) bildet ein aus fünf antiparallelen Helices bestehendes Bündel, von denen die Helix  $\alpha_1$  einem herausragenden Knopf gleicht (Derewenda et al. 2004). Desweiteren besteht das V- Antigen aus zwei kurzen parallelen  $\beta$ - Strängen und einer antiparallelen „Haarnadelstruktur“. Das mittlere Segment (AS 148-182) bildet eine lange  $\alpha$ - Helix ( $\alpha_7$ ), die den N- Terminus des Proteins mit der zweiten globulären Domäne verbindet, die aus weniger geordneten Strukturen ( $\alpha_8$ - $\alpha_{11}$ ) besteht. Den C- Terminus (AS 274-322,  $\alpha_{12}$ ) formt eine antiparallele coiled- coil- Struktur mit der Helix  $\alpha_7$  (s. Abb. 2). Diese beiden Helices interagieren über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander. Im Hinblick auf die Immunogenität einzelner Regionen des V- Antigens weist v.a. der zentrale Bereich (AS 135-275) protektive Epitope für eine Immunisierung mit rekombinantem Protein oder eine passive Immunisierung mit Antikörpern dagegen auf.



**Abb. 2 (A) Tertiärstruktur (B) Primär- und Sekundärstruktur von *Y. pestis* LcrV** (nach Derewenda et al. 2004; rot:  $\alpha$ - Helices, blau:  $\beta$ - Faltblatt).

#### 1.3.4.5 Das V- Antigen anderer Pathogene

Bei der Recherche in Proteindatenbanken findet man kaum Proteine, die der Gesamtstruktur oder einzelnen Domänen von LcrV ähneln. Konservierte Aminosäuresequenzen findet man in den einzig bekannten homologen Proteinen zu LcrV, dem PcrV aus *P. aeruginosa*, aber auch dem AcrV von *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* und LSSV von *Photobacterium luminescens*. Die Aminosäuresequenz von PcrV und LcrV sind zu 41% identisch. Die Hauptregionen der Homologie stellen die Helices  $\alpha$ -7,  $\alpha$ -10 und  $\alpha$ -12 dar. Trotz dieser strukturellen Ähnlichkeit besitzt PcrV im Gegensatz zu LcrV keine immunmodulierende Fähigkeiten. Es regt Makrophagen weder zu einer IL-10- Produktion an noch supprimiert es deren Produktion des proinflammatorischen TNF- $\alpha$  (Sing et al. 2002). Diese Eigenschaften machen PcrV zum idealen Vergleichsprotein für LcrV.

Ein weiteres Vergleichsprotein für LcrV, das in dieser Arbeit verwendet wurde, stellt das AcrV des Fischpathogens *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* dar, welches auch über ein TTSS verfügt. Das AcrV scheint auch in den Translokationsprozess z.B. des Toxins AexT ins Zytosol von Fischzellen involviert zu sein (Burr et al. 2003). Die Aminosäuresequenzähnlichkeit zu LcrV beträgt 36,6%.

### 1.3.5 Das *Yersiniabaktin*- Eisenaufnahmesystem

Da auch bei *Yersinien* wie bei den meisten pathogenen Bakterien eine effiziente Eisenversorgung die Voraussetzung für die Vermehrung und Verbreitung im Wirt ist, besitzen die drei humanpathogenen *Yersinien* im Gegensatz zu apathogenen *Yersinienarten* ein sehr ähnliches System zur Aufnahme von Eisenionen (Carniel 2001, Heesemann et al. 1993). Dieses *Yersiniabaktin*- Siderophor- System wird auf einer chromosomalen Pathogenitätsinsel (high pathogenicity island, HPI) codiert und spielt eine Rolle in der Nagetiervirulenz von *Yersinien*. Diese HPIs wurden auch in pathogenen *E. coli* Stämmen entdeckt (Schubert et al. 1998) und später auch in vielen anderen pathogenen *Enterobacteriaceae* nachgewiesen. *Yersinien* verfügen auch über ein Häminaufnahmesystem (Stojiljkovic I. u. Hantke K. 1992).

### 1.3.6 Weitere Virulenzfaktoren von *Y. pestis*

*Y. pestis* besitzt neben dem pYV- Plasmid noch zwei weitere Plasmide, die v.a. für die Übertragung der Bakterien über den Floh entscheidend sind. Zum einen das 100 kb grosse pTOX, auf dem das *capsular antigen termed fraction 1* (F1) codiert ist, gegen das sich eine Komponente des derzeit verfügbaren Pestimpfstoffs richtet. Das pTOX codiert ausserdem für ein mausspezifisches Toxin (Mtx), das sich als Lipase D erwiesen hat und für die Kolonisierung des Flohs mit Pestbakterien wichtig ist. Zum anderen beherbergt *Y. pestis* das 10 kb- Plasmid pCPC, auf dem das Gen für eine OmpT- ähnliche Protease, den Plasminogenaktivator Pla, sitzt. Mit Hilfe dieser Protease kann der Pesterreger sehr effektiv im Wirt disseminieren.

## **1.4 Aspekte der angeborenen Immunantwort des Wirts bei Yersinia Infektionen**

### **1.4.1 Zelluläre Abwehr an vorderster Front**

Da der Säugetierorganismus ständig mit pathogenen und apathogenen Mikroorganismen konfrontiert wird, ist ein effektives Erkennungs- und Abwehrsystem zur Aufrechterhaltung seiner Integrität unumgänglich: das Immunsystem. Es soll ein breites Spektrum an eindringenden Mikroorganismen erkennen und diese schnellstmöglich unter Schonung des eigenen Wirtsorganismus eliminieren, was eine Unterscheidung von Selbst und Nicht-Selbst voraussetzt (Beutler 2004). Die beiden Säulen des Immunsystems, die angeborene und die erworbene (adaptive) Immunität sind gut aufeinander abgestimmt und eng miteinander verzahnt. Die adaptive Immunität ist ein flexibles, individuell erworbenes System zur Keimelimination, das zur Aktivierung eine gewisse Vorlaufzeit benötigt. Im Gegensatz dazu hat sich die angeborene Immunität evolutionär über Millionen Jahre hin entwickelt und ist über Gattungs- und Speziesgrenzen hinweg hochkonserviert (Beutler 2004, Janeway et al. 2002). Die Antwort des angeborenen Immunsystems auf Mikroorganismen erfolgt schnell. Über hochkonservierte Protein- und Zuckermotive wird eine möglichst grosse Anzahl unterschiedlicher Mikroorganismen erkannt und bekämpft. Dadurch wird Zeit gewonnen, um die adaptiven Immunitätsmechanismen anzukurbeln, die z. B. durch Antigenpräsentation vom angeborenen Immunsystem initiiert werden. Neben neutrophilen Granulozyten, Mastzellen, Eosinophilen, NK- Zellen (natural killer cells) und dendritischen Zellen spielen die Makrophagen als ortsständige professionelle Phagozyten eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort (Sansonetti 2001). Nach rezeptorvermittelter Aufnahme eines Erregers in Makrophagen wird dieser dort im Phagolysosom degradiert. Die Phagozytose umfasst einen intrazellulären Transportprozess, der mit einer Umorganisation des Zytoskeletts und der Bildung von Phagosom und Phagolysosom einhergeht. Durch Ansäuerung des Phagolysosoms mit Hilfe antimikrobieller Peptide und dem „oxidative burst“, bei dem reaktive Sauerstoffspezies und Stickoxide entstehen, wird der Erreger abgetötet und

degradiert (Rosenberger et al. 2003). So können mikrobielle Antigene auf der Makrophagenmembran präsentiert werden, was eine angepasste adaptive Immunantwort einleitet. Ausser dieser „Killerfunktion“ sind Makrophagen auch noch für die Produktion einiger Entzündungsmediatoren und entzündungsregulierender Proteine wie Interleukine, Interferone, Prostaglandine und pro- bzw. antiinflammatorische Zytokine verantwortlich. Dadurch werden Immunzellen aktiviert und chemotaktisch angelockt.

#### **1.4.2 Zytokine als Effektoren der angeborenen Immunantwort:TNF- $\alpha$ und IL- 10 als Gegenspieler**

TNF- $\alpha$  stellt eines der wichtigsten pro- inflammatorischen Zytokine dar, die während einer bakteriellen Infektion von Makrophagen produziert werden. Es initiiert die Produktion einer Palette von weiteren Zytokinen, erhöht die Gefäßpermeabilität und rekrutiert weitere Makrophagen und Neutrophile zum Infektionsherd. Lokal ist es an der Entzündungsreaktion beteiligt, systemisch ist es hauptverantwortlich für die Symptome eines septischen Schocks ausgelöst durch das LPS Gram- negativer Bakterien (Tracey et al. 1993). Da dies für den Wirtsorganismus sehr bedrohlich ist, muss die Produktion von TNF- $\alpha$  gegenreguliert werden. Dies geschieht durch weitere Proteine, die aus Makrophagen stammen, nämlich v.a. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Transforming Growth Faktor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ), IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, G-CSF, und c-AMP (Zhang et al. 1998). Dieser Regulationsprozess anti- inflammatorischer Zytokine bewahrt den Wirtsorganismus vor überschüssenden Entzündungsreaktionen (Tato et al. 2002, Vasselon et al. 2002). Zu den für die vorliegende Arbeit wichtigen IL-10- Effekten gehört die Unterdrückung der Toll-like-Rezeptor- Synthese und die Deaktivierung von Makrophagen, Monozyten und T-Zellen. Desweiteren reguliert IL-10 das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen, NK- Zellen, zytotoxischen und Helfer- T-Zellen, Mastzellen, Granulozyten, dendritischen Zellen, Keratinozyten und Endothelzellen. Damit übernimmt IL-10 eine wichtige regulatorische Funktion in der angeborenen Immunantwort und spielt so (wie auch sein Gegenspieler im Entzündungsgeschehen TNF- $\alpha$ ) eine wichtige Rolle für die Bahnung der adaptiven Immunantwort.

### 1.4.3 Das TLR- System

Im Wirtsorganismus wirken viele verschiedene Rezeptortypen bei der Erkennung von Mikroorganismen zusammen. In den letzten Jahren hat die Entdeckung der Toll-like Rezeptor (TLR)- Familie wesentlich zum besseren Verständnis der Erkennung mikrobieller Substanzen beigetragen. Mitte der 1990er Jahre wurde eine zusätzliche antimikrobielle Abwehrfunktion des Toll- Moleküls der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt, für das zuvor nur eine Funktion bei der Dorso- Ventral-Organisation während der Embryonalentwicklung beschrieben war (Lemaitre 2004). Auf der Suche nach Toll- homologen Proteinen bei Säugetieren erbrachten Medzhitov et al. 1997 den Nachweis eines humanen Toll-like Rezeptors, der über NF- $\kappa$ B- Aktivierung die Produktion pro- inflammatorischer Zytokine auslöst (Medzhitov et al. 1997). Bislang wurden elf TLRs identifiziert. Diese Transmembranrezeptoren des angeborenen Immunsystems sind evolutionär hochkonserviert und erkennen ebenfalls hochkonservierte mikrobielle Struktur motive, sog. PAMPS (pathogen associated molecular patterns). Während sieben der TLRs (TLR 1, 2, 4, 5, 6, 9, 11) bakterielle Motive erkennen, werden TLR3, TLR7 und TLR8 von viraler RNA stimuliert (s. Tab.1). Für TLR10 konnte bislang noch kein Aktivator beschrieben werden (Akira et al. 2004, Heine et al. 2003, Takeda et al. 2003). Die TLRs lösen nach PAMP- Bindung an den Rezeptor über verschiedene intrazelluläre Signalwege eine Aktivierung von Wirtszellen aus, die die Produktion von pro- und anti- inflammatorischen Zytokinen nach sich zieht (Akira et al. 2004, Takeda et al. 2003).

TLR	Ligand	Herkunft
TLR1 (mit TLR2)	Tri-acylierte Lipopeptide	Bakterien, Mykobakterien
TLR2 (mit TLR1 oder TLR6)	Lipoproteine, Lipopeptide atypisches LPS  Peptidoglykan (umstritten) Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Phenol-lösliches Modulin Porine Glykolipide Glykoinositolphospholipide Zymosan	versch. Pathogene <i>Leptospira interrogans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> Gram-positive Bakterien Gram-positive Bakterien Mykobakterien <i>Staphylococcus epidermidis</i> Neisserien <i>Treponema maltophilum</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> Pilze
TLR3	ds RNA	Viren
TLR4	LPS	Gram-negative Bakterien
TLR5	Flagellin	Salmonellen
TLR6 (mit TLR2)	Di-acylierte Lipopeptide Lipoteichonsäure Zymosan	Mykoplasmen Gram-positive Bakterien Pilze
TLR7	ss RNA	Viren
TLR8	ss RNA	Viren
TLR9	CpG DNA, nicht-methyliert	Bakterien und Viren
TLR10	unbekannt	unbekannt
TLR11 (nur in Maus)	unbekannt	uropathogene Bakterien

**Tab.1 Natürlich vorkommende TLR- Agonisten mikrobieller Herkunft**

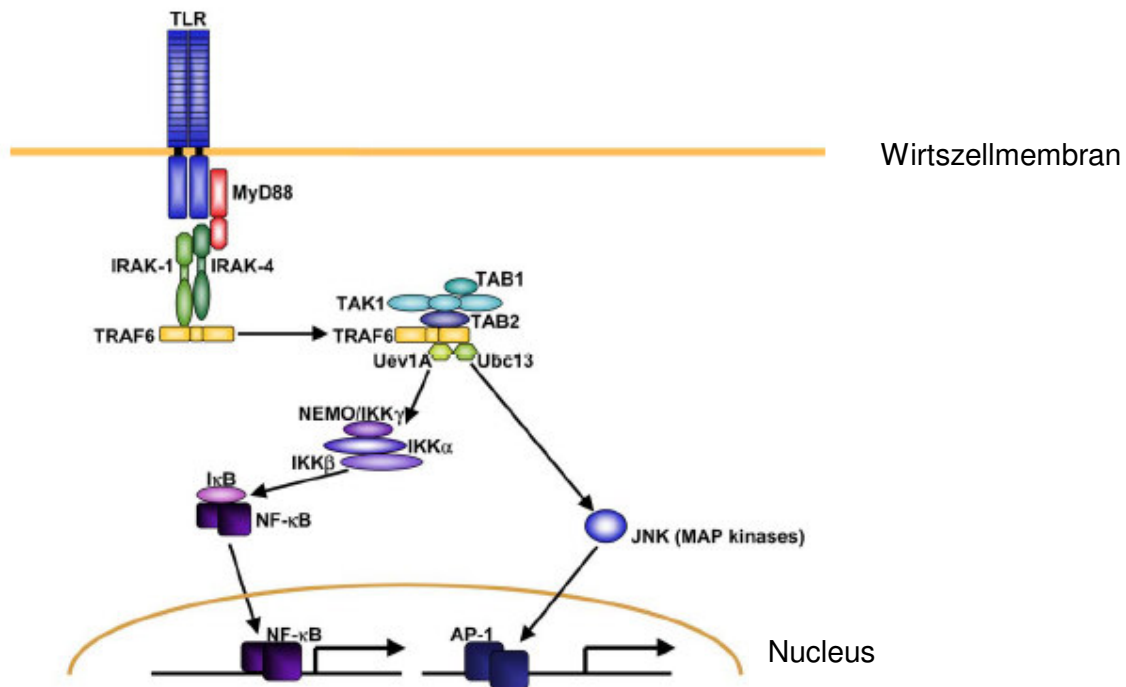
(modifiziert nach Akira et al. 2004)

Die TLRs sind Typ I- Transmembranproteine, deren extrazellulärer Teil (N- Terminus) für die spezifische PAMP- Erkennung aus Leucin-reichen Regionen (leucin rich repeats, LRRs) besteht. In Analogie zu anderen LRR- haltigen Proteinen konnte die Struktur der LRR- Region der TLRs in Computermodellen als hufeisenförmige

Struktur beschrieben werden (Bell et al. 2003). C-terminal weisen die TLRs eine zytoplasmatisch gelegene sog. TIR (Toll/ IL-1 receptor)- Domäne auf, an die ebenfalls TIR- haltige Adaptormoleküle über eine TIR- TIR- Interaktion binden können. Durch Rekrutierung weiterer Signalmoleküle wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, an deren Ende schließlich die Translokation von Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- $\kappa$ B, AP-1) in den Kern steht. Daraus resultiert die Produktion von Zytokinen und anderen Proteinen der Immunantwort (Takeda et al. 2003, Yamamoto et al. 2004). Mutationen in der TIR- Domäne der Toll-like Rezeptoren können zum Verlust der Signaltransduktion führen, wie es beim TLR4 von C3H/HeJ- Mäusen der Fall ist. Ein Austausch von Prolin zu Histidin in der Position 712 der TIR- Domäne macht diese Mäuse unempfindlich gegen LPS, da ihr TLR4 nach LPS- Stimulation kein Signal in der Zelle weiterleitet (Poltorak et al. 1998). Das Adaptormolekül MyD88 (myeloid differentiation factor-88) kann an allen von TLRs ausgehenden Signaltransduktionswegen beteiligt sein. MyD88 rekrutiert nach Bindung an die TIR- Domäne des TLRs verschiedene Signalkomponenten wie z.B. IL-1- Rezeptor- assoziierte Kinasen, IRAK. IRAK1 wird phosphoryliert und rekrutiert TRAF6 (TNF receptor- associated factor- 6), das einen Komplex mit TAB1 (TAK1- binding protein1) und TAB2 bildet und so die Kinase TAK1 (transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase1) aktiviert. Vom TRAF6/TAB/TAK1- Komplex (Signalosom) kann sowohl der I $\kappa$ B- Kinase (IKK)- als auch der MAPK- Signalweg ausgehen. Am Ende beider Signalwege werden die Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B bzw. AP-1 aktiviert und es kommt zur Produktion von Zytokinen und anderen Proteinen (s. Abb. 3). In TLR2- bzw. TLR4- abhängigen Signalwegen kann auch Mal/TIRAP, ein MyD88- ähnliches Adaptormolekül, rekrutiert werden, wobei die nachfolgende Kaskade unverändert bleibt. Neben dieser MyD88- abhängigen Zellaktivierung existiert für TLR3 oder TLR4 auch ein MyD88- unabhängiger Weg, der zur Aktivierung von IF-3 mit nachfolgender IFN $\alpha/\beta$ - Produktion führt. Das TLR- Erkennungssystem des Wirts erzielt seine Spezifität in der Erkennung verschiedener PAMPs mittels spezifischer LRRs, die TLR- Liganden spezifisch erkennen (Lien et al. 2000, Takeda et al. 2003) und unterschiedliche Signalkaskaden anwerfen. Einige TLRs heterodimerisieren zur spezifischen Liganderkennung, andere agieren als Homomere (Ozinsky et al. 2000). Das Zusammenspiel verschiedener TLRs macht die spezifische Erkennung strukturell ähnlicher TLRs möglich. TLR2 z.B. erkennt zusammen mit TLR1 tri- acyliertes, mit TLR6 di- acyliertes Lipoprotein von Bakterien



(Morr et al. 2002, Takeuchi et al. 2001 und 2002). Zusätzliche extrazelluläre Adaptermoleküle, die spezifisch an bestimmte TLRs binden wie z.B. MD2 an TLR4 bei der LPS-Erkennung (Nagai et al. 2002) oder mit verschiedenen TLRs interagieren wie CD14 mit TLR2 und TLR4 erhöhen die Spezifität des TLR-Systems weiter. Diese TLRs sind in verschiedenen Spezies und in verschiedenen Geweben bzw. Zellen auch abhängig von deren Differenzierungsstadien unterschiedlich exprimiert (Hornung et al. 2002, Mazzoni et al. 2004). Darüberhinaus können TLRs an verschiedenen Zellkompartimenten aktiviert werden. So geht das TLR2-, TLR4- und TLR5- Signal von der Zellmembran, die Signalkaskade von TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 hingegen vom endosomalen Lumen aus (Ahmad- Nejad et al. 2002, Takeda et al. 2003). Nach neueren Untersuchungen konnte TLR4 auch intrazellulär im Golgi-Apparat nachgewiesen werden (Hornef et al. 2002, Larz et al. 2002). Folglich wurde eine Funktion als LPS- Aufnahmerezeptor und als intrazellulärer Signaltransduktionsrezeptor diskutiert. Eine direkte TLR4- abhängige Aufnahme konnte jedoch nicht gezeigt werden (Dunzendorfer et al. 2004). Vielmehr war die LPS- Aufnahme über frühe Endosomen und Lysosomen unter Beteiligung des Golgi-Apparates CD14- abhängig (Kitchens et al. 1998, Poussin et al. 1998, Vasselon et al. 1999). TLR4 scheint erst im weiteren Internalisierungsprozess wichtig zu werden (Thieblemont et al. 1997). Kürzlich konnte an transfizierten humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293 Zellen) das Phänomen des LPS/TLR4-Trafficking gezeigt werden, welches beschreibt, dass TLR4- LPS- Komplexe schnell von der Zelloberfläche zum Golgi- Apparat und zurück wandern (Latz et al. 2002). Die Signaltransduktion selbst scheint in diesen Zellen aber von der Zelloberfläche auszugehen (Latz et al. 2002). Im Gegensatz dazu wurde in der Epithelzelllinie m- IC<sub>c12</sub> eine vom Golgi-TLR4 ausgehende Zellaktivierung beschrieben (Hornef et al. 2002). Für andere TLRs bleibt ein derartiges Trafficking noch zu untersuchen.



**Abb. 3 MyD88- abhängiger TLR- Signaltransduktionsweg (Erläuterung im Text)**  
(modifiziert nach Takeda, Akira, 2004)

#### 1.4.4 Das Nod- System

Neben den oben beschriebenen Transmembranrezeptoren der TLR- Familie wurden vor kurzem im Zytoplasma lokalisierte Rezeptoren des angeborenen Immunsystems beschrieben (Bertin et al. 1999, Inohara et al. 1999, Ogura et al. 2001), die wie TLRs LRRs aufweisen und NF- $\kappa$ B aktivieren können (Carneiro et al. 2004, Chamaillard et al. 2003a, Girardin et al. 2003a, Inohara et al. 2003a). Diese Rezeptoren der sog. Nod- (nucleotide- binding oligomerization domain) Familie scheinen an inflammatorischen Prozessen beteiligt zu sein, da bestimmte Mutationen, insbesondere von *nod2*, beim Menschen mit genetisch bedingten entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden können (Chamaillard et al. 2003a). Eine frame-shift Mutation, die zu einem Defekt in der LRR- Domäne von Nod2 führt, ist beispielsweise mit Morbus Crohn assoziiert (Bouma et al. 2003, Carneiro et al. 2004, Girardin et al. 2003a). Aufgrund der genannten Analogien der Nod-Rezeptoren zu den TLRs sowie zu bestimmten Pflanzenresistenzgenen (Girardin et al. 2002) liegt

die Vermutung nahe, dass auch Nod- Rezeptoren an der Erkennung intrazellulärer, mikrobieller Komponenten und an nachfolgender Zellaktivierung beteiligt sein könnten (Girardin et al. 2001, Inohara et al. 2001). Die bislang näher untersuchten Rezeptoren Nod1 (auch CARD4; caspase recruitment domain), das in zahlreichen Zelltypen zu finden ist, und Nod2 (=CARD15), das v.a. in Makrophagen/Monozyten exprimiert wird, besitzen beide eine C-terminale LRR- Domäne, die für die Liganderkennung verantwortlich ist. Zentral im Molekül liegt eine NBS (nucleotide binding site) oder NACHT (neuronal apoptosis inhibitor protein, CIITA, HET-E und TP1)- Region. N- terminal befindet sich bei Nod1 eine, bei Nod2 zwei CARDs, mittels derer die Nod- Rezeptoren ein Signal durch Wechselwirkung mit weiteren intrazellulären Molekülen weiterleiten. Dabei oligomerisieren die Nod- Rezeptoren durch CARD- CARD- Interaktionen mit der Kinase RIP2/RICK/CARDIAK (receptor interacting protein 2, RIP-like CARD- containing domain, CARD- containing interleukin1 $\beta$ - converting enzyme- associated kinase) und führen so über eine MyD88- unabhängige Signalkaskade zur NF- $\kappa$ B- Aktivierung und zur Produktion inflammatorischer Zytokine (Inohara et al. 2000, Kobayashi et al.2002, Chin et al. 2002). Für einige Moleküle des TLR- MyD88- Signalwegs wie IRAK, TRAF6, NIK, TAB2 und TAK1 konnte auch eine Beteiligung der Nod1/2- RIP2- Kaskade gezeigt werden (Opitz et al. 2004). Aufgrund der Mitwirkung von RIP2 an der TLR2-, TLR3- und TLR4- abhängigen Signalkaskade wird RIP2 als zentrale Schaltstelle zwischen TLR- und Nod- Signalweg diskutiert (Chin et al. 2002, Kobayashi et al. 2002). Das postulierte Zusammenspiel von TLR- und Nod- abhängigen zellulären Ereignissen wird auch durch Befunde bestärkt, die einen synergistischen Effekt von TLR2, TLR4 und TLR9- Agonisten mit einem bekannten Nod2- Aktivator (MDP= Muramyl-dipeptid) in der Zytokinsekretion beschreiben. Im Gegensatz dazu ist auch ein inhibitorischer Effekt des Nod2- Signallings auf eine TLR2- abhängige NF- $\kappa$ B- Aktivierung und auf eine daraus resultierende IL-12-, IL-18- und IFN- $\gamma$ - Produktion bekannt, der den Nod2- Weg als negativen Regulationsmechanismus für eine TLR2- vermittelte T- Helfer- Typ1- Antwort darstellt (Watanabe et al. 2004). Neben einer Nod1/2- vermittelten Induktion proinflammatorischer Zytokine, welche entweder synergistisch oder antagonistisch mit dem TLR- System zusammenwirkt, ist für Nod2 auch eine Induktion der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  nachgewiesen worden, die durch den TLR- Agonisten Pam3 Cys- KKKK ausgelöst wird (Netea et al. 2004b). Eine Vernetzung TLR- und Nod- abhängiger Signalwege

scheint also plausibel. Nod1 und Nod2 wurden als intrazelluläre Sensoren für das zunächst fälschlicherweise (Travassos et al. 2004) als TLR2- Agonist beschriebene Peptidoglykan (PGN) beschrieben. Innerhalb dieser Struktur können Nod1 und Nod2 spezifisch unterschiedliche Motive erkennen: von Nod1 wird als kleinste Strukturkomponente ein meso- Diaminopimelinsäure (DAP)- haltiges Motiv eines Tripeptids erkannt, das ein Abbauprodukt von Peptidoglykan darstellt und v.a. in Gram- negativen Bakterien vorkommt (Chamaillard et al. 2003b, Girardin et al. 2003b, Girardin et al. 2003c). Demgegenüber dient Nod2 als allgemeiner Sensor für Gram- positive und Gramnegative Bakterien. Es detektiert Muramyldipeptid (MDP), das in einem natürlichen Peptidoglykanabbauprodukt enthalten ist (Girardin et al. 2003c, Girardin et al. 2003d, Inohara et al. 2003b, Pauleau et al. 2003, Tanabe et al. 2004). Die Erkennung der Peptidoglykan- Motive erfolgt bei den Nod- Rezeptoren ebenso wie die Ligand- Erkennung bei den TLRs vermutlich über die LRR- Domäne.

#### **1.4.5 Störung der Makrophagenabwehr durch pathogene Bakterien**

Da Makrophagen eine Schlüsselfunktion in der angeborenen Immunabwehr einnehmen, haben pathogene Bakterien mehrere Mechanismen zur Umgehung oder funktionellen Beeinträchtigung der Makrophagen entwickelt, um effektiv in einen Wirtsorganismus eindringen zu können (Hornef et al. 2002, Rosenberger et al. 2003, Underhill et al. 2002):

1. Vermeidung einer Erkennung durch Makrophagen durch Veränderung des konservierten PAMP- Motivs von bakteriellem LPS
2. Vermeidung einer Erkennung durch Makrophagen mittels intrazellulärem Ausweichen: Bakterien wie Salmonellen oder Listerien entgehen einer extrazellulären Immunantwort durch Eindringen in das Wirtszytosol (Sansonetti 2001).
3. Störung der Phagozytosefähigkeit von Makrophagen: Yersinien besitzen mit ihren Yops ein effektives System, um der Phagozytose durch Makrophagen zu widerstehen (Rosenberger et al. 2003). Ähnliche Funktionen kommen z.B. den Yop- homologen Proteinen in *P. aeruginosa* zu. Zu nennen sind auch die

- Induktion von pro- apoptotischen bzw. die Inhibition von anti- apoptotischen Signalwegen durch YopP/J (Ruckdeschel et al. 2002).
4. Vermeidung einer intrazellulären Degradation durch Verharren in membrangebundenen Kompartimenten (pathogene *Echerichia coli*, *Bordetella pertussis*), durch Unterbindung der phagolysosomalen Reifung (z.B. *Legionella pneumophila*) oder durch Inaktivierung antimikrobieller Peptide oder Enzyme (*Mycobacterium tuberculosis*, Salmonellen, *Helicobacter pylori*)
  5. Ausschaltung von Makrophagen durch Störung der MAPK- und NF- $\kappa$ B-abhängigen Signalwege: Yop P/J stört nicht nur den MAPK- Signalweg, sondern verhindert auch die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern, so dass keine proinflammatorischen Mediatoren produziert werden.
  6. Ausschaltung von Makrophagen durch Modulation makrophagenabhängiger Zytokinnetzwerke: die Modulation makrophagenabhängiger Zytokinproduktion kann zu einer Deaktivierung von Makrophagen führen, aber auch zu einer Störung der Kommunikation der an einer Entzündungsreaktion beteiligten Zellen. Die unter 1.3.4.3 beschriebene IL-10- Induktion und die daraus resultierende TNF- $\alpha$ - Suppression durch rLcrV (Sing et al. 2002a) lassen sich hierunter einordnen.

#### **1.4.6 Makrophagendeaktivierung im Rahmen einer TLR- Toleranz**

Abgegrenzt von den unter 1.4.5 beschriebenen Mechanismen einer Makrophagendeaktivierung („silencing“) muss das Phänomen einer TLR- Toleranz betrachtet werden. Der Wirt verhindert mit diesem Mechanismus eine überschießende Immunreaktion bei dauerhaftem Kontakt mit PAMPs verschiedener mikrobieller Organismen (Beutler et al. 2003, Beutler 2004), wobei es nicht zu einer absoluten „Lähmung“ der Makrophagen kommt. Makrophagen reagieren nach einmaligem oder dauerhaftem Kontakt mit einem PAMP auf nochmalige Exposition mit dem gleichen oder- in bestimmter Konstellation- mit einem anderen PAMP nicht mehr mit der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-12 oder TNF- $\alpha$ . Von TLR- Homotoleranz spricht man, wenn Erst- und Zweitstimulus über denselben TLR , von TLR- Heterotoleranz, wenn Erst- und Zweitstimulus verschiedene TLRs benutzen und nachfolgende NF $\kappa$ B- Aktivierung unterbleibt. Die Endotoxintoleranz

stellt das am besten untersuchte Toleranzphänomen dar: Makrophagen sind nach Vorbehandlung mit einer geringen Menge an LPS refraktär auf eine Zweitgabe einer großen Menge an LPS und produzieren nicht mehr in adäquatem Maß TNF- $\alpha$ . *In vivo* hat die Entstehung einer Endotoxintoleranz die Auswirkung, dass ein Organismus nach Vorbehandlung mit einer geringen LPS- Menge eine ansonsten tödliche LPS-Dosis überlebt (Beeson 1947, Favorite et al. 1942, Morgan 1948).

Es sind mindestens drei sich nicht gegenseitig ausschliessende Mechanismen bekannt, mit deren Hilfe eine TLR- Homo- bzw. Heterotoleranz erreicht wird (Cross 2002, Dobrovolskaia et al. 2002, Fan et al. 2004, Freudenberg et al. 1998):

1. Modulation der Expression oder Funktion des jeweiligen TLR: LPS- bzw. Pam3Cys- induzierte TLR- Homo- oder Heterotoleranz wird vom Wirt durch eine Verminderung der Expression von TLR4 und/oder TLR2 beantwortet (Martin et al. 2001, Nomura et al. 2000, Sato et al. 2000, Wang et al. 2002).
2. Interferenz mit intrazellulären Signalkaskaden z.B. auf der Ebene von IRAK-Molekülen, des IKK- Komplexes oder von MAPKs (Dobrovolskaia et al. 2003, Jacinto et al. 2002, Kobayashi et al. 2002a, Li et al. 2000, Martin et al. 2001, Medvedev et al. 2002, Ropert et al. 2003, Sato et al. 2000 und 2002, Yeo et al. 2003).
3. Sekretion löslicher anti- inflammatorischer Mediatoren wie IL-10 oder TGF- $\beta$  (Karp et al. 1998, Randow et al. 1995): diese Zytokine lösen dann die Produktion intrazellulärer Moleküle der SOCS- Familie (suppressor of cytokine signaling; Berlato et al. 2002) oder von SHIP (SH2- containing inositol phosphatase; Sly et al. 2004) im Rahmen einer LPS- Toleranz aus.

Eine solche TLR- Toleranz ist als sehr komplexer Vorgang zu betrachten, mit dem sich ein Organismus bei wiederholter Nicht- Selbst- Erkennung gegen überschüssige Immun- und Entzündungsreaktionen schützt.

## 2 Fragestellungen

Aufgrund der oben beschriebenen Daten zur Immunmodulation durch LcrV ergaben sich für die vorliegende Dissertation folgende Fragestellungen:

1. Welche Mechanismen liegen der LcrV- induzierten IL-10- Produktion von Makrophagen zugrunde
2. Welcher extrazelluläre *pattern- recognition receptor* (PRR) ist an der LcrV- abhängigen Signaltransduktion beteiligt
3. Kann die „immunsuppressive“ Domäne einem LcrV- Strukturmerkmal zugeordnet werden
4. Kann das *lcrV*- Gen so mutiert werden, dass die LcrV- induzierte IL-10- Produktion abgeschwächt wird und die Bedeutung der IL-10- Induktion im Mausinfektionsmodell überprüft werden kann
5. Sind intrazelluläre PRRs der Nod- Familie an der Immunmodulation durch LcrV beteiligt

## 3 Material

### 3.1 Bakterienstämme

*E. coli*

Name	Beschreibung
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> <i>endA1 hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>k</sub><sup>+</sup></i> ) <i>supE44 thi-1 <math>\lambda^{-1}</math> recA1 gyrA96 recA1 gyrA96 relA1 <math>\Phi</math>80d lacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>(lacZYA-argF<sup>g</sup>) U169</i>
M15	M15 [pREP4], Km <sup>R</sup>
S17-1 $\lambda$ pir	Tp <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> M <sup>+</sup> , RP4:2-Tc:Mu:Km Tn7, $\lambda$ pir

*Yersinia enterocolitica*

Name	Beschreibung	Referenz
WA-314	Serovar O:8; klinisches Isolat, welches das Virulenzplasmid pYVO:8 besitzt, NaI <sup>R</sup>	Heesemann und Laufs, 1983
WA-C	WA-314 ohne pYV, NaI <sup>R</sup>	Konrad Trülsch Max. v. Pettenkofer Institut, München, Deutschland
WAP TNK <sup>-</sup> (Empfängeryersinie)	Km <sup>R</sup> , NaI <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> hergestellt durch Konjugation von WAP TNK (Km <sup>R</sup> ) mit SM10 $\lambda$ pir GV $\Omega$ VH (Cm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> )	A. Roggenkamp, Max v. Pettenkofer Institut, München, Deutschland
WA-C (pYV- LcrV)	Kontroll- Yersinie ohne Kodonaustausch im <i>lcrV</i> O:8, die den unter 5.3.2 beschriebenen Mutageneseprozess durchlaufen hat, Km <sup>R</sup> NaI <sup>R</sup> in der Arbeit als WAC-O:8 bezeichnet	diese Arbeit
WA-C (pYV- LcrV K42Q)	Yersinie mit Kodonaustausch im <i>lcrV</i> (K42Q), Herstellung unter 5.3.2 beschrieben, Km <sup>R</sup> , NaI <sup>R</sup> in der Arbeit als WAC-M74 bezeichnet	diese Arbeit



## 3.2 Eukaryotische Zelllinien und Kulturmedien

Zelllinie	Beschreibung	Kulturmedium
HEK- 293	Human embryonic kidney cells 293	DMEM, 10 % FCS
HeLa	Humane Epithelzellen; Zervix-Karzinom-Zelllinie (adhärent)	DMEM, 10 % FCS, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1x essentielle Aminosäuren
MM6	humane Mono-Mac-6- Monozyten Zelllinie (Ziegler- Heitbrock)	RPMI, 10 % FCS, 200U/mL Penicillin 200 µg/mL Streptomycin, 1X Non- essential amino acids (NEA) 1X OPI-Media Supplement
J774A.1	murine Makrophagen	RPMI, 10 % FCS, 100 U/mL Penicillin, 100µg/mL Streptomycin

## 3.3 Oligonukleotide und Plasmide

### 3.3.1 Oligonukleotide für die Integration von PCR- Produkten in Expressionvektoren

Name	Sequenz	Vektor
pQE30 V F <i>Bam</i> HI	ATAGGATCCATTAGAGCCTACGAACAAAAC	pQE30
pQE30 V R <i>Hind</i> III	ATAAAGCTTTTACCTCGTGTCATCTAGCAG	pQE30
pQE30 V130 R <i>Hind</i> III	ATAAAGCTTTTAGATACGATCGGCGGTAAAGA	pQE30
pLcrV F <i>Eco</i> RI	ATAGAATTCGCCATGGTTAGAGCCTACGAACAAAAC	pcDNA 3.1-
pLcrV R <i>Bam</i> HI	ATAGGATCCTTACCTCGTGTCATCTAGCAGAC	pcDNA 3.1-
pLcrV130 R <i>Bam</i> HI	ATAGGATCCTTAGATACGATCGGCGGTAAAGA	pcDNA 3.1-
pLcrV100C F <i>Eco</i> RI	ATAGAATTCGCCATGGACGACGAGTTGCACGAG	pcDNA 3.1-

pPcrV F <i>EcoRI</i>	ATAGA <u>ATTCGCC</u> CATGGAAGTCAGAAACCTTAATGCC	pcDNA 3.1-
pPcrV R <i>BamHI</i>	ATAG <u>GATCC</u> CTAGATCGCGCTGAGAATGTC	pcDNA 3.1-

Unterstrichen markiert sind die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme.

F= forward, R= reverse

### 3.3.2 Ortsspezifische Mutagenese

Name	Sequenz
V74 Forward	GGTTCAGTTAGTCAAAGAT <u>CAA</u> AAGATAGATATTTCCATTAATA
V74 Reverse	TATTTAATGGAAATATCTATCTTTT <u>GAT</u> CTTTGACTAACTGAACC

**Fett gedruckt ist die mutierte Base. Unterstrichen ist das Triplet, das zum Aminosäureaustausch führt.**

### 3.3.3 Expressionsvektoren und klonierte Gene

Name	Insert/Eigenschaften	Referenz
pQE30	Expressionvektor, N- terminaler (His) <sub>6</sub> - Tag, Amp <sup>R</sup>	QIAGEN, Hilden, Deutschland
pQE30 LcrV	LcrV von <i>Y. enterocolitica</i> O:8 N- terminal (His) <sub>6</sub> - tagged	diese Arbeit
pQE30 LcrV O:3	LcrV von <i>Y. enterocolitica</i> O:3 N- terminal (His) <sub>6</sub> - tagged	diese Arbeit
pQE30 LcrV pestis	LcrV von <i>Y. pestis</i> N- terminal (His) <sub>6</sub> - tagged	James Hill, Porton Down, Großbritannien
pQE30 AcrV	LcrV von <i>Aeromonas salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i> N-terminal (His) <sub>6</sub> - getagged	diese Arbeit
pQE30 V130 O:3	LcrV (His) <sub>6</sub> Δ131-334 von <i>Y. enterocolitica</i> O:3	diese Arbeit
pQE30 V130 pstb.	LcrV (His) <sub>6</sub> Δ131-334 von <i>Y. pseudotuberculosis</i>	diese Arbeit
pQE30 LcrV73	LcrV von <i>Y. enterocolitica</i> O:8 mit Kodonaustausch K40Q	diese Arbeit
pQE30 LcrV74	LcrV von <i>Y. enterocolitica</i> O:8 mit Kodonaustausch K42Q	diese Arbeit
pELAM-1-luc	Endothelial cell- leukocyte adhesion molecule- promoter; NFκB- abhängiger Luciferasereporter	Carsten Kirschning, TU München Kirschning et al.1998
pCD14	CD14- Gen im Expressionsplasmid pRK, Amp <sup>R</sup>	Carsten Kirschning, TU München Kirschning et al.1998
pTLR2	TLR2- Gen im Expressionsplasmid pFlag- CMV-1, Amp <sup>R</sup>	Carsten Kirschning et al.1998

pTLR4	TLR4- Gen im Expressionsplasmid pFlag- CMV-1, Amp <sup>R</sup>	Carsten Kirschning et al.1998
pMD2	humanes MD2- Gen mit Flag- Tag, Amp <sup>R</sup>	Kensuke Miyake, Universität Tokio, Japan
pMyD88DN	dominant negatives MyD88 (aa152- aa296)	Marta Muzio, Mario Negri Institut, Meiland, Italien
pTLR2DN	dominant negatives TLR2, P681H Mutation	Underhill et al. 1999
pRIP2DN	dominant negatives RIP2 (aa406- aa540)	Gabriel Nunez, Department of Pathology and Comprehensive Cancer Center, University of Michigan Medical School, Washington, USA Ogura et al. 2001
pNod1	Nod1- HA in pcDNA 3.1	Gabriel Nunez, Inohara et al. 2001
pNod2- HA	Nod2- HA in pcDNA 3.1	Gabriel Nunez; Ogura et al. 2001
pNod2 wt	Nod2 in pBK CMV- Vektor	Dana Philpott, Pasteur Institut, Paris, Frankreich
pNod1- EGFP	Nod1 C- terminal EGFP- tagged, p- EGFP-C1- Vektor (Clontech)	Hicham Bouabe, Max v. Pettenkofer Institut, München, Deutschland
pNod2- EGFP	Nod2 C- terminal EGFP- getagged	Hicham Bouabe Max v. Pettenkofer Institut, München, Deutschland
pNod1DN/LF	LRR- Region des <i>NOD1</i> - Gens in pcDNA 3.1	Rudi Haase, Max v. Pettenkofer Institut, München, Deutschland
pNod2FS	Nod2 3020InsC frame- shift mutation in pBK CMV- Vektor	Dana Philpott, Pasteur Institut, Paris, Frankreich Girardin et al. 2003a
RSV-β- galactosidase	<i>Rous sarcoma virus</i> -β- galactosidase	Carsten Kirschning, TU München Kirschning et al.1998
<b>pSUP</b>	Klonierungsvektor für Einführung der Punktmutation ins <i>lcrV</i>	Andreas Roggenkamp, Max v. Pettenkofer Institut, München
<b>pSUP/lcrGVH</b>	pSUP mit <i>lcrGVH</i> - Insert, Cm <sup>R</sup>	Andreas Roggenkamp, Max v. Pettenkofer Institut, München
<b>pKs</b>	Klonierungsvektor, <b>Amp<sup>R</sup></b>	Fermentas, St. Leon- Rot, Deutschland
<b>pJUL1.ApGPCAT+sacB</b>	Suizidvektor mit <i>sacB</i> - Gen, <b>Cm<sup>R</sup></b>	Andreas Roggenkamp, Max v. Pettenkofer Institut, München

pJULpGPCAT+sacB-LcrV M74	<i>lcrGV74H</i> mit K42Q- Kodonaustausch im LcrV von <i>Y. enterocolitica</i> O:8, Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pJULpGPCAT+sacB-LcrV O:8	<i>lcrGV74H</i> mit Wildtyp- LcrV von <i>Y. enterocolitica</i> O:8, Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pJULGVΩVH	Cm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Andreas Roggenkamp, Max v. Pettenkofer Institut, München
<b>pEGFP-1</b>	<b>Klonierungsvektor mit EGFP, Amp<sup>R</sup></b>	Clontech, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
pIL-10- EGFP	muriner -1538/+64 IL-10- Promoter in der MCS des p- EGFP-1- Vektors	diese Arbeit, IL-10- Promoter von Stephen T. Smale, Howard Hughes Medical Institut, Los Angeles, USA

## 3.4 Enzyme

### 3.4.1 Restriktionsenzyme

Name	Hersteller	Temperatur
<i>Bam</i> H I (10 U/μl)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	37°C
<i>Eco</i> R I (10 U/μl)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	37°C
<i>Hind</i> III (10 U/μl)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	37°C
<i>Sal</i> I (10 U/μl)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	37°C
<i>Sst</i> I (10U/μl)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	37°C
<i>Xho</i> I (10U/μl)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	37°C

### 3.4.2 Enzyme für die PCR, Ligation und Proteinreinigung bzw. –spaltung

Name	Hersteller
Ampli Taq Gold	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Cloned <i>Pfu</i> Polymerase	STRATAGENE, La Jolla, Kanada
Proteinase K (fungal)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

## 3.5 Antikörper

### 3.5.1 Primäre Antikörper für indirekte Immundetektion nach SDS-PAGE und Western Transfer sowie für Immunpräzipitationen, Immunfluoreszenz- und FACS-Analysen

Bezeichnung	Spezifität	Isotyp und Herkunft	Hersteller/ Bezug über	Referenz
Anti- LcrV	gegen LcrV gerichtet	polyklonales Serum aus Kaninchen	Andreas Sing Max von Pettenkofer-Institut, München, Deutschland	diese Arbeit
Anti- HA	gegen HA- Tag gerichtet	polyklonales Serum aus Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	siehe Produktinformation
Anti- Nod 11-A	gegen humanes Nod1 gerichtet	polyklonales Serum aus Kaninchen	ALPHA DIAGNOSTICS, USA	siehe Produktinformation
Anti- Nod2	gegen humanes Nod2 gerichtet	polyklonales Serum aus Kaninchen	Cayman CHEMICAL COMPANY, USA	siehe Produktinformation
Anti- TLR2 (C-19) IgG	gegen humanes TLR2 gerichtet	polyklonales Serum aus Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	siehe Produktinformation
Anti- TLR2 (N-17) IgG	Gegen humanes TLR2 gerichtet	polyklonales Serum aus Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	siehe Produktinformation
Anti- TLR4 (H-80) IgG	gegen humanes TLR4 gerichtet	polyklonales Serum aus Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	siehe Produktinformation
MEM 15	gegen humanes CD14 gerichtet	monoklonaler nicht-blockierender Antikörper	Dr. Vaclav Horejsi, Institut für Molekulare Genetik, Prag, Tschechien	diese Arbeit
MEM 18	gegen humanes CD14 gerichtet	monoklonaler, blockierender Antikörper	Dr. Vaclav Horejsi, Institut für Molekulare Genetik, Prag, Tschechien	diese Arbeit
NF- $\kappa$ B p65 (C-20)	gegen NF- $\kappa$ B gerichtet	polyklonales Antiserum aus Ratte	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	siehe Produktinformation

### 3.5.2 Sekundäre Antikörper für Western Transfer- Analysen

Bezeichnung	Spezifität	Hersteller
HRP Anti-Maus IgG (aus Schaf)	IgG mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert gegen murines IgG gerichtet	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
HRP Anti-Kaninchen IgG (aus Esel)	IgG mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert gegen Kaninchen IgG gerichtet	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland

### 3.5.3 Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

Bezeichnung	Spezifität	Hersteller
Cy3- gekoppeltes IgG	Cy3- gekoppelt, gegen Ratten IgG gerichtet	Dianova, Hamburg, Deutschland
WA vital- Serum	gegen <i>Y. enterocolitica</i> O:8 gerichtet	J. Heesemann Max v. Pettenkofer Institut München
FITC-conjugated AffiniPure Anti- Maus (aus Ziege)	Fluorescein gekoppelt, gegen murines IgG gerichtet	Dianova, Hamburg, Deutschland
FITC-conjugated AffiniPure Anti- Kaninchen (aus Ziege)	Fluorescein gekoppelt, gegen Kaninchen IgG gerichtet	Dianova, Hamburg, Deutschland
TRITC-conjugated AffiniPure Anti- Kaninchen (aus Ziege)	Rhodamin gekoppelt, gegen Kaninchen IgG gerichtet	Dianova, Hamburg, Deutschland

### 3.6 Chemikalien

Name	Hersteller/Lieferant
Acrylamid-Mix/ Protogel	National Diagnostics, Atlanta, USA
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ampuwa <sup>®</sup> (für Spülzwecke)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Aqua bidest, DNase- frei	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ATP- Magnesium Salz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
BHI (Brain Heart Infusion)-Medium	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BSA (bovine serum albumine)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Calciumchlorid	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Coenzym A Lithium Salz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	MERCK, Darmstadt, Deutschland
D- Luciferin (Firefly Luciferin)	BIOMOL, Hamburg, Deutschland
DMEM (Dulbecco's modified eagle media)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Längenstandard (Ready Load™ 1 kb)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DTT (1,4- Dithio-DL- threitol)	Applichem, Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
FCS (fötales Kälberserum)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd 37 %	MERCK, Darmstadt, Deutschland
HEPES ( <i>N</i> -2[Hydroxyethyl]piperazine- <i>N'</i> -[2-ethanesulfonic acid])	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	peqlab, Erlangen, Deutschland
LB (Luria Bertani)-Agar	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
LB (Luria Bertani)-Medium	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MDC (Monodansylcadaverin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MDP (Muramyl-dipeptid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MEM NON- ESSENTIAL AMINOACID SOLUTION (100x)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Moviol 4-88	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge (36 %)	MERCK, Darmstadt, Deutschland
OPI MEDIA SUPPLEMENT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Pam3Cys	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PBS	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PCR Nukleotid Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-Lösung (100X)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (complete)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
<i>Protein Assay</i> (Farbstoff-Konzentrat)	BIO- RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland

Protein-AG-Agarose	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Proteingrößenstandard (Bench Mark Prestained Protein Ladder)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Protease Peptone	Difco Laboratories, Detroit
Rhodamin-Phalloidin	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Salzsäure rauchend	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Saccharose	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Spectinomycin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamine)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Trichloressigsäure	MERCK, Darmstadt, Deutschland
TritonX-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypanblau (Benzaminblau)	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Trypsin-EDTA	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Zy mosan A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

### 3.7 Kits

Bezeichnung	Hersteller
ECL Western blotting detection reagents	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QuikChange Site- Directed Mutagenesis Kit	STRATAGENE, La Jolla, Kanada
Nucleobond AX Plasmid Maxi Kit	MACHEREY- NAGEL, Düren, Deutschland
QIAprep Spin MiniPrep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
EZ- Label Rhodamine Protein Labeling Kit	PIERCE, Bonn, Deutschland
ExGen 500 Transfektions Kit	Fermentas, St. Leon- Rot, Deutschland
DuoSet ELISA Kits	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt, Deutschland

### 3.8 Weitere Materialien

Name	Hersteller
CELLULOSENITRAT(E) PROTRAN BA 85	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Centricon (10 kDa, 30 kDa, 50 kDa)	Millipore, Eschborn, Deutschland
Deckgläschen für Mikroskopie	Schubert & Weiss, Wackersdorf, Deutschland
Einmalpipetten, steril (5mL, 10mL, 25mL, FALCON)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Fuji Medical X-Ray Film	Fuji Photo Film, Düsseldorf, Deutschland
HisTrap HP-Ni-NTA- Säule	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
HiTrap Desalting- Säule	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland



READY GEL 12 % TRIS- HCL	BIO- RAD Laboratories, München, Deutschland
Steriflip (0,22 µm, 50 mL)	Millipore, Eschborn, Deutschland
Superdex 200- Säule	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
TC-80- Kulturflaschen, 80cm <sup>2</sup>	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
24-/6- well Zellkulturplatten (FALCON)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zellschaber (FALCON)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

### 3.9 Peptide und Proteine

Die Peptide V1-V5, V7, V9, V71 (E34Q), V73 (K40Q), V74 (K42Q), V75 (K43Q) und V76 (K49Q) wurden von Prof. Dr. D. Palm (Physiologische Chemie, Peptidsynthese, Biozentrum der Universität Würzburg) bezogen und weisen C- terminal einen Cys-Tag auf.

rPcrV wurde von Anna Geiger (Max v. Pettenkofer- Institut, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

rLcrV von *Y. pestis* wurde von James Hill (DSTL Porton Down, Großbritannien) zur Verfügung gestellt.

### 3.10 Geräte

Gerät	Typ und Hersteller
Brutschränke	BBD 6220, Heraeus, Hanau, Deutschland
Elektrophoresekammer DNA	Agagel Standard G45/1, Biometra®, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer Protein	Mini-Protean 3, BIO- RAD Laboratories, München, Deutschland Hofer SE 400, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland Criterion™, BIO- RAD Laboratories, München, Deutschland
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II, BIO- RAD Laboratories, München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Leitz DM RBE, Leica, Mannheim, Deutschland
French Press	SLM-AMINCO, Spectronic Instruments, French Press® Pressure Cells (Typ 40K Manual-Fill-Cell, FA-030) und Cell Press, New York, USA
Geldokumentationssystem/ UV-Transilluminator	BIO- RAD Laboratories, München, Deutschland
HAMAMATSU CCD- Kamera	Hamamatsu Phototonics, Hamamatsu City, Japan
Lasermikroskop, konfokal	Leica DM IRB, Bensheim, Deutschland
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Luminometer	Luminometer READIT, BERTHOLD, Bad Wildbach, Deutschland
pH-Meter	pH211 Microprocessor pH-Meter, Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland

Präzisionswaagen	Sartorius Basic Plus (BP 615), Sartorius, Göttingen, Deutschland Sartorius BL 1500S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Spektralphotometer	Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Rotator	Bachofer Laborgeräte, Reutlingen, Deutschland
Schüttelinkubatoren	Certomat BS-1, B. Braun Biotech International, Osterode am Harz, Deutschland
Spannungsgeräte	Power Pac 1000, BIO- RAD Laboratories, München, Deutschland
Sterilwerkbänke	Heraeus, HS12, Hanau, Deutschland
Thermocycler	T3 Thermocycler, Biometra
Thermoschüttler	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transferapparatur	Multiblot, C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
UV- Schneidetisch	BACHHOFER, Reutlingen, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg, Deutschland Sigma, 3K30, B. Braun Biotech International, Osterode am Harz, Deutschland Sigma, 1K15, B. Braun Biotech International, Osterode am Harz, Deutschland Optima™ TL Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Beckman Instruments, Inc., CA, USA

## 4 Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Präparation von DNA

##### 4.1.1.1 Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *Y. enterocolitica*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden verschiedene Kit-Systeme verwendet. Die Reinigung von Plasmid-DNA im Maßstab bis zu 10 µg aus 10 mL Bakterienkultur (Minipräparation) erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin MiniPrep Kit (Qiagen). Für die Isolierung großer Plasmidmengen, d.h. im Maßstab von 300-500 µg aus 100 mL Bakterienkultur, wurde das EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Es wurde nach den jeweiligen Anweisungen des Herstellers vorgegangen. Beide Systeme beruhen auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und das unterschiedliche Verhalten von chromosomaler und Plasmid-DNA im alkalischen Milieu, die dadurch von der Plasmid-DNA getrennt werden kann.

##### 4.1.1.2 Präparation von DNA-Fragmenten nach elektrophoretischer Auftrennung

Elektrophoretisch im Agarosegel getrennte DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht als Block aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) gereinigt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

##### 4.1.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm (Absorptionsmaximum).

Gemessen wurde in Quarzküvetten bei Verdünnung von 1:20-1:50. Als Nullwert wurde Ampuwa (Fresenius Kabi, Bad Homburg) bzw. der Elutionspuffer des zur DNA-Gewinnung verwendeten Kits gesetzt. Die Berechnung der DNA-Konzentration aus der ermittelten Absorption erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

Verunreinigungen der Probe durch Proteine konnten durch zusätzliche Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von  $\lambda=280\text{nm}$  identifiziert werden. Der Quotient  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  verringert sich mit zunehmender Verunreinigung der Probe mit Proteinen und beträgt bei sehr reiner DNA annähernd 1,8.

Ausserdem wurde zur Konzentrationsbestimmung einer DNA- Lösung ein bestimmtes Volumen an Lösung im Agarosegel zusammen mit einer definierten DNA- Menge an Grössenstandard (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und die Fluoreszenzintensität der zu untersuchenden Lösung mit der des Markers verglichen.

#### 4.1.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmentgemische können durch Elektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt werden. Dieser Vorgang ermöglicht die Analyse der Fragmentgröße mit Hilfe eines aufgetragenen Längenstandards sowie eine quantitative Bestimmung.

Für die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Flachbettgele mit einer Agarosekonzentration von 0,7 bis 1,4 % eingesetzt. Als Gel- und Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Vor der Gelelektrophorese wurden die Proben ca. im Verhältnis 6:1 mit Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 90-120 V.

6x Auftragspuffer: 50 % (v/v) Glycerin; 0,1 mM EDTA; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; pH 7,0  
10x TAE: 40 mM Tris/HCl, pH 8,0; 5 mM Essigsäure; 1 mM EDTA

#### 4.1.2 Visualisierung von DNA

Nach der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten DNA-Banden im Agarosegel in einem Ethidiumbromidbad (1  $\mu\text{g/mL}$ ) für 10-20 min gefärbt und durch Fluoreszenzanregung mit UV-Licht ( $\lambda=260\text{ nm}$ ) sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit einem UV- Transilluminatorsystem (BIO- RAD Laboratories, München, Deutschland)

#### 4.1.2.1 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech in Konstanz durchgeführt.

### 4.1.3 Enzymatische Behandlung von DNA

#### 4.1.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungs-, Mutagenese- oder Analysezwecke diente die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). DNA-Fragmente können *in vitro* durch thermostabile DNA-Polymerasen vervielfältigt werden.

Die Amplifikation erfolgt über zwei gegensätzlich orientierte Oligonukleotid- Primer. Diese lagern sich an die denaturierten Einzelstränge der zu amplifizierenden DNA an und dienen der DNA-Polymerase als Ansatzstelle zur Synthese.

Für die Reaktion wurden standardmäßig jeweils 2  $\mu\text{M}$  Oligonukleotid, 100  $\mu\text{M}$  jedes dNTPs (Invitrogen) und 0,6 U Ampli Taq Gold DNA Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Als Matritze wurde entweder gereinigte Plasmid-DNA oder 5min in Ampuwa hitzepräparierte Bakterien herangezogen. Als Puffer diente der 10x PCR Buffer (Roche Diagnostics, Mannheim) .

Die Amplifikation der DNA-Fragmente wurde in automatisierten PCR-Prozessoren (T3 Thermocycler, Biometra) durchgeführt. Ein Zyklus umfasste 30-60 sec Denaturierung bei 94°C, 30-60 sec Anlagerung der Oligonukleotide bei den Primern angepasster Temperatur und abschließend 60-90 sec Extension bei 75°C. Insgesamt wurde dieser Zyklus 24-32x wiederholt. Zu Beginn der Amplifikation wurden 5 min Anfangsdenaturierung bzw. Aktivierung der AmpliTaq Gold Polymerase bei 94°C vorgeschaltet. Auf den letzten Zyklus folgten 7 min. Extension bei 75°C, um die Polymerisierung zu vervollständigen.

Der Erfolg der PCR wurde jeweils mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

#### 4.1.3.2 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

DNA- Verdau mit Restriktionsenzymen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer. Pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA wurden 2,5 U Enzym eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  für Plasmid-DNA und 6-16 h je nach Enzym für PCR- Produkten. Das Endvolumen des Reaktionsansatzes wurde so gewählt, dass die eingesetzte Enzymmenge 10 % des Gesamtvolumens nicht überschritt.

Mehrfachspaltungen wurden, soweit möglich, in einem Puffer durchgeführt. Waren die Puffersysteme zweier Restriktionsenzyme nicht kompatibel, erfolgte der Verdau zuerst in dem Puffersystem des schlechter spaltenden Enzyms (v.a. bei Plasmiden). Anschließend wurde der Restriktionsansatz mittels PCR- Purification Kit (Quiagen) vom Puffer gereinigt und anschliessend der Zweitverdau im anderen Puffer durchgeführt.

Im Anschluss an die Restriktion wurde der vollständige Ansatz auf einem Agarosegel aufgetrennt. Das herausgeschnittene DNA-Fragment der korrekten Größe wurde nach der Gelelektrophorese als möglichst kleiner Gelblock aus dem Gel geschnitten und mittels Gel Extraction Kit (Quiagen) aus dem Gel extrahiert.

#### 4.1.3.3 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren (pQE30, pcDNA3.1) wurde mit T4-DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) 16 h bei  $18^\circ\text{C}$  durchgeführt. Das Reaktionsvolumen wurde relativ klein ( $20\ \mu\text{L}$ ) gewählt. Das Insert-Fragment wurde im Überschuss zum Ligationsansatz gegeben (Insert: Vektor = 4:1), wobei 10 bis 50 ng Vektor-DNA eingesetzt wurden. Die DNA wurde mit 1 U T4-DNA-Ligase und 5x Ligationspuffer versetzt. Der Ansatz wurde mit DNase-freiem Aqua bidest. (Gibco) auf ein Endvolumen von  $20\ \mu\text{L}$  aufgefüllt.

Die Insert-Fragmente wurden über die Schnittstellen zweier verschiedener Restriktionsenzyme in die Vektoren ligiert. Dadurch konnte sowohl die Orientierung der Sequenz definiert als auch eine Selbstzirkularisierung des Vektors weitestgehend vermieden werden. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz, der lediglich den geschnittenen Vektor enthielt.

Im Anschluss an die Ligationsreaktion wurde bei Verwendung Calcium- kompetenter *E.coli* der gesamte Ansatz, bei Verwendung elektrokompetenter *E. coli* nur 1/5 des Ligationsansatzes in die jeweiligen Zellen transformiert und auf Agarplatten mit dem jeweils dem Plasmid entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Als Beweis für einen erfolgreichen vollständigen Restriktionsverdau sollten nach Transformation der Negativkontrolle sehr wenige bis keine Klone wachsen.

#### 4.1.3.4 Transformationskontrolle in *E. coli* mittels PCR

Der Erfolg einer Transformation wurde mittels der PCR überprüft. Dazu wurden die gewachsenen Klone gesichert und kleine Plasmidmengen mittels 5- minütiger Lyse durch Hitzeeinwirkung in je 50µl Ampuwa gewonnen. Das Lysat wurde kurz auf Eis abgekühlt und die Bakterien 2 min. bei 5000 U/min abzentrifugiert. 5 µL des Überstands wurden als DNA-Matrize in der PCR-Reaktion eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µL, die Parameter entsprachen den oben beschriebenen.

## 4.2 Biochemische Methoden

### 4.2.1 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine mit (His)<sub>6</sub>- Tag

#### 4.2.1.1 Affinitätschromatographie und Entsalzung

Das *lcrV*- Gen mit 37 kDa Molekulargewicht wurde mittels der Schnittstellen *Bam*HI und *Hind*III in die MCS des pQE30- Vektors (QIAexpressionist, Qiagen) kloniert, um im M15- *E.coli*- Stamm eine *high-level*- Expression eines N- terminal mit einem (His)<sub>6</sub>-Tag versehenen Proteins zu erzielen und dieses nach Lyse der Bakterien affinitätschromatographisch zu reinigen. Die Affinitätschromatographie ist die Trennmethode mit der höchsten Selektivität und Spezifität für die Isolierung und Reinigung von Biomolekülen. Der pQE30- Vektor trägt eine Ampicillin-Resistenzkassette.

Eine Bakterienkultur in LB- Medium mit Ampicillin und Kanamycin (für den M15-Stamm) wurde bis zu einer OD von ca. 0,7 angezchtet und dann mit 1mM IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) 16h bei 37°C unter Schütteln induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min., 5000 rpm, 4°C) geerntet. Das Pellet wurde nativ im Binding- Puffer resuspendiert, mittels French Press mechanisch aufgeschlossen und bei 12.000 rpm bei 4°C 50min. abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde zur Abtrennung aller Bakterien durch einen Celluloseacetatfilter mit 0,22  $\mu$ m Porendurchmesser filtriert. Die Reinigung der (His)<sub>6</sub>- Proteine aus dem klaren Überstand des Lysats von *E. coli*-Zellen erfolgte affinitätschromatographisch über eine Ni<sup>2+</sup>- NTA- Säule (HisTrap HP, Amersham Biosciences), die eine Chelatbindung von His an Ni<sup>2+</sup>-gekoppelte Sepharose-Kügelchen vermittelt. Dieses Verfahren wird als immobilized metal affinity chromatography (IMAC) bezeichnet. Aufgrund hochaffiner Wechselwirkung zwischen Protein und Ni<sup>2+</sup> kann durch Anlegen eines Elutionsgradienten mit steigendem Imidazolgehalt unspezifisch gebundenes Protein bei niedrigen Imidazolkonzentrationen entfernt werden. Gebundenes Protein kann anschließend bei höherem Imidazol- Gehalt des Elutionspuffers wieder von den Sepharose-Kügelchen getrennt werden. Das Imidazol im Elutionspuffer konkurriert mit dem gebundenen Histidin um die Bindung an die Ni<sup>2+</sup>-Sepharose-Kügelchen und löst so das gebundene Protein von der Säule. Die eluierten Proteinfractionen wurden auf SDS- Gelen analysiert. Fraktionen, die rekombinantes, gereinigtes Protein enthielten, wurden gepoolt und zur Entfernung von überschüssigem Salz und Imidazol im Puffer über eine mit Endpuffer equilibrierte HiTrap Desaltig- Säule (Amersham Biosciences) aufgereinigt. Hierbei verlässt das (His)<sub>6</sub>- Protein die Säule früher als das Salz, welches somit abgetrennt wird. Die Proteinaliquots wurden im Endpuffer bei -80°C gelagert.

<i>E. coli</i> -Lysispuffer:	1 mM DTT; 0,1 mM PMSF; 200 $\mu$ g/mL Lysozym in 1x PBS
Binding- Puffer:	40mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,3-0,5 M NaCl; pH 7,5
Elutionspuffer:	40mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,3-0,5 M NaCl; 0,5M Imidazol; pH 7,5
Endpuffer:	20mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,1 M NaCl; pH 7,5

[verändert nach HisTrap instructions (Amersham, Biosciences)]



Nach dieser Methode wurden in dieser Arbeit folgende (His)<sub>6</sub>- Proteine gereinigt:

Protein	Beschreibung
rLcrV	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:8 V- Antigen
rLcrV O:3	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:3 V- Antigen
V130 O:8	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:8 N- terminale 130 Aminosäuren des LcrV
V130 O:3	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:3 N- terminale 130 Aminosäuren des LcrV
V130 pestis/pstb.	<i>Y. pestis/pseudotuberculosis</i> . N- terminale 130 Aminosäuren des LcrV
rAcrV	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> AcrV
rLcrV K42Q	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:8 LcrV mit K42Q- Austausch
rLcrV K40Q	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:8 LcrV mit K40Q- Austausch

#### 4.2.1.2 Gelfiltration

Wiesen rekombinante, über Affinitätschromatographie gereinigte Proteine auf dem SDS- Gel noch Verunreinigungen mit Proteinen anderer Größe auf, wurde zusätzlich eine Gelfiltration mit Hilfe der Superdex 200 – Säule (Amersham Biosciences) durchgeführt. Dies traf für die Proteine zu, die die 130 N- terminalen Aminosäuren umfassen. Bei der Gelfiltration erfolgt eine Trennung der Proteine aufgrund ihrer Größe. Die Matrix der Gelfiltrationssäulen besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk mit definierter Porengröße. Kleine Moleküle können in die Poren eindringen, große nicht. Daher passieren kleine Moleküle die Säule langsamer als große und werden somit in späteren Fraktionen eluiert. Die Säule wurde vor Probenaufgabe mit Superdex-Puffer äquilibriert.

Die Fraktionen, die das (His)<sub>6</sub>- Protein enthielten, wurden gepoolt und in Superdex-Puffer bei –80 °C gelagert.

Superdex-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM DTT

## 4.2.2 Protein-Analysen

### 4.2.2.1 Endotoxintest

Alle in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Proteine wurden auf LPS- Reinheit mit Hilfe eines Limulus Amöbocyten Lysat Testes (Pyroquant, Walldorf, Deutschland) getestet. Nur in diesem Test als LPS- frei dokumentierte Proteine (LPS < 0,1ng/mL) wurden verwendet.

### 4.2.2.2 MALDI- MS

rLcrV wurde mittels Massenspektroskopie (Matrix- gekoppelte Laser Desorption- Ionisations- Massenspektroskopie, Toplab, Martinsried, Deutschland) analysiert.

### 4.2.2.3 Proteinquantifizierung

Zur Abschätzung von Proteinmengen wurden zwei Methoden angewandt:

a) Proteinquantifizierung nach Bradford (1976) mit einem Farbstoff-Konzentrat (BIO-RAD Laboratories, München). Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Mit Hilfe einer Eichkurve, die mit einer Stammlösung aus BSA angefertigt wurde, kann die Proteinkonzentration bestimmt werden.

b) Proteinquantifizierung durch Coomassie Blau-Färbung nach der Auftrennung der Proteine durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Durch den Einsatz von Proteinstandard in definierten Mengen (BenchMark Prestained Protein Ladder, Invitrogen, Karlsruhe) kann die Proteinquantität vergleichend abgeschätzt werden.

### 4.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte nach dem Protokoll von Laemmli (1970) mit vertikaler Laufrichtung. Die Laufstrecke betrug ca. 8 cm. Die Geldicke entsprach 0,75 mm. Trenn- und Sammelgele wurden nach den Protokollen in dem Laborhandbuch Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) angefertigt.

Die aufzutragenden Proteine wurden in SDS-Probenpuffer 5 min bei 100°C inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst bei 80 V und wurde, nachdem die Farbstoffbande das Trenngel erreicht hatte, bei 160 V weitergeführt. Nach dem Gellauf wurden die Proteine entweder für einen anschließenden Immunoblot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert oder das Gel wurde mit Coomassie Blau 2 h bei Raumtemperatur angefärbt, anschliessend mit Entfärbelösung ca. 5 h unter mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung bis zur gewünschten Farbintensität entfärbt und vor dem Trocknen zwischen angefeuchteter Einweckfolie 30 min. in 10% Glycerin in PBS geschwenkt.

Coomassie Blau-Färbelösung:	0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250 in 40 % Methanol und 7 % Essigsäure
Entfärbelösung:	50 % (v/v) Methanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1 % SDS
2x SDS-Probenpuffer :	125 mM Tris/HCl pH 6,8; 4 % SDS; 20 % (v/v) Glycerin; 0,3 mM Bromphenolblau; 2 % (w/v) $\beta$ -Mercaptoethanol

#### 4.2.2.5 Proteintransfer auf Membranen (Western Blot)

Beim Western Transfer werden die Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen, wobei das Trennungsmuster der Proteine erhalten bleibt. Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden in einer Nassblot-Apparatur (BIO- RAD Laboratories, München) auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Transfer erfolgte 1 h bei 0,4 mA.

Transfer-Puffer (Nassblot):	50 mM Tris; 184 mM Glycin
-----------------------------	---------------------------

#### 4.2.2.6 Immunologische Detektion (Immunoblot)

Die mit Hilfe von 1x Lämmli-Puffer bei 0,4 mA 1h auf die Nitrocellulosemembran transferierten Proteine wurden mit Hilfe spezifischer Primärantikörper nachgewiesen. An die Primärantikörper konnten Sekundärantikörper binden, die mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugiert sind. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL™-Kits (Amersham Biosciences, Freiburg).

Vor der Immundetektion wurden die Membranen entweder 1 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C in 1 % BSA/PBS mit 0,5 % Tween20 und 10 % Magermilchpulver

inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Bindung der Primär- und Sekundärantikörper erfolgte jeweils bei Raumtemperatur für 5-7 h beim Erstantikörper bzw. 1-2 h beim Zweitantikörper. Der Primärantikörper wurde 1:1000 (kommerziell erwerbbarer Antikörper) bzw. 1:5000 (polyklonales Anti-LcrV- Antiserum) im PBS mit 0,5% Tween 20 verdünnt. Der Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper gegen Maus- bzw. Kaninchen- IgG (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde 1:10000 in PBS mit 0,5% Tween20 verdünnt eingesetzt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten mit den Antikörpern wurden die Membranen jeweils 3 x 5 min unter Schwenken mit 0,5% Tween20 in PBS gewaschen. Die Detektion erfolgte nach dreimaligem Waschen mit Hilfe des ECL™-Kits (Amersham Biosciences, Freiburg) und Röntgenfilmen (Fuji Photo Film, Düsseldorf), der mit Hilfe des Filmentwicklers FUJIFILM FPM-100A in einer Dunkelkammer entwickelt wurde.

#### **4.2.3 (Ko-)Immunpräzipitationsexperimente zur Analyse von Protein- Protein- Interaktionen**

Bei einer Immunpräzipitation kann ein Protein über die spezifische Bindung an einen immobilisierten Antikörper präzipitiert und analysiert werden. Als Trägermatrix für den Antikörper wurde Protein AG-Agarose (Santa Cruz, Heidelberg) verwendet. Über das gebundene Protein können Interaktionspartner kopräzipitiert und bestimmt werden. HEK 293- Zellen wurden mit pLcrV und pPcrV in An- oder Abwesenheit von pNod1 oder pNod2 mit ExGen 500 transfiziert. 27 h nach der Transfektion wurden die Zellen in je 200 µl Lysepuffer 5 min. auf Eis lysiert. Die festen Zellbestandteile wurden vom Zelllysat abgetrennt (10 min. bei 14.500 rpm, 4°C) und verworfen. Das Lysat wurde mit Anti- LcrV- oder Anti- PcrV- Antikörpern, welche an 30 µl Protein AG-Agarose je Ansatz gebunden waren, nach den Angaben des Herstellers (Santa Cruz Biotechnology) immunpräzipitiert. Nach Zentrifugation (5 min bei 3500 rpm und 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und die Protein AG-Agarose mit den gebundenen Proteinen dreimal mit TN- Puffer mit dem zehnfachen Volumen an eingesetzten Agarose-Kügelchen gewaschen. Die gebundenen Fraktionen wurden mittels Gelelektrophorese auf einem 12% SDS- Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Zur immunologischen Detektion wurden Anti- HA- Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) für Nod1-HA oder Anti- Nod2- Antikörper (Cayman Chemical) zur Detektion von Nod2 verwendet. Als Zweitantikörper wurden Anti- Kaninchen- IgG (Amersham Biosciences, Freiburg)

verwendet. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL™-Kits (Amersham Biosciences, Freiburg).

Falls erforderlich wurden die Membranen mit Strippingpuffer für 20- 30 min. bei 37 °C gestrippt und nach Blocken erneut immunologisch detektiert. In einigen Experimenten wurden Kaninchen Anti- Nod1 IgG (NOD11-A, Alpha Diagnostic International) zur Detektion von humanem Nod1 verwendet.

TN- Puffer: 20 mM Tris/HCl (pH 7,5); 200 mM NaCl; 1mM DTT; 5mM PNPP; 5mMNaF; 5mM β- Glycerolphosphat; 0.4 mM Na<sub>3</sub> VO<sub>4</sub>; 1 Tablette Protease Inhibitor Mix Complete (Roche Diagnostics) in 50ml

Lysepuffer: 10mM HEPES (pH7,4); 150mM NaCl; 1% Triton X-100; 1mM DTT; 5mM PNPP; 5mMNaF; 5mM β- Glycerolphosphat; 0.4 mM Na<sub>3</sub> VO<sub>4</sub>; 1 Tablette Protease Inhibitor Mix Complete (Roche Diagnostics) in 50mL

Stripping- Puffer: 62,5mM Tris (pH 6,7); 50mM DTT; 2%SDS

## 4.3 Mikrobiologische Methoden

### 4.3.1 E.coli

#### 4.3.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von *E. coli*

*E. coli*-Stämme wurden bei 37°C in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika unter Schütteln kultiviert. Plattenkulturen wurden ebenfalls bei 37°C inkubiert. Die *E. coli*-Stämme wurden als konzentrierte Glycerinkulturen (10 % Glycerin) bei –80°C gelagert.

#### 4.3.1.2 Herstellung Calcium-kompetenter *E. coli*- Zellen nach Hanahan

Für die Transformation wurden *E. coli*-Zellen verwendet, die zur Plasmidaufnahme kompetent gemacht wurden. Eine Übernachtkultur in LB- Medium wurde 1:100 verdünnt, so dass ein Endvolumen von 200 mL vorlag. Die Bakterien wurden bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 250 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,5

angezogen. Nach Erreichen dieses OD-Werts wurden die Bakterien auf Eis gekühlt und anschließend 10 min. bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 30 mL eiskaltem TFB1- Puffer pro 200mL Hauptkultur resuspendiert und nach 5 min. wiederum 10 min. bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet mit 4 mL eiskaltem TFB2- Puffer je 200mL Hauptkultur vorsichtig resuspendiert und in auf Trockeneis mit Ethanol gekühlte Eppendorfcups abgefüllt, so dass sie schockgefrieren. Die nun kompetenten, schockgefrorenen Bakterien wurden bei -80 °C gelagert und erst kurz vor Gebrauch aufgetaut.

TFB1: 30mM K acetat; 50mM MnCl<sub>2</sub>; 100mMRbCl<sub>2</sub>; 10mM CaCl<sub>2</sub>; 15% Glycerin, mit Essigsäure auf pH5,8 eingestellt, sterilfiltrieren, bei 4°C lagern

TFB2: 10mM Mops pH7,0; 75mM CaCl<sub>2</sub>; 10mM RbCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin, pH7,0 einstellen, sterilfiltrieren, bei 4°C lagern.

#### 4.3.1.3 Transformation Calcium-kompetenter *E. coli*- Zellen

100 µL kompetente *E. coli*- Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit ca. 10 ng Plasmid-DNA gemischt oder auf den vollständigen Ligationsansatz gegeben und 20 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30 s bei 42 °C Hitzeschock- behandelt, mit 500 µL LB-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C unter Schütteln regeneriert. Die Bakteriensuspension wurde 1 min. zentrifugiert. Nach Abnahme von 400 µL Überstand wurden die Bakterien im verbleibenden Medium resuspendiert und auf entsprechenden Selektionsagarplatten plattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Als Negativ- bzw. Positivkontrollen wurden Transformationsansätze mit geschnittenem Plasmid ohne Insert bzw. mit ungeschnittenem Plasmid mitgeführt.

### 4.3.2 *Y. enterocolitica*

#### 4.3.2.1 Kultivierung und Stammhaltung von *Y. enterocolitica*

*Yersinia*-Kulturen wurden bei 27 °C in LB-Medium unter selektivem Druck und Schütteln kultiviert. Plattenkulturen auf CIN- Agar wurden ebenfalls bei 27 °C inkubiert. Die *Yersinia*-Stämme wurden als Glycerinkulturen (15 % Glycerin) bei -80 °C gelagert.

#### 4.3.2.2 Herstellung elektrokompetenter Yersinien

100 mL Kultur von *Y. enterocolitica* wurden bei 27 °C bis zu einem OD<sub>600</sub>-Wert von 0,3-0,5 in BHI-Medium kultiviert. Nach dem Zentrifugieren (10 min., 5000 rpm, 4 °C) wurden die Zellen in 30 mL eiskaltem, Aqua bidest. gewaschen. Dieser Vorgang wurde zweimal mit Aqua bidest., dann einmal mit 10% Glycerin wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 1 mL 10 % Glycerin resuspendiert. 100 µL Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrem Gebrauch bei -80°C gelagert.

#### 4.3.2.3 Transformation elektrokompetenter Yersinien

100 µL elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in eine gekühlte Transformationsküvette transferiert. Nach Zugabe von 0,5 bis 2,0 µg qualitativ hochreiner Plasmid-DNA erfolgte die Elektroporation (Gene Pulser II, BIO- RAD Laboratories, München) bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 200 Ohm und einer Kapazität von 25 µF. Die Zeit des konstanten Strompulses betrug mehr als 4 msec.

Die elektroporierten Bakterien wurden in 800 µL SOC-Medium resuspendiert und 1 h bei 27°C regeneriert. Anschließend wurden 150 µL der Zellsuspension auf entsprechende LB-Selektionsplatten plattiert und 24-48 h bei 27°C inkubiert.

SOC-Medium: 2 % Select Pepton 140; 0,5 % Select Yeast Extract; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1 mM NaOH; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM Glukose; pH 7,0

#### 4.3.2.4 Vorbereitung von *Yersinia*-Stämmen für *in vitro* Infektionsexperimente

Eine Yersinien Übernachtskultur wurde 1:20 in einem Endvolumen von 10-20 mL BHI-Medium verdünnt und 2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, um die Yop-Expression zu induzieren. Anschließend wurden die Bakterien 10 min. bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert und in 200 µL eiskaltem PBS resuspendiert.

Zur Infektion wurde die OD<sub>600</sub> auf 0,36 eingestellt, um die Infektion mit einer definierten Bakterienkonzentration durchzuführen. Eine optische Dichte OD<sub>600</sub> von

0,36 entspricht einer Bakterienkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ $\mu\text{L}$ . Die Einstellung der Konzentration erfolgte mit eiskaltem PBS.

#### 4.3.2.5 Isolierung von sezernierten Proteinen (Yops) von *Y. enterocolitica*

Eine bei 27 °C gewachsene Yersinien- Übernachtskultur wird 1:20 in BHI- Medium mit entsprechendem Antibiotikum verdünnt und 2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend werden 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM EGTA und 0,2 % Glucose zur Kultur gegeben. Diese wird weitere 2,5- 3 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und dann abzentrifugiert (6800 rpm, 10 min. bei 4 °C). Im Überstand werden die Proteine mit 10 % Trichloressigsäure 1 h lang auf Eis gefällt und bei 15000 rpm 20 min. bei 4 °C sedimentiert. Das Sediment wird mit 1 mL eiskaltem Aceton gewaschen (– 20 °C), erneut sedimentiert und mit eiskaltem Aceton und einmal mit eiskaltem Ampuwa gewaschen, getrocknet und in Proteinauftragepuffer für SDS- PAGE aufgenommen ( abgewandelt nach Heesemann et al. 1986).

## 4.4 Zellbiologische und immunologische Methoden

### 4.4.1 Gewinnung und *in vitro*- Stimulation von Peritonealmakrophagen (PPMs)

Zur verstärkten Einwanderung von Makrophagen in den Peritonealraum wurde Mäusen eine intraperitoneale Injektion mit 1mL 1% Proteose Peptone (Difco Laboratories, Detroit) verabreicht. Nach drei Tagen wurden die Peritonealmakrophagen mittels Peritoneallavage (5ml PBS) gewonnen. Die Zellen wurden aus dem Peritonealexsudat abzentrifugiert, dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in RPMI 1640 mit 100U/mL Penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Streptomycin und 10 % hitzeinaktiviertem FCS resuspendiert und in 24- well- Platten ( $1 \times 10^6$  Zellen/mL) ausgesät. Nachdem die Zellen 2 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$ - Atmosphäre inkubiert worden waren, wurden nicht- adhärente Zellen durch Waschen mit PBS entfernt. Die



verbleibenden Zellen bestanden zu über 98 % aus Makrophagen, sogenannten PPMs (protease peptone- elicited macrophages). Die Makrophagenmonolayer wurden für die entsprechenden Zeiträume mit den jeweiligen Stimuli bzw. PBS als Negativkontrolle inkubiert. Falls nicht anders beschrieben wurden zur Messung von IL-10 die Zellüberstände nach 3 h, zur Messung von TNF- $\alpha$  nach 18 h abgenommen. Auf diese Weise wurde auch der Einfluß von IL-10 auf die TNF- $\alpha$ - Produktion in den Kreuztoleranzexperimenten untersucht. Dabei erfolgte die Vorstimulation mit rLcrV oder einem anderen TLR- wirksamen Erststimulus, dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 18 h mit Zymosan A (1 mg/mL) oder einem anderen TLR- wirksamen Stimulus zur Anregung der TNF- $\alpha$ - Produktion inkubiert. Die gesammelten Zellüberstände wurden für eine spätere Zytokinmessung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für Aufnahmeexperimente wurden die entsprechenden PPMs ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ) in 24- well-Platten auf Deckgläschen ausgesät, nach 2 h mit PBS gewaschen und dann mit Rhodamin- gekoppeltem rLcrV 30 min, 2 h bzw. 6 h inkubiert. Nach Fixierung mit 3,7 % Formaldehyd wurden die Zellen extensiv mit PBS gewaschen, um überschüssiges rLcrV zu entfernen. Die Untersuchung erfolgte z.T. mit einem Fluoreszenzmikroskop, z.T. mittels konfokaler Lasermikroskopie.

#### **4.4.2 Gewinnung, Ausdifferenzierung und *in vitro*- Stimulation von murinen Knochenmarksmakrophagen**

Die Gewinnung und Ausdifferenzierung von Knochenmarksmakrophagen aus Mäusen erfolgte nach den Angaben von Hoffmann (Hoffmann et al. 2004). Die Zellen wurden in 6- well- Platten in einer Konzentration von  $1 \times 10^6/\text{mL}$  ausgesät und mit rLcrV (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) oder Pam3Cys (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Für Zytokinmessungen wurden Zellüberstände nach verschiedenen Zeitintervallen abgenommen, bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und mittels ELISA analysiert.

#### **4.4.3 Kultivierung und Stimulation von Mono- Mac-6- Zellen (MM6; Ziegler- Heitbrock)**

Die in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellsuspension wurde schnell in einem  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  Wasserbad aufgetaut, mit auf  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgewärmten Medium gewaschen (5 min. bei 900 rpm und RT) und in 24- well- Platten ( $2 \times 10^5/\text{well}$ ) in einem Volumen von 2 mL

ausgesät. Die ausgesäten Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gesättigter Atmosphäre in MM6- Medium mit 10 % FCS kultiviert. Sollten konfluente Zellen passagiert werden, wurde die Hälfte des Mediums entfernt, und die semiadhärenten Zellen mittels Pipette mit dem restlichen Medium abgespült, abzentrifugiert und erneut in einer Konzentration von 1X10<sup>5</sup>/well in 24- well- Platten ausgesät. Die Zellen waren nach ca. 25-30 Passagen zu erneuern.

Zur Stimulation der Zellen mit LcrV wurden diese in 24- well- Platten ausgesät (2 X10<sup>5</sup>/mL) und für verschiedene Zeiträume mit den angegebenen Stimuli inkubiert oder unstimuliert gelassen. Für die Kreuztoleranztests wurden die Zellen 18 h mit den entsprechenden Substanzen inkubiert und anschließend für 6 h restimuliert. Die Überstände wurden zur TNF- $\alpha$ - Messung gesammelt. Für die Untersuchung des Einflusses von CD14 bzw. TLR2 auf die LcrV- abhängige IL- 10- Produktion wurden die Zellen 1 h mit blockierenden (MEM18) bzw. nicht- blockierenden (MEM15), monoklonalen Anti- CD14- Antikörpern (10  $\mu$ g/mL; Dr. Vaclav Horejsi, Institut für molekulare Genetik, Prag) oder TLR2- blockierenden Antikörpern (10  $\mu$ g/mL, N-17, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz) inkubiert und dann 2 h mit rLcrV (5  $\mu$ g/mL) stimuliert.

MM6- Medium: RPMI mit 10 % FCS, 200 U/mL Penicillin, 200  $\mu$ g/mL Streptomycin, 1X Non-essential amino acids (NEAA), 1X OPI MEDIA SUPPLEMENT

#### **4.4.4 Kultivierung von HEK- 293- Zellen**

Die in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellsuspension wurde schnell in einem 37°C Wasserbad aufgetaut, mit auf 37°C vorgewärmten Medium gewaschen (5 min. bei 1200 rpm und RT) und in 10 mL Medium in TC-80- Kulturflaschen ausgesät. Die ausgesäten Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> gesättigter Atmosphäre in DMEM- Medium mit 10% FCS kultiviert.

Sollten konfluente Zellen passagiert werden, wurden die semiadhärenten Zellen mittels Pipette abgespült und in entsprechender Verdünnung in neue Gewebekulturflaschen (80 cm<sup>2</sup>) ausgesät.

#### 4.4.5 Kultivierung von HeLa-Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellsuspension wurde 1-2 min. in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut, in auf 37 °C vorgewärmtem Medium gewaschen (5 min. bei 1100 rpm und RT) und in 10 mL Medium in TC-80-Kulturflaschen ausgesät. Die ausgesäten Zellen wurden bei 37°C in 5 % CO<sub>2</sub> gesättigter Atmosphäre in supplementiertem DMEM kultiviert.

Sollten konfluente Zellen passagiert werden, wurden sie mit Trypsin/EDTA abgelöst und in entsprechender Verdünnung in TC-80- Kulturflaschen ausgesät.

Medium: DMEM mit 10 % FCS, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 % Vitamine, 1x essentielle Aminosäuren

##### 4.4.5.1 Ablösen adhärenter HeLa-Zellen mit Trypsin/EDTA

Um die adhärent wachsenden HeLa-Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen, wurden sie mit 1x Trypsin-EDTA-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) behandelt. Zunächst wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden gleichmäßig mit 3 mL 1x EDTA-Trypsin-Lösung beschichtet und 3 min. bei 37°C inkubiert. Dabei wird die Bindung der Zellen an den Untergrund über ihre Zelladhäsionsmoleküle gestört. Die Ablösung der Zellen vom Untergrund wurde unter dem Lichtmikroskop verfolgt und durch Klopfen gegen die Kulturflasche unterstützt. Durch Zugabe des dreifachen Volumens an Kulturmedium wurde die Trypsinaktivität gestoppt und das zytotoxische EDTA gebunden.

#### 4.4.6 Kultivierung von J774A.1 Makrophagen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellsuspension wurde 1-2 min. in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut, in auf 37 °C vorgewärmten Medium gewaschen (5 min. bei 1100 rpm und RT) und in 10 mL Medium in TC-80-Kulturflaschen ausgesät. Die ausgesäten Zellen wurden bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> gesättigter Atmosphäre in RPMI-Medium mit 10 % FCS und 100U/mL Penicillin und 100µg/mL Streptomycin kultiviert. Sollten die Zellen passagiert werden, erfolgte die Ablösung der adhären Zellen

mittels Zellschaber. Daraufhin wurden die Makrophagen 5 min. bei 1100rpm sedimentiert und in frischem Medium aufgenommen und in entsprechender Verdünnung in TC-80- Kulturflaschen ausgesät.

#### 4.4.7 Überprüfung der Vitalität von Zellen

Die Zahl lebender Zellen wurde mit Hilfe der Neubauerzählkammer und Trypanblau bestimmt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der nur in tote Zellen eindringen kann und diese so anfärbt. 10 µL Zellsuspension wurden mit 90 µL Trypanblau (0,5 % in PBS) versetzt (1:10 Verdünnung). Mit Hilfe der Neubauerzählkammer wurde die Zahl der lebenden Zellen berechnet.

#### 4.4.8 Kryokonservierung von Zellen

$1 \times 10^7$  Zellen wurden 10 min bei 1100 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1,5 mL vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert und in vorgekühlten Kryoröhrchen bei -80°C tiefgefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Einfriermedium: 10 % DMSO in FCS

#### 4.4.9 Infektion von HeLa- Zellen bzw. J774A.1- Makrophagen mit *Y. enterocolitica*

Für eine Infektion lagen die Zellen subkonfluent vor. Vor der Infektion wurden die Zellen zweimal mit auf 37°C vorgewärmtem PBS gewaschen, um Antibiotika-Reste zu entfernen, und in Medium ohne Antibiotika in den gewünschten Platten ausgesät. Die *Y. enterocolitica*-Stämme, mit denen die Infektion erfolgte, wurden wie unter Kapitel 4.3.2.4 beschrieben vorbereitet. Das Volumen der Bakterien, die zu den Zellen pipettiert wurden, wurde so gewählt, dass die gewünschte MOI (*multiplicity of infection*, Verhältnis Bakterienzahl:Zahl der Zielzellen) vorlag. Der Infektionsansatz wurde für einen Phagozytoseresistenztest 2 h (HeLa- Zellen), für Apoptoseinduktionsversuche 4 h (J774A.1- Makrophagen) bei 37°C in 5 % CO<sub>2</sub> gesättigter Atmosphäre inkubiert.

#### 4.4.10 Färbung des Aktinzytoskeletts mit Rhodamin- Phalloidin

Phalloidin, ein Peptid aus dem Knollenblätterpilz, lagert sich spezifisch in fibrilläres (F-) Aktin ein. Die Kopplung an den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin ermöglicht den direkten Nachweis im Fluoreszenzmikroskop.

Vor der Färbung wurden die Zellen mit 3,7 % Formalin in PBS 30 min. bei RT fixiert. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte für 5 min. in eiskaltem Aceton bei – 20°C. Anschließend wurden die Zellen luftgetrocknet. Die Aktinfärbung wurde mit Rhodamin-Phalloidin (Molecular Probes, Leiden), das 1:80 in PBS + 1 % BSA verdünnt wurde, durchgeführt. Dazu wurden 25 µL Rhodamin-Phalloidin-Lösung auf Parafilm in einer feuchten Kammer getropft. Die Deckgläschen wurden mit Hilfe einer spitzen Pinzette mit der Zellseite nach unten auf die Tropfen gelegt und 30 min. bei RT inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschriffe von je 5 min. in PBS + 1 % BSA. Pro Deckgläschen wurden 6 µL Moviol auf mit Ethanol gereinigte Objektträger gegeben. Die Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten auf die Moviol-Tropfen gelegt und luftgetrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Proben versiegelt. Die Färbung des Aktinzytoskeletts wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

#### 4.4.11 Immunfluoreszenzfärbungen

Die Zellen wurden in 24- well- Platten auf Deckgläschen ausgesät, zur Färbung mit 3,7 % Formaldehydlösung 15-20 min. lang fixiert und für 5 min. mit 0.1 % TritonX-100 in PBS permeabilisiert. Für die NF-κB- Färbung wurde 5 min. mit eiskaltem Aceton permeabilisiert. Nach Blocken mit 10 % Humanserum wurde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Erstantikörper (Verdünnung 1: 100- 1: 500 in 1 % BSA in PBS) in einer feuchten Kammer für 45 min. gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Färbung mit Zweitantikörper (Verdünnung 1:200 in 1 % BSA/PBS) für 30 min. bei Raumtemperatur. Die Präparate wurden erneut dreimal gewaschen, mit Moviol auf Objektträger geklebt, mit Nagellack an den Rändern versiegelt und bei 4-8 °C im Kühlschrank unter Lichtabschluss gelagert. Die Auswertung erfolgte mit Fluoreszenzmikroskop bzw. konfokaler Lasermikroskopie.

#### **4.4.12 Doppelimmunfluoreszenzfärbung zur Differenzierung von intrazellulären und extrazellulären Yersinien**

Die Zellen wurden 2 h lang mit Yersinien infiziert (MOI 30). Nach dem Waschen der infizierten Zellen mit PBS wurden die Zellen mit 3,7 % Formaldehyd 20 min. fixiert. Die Deckgläschen wurden daraufhin mit 0,2-0,3 mL eines Kaninchen-antigeninduzierten Serums (WA vital- Serum, 1:100 verdünnt in PBS) überschichtet und auf Eis 30 min. inkubiert. Daraufhin wurde überschüssiges Antiserum durch dreimaliges Tauchen der Deckgläschen in PBS abgewaschen. Nach Trocknen wurden die Zellen mit TRITC- gekoppeltem AffiniPure Anti- Kaninchen IgG (1:100 verdünnt) für 45 min. bei Raumtemperatur in einer feuchten lichtgeschützten Kammer gefärbt. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen 5 min. mit 0,1 % Tween20 in PBS permeabilisiert, daraufhin erneut mit WA vital- Serum 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit Anti- Kaninchen IgG- FITC 45 min. bei Raumtemperatur grün angefärbt. Überschüssiger Antikörper wurde dreimal mit PBS abgewaschen, und die Deckgläschen mit Moviol auf Objektträger transferiert, mit Nagellack versiegelt und unter Lichtausschluß kühl aufbewahrt. Aussen liegende Bakterien waren rot und grün (→ orange- gelb), innen liegende nur grün angefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop (verändert nach Heesemann et al. 1985).

#### **4.4.13 Translokation von NF- $\kappa$ B**

PPMs ( $3 \times 10^5$ /mL) wurden mit oder ohne Vorbehandlung mit den entsprechenden Inhibitoren 2 h lang mit rLcrV (5  $\mu$ g/mL) inkubiert und anschließend mit eiskaltem Methanol 10 min. lang fixiert und permeabilisiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 2 % Ziegen Serum/PBS für 15 min. lang geblockt. Die Translokationsfärbung von NF- $\kappa$ B wurde wie bei Meier et al. 2003 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden RelA- spezifisches Antiserum (Santa Cruz Biotechnology) und Cy3- gekoppelte Zweitantikörper (Dianova) verwendet. Die Auswertung erfolgte durch konfokale Lasermikroskopie.

#### 4.4.14 FACS- Analysen

Mono- Mac-6- Zellen ( $2 \times 10^6$ /mL) wurden mit rLcrV (5  $\mu$ g/mL) für 5, 15 min., 2 h und 16 h stimuliert. Daraufhin wurde die TLR2- und TLR4- Expression untersucht. Für die TLR2- bzw. TLR4- Färbung wurden folgende Antikörper verwendet: Anti- TLR2 (Santa Cruz Biotechnology, Verdünnung 1: 100) oder Anti- TLR4 (Santa Cruz Biotechnology, Verdünnung 1: 100) als Erstantikörper und FITC- gekoppelte Ziege-Anti- Maus- Zweitantikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland). Die Färbung wurde bei 4 °C durchgeführt. 30.000 Zellen wurden je Probe in einem FAC- Scan (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) analysiert.

#### 4.4.15 ELISA für Zytokinbestimmungen

TNF- $\alpha$ - und IL-10- Spiegel in Zellüberständen wurden mittels kommerziell erhältlicher ELISA- Kits (Duoset, R&D Systems, Minneapolis, MN) nach Angaben des Herstellers quantifiziert.

#### 4.4.16 Transfektion von HEK 293- Zellen und Makrophagen

##### 4.4.16.1 HEPES- Transfektion mit Calciumphosphat

Für die NF- $\kappa$ B- abhängigen Luciferaseassays wurden HEK-293- Zellen in 6- well-Platten mit DNA- Konstrukten für CD14, TLR1, TLR2, TLR4, ELAM-1- Luciferase als Reporter und RSV- $\beta$ - galaktosidase zur Normalisierung der Transfektionseffizienz unter Verwendung von HEPES- Puffer und Calciumchloridlösung transient transfiziert (Kirschning et al. 1998).

Bei Transfektionsversuchen mittels des in dieser Arbeit als „Calciumphosphatmethode“ bezeichneten Verfahrens (Girardin et al. 2003a, Inohara et al. 2003) wurde gleichzeitig mit den Transfektionsagentien verschiedene Stimuli zu den Zellen gegeben. Der Mediumswechsel 9 h nach der Transfektion entfiel hier.

Bei allen Transfektionen wurde die transfizierte Gesamt- DNA- Menge durch Zugabe eines entsprechenden Leervektors konstant gehalten. Wenn nicht anders angegeben

wurden 50-100 ng/mL Gesamt- DNAMenge (abhängig von der Anzahl der transfizierten Plasmide) transfiziert. pNod1/2 wurden in einer Konzentration von 20ng/mL verwendet.

HEPES- Puffer: 1,64 g NaCl; 1,19 g HEPES; 0,0267 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; ad 100 mL Ampuwa;  
pH 7,08- 7,10 mit 5N NaOH einstellen

CaCl<sub>2</sub>-Lsg. : 2,5 M CaCl<sub>2</sub> in Ampuwa

#### 4.4.16.2 Transfektion mit ExGen 500

J774A.1 Makrophagen wurden in 24- well- Platten mit den jeweiligen Plasmiden mittels ExGen 500- Transfektionsreagens (Fermentas, St. Leon- Rot, Deutschland) nach Angaben des Herstellers transfiziert.

Bei HEK-293- Zellen wurde die Transfektion mit ExGen 500 gewählt: einerseits für die Koimmunpräzipitationen, bei denen die transfizierte Plasmidmenge im Vergleich zu den Transfektionen für Luciferasemessungen erhöht war, und andererseits für die mikroskopisch auszuwertenden Versuche, bei denen die Zellen in 24- well- Platten auf Deckgläschen ausgesät wurden.

Falls nicht anders angegeben wurde 1 µg Gesamt- DNA- Menge pro well transfiziert.

#### 4.4.17 Bestimmung der NF-κB- abhängigen Luciferaseaktivität

Die transfizierten Zellen wurden für verschiedene Zeitspannen mit dem jeweiligen Stimulus inkubiert, dann wie bei Kirschning et al. 1998 beschrieben mit LUC- Lysepuffer lysiert, und die Luciferaseaktivität nach Zugabe von Luciferin- Substrat in einer Mikrotiterplatte mittels Chemoluminometer (Hamamatsu Photonics oder BERTHOLD) bestimmt.

LUC- Lysepuffer: 1,4 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,267 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 90 mL Ampuwa lösen, auf pH 7,8 einstellen; 400 µL 0,5 M EDTA; 1 mL TritonX-100; 0,5 g BSA;  
ad 100 mL Ampuwa; bei -20 °C lagern;  
zu 10 mL Puffer frisch zugeben: 100 µL 100 mM DTT



Luciferin- Substrat: 20 mM Tricine; 1,07 mM  $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 mM EDTA;  
pH 7,8 mit 1 M HCl einstellen  
33,3 mM DTT; 270  $\mu\text{M}$   $\text{Li}_3$ - Coenzyme A; 470  $\mu\text{M}$  D(-)- Luciferin; 530  $\mu\text{M}$  Mg-ATP

## 4.5 Tierversuche

Die Tierversuche wurden entsprechend der genehmigten Anträge Az.209.1/211-2531-110/01 und Az.211-2531.6-4/2001 durchgeführt.

### 4.5.1 Mäuse

TLR4- defiziente C3H/HeJ-, IL-10- defiziente (IL-10<sup>-/-</sup>)- und Wildtyp- C57BL/6-Mäuse wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbour, ME) bezogen. TLR2-defiziente Mäuse (TLR2<sup>-/-</sup>) wurden von Tularik Inc zur Verfügung gestellt (Werts et al. 2001). MyD88- defiziente Mäuse (MyD88<sup>-/-</sup>) wurden von Prof. Holzmann (Technische Universität München) bezogen. Alle Mäuse wurden unter SFP-Bedingungen (specific pathogen free) gehalten. Es wurden 6-8 Wochen alte weibliche Mäuse verwendet.

### 4.5.2 Experimentelle Infektion von Mäusen

Die entsprechenden Yersinien- Stämme wurden über Nacht in Luria- Bertani Medium bei 27 °C angezüchtet, 1:20 zur Hauptkultur verdünnt, nach 3 h Wachstum sedimentiert, mit PBS gewaschen und in 10 % Glycerin bei -80 °C eingefroren. Zur Infektion wurden die Glycerol- Kulturen aufgetaut und in sterilem PBS (pH 7,4) auf die entsprechende Bakterienkonzentration verdünnt. Peroral wurden die Mäuse mit verschiedenen Bakterienzahlen nach 4- stündigem Fasten infiziert. Nach der peroralen Infektion wurden die Mäuse weitere 5 h ohne Wasser und Futter gelassen. Bei i.p. Infektion wurde den Mäusen eine Injektion von 200  $\mu\text{L}$  Volumen mit unterschiedlicher Bakterienzahl injiziert.

### **4.5.3 Erfassung der Yersinienzahlen in Milz, Leber und Peyer`schen Plaques**

Nach Tötung der infizierten Mäuse durch CO<sub>2</sub>- Inhalation und Sektion wurden Milz, Leber und Peyer`sche Plaques entnommen. Vor Entnahme der Peyer`schen Plaques wurde der Darm gründlich mit PBS gespült, um den Darminhalt weitestgehend zu entfernen. Die Organe bzw. alle Peyer`schen Plaques einer Maus wurden in PBS mit einem sterilen Mörser homogenisiert und in Verdünnungsstufen auf *Yersinia*-selektivem CIN- Agar (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) ausplattiert. Nach 40 h Inkubation bei 27 °C wurde die CFU ermittelt.

## **4.6 Statistische Auswertungen**

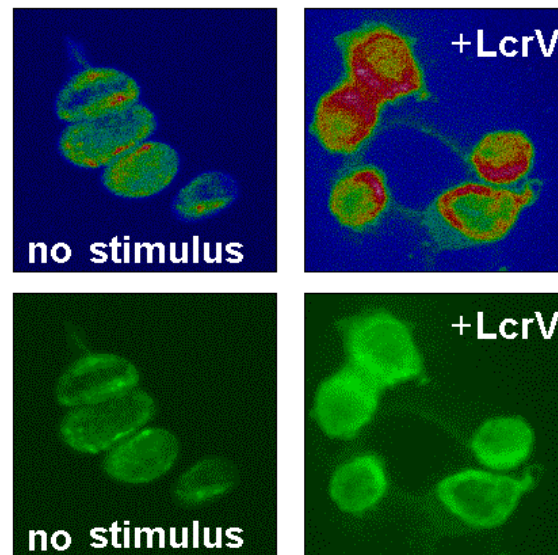
*In vitro* Experimente wurden mindestens fünfmal durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Tierexperimente wurden mindestens dreimal wiederholt, wobei 5-10 Tiere pro Gruppe verwendet wurden. Die statistische Analyse wurde mittels doppelseitigem Student t- Test bzw. Wilcoxon Test durchgeführt. Unterschiede wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn die P- Werte < 0,05 waren.

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Unterdrückung der angeborenen Immunantwort durch LcrV- induziertes Interleukin-10**

#### **5.1.1 IL-10- abhängige Makrophagendeaktivierung als Pathomechanismus von LcrV**

2002 wurde von Andreas Sing gezeigt, dass LcrV- behandelte PPMs IL-10 produzieren. In einem ersten Versuch wurde dieser Befund mittels Transfektion eines IL-10- EGFP- Reporterplasmids (pIL- 10- EGFP) in J774A.1- Makrophagen überprüft. 24h nach der Transfektion mit ExGen500 wurden die Zellen für 3 h mit 5 µg/mL rLcrV inkubiert, mit 3,7% Formaldehyd fixiert und die EGFP-Reporteraktivität lasermikroskopisch ausgewertet (s. Abb.4). Da rLcrV den IL-10- Promoter induziert, liegt der Schluss nahe, dass LcrV in Makrophagen die Produktion von endogenem IL-10 induziert, das dann para- oder autokrin auf Makrophagen zurückwirkt, und diese so ruhigstellt.

**Abb. 4: LcrV induziert den IL-10- Promotor.**

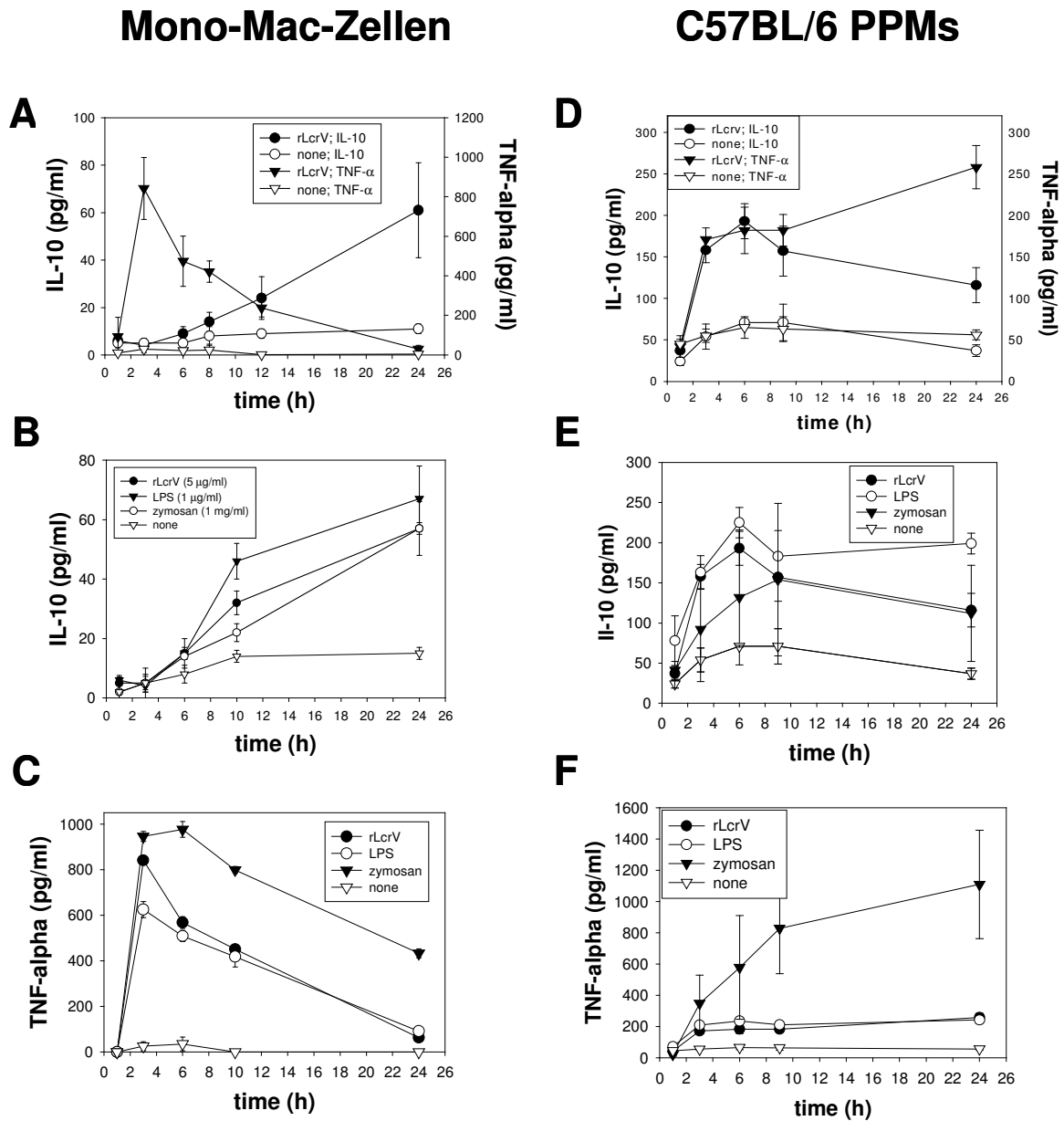
Mit einem EGFP- IL-10- Promotor- Plasmid transfizierte Zellen der murinen Makrophagenlinie J774A.1 wurden mit LcrV inkubiert. Nach 3h wurde die induzierte EGFP-Reporteraktivität lasermikroskopisch evaluiert. Die obere Zeile zeigt eine Intensitätsdarstellung (rot= hohe Reporteraktivität, grün= geringe Reporteraktivität), die untere das unbearbeitete fluoreszenzmikroskopische Bild.

Eine mögliche *in vivo* Rolle konnte durch i.p. Infektionen von Mäusen mit *Y. enterocolitica* O:8 gezeigt werden. Im Gegensatz zu C57BL/6 Wildtyp-Mäusen waren IL10<sup>-/-</sup> Mäuse, bei denen keine LcrV- induzierte TNF- $\alpha$ - Suppression auftrat, gegen die Yersinieninfektion hochgradig resistent (Sing et al. 2002a).

So lag die für die weitergehenden Untersuchungen zugrundeliegende Hypothese nahe, dass LcrV die immunsupprimierenden Wirkungen von endogenem IL-10 ausnützt, um die Immunantwort des Wirtes zu lähmen.

Da der Pathomechanismus einer IL-10- abhängigen Immunsuppression durch LcrV eine Art LcrV- induzierte Toleranz gegen den in der Zellwand von Pilzen vorhandenen TLR2- Agonisten Zymosan A darstellt, stellte sich die Frage, ob LcrV Makrophagen auch gegen bakterielle Stimuli im Rahmen eines TLR- Homo- bzw. Heterotoleranzphänomens unempfindlich machen kann und eine solche Wirkung auf Makrophagen ebenfalls IL-10- abhängig ist. Dazu wurde als erster Schritt die Kinetik von TNF- $\alpha$ - und IL-10- Induktion durch verschiedene TLR- Agonisten (LcrV, LPS, Zymosan A) in murinen C57BL/6- Peritonealmakrophagen und in humanen Mono-

Mac-6-Zellen experimentell ermittelt und miteinander verglichen (Reithmeier- Rost et al. 2004). Die Zellen wurden in den in Abb. 5 genannten Konzentrationen ausgesät und mit den genannten Stimuli für verschiedene Zeiträume stimuliert. Anschliessend wurde eine Zytokinbestimmung der Zellüberstände mittels ELISA durchgeführt. Die Zellen reagierten auf die unterschiedlichen Stimuli vergleichbar. Die Kinetik der IL-10-Produktion der murinen und humanen Zellen ist jedoch unterschiedlich. In den Mono-Mac-6-Zellen geht eine schnelle TNF- $\alpha$ - Antwort mit einer langsam ansteigenden IL-10- Produktion einher, während in murinen Peritonealmakrophagen TNF- $\alpha$  und IL-10- Produktion zunächst synchron und relativ rasch erfolgen, um später je nach Stimulus abzufallen oder weiter anzusteigen (s. Abb. 5).



**Abb. 5 LcrV induziert IL-10 und TNF- $\alpha$  in humanen und murinen Monozyten/Makrophagen.**

Mono-Mac-6-Zellen ( $2 \times 10^5$  Zellen/mL; A-C) und C57BL/6 PPMs ( $1 \times 10^6$  Zellen/mL; D-F) wurden mit LcrV (5  $\mu$ g/mL), Pam3Cys (1  $\mu$ g/mL), LPS (1  $\mu$ g/mL) oder Zymosan A (1 mg/mL) stimuliert. Nach den angegebenen Zeiträumen wurden die Überstände abgenommen und IL-10 und TNF- $\alpha$  mittels ELISA gemessen. (A und D) Kinetik der rLcrV-induzierten IL-10- und TNF- $\alpha$ -Spiegel in Mono-Mac-6-Zellen (A) und C57BL/6-Peritonealmakrophagen. (D). (B, C, E, F) Vergleich der rLcrV-, LPS- und Zymosan A-induzierten IL-10 und TNF- $\alpha$ -Spiegel in Mono-Mac-6-Zellen (B und C) und in C57BL/6 PPMs (E und F).

Während die TNF- $\alpha$ - Kurve ihren Peak nach 3h zeigt, nachfolgend abfällt und nach 24h auf 0 absinkt, zeichnet sich beim rLcrV- induzierten IL10- Spiegel nach 6h ein signifikanter Anstieg ab, der über 24 h anhielt (s. Abb. 5A). Sowohl der Zeitverlauf als auch die Intensität der rLcrV- induzierten IL-10- und TNF- $\alpha$ - Produktion waren vergleichbar mit denen, die durch LPS (1  $\mu$ g/mL) oder Zymosan A (1 mg/mL) induziert wurden. Hier lässt sich ein TNF- $\alpha$ - suppressiver Effekt der IL-10- Induktion deutlich erkennen. Hingegen steigen bei C57BL/6 PPMs sowohl die rLcrV- induzierten IL-10- als auch TNF- $\alpha$ - Spiegel während der ersten 6 h kontinuierlich an. Nach 9h steigt der TNF- $\alpha$ - Spiegel weiter, während der IL-10- Level bereits leicht sinkt (Abb. 5D). Die IL-10- Induktion durch rLcrV, Zymosan A und LPS - zumindest innerhalb der ersten 9 h - verhalten sich bezüglich des Zeitverlaufs ähnlich (Abb. 5E). Die TNF- $\alpha$ - Zeitkurven nach rLcrV- und LPS- Stimulation verlaufen weitgehend identisch (Abb. 5F).

In einem nächsten Schritt wurde die TLR- Toleranz- vermittelnde Wirkung von LcrV untersucht. Mono-Mac-6-Zellen wurden mit rLcrV (5  $\mu$ g/mL), dem synthetischen TLR2- Agonisten Pam3Cys (1  $\mu$ g/mL) oder TLR4- wirksamen LPS (1  $\mu$ g/mL) 18 h lang vorbehandelt und dann mit PBS gewaschen, um den Erststimulus zu entfernen. Eine Vorbehandlung mit rLcrV reduzierte eine TNF- $\alpha$ - Antwort auf nachfolgende 6- stündige Stimulation mit den TLR2- Agonisten rLcrV und Pam3Cys wie auch auf Stimulation mit dem TLR4- Agonisten LPS drastisch (s.Abb. 6A). Vorheriges Kochen der rLcrV- Präparation oder Zugabe von Proteinase K verhinderte den TNF- $\alpha$ - suppressiven Effekt von rLcrV. Es stellte sich ausserdem die Frage, ob *vice versa* auch Pam3Cys oder LPS in der Lage sind, rLcrV- induzierte TNF- $\alpha$ - Produktion zu unterdrücken. Sowohl eine Vorbehandlung mit Pam3Cys als auch mit LPS inhibierte eine TNF- $\alpha$ - Produktion nach Stimulation mit rLcrV. Desweiteren lösten Pam3Cys und LPS sowohl Auto- als auch Kreuztoleranz gegen den jeweils anderen Stimulus aus (s. Abb. 6B; Reithmeier- Rost et al. 2004). Aus diesen Messungen geht hervor, dass der Virulenzfaktor LcrV mit der Auslösung von TLR- Homo- und Heterotoleranz einen konservierten Mechanismus ausnutzt, um Makrophagen ruhigzustellen.

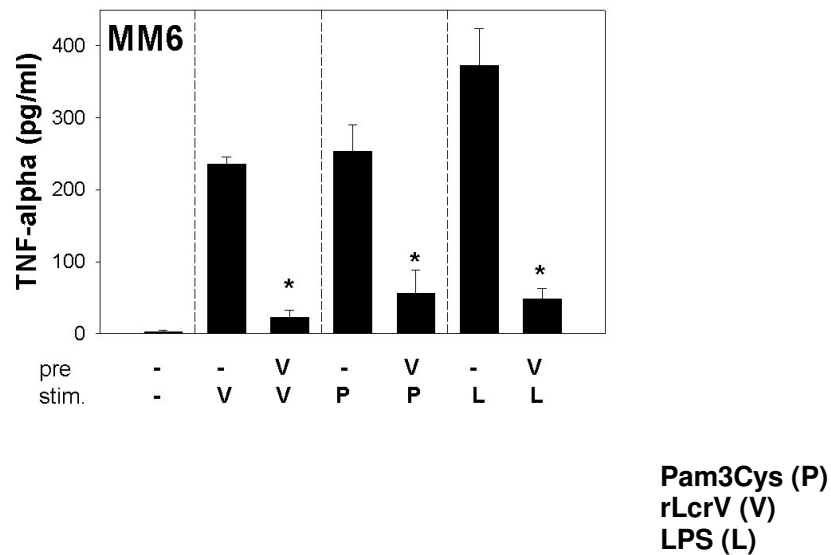


Abb. 6A

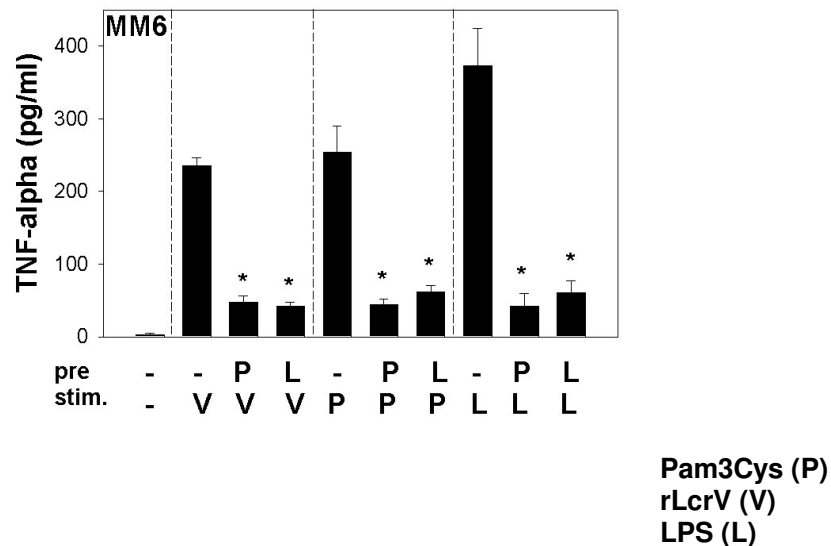


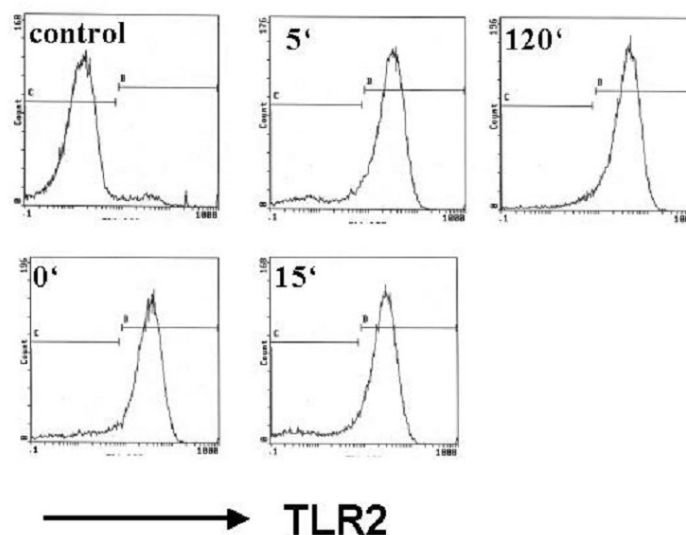
Abb. 6B

### Abb. 6 rLcrV induziert in Mono-Mac-6-Zellen Auto-, TLR- Homo- und Heterotoleranz.

(A) Mono-Mac-6-Zellen ( $2 \times 10^5$  Zellen/mL) wurden 18h lang mit rLcrV (=V;  $5 \mu\text{g/mL}$ ), vorstimuliert, gewaschen und dann mit rLcrV ( $5 \mu\text{g/mL}$ ), Pam3Cys (=P;  $1 \mu\text{g/mL}$ ) oder LPS (=L;  $1 \mu\text{g/mL}$ ) 6h lang inkubiert. Nicht- vorstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Die TNF- $\alpha$ -Spiegel wurden im ELISA-Test ermittelt. (B) Mono-Mac-6-Zellen ( $2 \times 10^5$  Zellen /mL) wurden 6 h lang mit Pam3Cys ( $10 \text{ ng/mL}$ ) oder LPS ( $10 \text{ ng/mL}$ ) inkubiert, gewaschen und nachfolgend mit rLcrV ( $5 \mu\text{g/mL}$ ), Pam3Cys ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) oder LPS ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) 6h lang stimuliert. Nicht- vorbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die TNF- $\alpha$ - Spiegel wurden mit Hilfe eines ELISA ermittelt. \* zeigt  $P < 0.01$  im Vergleich zu nicht- vorstimulierten Zellen.



Die durch einige TLR- Agonisten ausgelösten TLR- Homo- bzw. Heterotoleranzphänomene wurden mit einer verminderten Expression (Downregulation) der entsprechenden TLRs in Verbindung gebracht (Martin et al. 2001, Nomura et al. 2000, Sato et al. 2002, Wang et al. 2002). Ausserdem wurde ein Anstieg der TLR2 mRNA- Spiegel und der TLR2- Expression auf rLcrV- Stimulation hin diskutiert, während die TLR4- Expressionslevel unverändert blieben (Sharma et al. 2004). Da die Modulation der Rezeptorexpression ein bekannter Mechanismus ist, der zu Toleranzphänomenen führen kann, wurde untersucht, ob eine rLcrV- Stimulation in dem hier verwendeten experimentellen System die TLR2- oder TLR4- Expression beeinflusst. Mittels FACS- Analyse und Western Blot konnte in Mono-Mac-6-Zellen nach Stimulation mit rLcrV (5 µg/mL) für unterschiedliche Zeitspannen (5 min., 15 min., 2 h und 16h) weder eine Veränderung der TLR2- noch der TLR4- Expression und insbesondere keine Verminderung festgestellt werden (s.Abb. 7). Dies legt nahe, dass Veränderungen der TLR- Expression für das Zustandekommen einer rLcrV- induzierten Homo- und Heterotoleranz in Mono-Mac-6-Zellen keine Rolle spielen (Reithmeier- Rost et al. 2004).



**Abb. 7A**

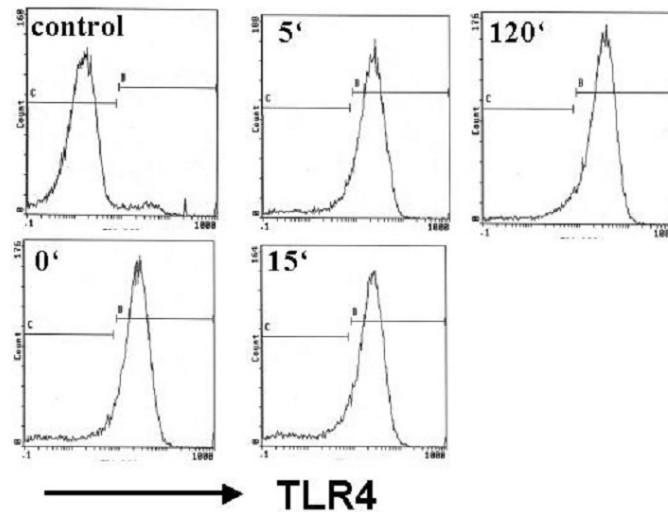


Abb. 7B

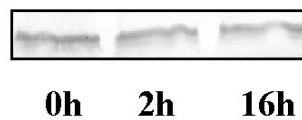


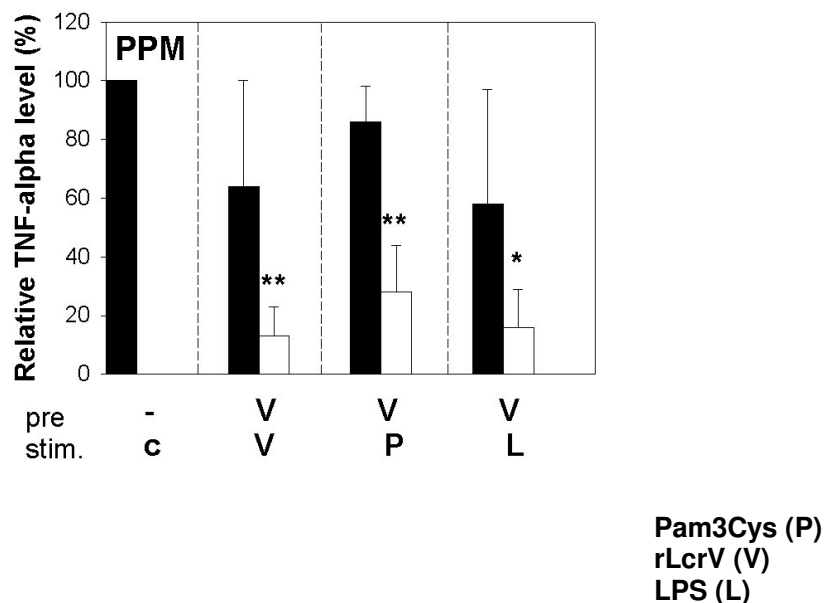
Abb. 7C

**Abb. 7 rLcrV verändert in Mono-Mac-6-Zellen weder die TLR2- noch die TLR4-Expression.**

(A und B) Mono-Mac-6-Zellen ( $2 \times 10^6$  Zellen/mL) wurden für 5 min., 15 min., 2 h und 16 h mit rLcrV ( $5 \mu\text{g/mL}$ ) stimuliert. Dann wurden die Zellen mit murinen Anti-TLR2- (A) oder murinen Anti-TLR4- (B) Antikörpern inkubiert, gefolgt von einer Färbung mit FITC-markierten kaprinen Anti-Maus IgG-Antikörpern und einer Analyse mittels Durchflusszytometrie. (C) Mono-Mac-6-Zellen ( $2 \times 10^6$  Zellen/mL) wurden 2 h bzw. 16 h lang mit rLcrV ( $5 \mu\text{g/mL}$ ) behandelt. Die Zellen wurden lysiert und mit einem Western Blot auf TLR2-Expression untersucht.

Da von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass die rLcrV-vermittelte Reduktion der Zymosan A-induzierten  $\text{TNF-}\alpha$ -Produktion in murinen Peritonealmakrophagen streng IL-10-abhängig ist (Sing et al. 2002a), wurden Peritonealmakrophagen IL-10-defizienter Mäuse verwendet, um so die Rolle von endogenem IL-10 für das Zustandekommen LcrV-induzierter TLR-

Toleranzphänomene zu beleuchten. Der Effekt einer rLcrV- Vorstimulation auf TLR2- oder TLR4- vermittelte TNF- $\alpha$ - Produktion wurde dazu in murinen IL-10<sup>-/-</sup> und Wildtyp- PPMs (isogene C57BL/6 Mäuse) verglichen. Eine von rLcrV, Pam3Cys oder LPS ausgelöste TNF- $\alpha$ - Produktion wurde durch rLcrV- Vorstimulation in C57BL/6 PPMs signifikant reduziert. In IL-10<sup>-/-</sup> PPMs hingegen war dieser TNF- $\alpha$ - suppressive Effekt auf einen TLR2- oder TLR4- Stimulus hin nur gering. Dies deutet auf eine Abhängigkeit der rLcrV- induzierten TLR- Homo- und Heterotoleranz von endogenem IL-10 hin, die im Falle der TLR2- Homotoleranz gegen Zymosan A und Pam3Cys besonders ausgeprägt ist. Für die rLcrV- induzierte Autotoleranz und Heterotoleranz gegen den TLR4- Agonisten LPS war die IL-10- Abhängigkeit weniger stark, was auch durch die höheren Standardabweichungen ersichtlich wird. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass LcrV und LPS im Gegensatz zu Zymosan A oder Pam3Cys neben IL-10- abhängigen auch noch IL-10- unabhängige Signalwege aktivieren. Nichtsdestotrotz waren die TNF- $\alpha$ - Spiegel nach den unterschiedlichen Zweitstimuli in den IL-10<sup>-/-</sup> Makrophagen stets höher als bei den Wildtypmakrophagen (Abb. 8; Reithmeier- Rost et al. 2004).

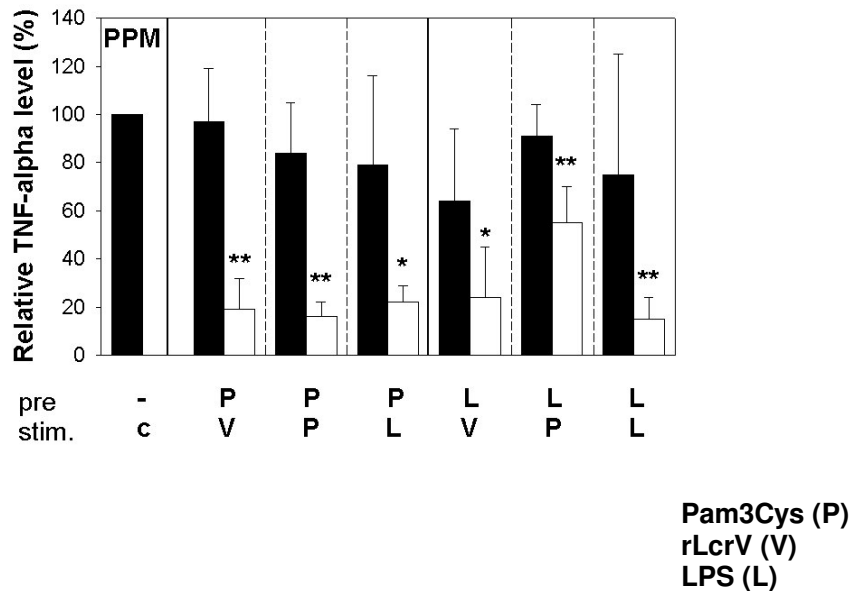


**Abb. 8 IL-10- Abhängigkeit der rLcrV- induzierten TLR- Homo- oder Heterotoleranz in murinen Peritonealmakrophagen.**

1x10<sup>6</sup> PPMs/mL von IL-10<sup>-/-</sup> (schwarze Balken) und C57BL/6 Wildtyp- (weisse Balken) Mäusen wurden mit rLcrV (5  $\mu$ g/mL) inkubiert. Nicht- stimulierte Zellen dienten als Kontrollen (s.Abb. 8 pre). Nach 3 h wurden die Zellen gewaschen und für 18 h mit rLcrV (5  $\mu$ g/mL), Pam3Cys (1  $\mu$ g/mL) oder LPS (1  $\mu$ g/mL) stimuliert. In den Zellüberständen wurde die TNF- $\alpha$ -

Konzentration gemessen. Die Daten sind als Prozentsatz der TNF- $\alpha$ - Spiegel der nicht vorbehandelten Makrophagen (100 %, linker Balken) dargestellt. \* und \*\* zeigen P-Werte <0.05 und 0.01 der relativen TNF- $\alpha$ - Spiegel in Wildtyp- gegenüber IL-10-/- PPMs an.

Um herauszufinden, ob der Einfluss von IL-10 auf TLR- Homo- und Heterotoleranz ein generelles Phänomen ist, wurden die vorliegenden Versuche um weitere Erststimuli erweitert. Dazu wurde der Effekt einer Vorstimulation durch Pam3Cys (10 ng/mL) und LPS (10 ng/mL) auf rLcrV-, Pam3Cys- oder LPS- induzierte TNF- $\alpha$ - Produktion in C57BL/6 und IL-10-defizienten PPMs untersucht. Unabhängig vom verwendeten TLR- Agonist waren sowohl TLR- Homo- als auch Heterotoleranz in IL-10-/- PPMs im Vergleich zu Wildtyp C57BL/6 Makrophagen mehr oder weniger stark aufgehoben (s. Abb. 8; Reithmeier- Rost et al. 2004).



**Abb. 9 IL-10 spielt eine Rolle bei rLcrV- induzierter TLR- Homo- oder Heterotoleranz in murinen Peritonealmakrophagen.**

1x10<sup>6</sup> PPMs/mL von IL-10<sup>-/-</sup> (schwarze Balken) und C57BL/6 Wildtyp (weisse Balken) Mäusen wurden mit Pam3Cys (10 ng/mL), LPS (10 ng/mL) vorbehandelt oder nicht vorstimuliert. Nach 3h wurden die Zellen gewaschen und 18h lang mit rLcrV (5 $\mu$ g/mL), Pam3Cys (1  $\mu$ g/mL) oder LPS (1  $\mu$ g/mL) stimuliert. TNF- $\alpha$  wurde in den Überständen gemessen. Die Daten sind als Prozentsatz der TNF- $\alpha$ - Spiegel der nicht vorbehandelten Makrophagen (100 %, linker Balken) dargestellt. \* und \*\* zeigen P-Werte <0.05 und 0.01 der relativen TNF- $\alpha$ - Spiegel in Wildtyp- gegenüber IL-10-/- PPMs an.

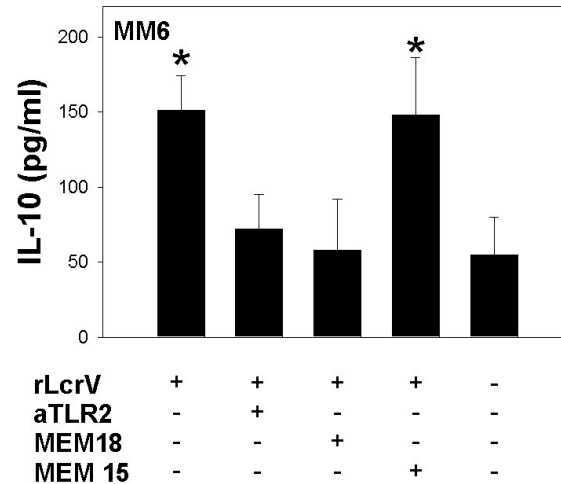
Diese Ergebnisse legen nahe, dass LcrV einen allgemeinen, evolutionär aus der Auseinandersetzung mit Bakterien entstandenen Toleranzmechanismus des Wirtes ausnutzt, um der Wirtsantwort zu entgehen.

## **5.2 LcrV führt über CD14 und TLR2 zu Interleukin-10- vermittelter TNF $\alpha$ - Suppression**

### **5.2.1 CD14/TLR2- abhängige Immunmodulation durch LcrV**

Wie aus den in 5.1 beschriebenen Experimenten hervorgeht, ruft LcrV einen Endotoxintoleranz- ähnlichen Zustand in Makrophagen hervor. Daher wurde vermutet, dass LPS und LcrV ähnliche Signaltransduktionswege aktivieren. Eine Zellaktivierung durch LPS erfolgt über TLR4-MD2, wobei ein Komplex aus LPS-bindendem Protein (LBP), CD14 und LPS die Signaltransduktion am effektivsten einleitet (Fan et al. 2004). Ich konnte zeigen, dass eine Beteiligung von LBP an der rLcrV- vermittelten Immunmodulation nicht erforderlich war.

Es wurde deshalb getestet, ob TLR2 an der LcrV- vermittelten IL-10- Induktion beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass die LcrV- abhängige IL-10- Induktion in murinen PPMs CD14- und TLR2- abhängig ist, da die IL-10- Antwort auf rLcrV- Stimulation sowohl in CD14-/- als auch in TLR2-/- Makrophagen drastisch reduziert ist (Sing et al. 2002a). Dies sollte auch in humanen Mono-Mac-6-Zellen untersucht werden. 1 h vor rLcrV- Stimulation (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) wurden inhibierende Anti- TLR2 Antikörper (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) , inhibierende Anti- CD14 Antikörper (MEM18, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) oder nicht- inhibierende Anti-CD14 Antikörper (MEM15, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) zu den Zellen gegeben. Nach 2-stündiger rLcrV- Stimulation wurde IL-10 im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Die inhibierenden Antikörper gegen CD14 und TLR2 verhinderten eine rLcrV- vermittelte IL-10- Produktion, während die nicht- inhibierenden Antikörper keinen Effekt zeigten. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die rLcrV- induzierte IL-10- Produktion nicht nur in murinen Peritonealmakrophagen, sondern auch in humanen Monozyten CD14/TLR2- abhängig verläuft (s.Abb. 10; Reithmeier-Rost et al. 2004).

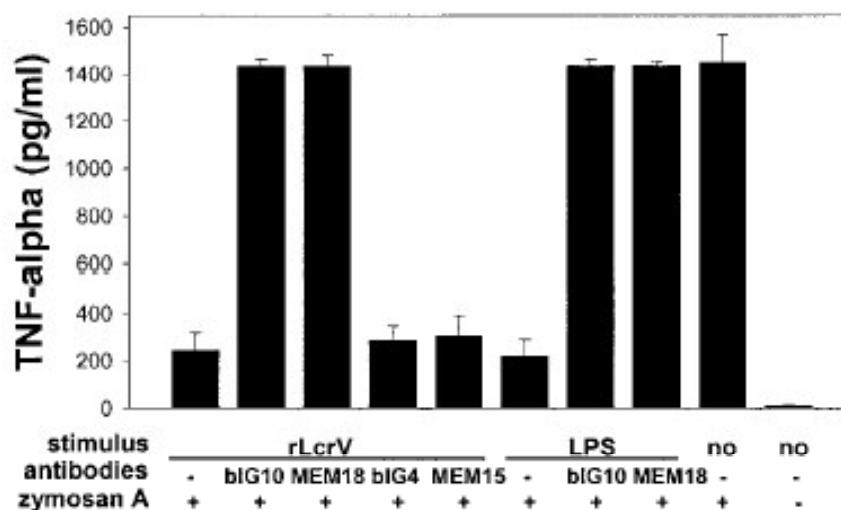


**Abb. 10 rLcrV induziert CD14/TLR2- abhängig IL-10 in Mono-Mac-6-Zellen.**

Mono-Mac-6-Zellen wurden 1 h mit Anti- TLR2 (10 µg/mL), inhibierenden Anti- CD14 (MEM18, 10 µg/mL) oder nicht- inhibierenden Anti- CD14 (MEM15, 10 µg/mL) inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die IL-10- Konzentration in den Überständen wurde nach zwei- stündiger rLcrV- Stimulation mittels ELISA bestimmt.

\* zeigt P- Werte < 0.01 im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

Die CD14- Abhängigkeit des TNF- $\alpha$ - supprimierenden Effektes von LcrV konnte dadurch bestätigt werden, dass in Mono-Mac-6-Zellen die durch Vorbehandlung mit rLcrV (5 µg/mL) auslösbare TNF- $\alpha$ - Suppression durch Zugabe von blockierenden Anti-CD14- Antikörpern vollständig aufgehoben werden kann. Die CD14- blockierten Zellen reagieren auf einen Zweitstimulus mit Zymosan A (1 mg/mL) hin mit ähnlich hoher TNF- $\alpha$ - Produktion wie nicht mit rLcrV vorbehandelte Zellen. Wie auch bei den IL-10- Messungen beeinflussten nicht- blockierende Anti-CD14- Antikörper die TNF- $\alpha$ - supprimierende Wirkung von LcrV nicht (s.Abb. 11; Sing et al. 2002b).

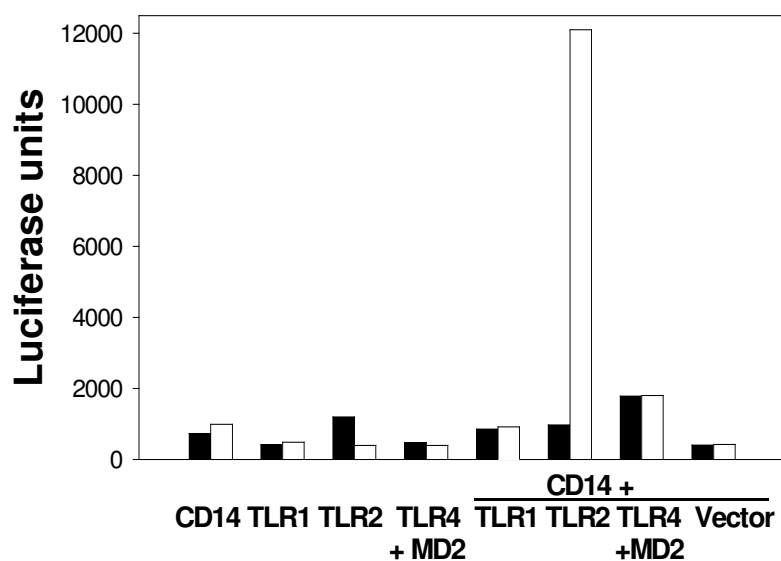


**Abb. 11 CD14 ist erforderlich für die LcrV- induzierte Immunmodulation in humanen Mono-Mac-6-Zellen.**

Mono-Mac-6-Zellen wurden 1h mit blockierenden monoklonalen Anti-CD14- Antikörpern (MEM18 oder big10) oder den entsprechenden nicht- blockierenden monoklonalen Antikörpern (MEM15 oder big4) behandelt und anschliessend 18 h lang mit rLcrV (5 µg/mL) oder LPS (10 ng/mL) stimuliert. Dann wurde 6h mit Zymosan A (1 µg /mL) stimuliert und die TNF-α- Produktion in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt.

Diese Ergebnisse sollten mittels TLR- Transfektionsversuche überprüft werden, um die Beteiligung von TLR2 zu bestätigen. Um den beteiligten TLR zu identifizieren, wurden alle erhältlichen humanen TLRs (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4/MD2, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10; Auswahl in Abb. 12 gezeigt) mittels transienter Transfektion in HEK 293- Zellen mit oder ohne kotransfiziertem CD14 überexprimiert. Zusätzlich wurde als NFκB- abhängiger Luciferase- Reporter p ELAM-1-Luc (Endothelial cell- leukocyte adhesion molecule) transfiziert. Auf 6- stündige rLcrV- Stimulation (5 µg/mL) hin wurde die NFκB- abhängige Luciferaseaktivität messen. Transfizierte Zellen, die nur CD14 oder einen TLR alleine exprimierten, zeigten keine Reporterogenaktivität. Nur TLR2- transfizierte 293- Zellen zeigten eine NF-κB- Aktivierung auf LcrV- Stimulation hin. Diese war an die Anwesenheit von CD14 - entweder in Form eines kotransfiziertem CD14 - Plasmids oder durch Zugabe von rekombinantem, löslichen CD14- gebunden (s. Abb. 12; Sing et al. 2002b und eigene unpublizierte Ergebnisse). Eine TLR2- vermittelte NF-κB- Aktivierung durch LcrV erwies sich als CD14- abhängig. Dadurch werden die Ergebnisse aus den

Experimenten mit Mono-Mac-6-Zellen zur CD14- Abhängigkeit der rLcrV- induzierten IL-10- Induktion bzw. der dadurch ausgelösten TNF- $\alpha$ - Suppression bestätigt. Das zu LcrV homologe Protein PcrV aus *P. aeruginosa* war in den Transfektionsexperimenten mit HEK- 293- Zellen nicht in der Lage, über TLR2/CD14 NF- $\kappa$ B zu aktivieren, was dafür spricht, dass TLR2 spezifisch zwischen den beiden homologen Proteinen unterscheiden kann. Eine Zugabe von Polymyxin B (pB), einem starken LPS- Inhibitor, hatte keinen Effekt auf das rLcrV- Signaling über TLR2/CD14, so dass man davon ausgehen kann, dass die detektierte NF- $\kappa$ B- Aktivierung nicht durch eine mögliche LPS- Verunreinigung der verwendeten rLcrV- Präparation ausgelöst wird. Eine 100°C Erhitzung der rLcrV- Präparation hingegen, die TLR2- Stimulatoren wie Lipopeptide, Peptidoglykan und LPS nicht inaktiviert, führte zur völligen Inaktivierung (s. Abb. 12; Sing et al. 2002b).



#### Abb. 12 LcrV aktiviert CD14/TLR2.

HEK 293- Zellen wurden transient mit Plasmiden transfiziert, die für ELAM-1 Luciferasereporter, für  $\beta$ -Galaktosidase- zur Normalisierung der Transfektionseffizienz- bzw. für die angegebenen TLRs (plus MD2, wo gezeigt) codieren oder mit einem Leervektor in An- oder Abwesenheit von kotransfiziertem CD14- Plasmid. Nach 24 h wurden die Zellen entweder unstimuliert gelassen (schwarze Balken) oder für 6 h mit rLcrV (5  $\mu$ g/mL) stimuliert (weisse Balken). Daraufhin wurde die Luciferaseaktivität bestimmt.



Hinweise auf eine mögliche pathogenetische Bedeutung dieser TLR2- abhängigen IL-10- Induktion wurden durch orale Infektion von Mäusen mit Yersinien erhalten (Sing et al. 2002b, Sing et al. 2003a). Im Vergleich zu Wildtyp- C57BL/6- Mäusen waren TLR2- defiziente Mäuse resistenter gegen eine perorale *Y. enterocolitica*- Infektion. Die Bakterienlast in Milz und Leber von TLR2-/- Mäusen lag zwei log- Stufen unter der von C57BL/6- Wildtyp- Mäusen (Sing et al. 2002b). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Yersinien mittels LcrV über TLR2 eine IL-10- bedingte Immunsuppression erzeugen.

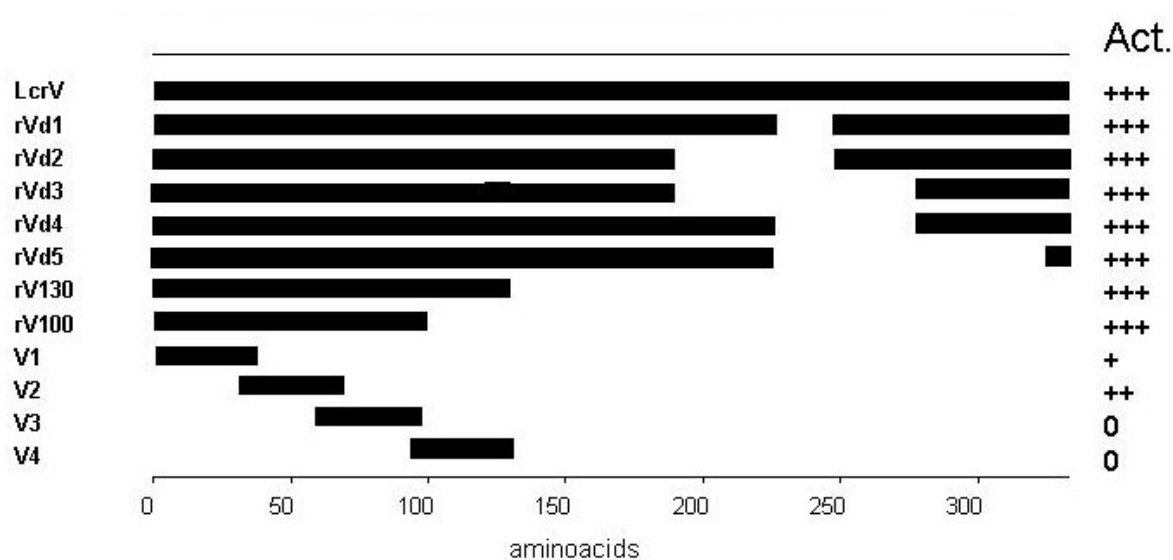
### 5.2.2 Identifizierung der TLR2- wirksamen Domäne von LcrV

Im Gegensatz zu *Yersinia* LcrV konnte das homologe *Pseudomonas* PcrV die hier für LcrV beschriebene Immunmodulation weder in murinen noch in humanen Makrophagen/Monozyten bewirken und auch in transfizierten HEK 293- Zellen über CD14/TLR2 keine NF- $\kappa$ B- Aktivierung auslösen. Aufgrund dieses Unterschieds zwischen LcrV und PcrV versuchten wir durch Sequenzvergleich der beiden Proteine die mögliche TLR2- wirksame Domäne von LcrV einzugrenzen. Die Sequenz von PcrV wies deutliche Unterschiede zum *Y. enterocolitica* O:8 WA-314 LcrV (Homologie 40%) auf. Ein Datenbankvergleich der LcrV- Sequenzen verschiedener Yersinien- Stämme der drei humanpathogenen Yersinien zeigte hingegen hohe Homologien (90-95%; Roggenkamp et al. 1997). Bei PcrV fiel besonders eine relativ grosse Lücke in der Aminosäuresequenz des N- Terminus auf, die in der entsprechenden LcrV- Sequenz von den Aminosäuren 41 bis 59 ausgefüllt wird.

Es wurden daher unterschiedliche LcrV- Deletionskonstrukte hergestellt und getestet. Die LcrV- Konstrukte mit C- terminalen Deletionen waren sowohl im Makrophagenmodell (bezüglich IL-10- Induktion und TNF- $\alpha$ - Suppression) als auch in CD14/TLR2- transfizierten HEK 293- Zellen (bezüglich der NF- $\kappa$ B- Aktivierung) vergleichbar aktiv wie das komplette rLcrV (s. Abb. 13). Daher wurde vermutet, dass der C- terminale Bereich des LcrV für die Immunmodulation in den in dieser Arbeit verwendeten Zellsystemen unbedeutend ist. Schließlich erwiesen sich LcrV- Fragmente, die die 130 bzw. 100 N- terminalen Aminosäuren von LcrV umfassen, in diesen beiden Zellsystemen als immunmodulatorisch ähnlich wirksam wie das komplette rLcrV.

Daraufhin wurden überlappende Polypeptide von „35 Aminosäurenlänge“ abgeleitet vom N-Terminus von LcrV und als synthetische Polypeptide getestet. Dabei umfasste das Peptid V1 die Peptidsequenz aa2-aa39, V2 aa31-aa70, V3 aa 60-aa98, und V4 aa94-aa131 von LcrV.

Durch Testung der Aktivität dieser Peptide als Stimulatoren von CD14/TLR2-transfizierten HEK 293- Zellen im NF- $\kappa$ B- abhängigen Luciferaseassay konnte die aktive Domäne von LcrV auf die Aminosäurenregion aa31-aa70 eingengt werden (s. Abb. 13).



### Abb. 13 Struktur- Funktions- Analyse von LcrV.

Relative Aktivität rekombinanter LcrV- Konstrukte und LcrV-abgeleiteter Peptide in CD14/TLR2-transfizierten HEK 293-R-Zellen (nach Sing et al. 2003b).

Die aktive Region von LcrV abdeckend wurden drei weitere synthetische Polypeptide konstruiert: V5 aa27-aa43, V7 aa31-aa49 und V9aa39-aa57. Das Peptid V7 (10  $\mu$ g/mL) induzierte in CD14/TLR2-kotransfizierten HEK 293- Zellen den NF- $\kappa$ B- abhängigen Luciferasereporter ähnlich stark wie rLcrV (5  $\mu$ g/mL), während sich Peptid V5 (10  $\mu$ g/mL) und rPcrV (5  $\mu$ g/mL) in diesem System als nicht stimulierend erwiesen. Das Peptid V9 (10  $\mu$ g/mL) war weniger aktiv als V7. Die immunmodulatorisch wirksame Domäne von LcrV scheint also in der Aminosäureregion aa31-aa57 zu liegen, welche nach der Tertiärstruktur von LcrV (Derewenda et al. 2004) einen grossen Teil des N- terminalen Abschnitts der  $\alpha$ 1-

Helix sowie das  $\beta$ 1- Faltblatt von LcrV einschliesst (s. Abb. 14; Sing et al. 2002b). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass synthetische Peptide abgeleitet vom N-Terminus von LcrV in der Lage sind, CD14/TLR2- Signaltransduktion zu induzieren.

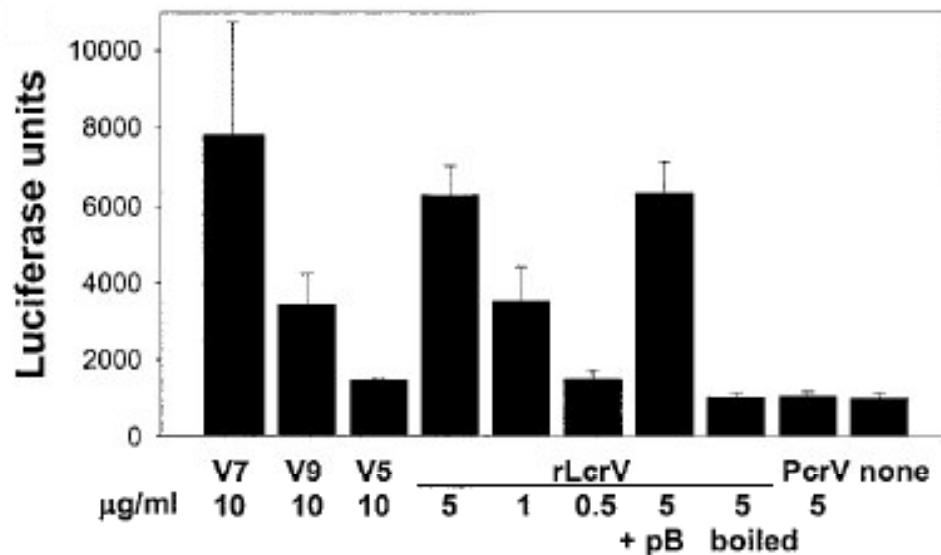


Abb. 14A

```

PcrV ...MEVRNLNAARELFLDELLAASAAPASAEQEELLALLR.....SE 39
LcrV MIRAYEQNPQHFIEDLEKFRVEQLTGHGSSVLEELVQLVKDKKIDISIKYDPKKDSE 56
V5                HGSSVLEELVQLVKDKK
V7                VLEELVQLVKDKKIDISIK
V9                VKDKKIDISIKYDPKKDSE

```

Abb. 14B

**Abb. 14 (A) Zwei synthetische Oligopeptide abgeleitet von der N-terminalen Region von LcrV sind in der Lage, CD14/TLR2- Signaling zu induzieren.** CD14/TLR2- kotransfizierte HEK 293- Zellen wurden mit den Peptiden V5, V7 und V9 (je 10 µg/mL), rLcrV (5 µg/mL) und rPcrV (5 µg/mL) stimuliert oder unstimuliert gelassen. Zur Kontrolle wurde Polymyxin B (+pB; 10 µg/mL) zugefügt oder die rLcrV- Präparation vor der Zugabe 1 h lang gekocht. Nach 6h wurde die NF- $\kappa$ B- abhängige Luciferaseaktivität mittels pELAM- Luc bestimmt.

**(B) Aminosäuresequenz der N-terminalen Region von PcrV (aa1-aa39), LcrV (aa1-aa56), und den Polypeptiden V5, V7 und V9.**

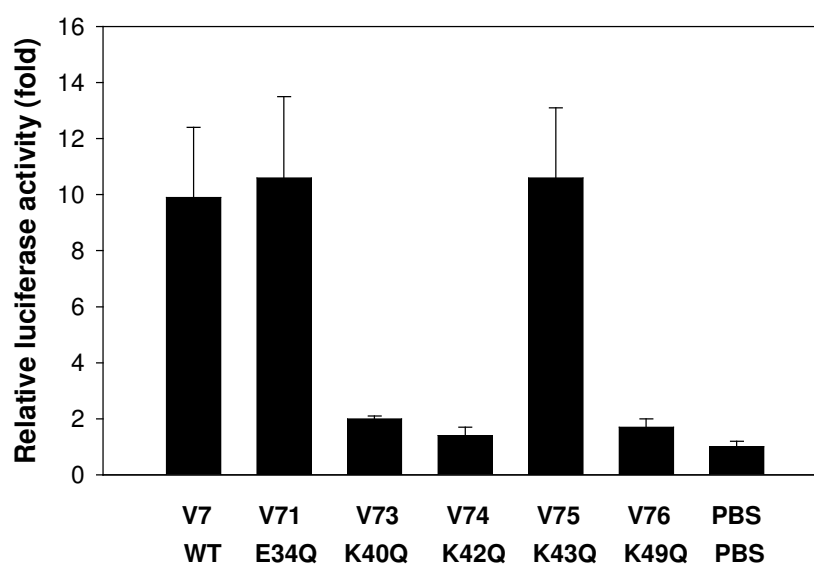
## **5.3 Bedeutung der TLR2- vermittelten Immunsuppression durch LcrV im Mausinfektionsmodell**

### **5.3.1 LcrV mit Punktmutation in der TLR2- aktiven Region (K42Q) verliert immunsuppressorische Aktivität**

Entscheidend war nun die Frage nach einer möglichen *in vivo*- Bedeutung des aufgrund der *in vitro*- Daten vorgeschlagenen Pathomechanismus einer LcrV- bedingten IL-10- Induktion über TLR2 mit der daraus resultierenden Immunevasion durch *Y. enterocolitica*. Diese Frage sollte anhand von Infektionsversuchen im Mausmodell beantwortet werden. Wegen der Multifunktionalität, im besonderen wegen der Beteiligung von LcrV an der Regulation des für die Virulenz der Yersinien wichtigen TTSS, ist es unmöglich, zur Klärung dieser Frage vergleichende Infektionsversuche mit Wildtyp- *Y. enterocolitica* und einer einfachen *lcrV*- Gendeletions- Mutante durchzuführen. Daher war es das Ziel, eine Yersinie mit punktmutiertem LcrV herzustellen. Durch die Mutation sollte die TLR2- Aktivität von LcrV unter Beibehaltung aller anderen Funktionen verlorengehen. Um eine genauere Lokalisation einer geeigneten Mutation innerhalb der immunmodulatorisch aktiven Domäne von LcrV (aa31-aa57) zu finden, wurden ausgehend vom Peptid V7 (aa31-aa49) synthetische Oligopeptide mit Aminosäureaustauschen von sauren oder basischen Aminosäuren in der aktiven LcrV- Region konstruiert und im Luciferaseassay mit CD14/TLR2- transfizierten HEK 293- Zellen, denen das pELAM- Luc- Reporterkonstrukt kotransfiziert war (=HEK 293-R- Zellen), getestet. Bei der Einführung von Punktmutationen in den Peptiden wurde eine basische bzw. saure Aminosäure gegen Glutamin, eine neutrale Aminosäure, ausgetauscht. Damit sollte verhindert werden, dass sich der isoelektrische Punkt des mutierten Peptids im Vergleich zum entsprechenden Peptid mit Wildtyp- LcrV- Sequenz zu stark verändert. Desweiteren sollte durch den Austausch eine geladene Seitengruppe in der aktiven Region von LcrV eliminiert werden. Im Luciferaseassay wurden CD14/TLR2- transfizierte HEK-293- R- Zellen 6h mit den verschiedenen punktmutierten Peptiden (10 µg/mL, s. Tab.2) stimuliert und dann die NF-κB- abhängige Luciferaseaktivität bestimmt. Wie aus Abb. 15 ersichtlich senkt ein

Aminosäureaustausch in Position 40 (Peptid V73, K40Q) oder in Position 42 (Peptid V74, K42Q) die CD14/TLR2- Aktivität des Peptids im Vergleich zum Peptid V7 (aa31-aa49), am stärksten (s. Abb. 15).

Während das Wildtyp O:8-Peptid V7 fast ähnlich stark NF- $\kappa$ B- Aktivierung über CD14/TLR2 stimulierte wie das komplette rLcrV, haben besonders die Peptide mit Aminosäureaustausch an Position 40 (Lysin) oder 42 (Lysin) an TLR2-stimulatorischer Aktivität verloren. Das Peptid V74 (K42Q) erwies sich als völlig inaktiv. Das Peptid V73 (K40Q) zeigt noch eine Restaktivität.



**Abb. 15A Testung von LcrV- abgeleiteten und mutierten synthetischen Oligopeptiden auf TLR2- induzierte NF $\kappa$ B- Reporteraktivität.**

HEK 293-R-Zellen wurden transient mit CD14 und TLR2 transfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion 6 h lang mit den angegebenen Peptiden (10  $\mu$ g/mL) mit Aminosäureaustausch oder mit Wildtyp- Peptid (V7) mit LcrV O:8- Sequenz stimuliert. Anschliessend wurden die Luciferaseaktivitäten bestimmt. Nur mit PBS inkubierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die obere Zeile der X- Achsen- Beschriftung beinhaltet die Namen der Peptide, die untere Zeile den jeweiligen Aminosäureaustausch im Peptid mit Angabe der Austauschposition.

Aminosäureposition: 40 42

↓ ↓

V7	VLEELVQLVKDKKIDISIKY
V71	VLEQLVQLVKDKKIDISIKY
V72	VLQQLVQLVKDKKIDISIKY
V73	VLEELVQLVQDKKIDISIKY
V74	VLEELVQLVKDQKIDISIKY
V75	VLEELVQLVKDKQIDISIKY
V76	VLEELVQLVKDKKIDISIQY
Peptid	Aminosäuresequenz

**Tab.2 Aminosäuresequenzen der zur Stimulation verwendeten Peptide mit Aminosäureaustausch (unterstrichen) gegenüber der LcrV O:8- Sequenz (= V7).**

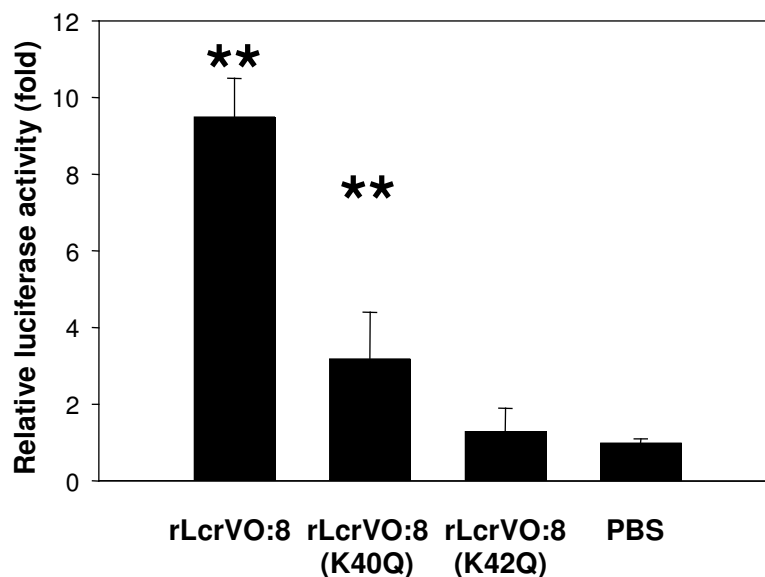
Besonders die Peptide mit Austausch an Aminosäureposition 40 bzw. 42 (jeweils Lysin K→ Glutamin Q) erwiesen sich im CD14/TLR2- Transfektionsmodell als inaktiv (s. auch Abb.15A).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden rekombinante LcrV- Konstrukte hergestellt, die an den entsprechenden Positionen die ermittelten Aminosäureaustausche tragen (rLcrV K40Q und rLcrV K42Q), ansonsten aber dem Wildtyp- LcrV (rLcrV O:8) entsprechen. Im Luciferaseassay zeigt rLcrV K42Q keine CD14/TLR2- Aktivität mehr, während rLcrV K40Q, das in der aktiven Region die LcrV O:3- Sequenz aufweist, noch eine geringe TLR2- stimulatorische Fähigkeit besitzt (s. Abb. 16).

Wie in Abb.15B gezeigt weisen die LcrV- Sequenzen besonders im Aminosäurebereich aa40-aa61 große Unterschiede auf.

<b>Y. pestis</b>	VLEELVQLV <b>KDKN</b> IDISIKYDP <b>R</b> KDSEVFA <b>N</b> RVITDD
<b>Y. pstb.</b>	VLEELVQLV <b>KDKN</b> IDISIKYDP <b>R</b> KDSEVFA <b>N</b> RVITDD
<b>Y.e. 09</b>	VLEELVQLV <b>KDKK</b> IDISIKYDP <b>K</b> KDSEVFA <b>D</b> RVITDD
<b>Y.e. 09</b>	VLEELVQLV <b>QDKK</b> IDISIKYDP <b>Q</b> KDSEVFA <b>D</b> RVITDD
<b>Y.e. 08</b>	VLEELVQLV <b>KDKK</b> IDISIKYDP <b>K</b> KDSEVFA <b>E</b> RVITDD
<b>Y.e. 05/27</b>	VLEELVQLV <b>QDKK</b> IDISIKYDP <b>K</b> KDSEVFA <b>D</b> RVITDD
<b>Y.e. 03</b>	VLEELVQLV <b>QDKK</b> IDISIKYDP <b>Q</b> KDSEVFA <b>N</b> RVITDD
<b>Y.e.03/09</b>	VLEELVQLV <b>KDKK</b> IDISIKYDP <b>K</b> KDSEVFA <b>D</b> RVITDD
<b>Y.e. 03/09</b>	VLEELVQLV <b>KDKK</b> IDISIKYDP <b>K</b> KDSEVFA <b>N</b> RVITDD

**Abb. 15B N- terminale LcrV- Regionen natürlich vorkommender Yersinien**



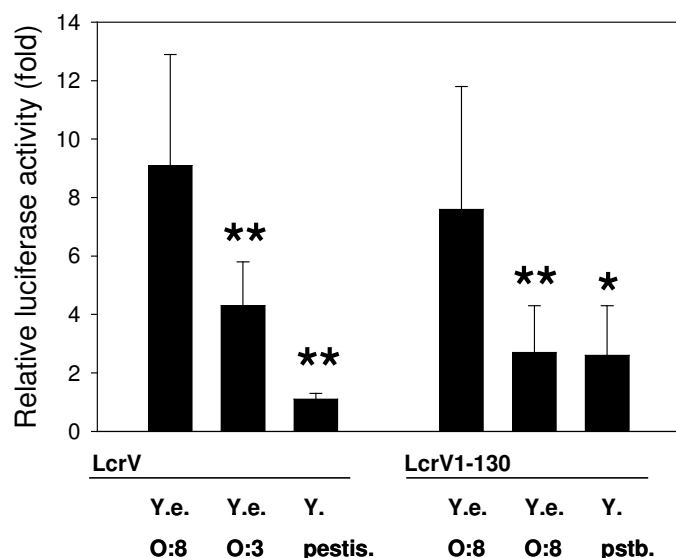
**Abb. 16 TLR2- induzierte NF $\kappa$ B- Reporteraktivität von rLcrV, rLcrV K40Q und rLcrV K42Q.**

HEK 293-R-Zellen wurden transient mit CD14 und TLR2 transfiziert. Die Zellen wurden 24h nach der Transfektion 6 h lang mit rLcrV O:8, rLcrV K40Q, rLcrV K42Q (5  $\mu$ g/ml) oder PBS inkubiert. Anschliessend wurde die Luciferaseaktivität gemessen. Die obere Zeile der X-Achsen- Beschriftung stellt die Namen der Proteine dar, die untere Zeile den jeweiligen Aminosäureaustausch im Protein mit Angabe der Austauschposition.

Da auch die natürlich vorkommenden LcrVs verschiedener *Yersinia*- Arten sowie LcrV- Homologe anderer Bakteriengattungen Unterschiede in der N- terminalen, TLR2- aktiven Region aufweisen, wurden rekombinantes LcrV von *Y. enterocolitica* O:3, *Aeromonas rAcrV* von *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* und die 130 N- terminalen Aminosäuren umfassende Fragmente LcrV1-130 (=V130) O:8, LcrV1-130 O:3 und LcrV1-130 von *Y. pseudotuberculosis* (=V pst.) als rekombinante (His)<sub>6</sub>- Proteine hergestellt. Die N- terminale Sequenz aa1-aa130 von *Y. pseudotuberculosis* ist 99,2% identisch zu der von *Y. pestis*. Zusätzlich wurde rekombinantes GST- LcrV von *Y. pestis* von James Hill (Porton Down, Großbritannien) zur Verfügung gestellt. Die Testung dieser rekombinanten Proteine (5  $\mu$ g/mL) bzw. LcrV- Trunkate (äquimolar zu den Proteinen mit voller Länge eingesetzt) im CD14/TLR2- abhängigen NF- $\kappa$ B- Reporterassay, ergab folgendes (s. Abb. 17):



Am stärksten CD14/TLR2- stimulierend erweist sich das rLcrV O:8, während rLcrV O:3 im Vergleich zu LcrV O:8 eine auf ca. 50 % reduzierte NF- $\kappa$ B- Aktivierung zeigt. Überraschenderweise ist bei LcrV von *Y. pestis* bzw. *Y. pseudotuberculosis* die Fähigkeit zur NF- $\kappa$ B- Aktivierung über CD14/TLR2 noch geringer. Diese Aktivitätsabschwächung ist beim Trunkat rLcrV1-130 stärker ausgeprägt als beim kompletten Protein. AcrV (Daten nicht gezeigt) erweist sich in diesem Assay als nur sehr schwach aktiv.

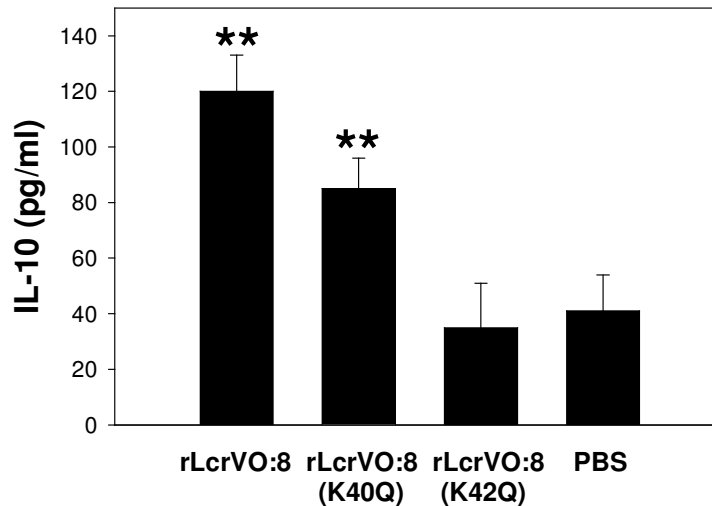


**Abb. 17 Die V- Antigene verschiedener Yersinienspezies oder verschiedener Serotypen von *Y. enterocolitica* zeigen unterschiedliche Fähigkeiten zur NF- $\kappa$ B- Aktivierung über CD14/TLR2.**

HEK 293-R-Zellen wurden transient mit pCD14 und pTLR2 transfiziert und 24 h nach der Transfektion 6 h lang mit den angegebenen rekombinanten Proteinen (5  $\mu$ g/mL) bzw. mit den die 130 N- terminale Aminosäuren umfassenden LcrV- Fragmenten (2 $\mu$ g/mL) stimuliert. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. \*\*zeigt P- Werte<0.01, \* P- Werte<0.05 an.

Um die mutierten Proteine auch auf ihre Fähigkeit zur IL-10- Induktion in C57BL/6 Peritonealmakrophagen zu testen, wurden 2 h nach Stimulation die IL-10- Spiegel im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Auch im Makrophagenassay erwies sich rLcrV O:8 als stärker IL-10- induzierend als rLcrV O:8 K40Q, rLcrV K42Q zeigte

ebenso wie rLcrV von *Y. pestis* (Daten nicht gezeigt) nur eine sehr geringe IL-10-Induktion (s. Abb. 18).



**Abb. 18 Durch Aminosäureaustausch im LcrV kann die LcrV- abhängige IL-10-Induktion im Vergleich zum Wildtyp- LcrV O:8 verringert bzw. völlig verhindert werden.**

C57BL/6- PPMs ( $1 \times 10^6$ /mL) wurden mit rLcrV O:8, rLcrV O:8 K40Q, rLcrV O:8 K42Q (5  $\mu$ g/mL) oder PBS als Negativkontrolle inkubiert. Nach 2 h wurde die IL-10- Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. \*\* zeigt P- Werte < 0.01 gegenüber den PBS-inkubierten Zellen an.

Da die K42Q- Austausch im LcrV O:8 sowohl im Makrophagen- als auch im Transfektionsassay keine Aktivität mehr zeigte, lag es nahe, eine Yersinien *lcrV*- Mutante mit K42Q- Austausch zu konstruieren. Vorausgesetzt, dass diese Yersinien- Mutante ihre sonstigen Funktionen in der TTSS- Regulation beibehält, wäre sie eine ideale Möglichkeit, um die Relevanz der immunmodulatorischen Fähigkeit von LcrV für die Pathogenität von *Y. enterocolitica* im Mausinfektionsmodell direkt zu zeigen.

### 5.3.2 Konstruktion einer Yersinien- Mutante mit K42Q- Mutation im LcrV- Gen und Testung *in vitro*

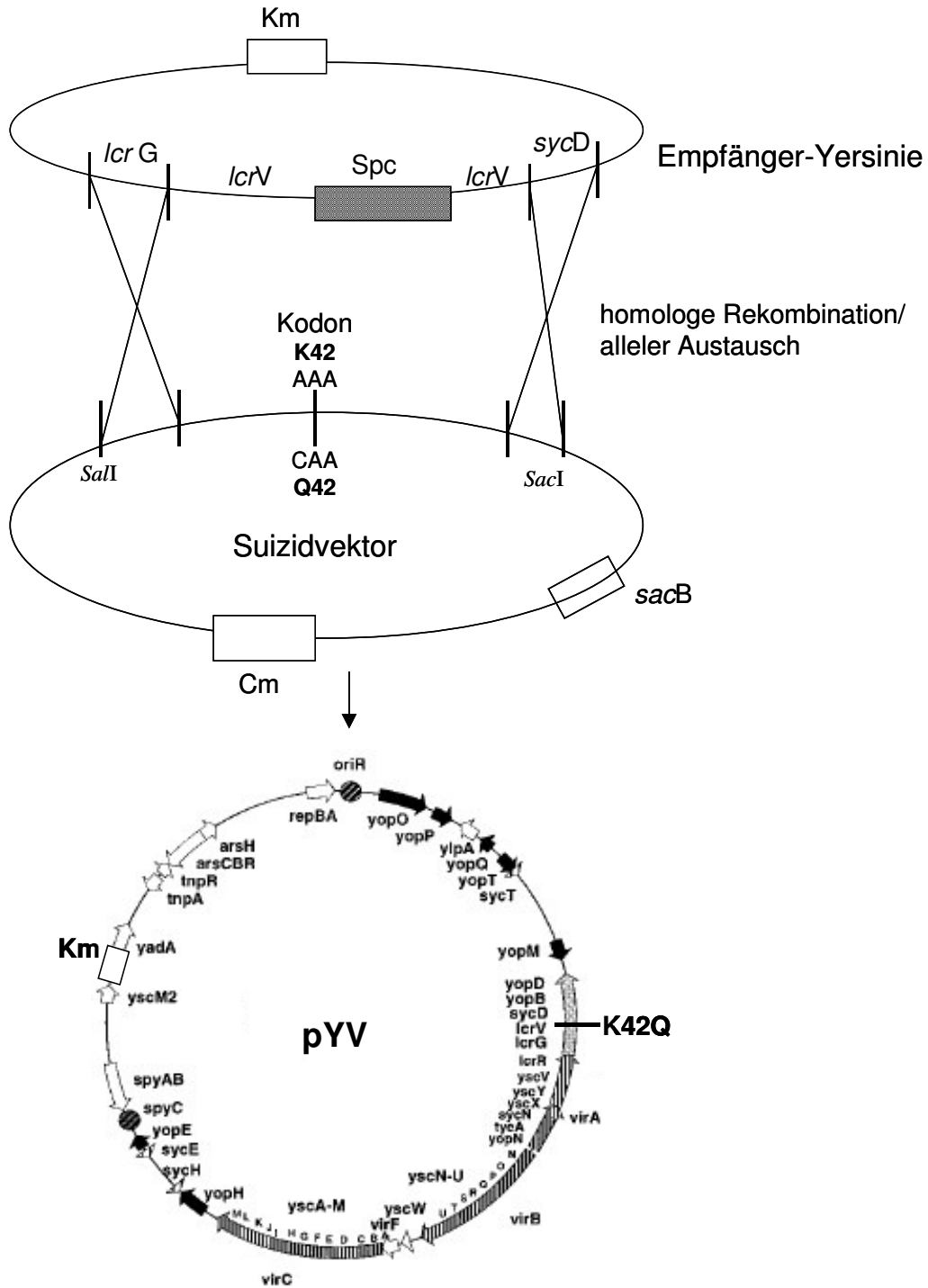


Abb. 19 Modell zum Kodonaustausch K42Q und genetische Karte des Virulenzplasmids von WAC- M74 (LcrV K42Q) nach der Mutagenese (hier als Virulenzplasmid exemplarisch: nach Cornelis et al. 1998).

Um das *LcrV*- Gen unter der Kontrolle des natürlichen Promoters zu belassen, wurde zunächst das gesamte *lcrGVH*- Operon von *Y. enterocolitica* Serotyp O:8 in den pks-Vektor (Stratagene) kloniert, beginnend 150 Basenpaare vor der Promoterregion von *lcrG* und endend hinter *sycD*, am Anfang von *yopB*. Hierfür wurden die Schnittstellen *Sall* und *BamHI* verwendet. Der verwendete pks- Vektor hatte eine geeignete Grösse, um mittels Site- directed- Mutagenesis Kit (Stratagene) eine Punktmutation ins *lcrV*- Gen einzuführen, welche zu einem K42Q- mutierten Protein führen würde. Diese Punktmutation wurde mit Hilfe überlappender, entgegengesetzt ausgerichteter, langer Mutationsprimer, die für die Aminosäure Q (DNA- Triplet unterstrichen) anstelle von K in der Position 42 im *LcrV*- Protein codierten. Diese an den normalen *LcrV* O:8- DNA- Strang nicht passende Position ( dick + unterstrichen) wurde mittig in den Primer gesetzt, so dass sich folgendes Primerpaar ergab:

V74 Forward:

5` GGTTCAGTTAGTCAAAGATCAAAAGATAGATATTTCCATTAAATA 3`

V74 Reverse:

5` TATTTAATGGAAATATCTATCTTTGATCTTTGACTAACTGAACC 3`

Das 5`Ende der Primer war jeweils phosphoryliert, die Primer HPLC- gereinigt. Nach PCR mit *Pfu*- Polymerase wurde das nicht- mutierte Plasmidtemplate mit *Dpn1*- Verdau entfernt, und die mutierte Plasmid- DNA in kompetente DH5 $\alpha$ - *E. coli* transformiert. Aus den resultierenden Klonen mit der korrekten Resistenz wurde das mutierte *lcrV* in den Suizidvektor pJULpGPCAT+sacB mittels der Schnittstellen *Sall* und *SacI* subkloniert. Der Suizidvektor enthält eine Chloramphenicol- Resistenzkassette und ein *sacB*- Gen von *Bacillus subtilis* als möglichen positiven Selektionsmarker für den Verlust des Plasmids. Das *sacB*- Gen codiert für Levansucrase, ein Enzym, das die Hydrolyse von Sucrose sowie die Synthese von Levanen katalysiert. In einigen gram- negativen Bakterien ist Levansucrase letal für die Bakterien in Anwesenheit von 5 % Sucrose. S17-1  $\lambda$ pir *E. coli* mit dem Suizidvektor, das mutierte *GVH*- Insert tragend, wurden bei 37°C für 8 h auf Blutagar mit dem Empfängerstamm WA- TNK` (pYV Km<sup>R</sup>, *lcrV*: Spc<sup>R</sup>) konjugiert. Dieser WA- TNK enthielt eine Kanamycinkassette in der Nähe des *yadA*- Gens und eine Spectinomycin- Resistenzkassette innerhalb des *lcrV*- Gens. Die Konjuganten wurden zuerst auf Agar mit Nalidixinsäure, Kanamycin und Chloramphenicol ausplattiert, um auf eine einseitige homologe Rekombination des Suizidvektor-Inserts

in das Virulenzplasmid der Empfängeryersinie zu selektionieren. Dann wurden die resultierenden Klone wiederholt auf Nalidixinsäure/Kanamycin- Agar mit 5 % Sucrose ausplattiert. Dabei wurde auf eine doppelte homologe Rekombination des Suizidvektor- Inserts in das Virulenzplasmid der Empfängeryersinie selektioniert (alleler Austausch). Die sucroseresistenten Kolonien wurden auf Chloramphenicolsensitivität getestet, die den Verlust des Suizidvektors anzeigt. Ausserdem wurden die Kolonien auf Spektinomycinsensitivität geprüft, die den alleler Austausch des mutierten *lcrV* in das Virulenzplasmid der Empfängeryersinie anzeigt.

Um eine vergleichbare Kontroll- Yersinie ohne mutiertes *lcrV*, die denselben Prozess wie M74 durchlaufen hat, zu erhalten, wurde der gesamte alleler Austausch wiederholt, wobei nun Primer verwendet wurden, die keine Mutation in die LcrV- O:8- Sequenz einführen:

VO:8 Forward:

5` GGTTCAGTTAGTCAAAGATAAAAAAGATAGATATTTCCATTAAATA 3`

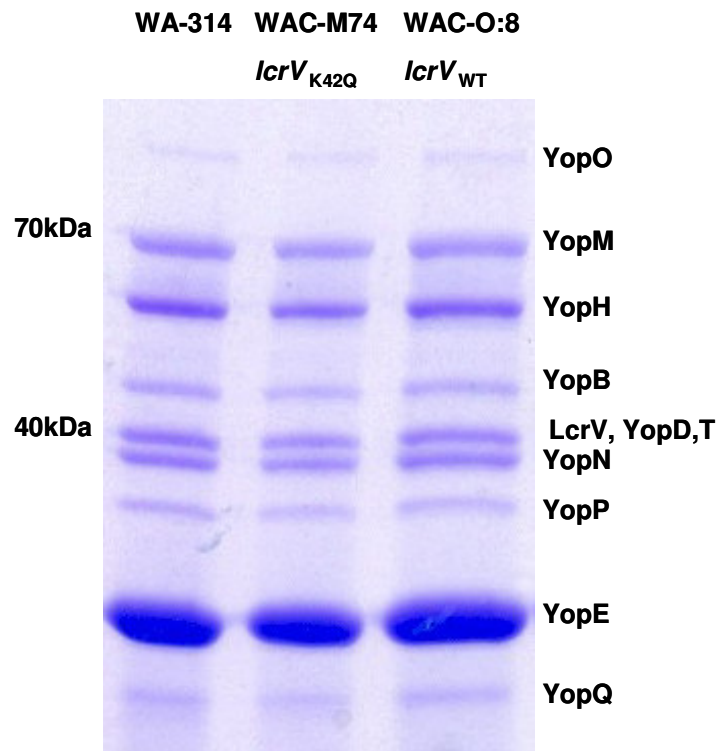
VO:8 Reverse:

5` TATTTAATGGAAATATCTATCTTTTTTTATCTTTGACTAACTGAACC 3`

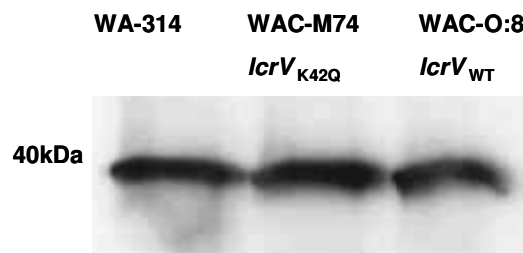
Um sicherzugehen, dass für die Infektionstestung isogene Yersinien ohne Veränderungen des chromosomalen Hintergrundes verwendet werden, wurden abschliessend die zwei Virulenzplasmide isoliert und diese nach Überprüfung des *lcrV*- Gens durch Sequenzierung jeweils in einen elektrokompetenten WA-C- Stamm, der selbst kein Virulenzplasmid enthält, durch Elektroporation eingeführt und auf Kanamycinresistenz selektioniert.

Bei der aus dieser Mutagenese hervorgegangenen Yersinien- LcrV- Mutante mit K42Q Aminosäureaustausch (WAC-M74) wurde nun überprüft, ob die über die Immunmodulation hinausgehenden Funktionen von LcrV durch Einführung der Punktmutation im Vergleich zur Kontroll- Yersinie (WAC-O:8) unbeeinflusst geblieben sind. Als erstes wurde die Yop- Sekretion der beiden Stämme unter  $Ca^{2+}$ - Mangelbedingungen getestet. Die Yops aus je 1 mL Bakterienkulturüberstand wurden in einem 12% SDS- Gel aufgetrennt, und entweder mit Coomassie Blue angefärbt (Abb. 20A) oder auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mittels Anti-LcrV- Antiserum detektiert (Abb. 20B). Sowohl WAC-M74 als auch WAC-O:8 und

WA-314 sezernieren das bekannte Yop- Muster an Proteinen (Aepfelbacher et al. 1999, Heesemann et al. 1986). Aus dem Versuch wird ersichtlich, dass die Proteinsekretion der WAC-M74 Yersinien- Mutante durch die Punktmutation im LcrV- Gen und den daraus resultierenden Aminosäureaustausch im Protein (K→Q) nicht gestört ist. Das punktmutierte LcrV wird ebenso wie die anderen Yops bei 37°C und Ca<sup>2+</sup>- Mangelbedingungen in den Kulturüberstand sezerniert (s.Abb. 20B).



**Abb. 20A** Coomassiefärbung von Yops nach 12 % SDS- PAGE



**Abb. 20B** Anti- LcrV- Westernblot der sezernierten Yops nach 12 % SDS- PAGE

**Abb. 20** Es wurden Yops aus 1mL Kulturüberstand präzipitiert .

Die Proteine wurden mit Probenpuffer solubilisiert und elektrophoretisch getrennt. Spur1: Marker 90 kDa-20 kDa, Spur 2: WA-314, Spur 3: WAC-M74 (*lcrV*<sub>K42Q</sub>), Spur 4: WAC-O:8 (*lcrV*<sub>WT</sub>).

Auch die Wachstumskurven von WAC-M74 und WAC-O:8 waren bei 27°C und 37°C vergleichbar und unterschieden sich nicht von des Elternstammes (Daten nicht gezeigt).

Da LcrV an der Yop- Translokation über die Wirtszellmembran beteiligt ist, wurde das isogene Paar auf YopP- Translokation getestet. Da YopP Apoptose induziert, wurde auf vergleichbare Apoptoseinduktion hin getestet. Dazu wurden  $5 \times 10^5$  J774A.1 Makrophagen mit WAC-M74 oder WAC-O:8 infiziert (MOI = 50), wobei die Bakterien 2h bei 37°C angezüchtet wurden, um sie zur Produktion von Yops anzuregen. Vor Infektion wurde das Anzuchtmedium durch zweimaliges Waschen der Bakterien mit PBS entfernt. Nach 4-stündiger Infektion der Makrophagen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Sättigung wurde begonnen, in zeitlichen Abständen den Zustand der Zellen lichtmikroskopisch zu begutachten. Zellen, die formverändert oder nicht mehr adhären waren, wurden als apoptotisch eingestuft. Zusätzlich wurde eine Propidiumiodidfärbung, die apoptotische Zellen blau anfärbt, durchgeführt. Die Makrophagen zeigten sowohl bei Infektion mit WAC-M74 als auch mit WAC-O:8 nach 4-6 h eine Apoptoserate von ca. 30 % der Zellen. Die Fähigkeit der WAC-M74-Mutante als auch der WAC-O:8- Yersinie, Yops in die Wirtszellen zu translozieren und so in diesen Apoptose auszulösen, scheint daher vergleichbar zu sein.

Weiterhin wurde ein Phagozytoseresistenztest durchgeführt, um die beiden Stämme hinsichtlich ihrer Phagozytoseresistenz miteinander zu vergleichen (YopE und YopH Beteiligung). Dafür wurden  $1 \times 10^5$  HeLa- Zellen 2h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>- Sättigung entweder mit WAC-M74 oder mit WAC-O:8 infiziert (MOI=30). Anschliessend wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung der Bakterien durchgeführt. Dabei werden Bakterien, die phagozytiert wurden und innerhalb der HeLa- Zellen liegen, grün angefärbt, während ausserhalb der Zellen liegende Bakterien grün und rot gefärbt werden und somit orange bzw. gelb erscheinen. Sowohl bei Infektion mit WAC-M74 als auch mit WAC-O:8 wurden weniger als 5 % der Bakterien phagozytiert (s. Abb. 21). Durch diesen Versuch wird nochmals deutlich, dass die WAC-M74-Yersinie mit K42Q Aminosäureaustausch im LcrV in der Lage ist, Yops in die Wirtszellen zu translozieren und sich so vor Phagozytose durch die Wirtszellen schützt wie WAC-O:8. Damit beeinträchtigt das mutierte LcrV (K42Q) weder Yop- Sekretion noch Yop-Translokation.



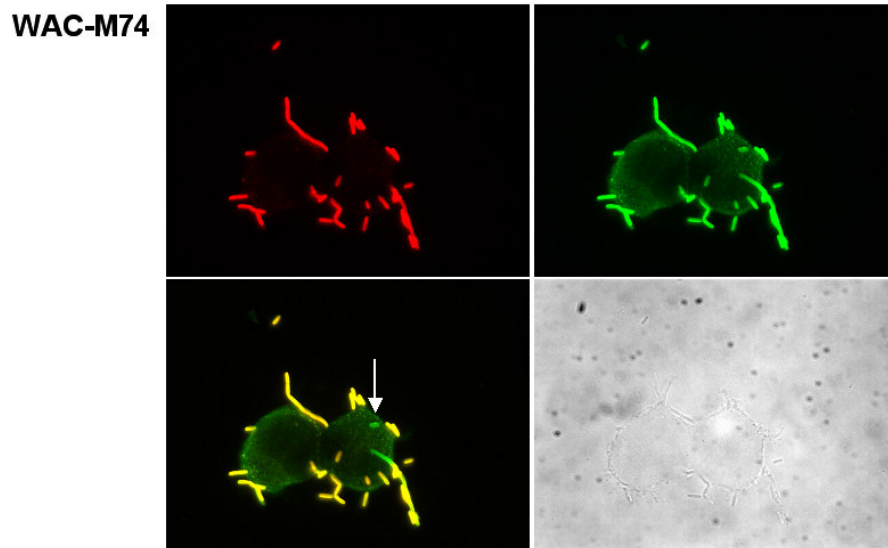


Abb. 21A

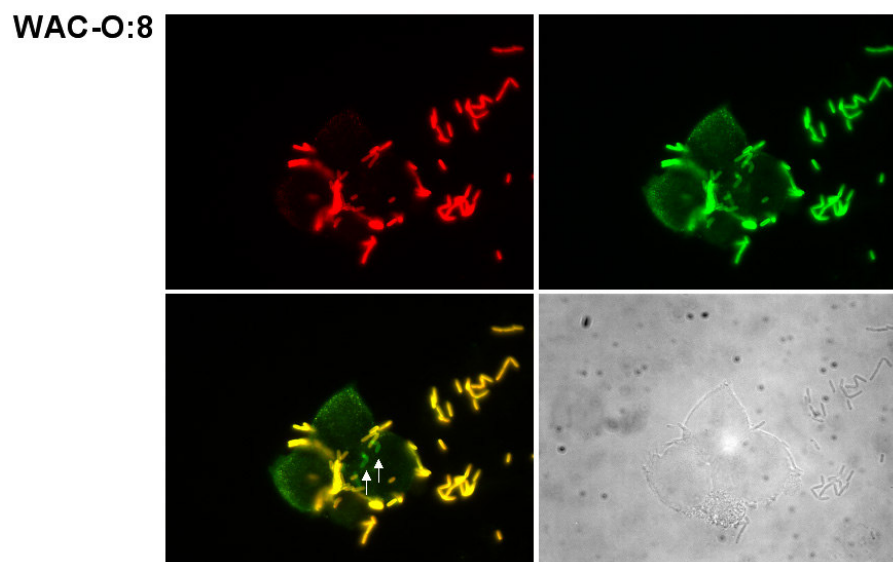


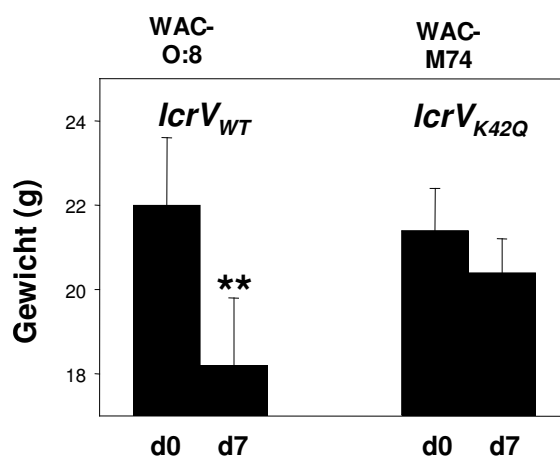
Abb. 21B

**Abb. 21 Differenzierung von extrazellulären und intrazellulären Yersinien in HeLa- Zellkultur.**

1X10<sup>5</sup> HeLa- Zellen wurden 2h mit WAC-M74 (A) oder WAC-MO:8 (B) infiziert. Die Lokalisation der Bakterien wurde mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung visualisiert und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die jeweils obere Zeile der Abbildungen zeigt die einzelnen Färbungen, die untere Zeile die übereinandergelegten Bilder der roten und grünen Färbung und die zugehörige Hellfeldabbildung. Gelbe Bakterien wurden mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt und liegen ausserhalb der Zellen. Grüne Bakterien liegen intrazellulär, wurden also phagozytiert (durch Pfeile angezeigt).

### 5.3.3 Testung der Yersinien- Mutante mit K42Q- Austausch im LcrV im Mausinfektionsmodell

Der Stamm WAC-O:8 und die Mutante WAC-M74 wurden vergleichend im Mausinfektionsmodell auf Virulenz Um einen natürlichen Infektionsweg nachzuahmen, wurden zunächst C57BL/6- Mäuse peroral mit  $1 \times 10^8$  WAC-M74 oder WAC-O:8 infiziert. Der Gewichtsverlust der Mäuse während der Infektion wurde täglich protokolliert. In abb. 22 wird deutlich, dass die WAC-M74 infizierten Mäuse innerhalb von 7 Tagen weniger Gewicht verloren haben als die WAC-O:8 infizierten, was ein erster Hinweis auf Virulenzabschwächung der Mutante ist.

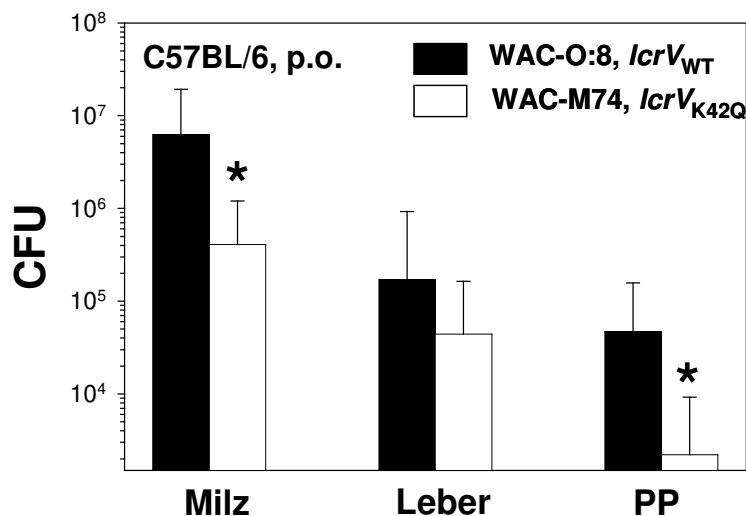


#### Abb. 22 Vergleich des Gewichtsverlustes von infizierten Mäusen.

Je 5 C57BL/6- Mäuse wurden mit einer Infektionsdosis von  $1 \times 10^8$  Yersinien infiziert. Gezeigt ist das Durchschnittsgewicht einer Maus am Tag der Infektion (d0) bzw. 7 Tage nach der Infektion (d7) mit den angegebenen Yersinienstämmen. Das Experiment wurde 3x wiederholt. \*\* zeigt P-Werte < 0.0001 an.

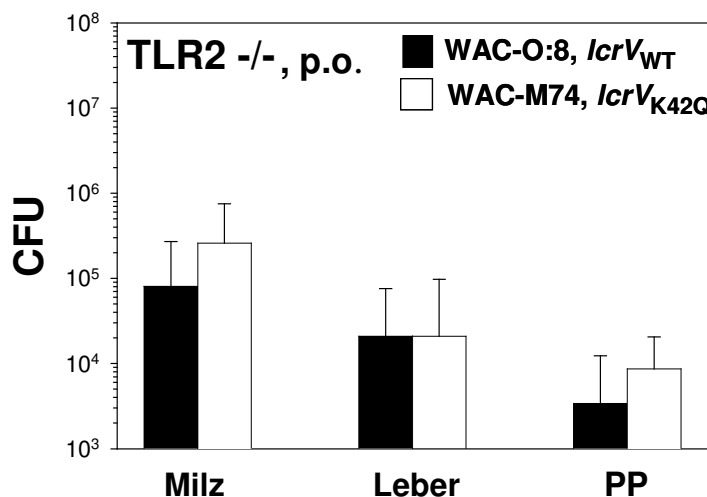
Nach 7 Tagen wurden die infizierten Tiere getötet, Milz, Leber und Peyer`sche Plaques entnommen, in 500  $\mu$ L PBS homogenisiert und in Verdünnungsreihen auf CIN- Agar ausplattiert. Nach 24 h Inkubation bei 27 °C wurden die Bakterienkolonien ausgezählt. Ein Vergleich der Bakterienzahlen in den Organen und den Peyer`schen Plaques ergab folgendes Ergebnis (s. Abb. 23): In C57BL/6- Mäusen ist bei Infektion mit WAC-O:8 die Bakterienlast in Milz, Leber und Peyer`schen Plaques höher als bei Infektion mit der Mutante WAC-M74 mit K42Q Austausch im LcrV. In der Milz beträgt der Unterschied ca. 1 log- Stufe, in der Leber ca. 0,5 log- Stufen und in den

Peyer`schen Plaques fast 2 log- Stufen. Dies zeigt, dass die Yersinie mit mutiertem LcrV (K42Q) tatsächlich im Vergleich zur Kontroll-Yersinie mit Wildtyp- LcrV in ihrer Pathogenität abgeschwächt ist. Um herauszufinden, ob diese abgeschwächte Pathogenität von WAC-M74 tatsächlich auf einer gestörten CD14/TLR2- Aktivität und auf einer daraus resultierenden unterdrückten IL-10-Induktion durch das punktmutierte LcrV beruhen könnte, wurden die Infektionsversuche zusätzlich mit TLR2-/- Mäusen durchgeführt. Interessanterweise traten die oben erläuterten Unterschiede in der Bakterienlast hier nicht auf (s. Abb.24). Die Keimzahlen in Milz, Leber und Peyer`schen Plaques waren bei WAC-O:8 und WAC-M74- Infektion vergleichbar, lagen aber deutlich unter denen bei C57BL/6- Mäusen. Dies spricht dafür, dass TLR2 für die LcrV- vermittelte Pathogenität der Yersinie bedeutsam ist.



**Abb. 23 Keimzahlen in Milz, Leber und Peyer`schen Plaques von WAC-O:8 und WAC- M74 infizierten C57BL/6 Mäusen.**

WAC-M74 hat durch die Mutation im LcrV an Pathogenität verloren. Je 5 Mäuse wurden mit  $1 \times 10^8$  der angegebenen Yersinienstämme peroral infiziert. Die Bakterienzahlen stellen die durchschnittliche Bakterienlast in den einzelnen Organen an Tag 7 nach der Infektion logarithmisch dar. Die schwarzen Balken repräsentieren eine Infektion mit WAC-O:8, die weißen eine Infektion mit WAC-M74. Das Experiment wurde 5x wiederholt. \* zeigt  $P < 0.05$  an.



**Abb. 24 Keimzahlen in Milz, Leber und Peyer`schen Plaques von WAC-O:8 und WAC- M74 infizierten TLR2-/- Mäusen.**

Je 5 Mäuse wurden mit  $1 \times 10^8$  der angegebenen Yersinienstämme peroral infiziert. Die Bakterienzahlen stellen die durchschnittliche Bakterienlast in den einzelnen Organen an Tag 7 nach der Infektion logarithmisch dar. Die schwarzen Balken repräsentieren eine Infektion mit WAC-O:8 (*IcrV<sub>WT</sub>*), die weißen eine Infektion mit WAC-M74 (*IcrV<sub>K42Q</sub>*). Das Experiment wurde 5x wiederholt.

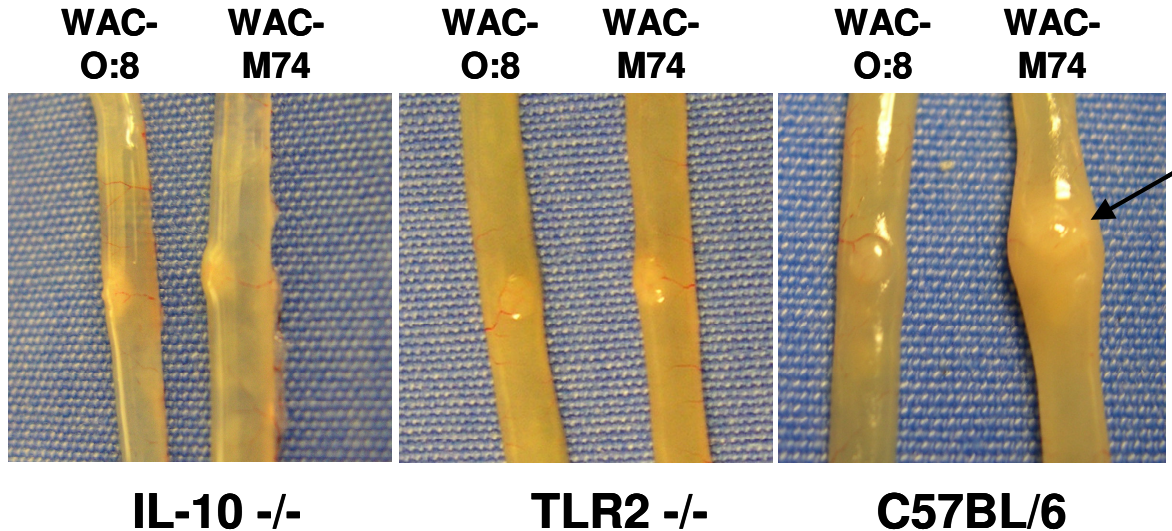
	C57BL/6		TLR2 -/-	
	<i>IcrV<sub>WT</sub></i>	<i>IcrV<sub>K42Q</sub></i>	<i>IcrV<sub>WT</sub></i>	<i>IcrV<sub>K42Q</sub></i>
Milz	<b><math>6,2 \times 10^6</math></b> $\pm 1,3 \times 10^7$	<b><math>4,1 \times 10^5</math></b> $\pm 7,9 \times 10^5$	$8,1 \times 10^4$ $\pm 1,9 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$ $\pm 4,9 \times 10^5$
Leber	$1,7 \times 10^5$ $\pm 7,6 \times 10^5$	$4,4 \times 10^4$ $\pm 1,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$ $\pm 5,5 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$ $\pm 7,7 \times 10^4$
PP	<b><math>4,7 \times 10^4</math></b> $\pm 1,1 \times 10^5$	<b><math>2,2 \times 10^3</math></b> $\pm 7 \times 10^3$	$3,4 \times 10^3$ $\pm 9 \times 10^3$	$8,7 \times 10^3$ $\pm 1,2 \times 10^4$

**Tab. 3 Übersicht über die Keimzahlen in Milz, Leber und Peyer`schen Plaques von WAC-M74 (*IcrV<sub>K42Q</sub>*) und WAC-O:8 (*IcrV<sub>WT</sub>*) infizierten Mäusen (s. auch Abb. 23 u. 24).**

Fett: signifikante Unterschiede zwischen WAC-O:8 (*IcrV<sub>WT</sub>*) und WAC-M74 (*IcrV<sub>K42Q</sub>*) Infektion.

Da der Unterschied in der Bakterienlast bei C57BL/6- Mäusen in den Peyer`sche Plaques am deutlichsten, wurden diese näher untersucht. Dabei fiel ein interessanter Unterschied auf: Waren die Mäuse mit WAC-O:8 infiziert, zeigten sie nach 7 Tagen im Vergleich zu nicht infizierten Mäusen geringfügig vergrößerte, mässig entzündete (nach Schwellungsgrad bestimmt) Peyer`sche Plaques. Diese

waren bei Infektion mit WAC-M74 dagegen stark vergrössert, woraus auf eine stärkere Entzündung der PPs geschlossen werden kann. Dieser Unterschied fehlte sowohl bei infizierten IL-10<sup>-/-</sup> als auch bei infizierten TLR2<sup>-/-</sup> Mäusen (s.Abb. 25).



**Abb. 25 PPs des Jejunums von infizierten Mäusen an Tag 7.**

IL10<sup>-/-</sup>, TLR2<sup>-/-</sup> und C57BL/6- Mäuse wurden peroral mit  $1 \times 10^8$  der angegebenen Yersinien infiziert. 7 Tage nach Infektion wurden an PBS- gespülten Därmen die Grösse der Peyerschen Plaques verglichen. Verstärkte Schwellung ist mit Pfeil angezeigt. Der Versuch wurde fünfmal mit 10 Mäusen pro Gruppe wiederholt.

Um herauszufinden, ob das Vorhandensein des LcrV- Effektes auch Einfluss auf die Überlebensrate der Mäuse bei einer *Y. enterocolitica*- Infektion haben könnte, wurden vergleichende Überlebensversuche mit WAC-M74 und WAC-O:8 durchgeführt. Die infizierten Mäuse wurden engmaschig kontrolliert und im Falle einer schwerwiegenden gesundheitlichen Beeinträchtigung (starker Gewichtsverlust und Apathie) euthanasiert. Vergleichende Überlebensversuche mit peroraler Infektion in C57BL/6-, IL-10<sup>-/-</sup> und TLR2<sup>-/-</sup> Mäusen konnten nicht durchgeführt werden, da die Infektionsdosis aufgrund der Resistenz der IL-10<sup>-/-</sup> und der TLR2<sup>-/-</sup> Mäuse sehr hoch gewählt werden müsste. Deshalb wurden Überlebensversuche mit peroraler Infektion nur an C57BL/6- Mäusen durchgeführt.

Für vergleichende Überlebensversuch mit C57BL/6, TLR2<sup>-/-</sup> und IL-10<sup>-/-</sup> Mäusen wurde die intraperitoneale Infektion gewählt. Peroral betrug die Infektionsdosis  $1 \times 10^7$ , intraperitoneal  $1 \times 10^4$ . Das Überleben der Mäuse wurde über 14 Tage verfolgt. Wie aus Abb. 26A und 26B ersichtlich überlebten in der Gruppe der C57BL/6- Mäuse die WAC-M74 infizierten Mäuse sowohl bei peroraler als auch bei

intraperitonealer Infektion länger als die WAC-O:8 infizierten. Bei peroraler Infektion starben bei WAC-M74- Infektion nur knapp 20 %, bei WAC-O:8- Infektion ca. 80 % der Mäuse (s. Abb. 26A), so dass ein grösser Unterschied in der Überlebensrate bei peroraler Infektion zu verzeichnen war. Bei der i.p. Infektion starben die Mäuse innerhalb einer Woche, weshalb hier die angeborene Immunantwort mit dem TLR-System eine grosse Rolle für das Überleben der Mäuse spielen dürfte. Ein fehlender immunsuppressiver LcrV- Effekt über CD14/TLR2 wie bei der WAC-M74- Yersinie der Fall scheint hier Einfluss auf das Überleben der Mäuse zu haben.

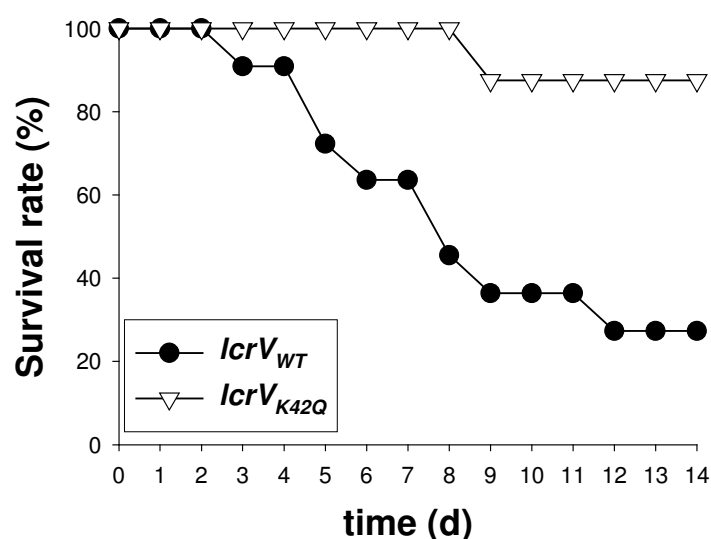


Abb. 26A Perorale Infektion von C57BL/6- Mäusen

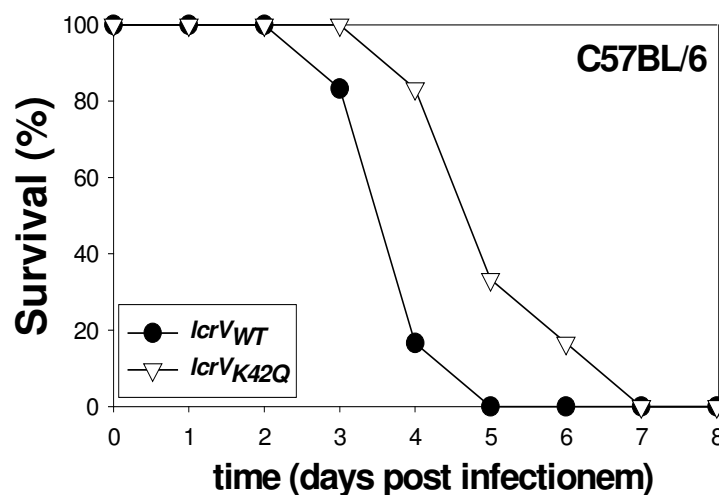
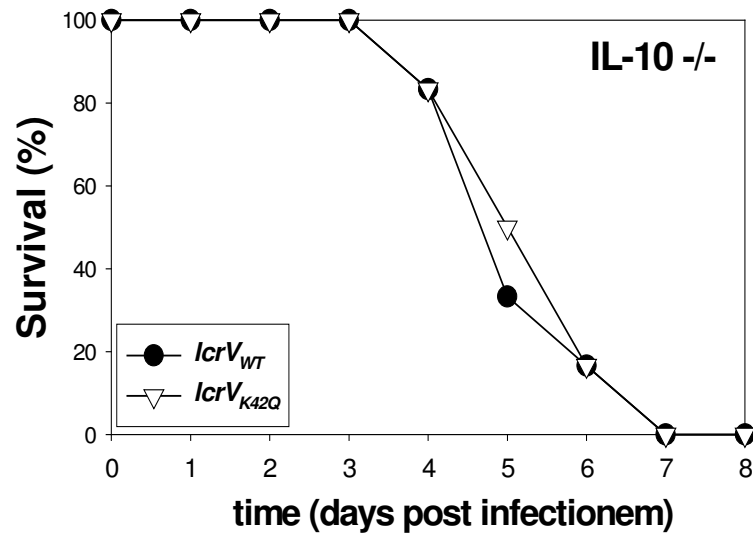
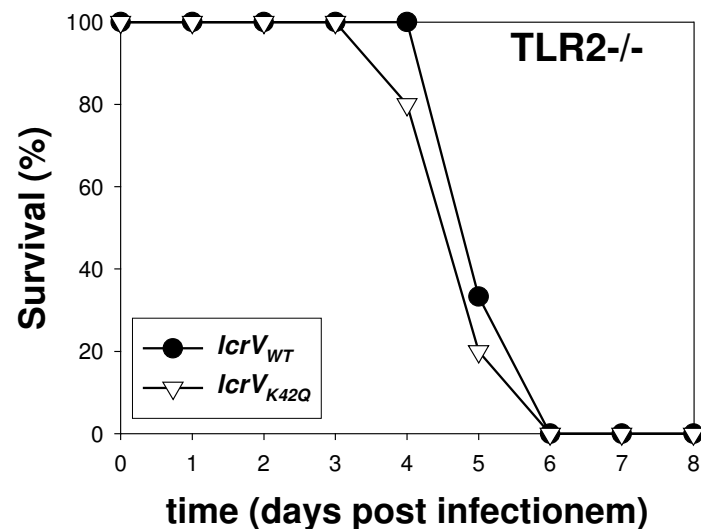


Abb. 26B Intraperitoneale Infektion von C57BL/6- Mäusen



**Abb. 26C** Intraperitoneale Infektion von IL-10<sup>-/-</sup> Mäusen



**Abb. 26D** Intraperitoneale Infektion von TLR2<sup>-/-</sup> Mäusen

**Abb. 26 Überlebenskurven von Mäusen nach Infektion mit WAC-O:8 (*IcrV<sub>WT</sub>*) und WAC-M74 (*IcrV<sub>K42Q</sub>*).**

Abb. 26: (A) C57BL/6- Mäuse wurden p.o. mit  $1 \times 10^7$  der angegebenen Bakterien infiziert (B) C57BL/6- Mäuse wurden i.p. mit  $1 \times 10^4$  der angegebenen Bakterien infiziert und das Überleben der Tiere wurde über 7 Tage hinweg überwacht. Bei C57BL/6- Mäusen überleben die WAC- M74 (mit *IcrV<sub>K42Q</sub>*)- infizierten Tiere länger als die WAC-O:8- infizierten und zeigen bei peroraler Infektion eine höhere Überlebensrate. (C), (D) Diese Unterschiede sind bei IL-10<sup>-/-</sup> bzw. TLR2<sup>-/-</sup> Mäusen nicht zu beobachten.

## 5.4 Untersuchungen zur Interaktion von LcrV mit Nod- PAMP- Rezeptoren

### 5.4.1 Nod1/2- vermittelte IL-10- Induktion durch LcrV

TLRs von Säugetieren erkennen als Typ I- Transmembranproteine mit ihrer extrazellulären Domäne PAMPs und aktivieren dadurch die angeborene Immunantwort. Die den TLRs strukturell verwandten Nod- Rezeptoren stellen zytosolische Proteine dar, die ebenfalls LRRs (aber am C- Terminus) enthalten und nach Stimulation durch mikrobielle Bestandteile eine NF- $\kappa$ B- Aktivierung in der Wirtszelle auslösen. Bislang ist nur das zunächst als TLR2- Agonist beschriebene Peptidoglykan als spezifischer Nod- Aktivator bekannt (Carneiro et al. 2004, Chamailard et al. 2003s, Girardin et al. 2003a, Inohara et al. 2002, Inohara et al. 2003a, Travassos et al. 2004, Viala et al. 2004). Wie in der Einleitung unter 1.4.4 beschrieben erkennen die beiden Nod- Rezeptoren unterschiedliche Fragmente des Peptidoglykans. LcrV wird als sezerniertes Protein nicht nur aus der Yersinie ausgeschleust, sondern auch in die Wirtszelle transloziert (Fields et al. 1999b), so dass neben TLR2 auch zytosolische Rezeptoren an der Erkennung von LcrV beteiligt sein könnten. Zur Untersuchung einer möglichen zytosolischen Erkennung von LcrV durch das Nod- System wurden zunächst HEK 293- Zellen mit einem NF- $\kappa$ B- abhängigen Luciferasereporterplasmid transient transfiziert (HEK 293-R) und mit LPS, Peptidoglykan, Pam3Cys, MDP oder rLcrV stimuliert. Dadurch konnte keine NF- $\kappa$ B- Aktivierung ausgelöst werden, was zeigt, dass HEK 293- Zellen TLR2, TLR4 und/oder Nod1/Nod2 nicht oder nicht in einer für eine spezifische Stimulation ausreichend grossen Menge exprimieren (Chamailard et al. 2003b, Girardin et al. 2003b, und 2003d, Inohara et al. 2003b). Auch nach Überexpression von Nod1 bzw. Nod2 zeigten die Zellen auf die o.g. Stimuli keine NF- $\kappa$ B- Aktivierung (Chamailard et al. 2003b, Girardin et al. 2003b und 2003d, Inohara et al. 2003b, in dieser Arbeit gewonnene Daten). Die Zugabe der Stimuli in den Zellüberstand von HEK 293- Zellen reicht offensichtlich nicht aus, um die Nod- Rezeptoren zu aktivieren. Die bakteriellen Bestandteile müssen demnach zuerst in die Wirtszelle internalisiert werden, um dort mit den zytosolischen Rezeptoren interagieren zu können. Daher wurden HEK 293- R- Zellen während der Transfektion in Anwesenheit des



Transfektionsagens Calciumphosphat, das die Zellen reversibel permeabilisiert, mit den zu internalisierenden Stimuli inkubiert (Inohara et al. 2001). Auf diese Weise sollten rLcrV und rPcrV gleich gut in das Zytosol translozieren. Nach 16 h wurden die Zellen lysiert und die NF- $\kappa$ B- abhängige Luciferaseaktivität bestimmt. rLcrV, nicht aber rPcrV induzierte sowohl Nod1- als auch Nod2- abhängig eine NF- $\kappa$ B- Aktivierung, die konzentrationsabhängig ist und im Falle von Nod2 vergleichbar mit der von MDP ist (s. Abb. 27).

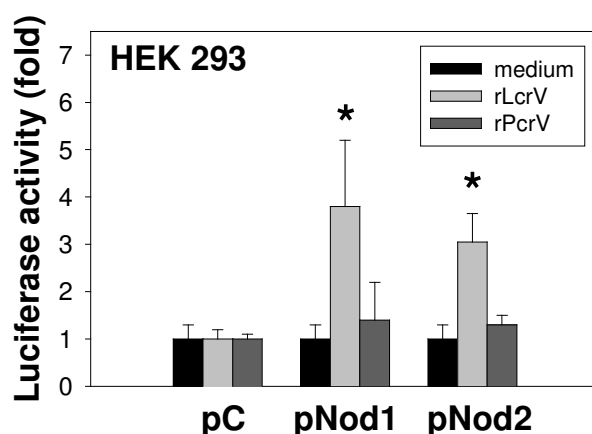


Abb. 27A

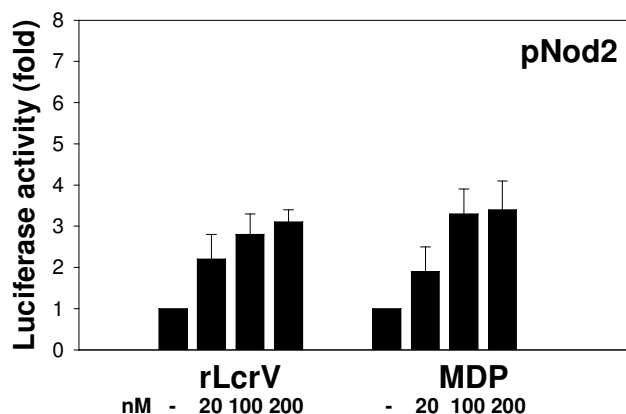
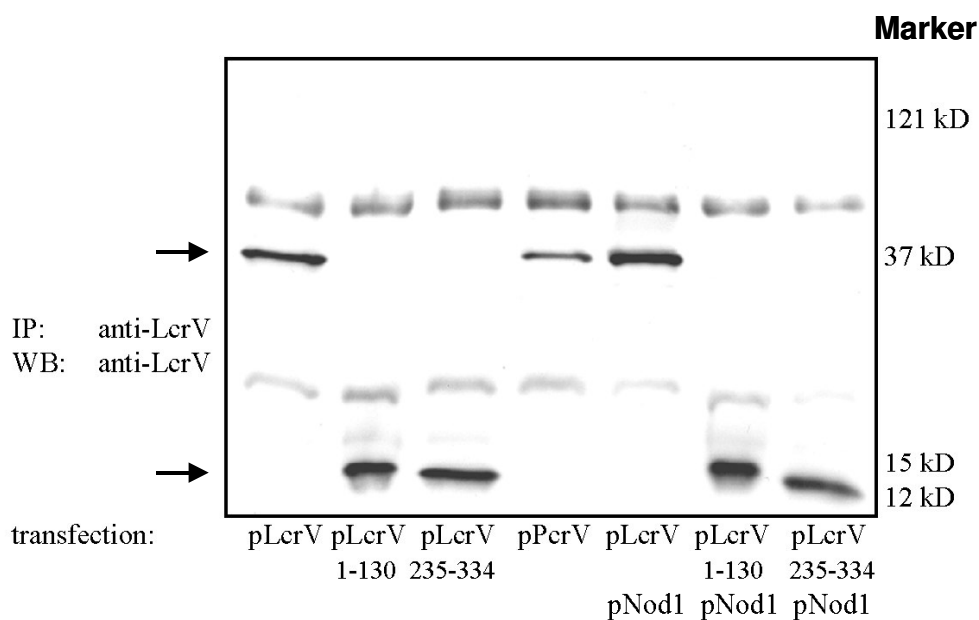


Abb. 27B

### Abb. 27 LcrV führt Nod1/2- abhängig zu NF $\kappa$ B- Aktivierung.

HEK 293- Zellen wurden transient mit Leervektor (pC) als Kontrolle, pNod1 oder pNod2 und ELAM-Luc transfiziert. Die Gesamtmenge an transfizierter DNA wurde bei allen Versuchsansätzen konstant gehalten. (A) rLcrV oder rPcrV (5  $\mu$ g/mL entsprechend 135 nM) bzw. (B) rLcrV und MDP wurden gleichzeitig mit dem Transfektionsreagens zugegeben, so dass die Substanzen in die Zellen gelangen konnten. 16 h nach der Transfektion wurde die NF- $\kappa$ B- abhängige Luciferasereporteraktivität bestimmt. Die Werte stellen die Induktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zu unstimulierten Zellen dar.

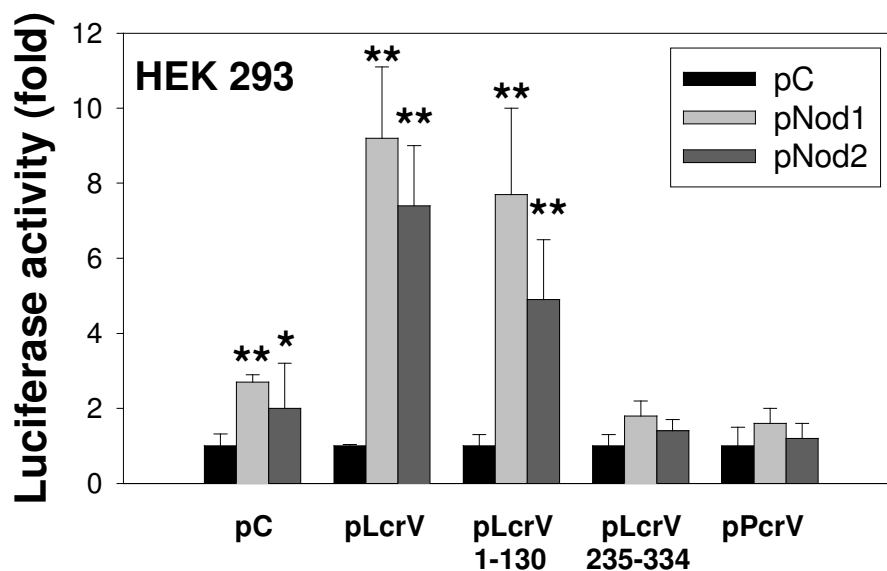
Auch bei Verwendung des die 130 N- terminalen Aminosäuren umfassenden LcrV-Fragments konnte in HEK 293-R-Zellen über Nod1 und Nod2 eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung erreicht werden. Deshalb liegt der Verdacht nahe, dass die Nod-wirksame Domäne ebenso wie die TLR2- stimulierende Region von LcrV N- terminal liegt. Obwohl die verwendeten rLcrV- Präparationen LPS- frei sein sollten (s. Methoden- Teil), wurde ein zweiter experimenteller Ansatz gewählt, um mögliche Kontaminationen auszuschliessen. Dazu wurden die zu untersuchenden Proteine (LcrV, LcrV 1-130, LcrV 235-334 und PcrV) mit Hilfe eukaryontischer Expressionsplasmide (pLcrV, pLcrV1-130, pLcrV235-334 und pPcrV) intrazellulär in Nod1- bzw. Nod2- transfizierten HEK 293-R- Zellen exprimiert. Die Expression der Proteine wurde im Western Blot kontrolliert. Eine Kotransfektion von LcrV mit Nod1 oder Nod2 führte zu keiner Veränderung der jeweiligen Proteinexpression (s. Abb. 28). Auch die Expression von Nod1/2 und von den auch in dieser Arbeit verwendeten *loss of function*- Konstrukten Nod1-LF bzw. Nod2FS wurde mittels Western Blot nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).



### Abb. 28 Expression der intrazellulär produzierten Proteine.

$1 \times 10^8$  HEK 293- Zellen wurden mittels ExGen 500 mit  $15 \mu\text{g}$  des Plasmids pNod1 (codierend für HA- tagged Nod1), pNod2, pLcrV, pLcrV1-130, pLcrV235-334 und pPcrV wie angezeigt transfiziert. 27 h nach Transfektion wurden die Zelllysate mit den angegebenen Antikörpern immunpräzipitiert (IP). Die Präzipitate wurden in einem 12% SDS-Polyacrylamid-Gel getrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit den angegebenen Antikörpern (WB) im Western Blot detektiert. Mit Pfeilen sind die Volllängeproteine LcrV und PcrV sowie die verkürzten Proteine gekennzeichnet.

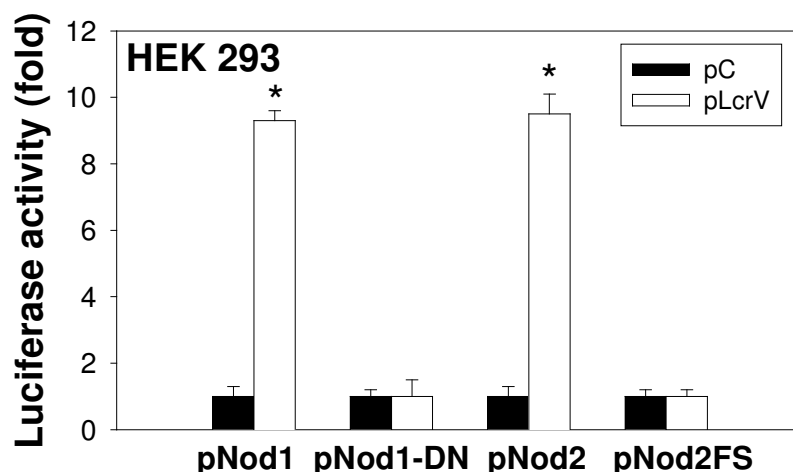
Intrazellulär produziertes LcrV und LcrV1-130, nicht aber LcrV235-334 oder PcrV konnten eine signifikante NF- $\kappa$ B- abhängige Luciferasereporteraktivität in Nod1- oder Nod2- transfizierten Zellen induzieren (s. Abb. 29). Diese Daten bestätigen die Ergebnisse aus den Versuchen, die mit den durch Calciumphosphat internalisierten rekombinanten Proteinen durchgeführt wurden.



**Abb. 29 Intrazellulär exprimiertes LcrV führt Nod1/2- abhängig zu NF- $\kappa$ B- Aktivierung.**

HEK 293- Zellen wurden transient mit pNod1 oder pNod2 und pLcrV, pLcrV1-130, pLcrV235-334 und pPcrV in Anwesenheit von pELAM-Luc transfiziert. Kontrollbedingung war die Transfektion mit dem zugehörigen Leervektor (pC). 30h nach der Transfektion wurde die NF- $\kappa$ B- abhängige Luciferaseaktivität bestimmt. \* zeigt P-Werte <0.05, \*\* P- Werte <0.01 im Vergleich zu pC- transfizierten Zellen.

Wurden in analogen Versuchen die dominant- negativen Nod- Konstrukte anstelle von Nod1 oder Nod2 verwendet, die im Falle von Nod1-LF (*loss of function*) nur die LRR- Region oder bei der *frame-shift* Mutante Nod2-FS (*frame-shift*) nur eine verkürzte LRR- Region aufweisen, konnte intrazellulär exprimiertes LcrV keine NF- $\kappa$ B- Aktivierung induzieren (s.Abb. 30).

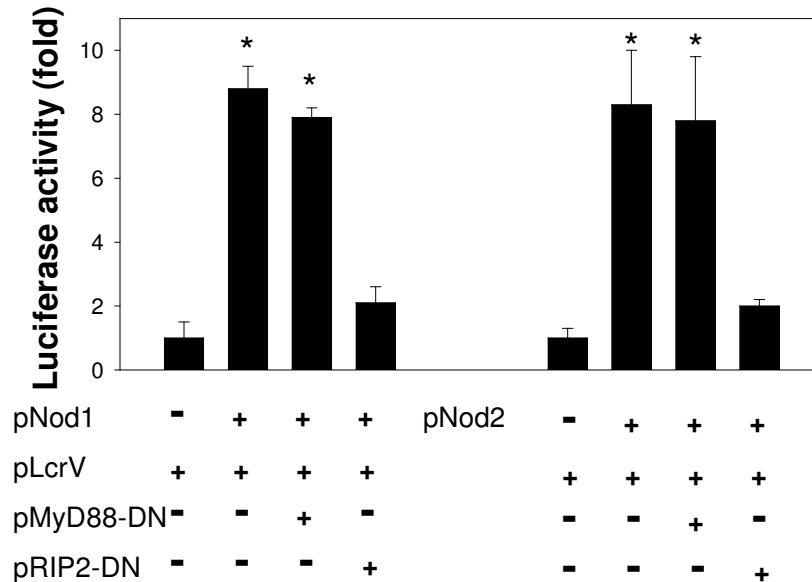


**Abb. 30 Loss of function- Nod- Konstrukte antworten nicht auf LcrV-Stimulation.**

HEK 293- Zellen wurden transient mit pNod1, pNod1-LF, pNod2, pNod2FS und ELAM- Luc entweder zusammen mit dem Leervektor (pC) oder pLcrV transfiziert. 30h nach der Transfektion wurde die Luciferasereporteraktivität bestimmt. \* bedeuten P- Werte <0.01 im Vergleich zu pC- transfizierten Zellen.

Die NF- $\kappa$ B- Aktivierung durch Nod- Rezeptoren wird über die Interaktion der CARD von Nod mit der CARD der Proteinkinase RIP2 vermittelt. RIP2 ist sowohl an TLR2-, TLR3-, TLR4- als auch an Nod1- bzw Nod2- abhängigen Signalwegen beteiligt. Folglich inhibiert dominant negatives RIP2 (RIP2DN) die TLR- als auch die Nod- vermittelte NF- $\kappa$ B- Aktivierung (Chin et al. 2002, Kobayashi et al. 2002). Um herauszufinden, ob RIP2 auch an der LcrV- abhängigen Nod1/2- Signaltransduktion beteiligt ist, wurde RIP2DN in pLcrV/Nod1- bzw. pLcrV/Nod2- transfizierten HEK 293- R-Zellen kotransfiziert. In diesem Versuchsansatz verhinderte RIP2DN eine LcrV- abhängige NF- $\kappa$ B- Aktivierung, was darauf hindeutet, dass RIP2 Teil des Nod- vermittelten Signalwegs von intrazellulärem LcrV ist.

MyD88 ist ein zentraler Bestandteil von TLR-, nicht jedoch von Nod- abhängigen Signalkaskaden (Takeda et al. 2003). Wie erwartet hatte eine Koexpression von MyD88DN keinen Einfluss auf die Nod1/2- vermittelte NF- $\kappa$ B- abhängige Luciferasereporteraktivierung durch intrazellulär exprimiertes LcrV (s. Abb. 31). Dieses Ergebnis weist auch darauf hin, dass TLRs wahrscheinlich nicht in das intrazelluläre LcrV- Signaling involviert sind.



**Abb. 31 RIP2, nicht aber MyD88 ist am LcrV- induzierten Nod1/Nod2- Signalweg beteiligt.**

HEK 293- R- Zellen wurden transient mit pLcrV, pNod1 oder pNod2 in Anwesenheit oder Abwesenheit von MyD88DN oder RIP2DN transfiziert. 24h nach der Transfektion wurde die Luciferaseaktivität gemessen. \* zeigt P- Werte <0.01 im Vergleich zu pLcrV- transfizierten Zellen.

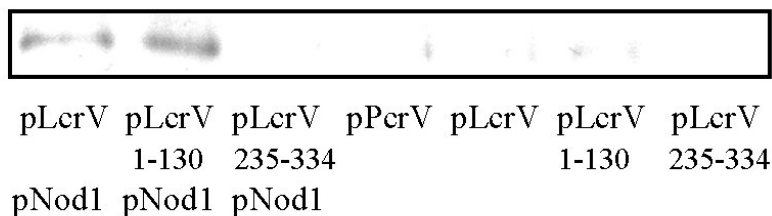
Diese Ergebnisse einer Nod- vermittelten NF- $\kappa$ B- Aktivierung durch LcrV lassen auf eine mögliche Interaktion von LcrV mit Nod- Rezeptoren schliessen, die es hier zu prüfen galt. Dazu wurden HEK 293- Zellen mit pLcrV oder pPcrV als Kontrolle und pNod1 (mit HA-Tag) oder pNod2-HA kotransfiziert. Die Zelllysate wurden mit Anti-LcrV Kaninchenantiserum (Anti-LcrV; genügend Kreuzreaktivität für PcrV vorhanden, s. Abb. 28) immunpräzipitiert. Die mit Hilfe von Agarose AG gereinigten Immunpräzipitate wurden mittels SDS- PAGE aufgetrennt und mit einem monoklonalen Anti-HA- Antikörper detektiert (zur Detektion von HA- tagged Nod1/Nod2). Nod1-HA und Nod2-HA konnten mit LcrV, nicht aber mit PcrV koimmunpräzipitiert werden (s. Abb. 32; vom selben Zelllysate- wurde vor Western Blot Analyse geteilt- wie Abb. 28). Ein „Strippen“ (Dissoziation der Immunkomplexe mit unter 4.2.3 beschriebenem „Strippingpuffer“) des Blots aus Abb. 28 erbrachte nach Detektion mit Anti-HA- Antikörpern eine Bestätigung für das hier gewonnene Ergebnis einer Assoziation von intrazellulärem LcrV mit Nod1 und Nod2.

HA- tagged Nod1/Nod2 konnten auch mit LcrV1-130, nicht aber mit LcrV 235-334 koimmunpräzipitiert werden, was wiederum bestätigt, dass die Region von LcrV, die für eine Assoziation mit Nod1/Nod2 verantwortlich ist, innerhalb der 130 N-terminalen Aminosäuren gelegen ist. Wie erwartet zeigten Immunoblots, bei denen die Zellysate mit Anti-PcrV immunpräzipitiert wurden, nach Anti-HA- Detektion keine Kopräzipitation von PcrV mit Nod1/Nod2.

IP: anti-LcrV

WB: anti-HA

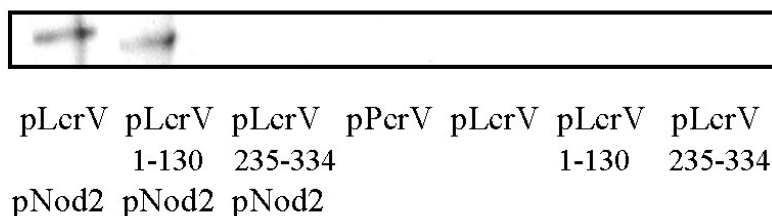
transfection:



IP: anti-LcrV

WB: anti-HA

transfection:

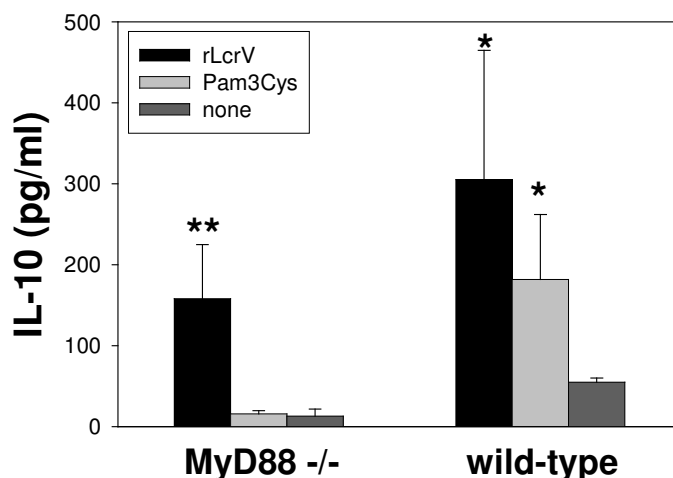


### Abb. 32 LcrV und Nod1/2 ko- immunpräzipitieren.

$1 \times 10^8$  HEK 293- Zellen wurden mittels ExGen 500 mit  $15 \mu\text{g}$  pNod1-HA oder pNod2-HA und pLcrV, pLcrV 1-130, pLcrV235-334 oder pPcrV transfiziert. 27h nach Transfektion wurden Zellysate hergestellt und mit Anti-LcrV immunpräzipitiert. Diese Immunpräzipitate wurden geteilt (s. Abb. 28), auf einem SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Immunoblot wurde mit Anti-HA- Antikörpern zur Detektion von HA-getagtem Nod1 und Nod2 durchgeführt.

Da LcrV in Makrophagen CD14/TLR2- abhängig IL-10 induziert, stellte sich die Frage, ob die Interaktion von LcrV mit Nod-Rezeptoren auch eine Rolle bei der LcrV-vermittelten IL-10- Induktion spielt. Zunächst wurden die LcrV- vermittelten Effekte auf die IL-10-Produktion in Abwesenheit eines funktionellen TLR2-MyD88-Signallings analysiert. Dazu wurde die durch rLcrV ausgelöste IL-10- Induktion in MyD88- defekten Knochenmarksmakrophagen (BMDMs, bone marrow derived macrophages) mit der in C57BL/6 BMDMs verglichen. Sowohl MyD88-/- als auch C57BL/6 BMDMs antworteten auf rLcrV- Stimulation hin mit IL-10- Produktion, nicht aber auf Pam3Cys- Stimulation (s. Abb. 33). Diese Ergebnisse deuten auf die

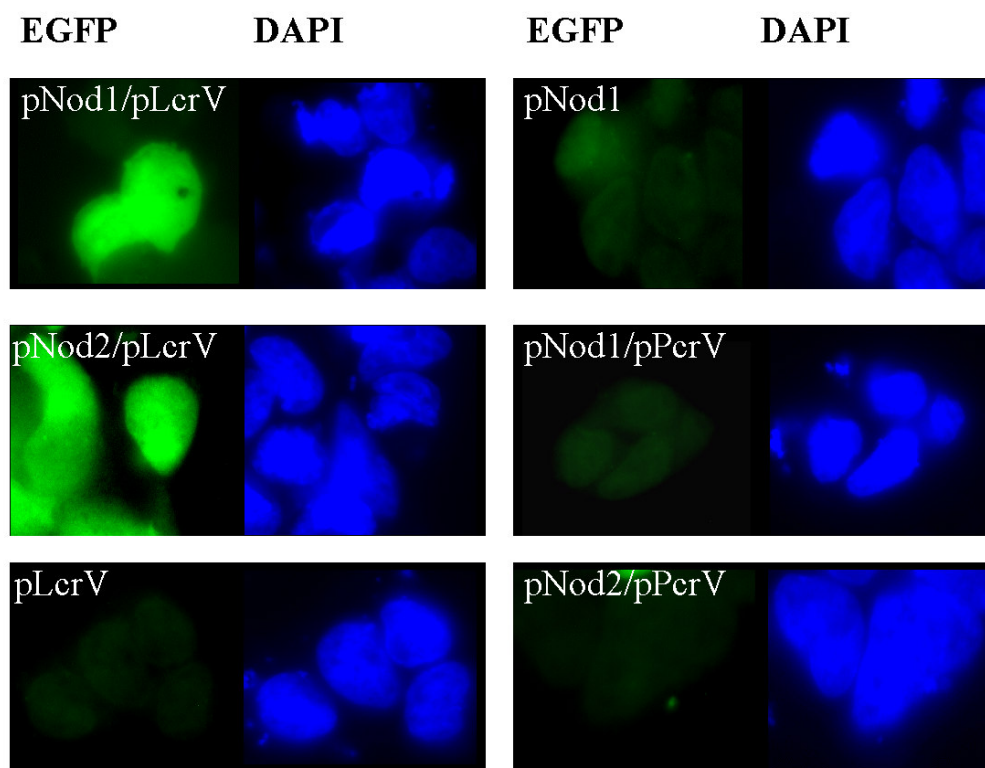
Existenz eines von LcrV ausgelösten Signalwegs hin, der TLR2-MyD88- unabhängig zur IL-10- Produktion führt.



**Abb. 33 rLcrV führt MyD88- unabhängig zu IL-10-Induktion.**

MyD88<sup>-/-</sup> und C57BL/6 BMDMs ( $1 \times 10^6$  Zellen/mL) wurden mit rLcrV (5  $\mu$ g/mL) oder Pam3Cys (1  $\mu$ g/mL) inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Nach 2 h Stimulation wurde im Zellüberstand die IL-10- Konzentration mittels ELISA gemessen.\* zeigen P- Werte <0.05, \*\* P-Werte <0.01 im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

Anschließend wurde überprüft, ob rLcrV über Nod1/2 zu einer Sp1- abhängigen IL-10- Promoter- EGFP Aktivierung führt. Dazu wurden transient mit pIL-10-Promoter-EGFP transfizierte HEK 293- Zellen mit pLcrV oder pPcrV kotransfiziert, um auf die Spezifität des exprimierten Proteins zu testen, und mit pNod1, pNod2, pNod1-LF, pNod2F oder einem Leervektor, um auf die Spezifität des zytosolischen Rezeptors zu testen. Eine Aktivierung des IL-10- Promoters wurde nur bei mit pNod1 bzw. pNod2 und pLcrV, nicht aber mit pPcrV kotransfizierten Zellen anhand grüner Fluoreszenz sichtbar. Expression von Nod1 bzw. Nod2 oder LcrV bzw. PcrV alleine erbrachte keine IL-10- Promotor- Aktivierung.



**Abb. 34 Intrazelluläres LcrV führt zu einer IL-10- Promoter- Aktivierung über Nod1 und Nod2.**

Transient mit einem IL-10- Promoter- EGFP- Plasmid transfizierte HEK 293- Zellen wurden mit den angegebenen Expressionsplasmiden kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, DAPI- gefärbt und mittels eines Fluoreszenzmikroskops auf GFP- Fluoreszenz hin untersucht.

Weiterhin konnte durch Transfektion von dominant negativen Nod1-, Nod2- oder RIP2- Konstrukten in murine J774A.1- Makrophagen wie auch in humane Mono-Mac-6- Monozyten, die beide über endogenes Nod1, Nod2 und TLR2 verfügen, eine LcrV- bedingte IL-10- Produktion drastisch verringert werden. Am stärksten war die Verringerung der IL-10- Produktion bei Kotransfektion von RIP2DN, da dieses sowohl in TLR2- als auch in Nod1/2- abhängigen Signalwegen vorkommt (s. Abb. 35).

Der Leervektor alleine ohne LcrV- Stimulation induzierte in keiner Zelllinie detektierbare IL-10- Spiegel (Daten nicht gezeigt).



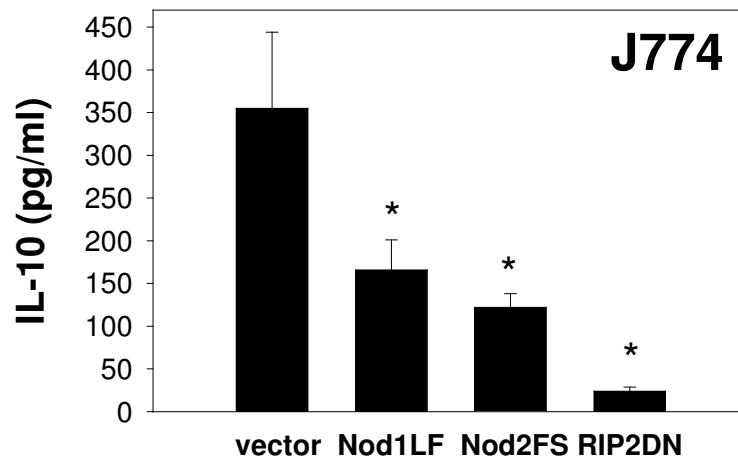


Abb. 35A

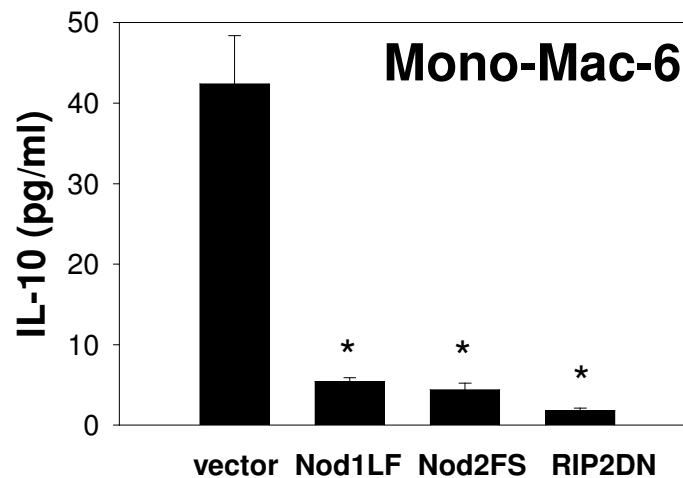


Abb. 35B

**Abb. 35 rLcrV führt über Nod1/2 zu IL-10- Produktion.**

(A) murine J774A.1 Makrophagen oder (B) humane Mono-Mac-6-Monozyten wurden mit pNod1-LF, pNod2FS oder RIP2DN wie angezeigt transfiziert. Leervektor- transfizierte Zellen dienten als Kontrolle. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit rLcrV (5 µg/mL) stimuliert. Dann wurde in den Zellüberständen IL-10 gemessen. Die IL-10- Spiegel wurden nur auf die transfizierten Zellen unter Zuhilfenahme der ermittelten Transfektionseffizienz berechnet. \* zeigt P- Werte <im Vergleich zu Leervektor- transfizierten Zellen.

## 5.4.2 TLR2- abhängige Endozytose von LcrV

Wie unter 5.4.1 dargestellt wird LcrV von intrazellulären Nod- Rezeptoren erkannt und induziert über diese Rezeptoren IL-10- Produktion. Daher sollte auch die Frage geklärt werden, ob und wie LcrV in die Zelle gelangt. Es war bereits bekannt, dass LcrV TTSS- unabhängig in Zellen gelangen kann (Fields et al. 1999b). Da TLR2 für die LcrV- vermittelte IL-10- Induktion erforderlich ist, lag es nahe, eine mögliche Beteiligung von TLR2 an der LcrV- Aufnahme zu untersuchen. Für TLR4 ist publiziert, dass der Rezeptor nicht nur in der Zellmembran lokalisiert ist, sondern auch in intrazellulären Kompartimenten wie z.B. im Golgi- Apparat (Hornef et al. 2002, Lien et al. 2002). Außerdem konnte ein schneller Austausch von TLR4 zwischen Zytoplasmamembran und intrazellulären Kompartimenten (endosomale Membran) gezeigt werden (Latz et al. 2002). Dieses „Trafficking“ ist jedoch für ein TLR4- Signalling durch den Agonisten LPS nicht von Bedeutung (Latz et al. 2002). TLR4 scheint nicht für den Transport von LPS in die Zelle verantwortlich zu sein (Dunzenhofer et al. 2004). Dieser Fragenkomplex sollte daher für LcrV und TLR2 untersucht werden.

Zunächst wurde FITC- oder Rhodamin- gekoppeltes rLcrV zu HEK 293- Zellen gegeben, die mit pCD14/pTLR2 oder pCD14/pTLR4/MD2 transfiziert waren. Kontrollen stellten pCD14- oder Leervektor- transfizierte Zellen dar. Nur pCD14/TLR2- transfizierte Zellen zeigten zuerst an der Zelloberfläche, dann intrazellulär fluoreszierendes rLcrV. 30 min. nach Zugabe von FITC- oder Rhodamin- konjugiertem rLcrV war das fluoreszierende rLcrV in vesikulären Strukturen zu sehen, während nach 6 h das Zytosol der Zellen homogen fluoreszierte (s. Abb. 36; gezeigt für Rhodamin- konjugiertes rLcrV). Diese am Fluoreszenzmikroskop gewonnenen Ergebnisse wurden mittels Lasermikroskopie bestätigt. FITC- oder Rhodamin- gekoppeltes rPcrV wurde praktisch nicht in pCD14/TLR2 transfizierte Zellen aufgenommen. rLcrV wird demnach CD14/TLR2- abhängig endozytiert.

Um zusätzlich herauszufinden, ob ein TLR2- Signaling für die beobachtete rLcrV- Aufnahme erforderlich ist, wurde anstelle von TLR2 der dominant- negative TLR2-DN (Xu et al. 2000) verwendet, der eine gestörte MyD88- Interaktion aufgrund einer Punktmutation in der TIR-Domäne zeigt. TLR2-DN vermittelte zusammen mit CD14 ebenso die Aufnahme von rLcrV (s. Abb. 36). Auch mit pCD14/pTLR2

kotransfiziertes MyD88DN, das ein TLR2- Signaling verhinderte, konnte eine rLcrV- Aufnahme in die Zellen nicht verhindern (Bilder nicht gezeigt). Die TLR2- abhängige LcrV- Aufnahme scheint daher unabhängig von der TLR2- Signaltransduktion zu erfolgen.

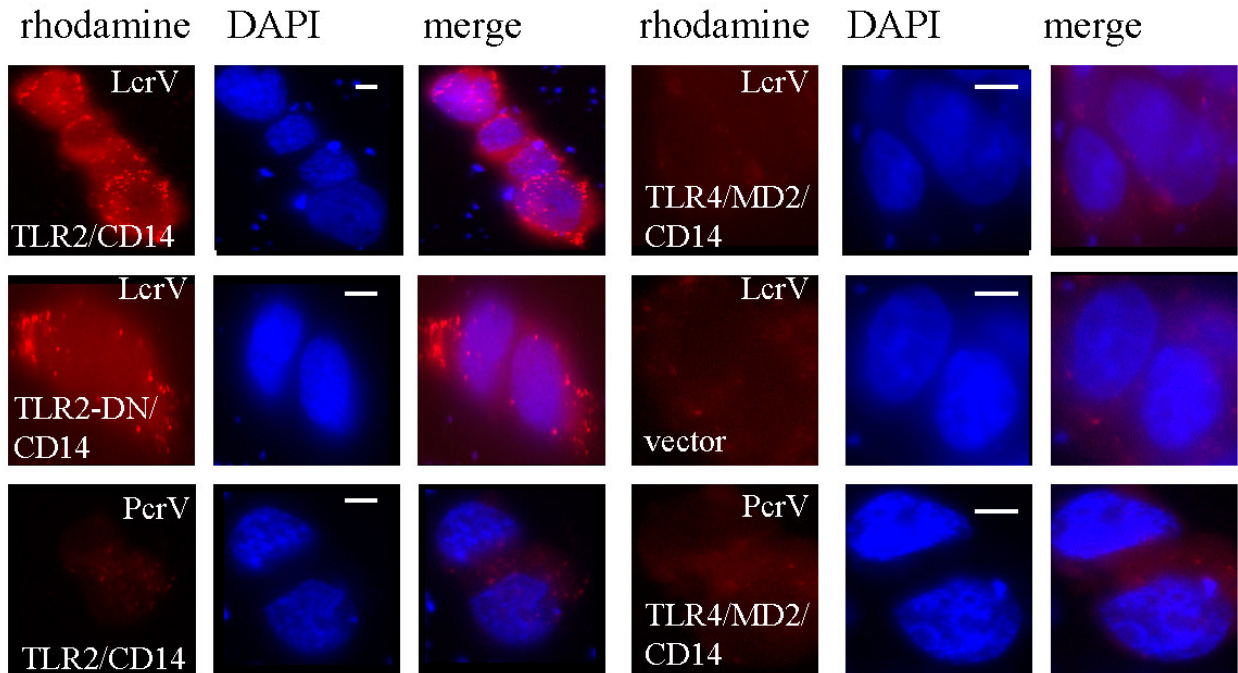


Abb. 36A

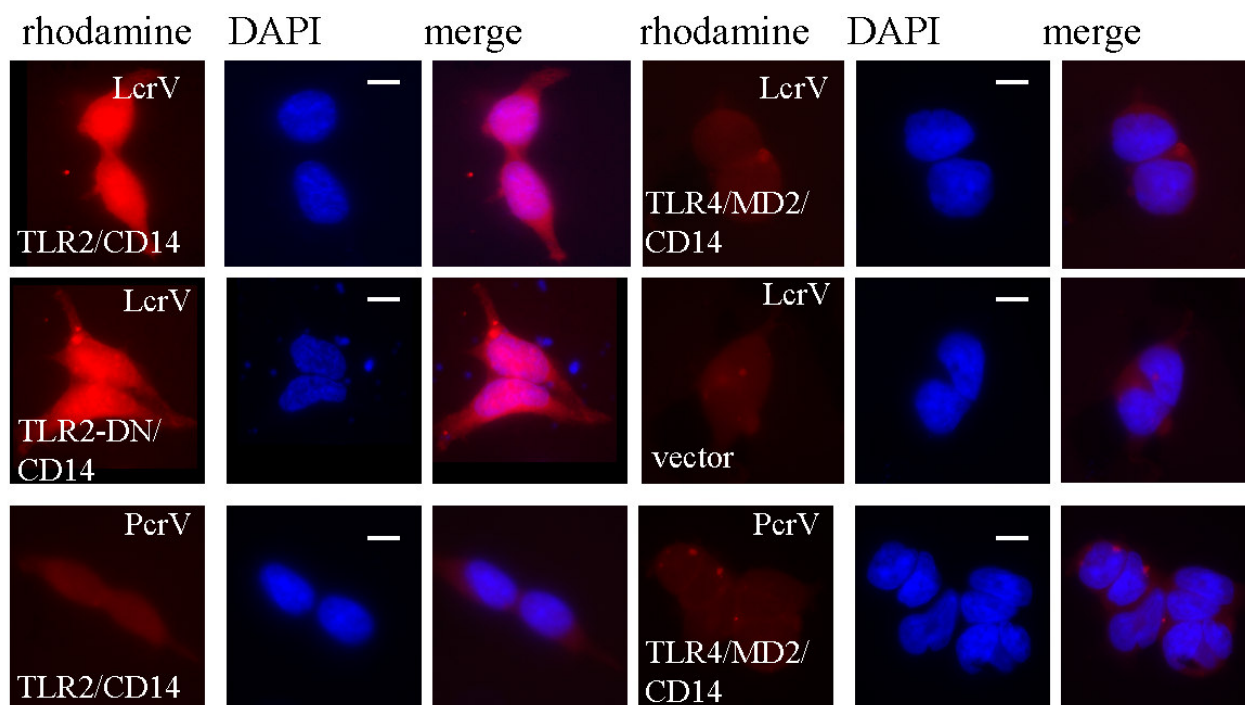
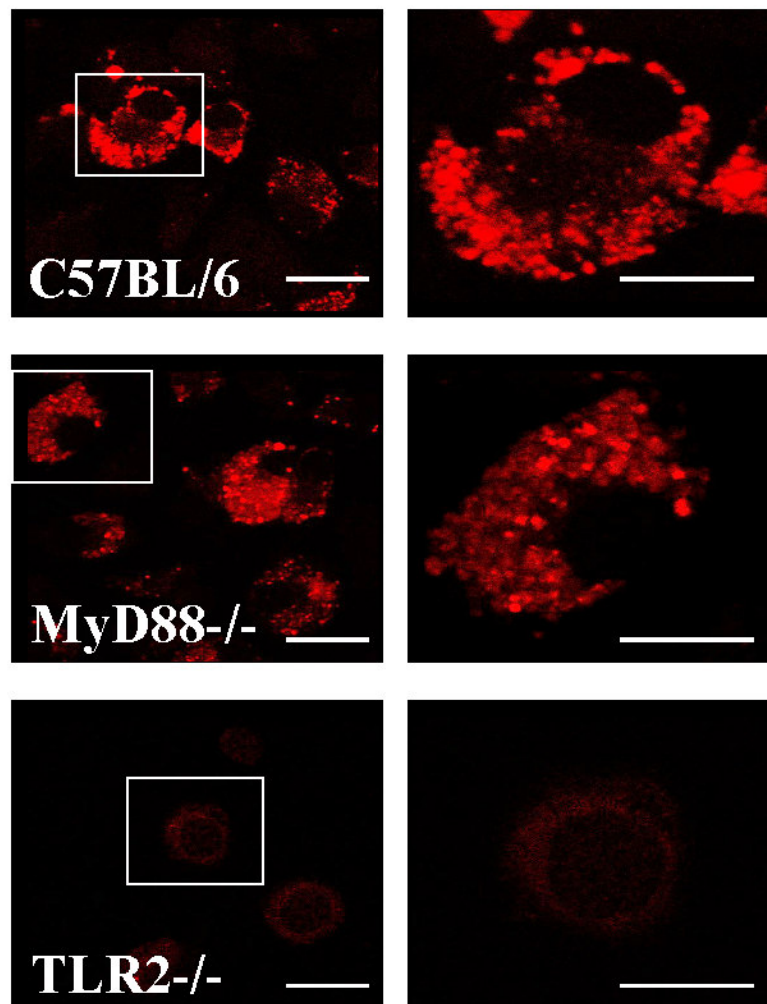


Abb. 36B

**Abb. 36 LcrV wird TLR2- abhängig endozytiert.**

HEK 293- Zellen wurden mit pCD14/pTLR2, pCD14/pTLR4/MD2, pCD14/pTLR2-DN oder Kontrollvektor mittels ExGen 500 transfiziert. Nach 30 h wurden die Zellen sechsmal mit PBS gewaschen. Danach wurde Rhodamin- konjugiertes rLcrV oder rPcrV zugegeben. Nach 30 min. (A) bzw. 6 h (B) wurden die Zellen fixiert, DAPI- gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die weißen Eichbalken stellen 5  $\mu$ m dar.

Die im Transfektionsmodell gezeigte TLR2- vermittelte Endozytose von LcrV konnte auch in murinen Peritonealmakrophagen bestätigt werden. Rhodamin- gekoppeltes rLcrV konnte nach 30 min. in vesikulären Strukturen in C57BL/6- (Wildtyp-), nicht aber in TLR2-/- Makrophagen fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Da auch MyD88- defiziente Makrophagen fluoreszenzmarkiertes rLcrV internalisieren konnten (s.Abb. 37), bestätigen sowohl die Transfektions- als auch die Makrophagenexperimente, dass die LcrV- Aufnahme über TLR2 nicht vom TLR2- MyD88- abhängigen Signalling abhängig ist.

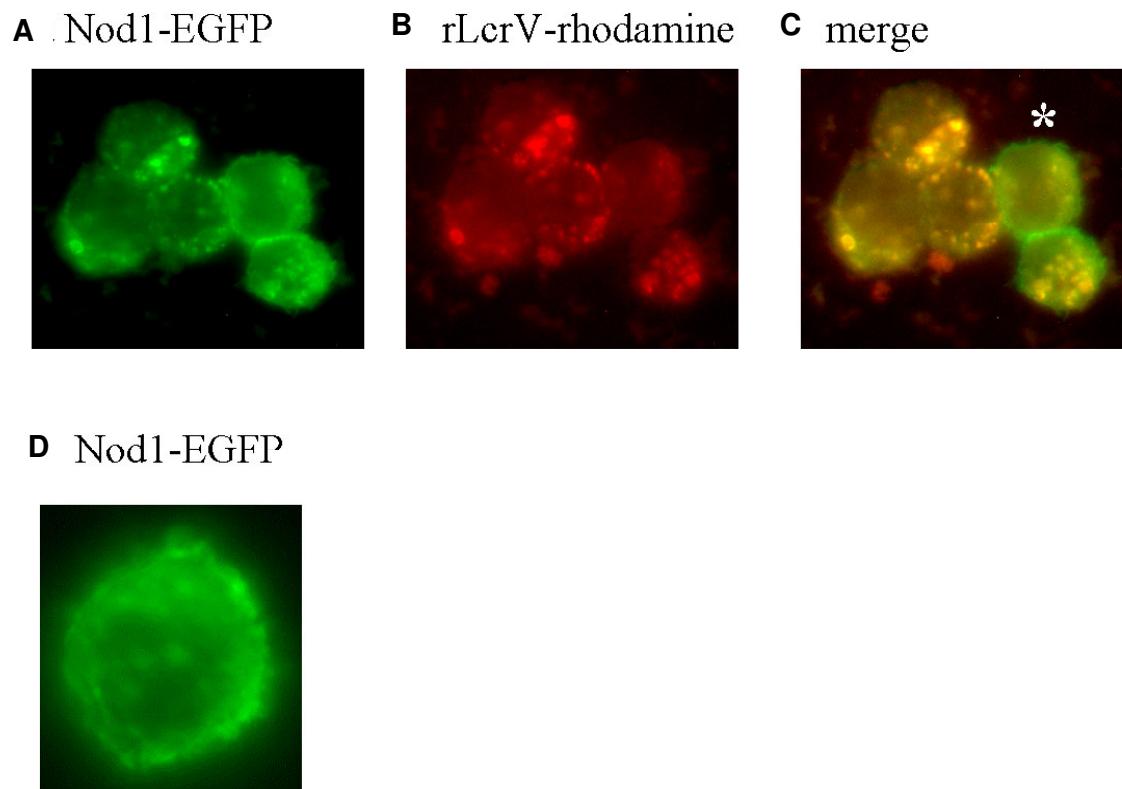


**Abb. 37 LcrV gelangt innerhalb der ersten 30 min. über TLR2 in murine Makrophagen.**

Ein funktionelles TLR2- Signalling ist dabei nicht erforderlich. PPMs aus den angegebenen Mausstämmen wurden 30 min. mit Rhodamin- konjugiertem rLcrV inkubiert, fixiert, mit PBS gewaschen und mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht.

In einem nächsten Schritt sollte die postulierte Interaktion von LcrV mit Nod1/2 visualisiert werden. Dazu wurden murine J774A.1 Makrophagen mit einem Nod1-EGFP- Plasmid (pNod- EGFP) transfiziert , das im Luciferase- Reporterassay eine pNod1 vergleichbare Aktivität nach LcrV- Stimulus zeigte. In unstimulierten Zellen konnte nach Formaldehydfixierung eine grüne Fluoreszenz aufgrund von Nod1-EGFP im Zytosol und nahe der Zellmembran beobachtet werden (s. Abb. 38D). Nach 30- minütiger Stimulation mit Rhodamin- gekoppeltem rLcrV kolokalisierte das rot fluoreszierende LcrV mit dem grün fluoreszierenden Nod1- EGFP in vesikulären

Strukturen (s. Abb. 38A-C). Dies bestätigt eine räumliche Nähe von LcrV und Nod1. Vergleichbare Ergebnisse wurden nach Behandlung mit Rhodamin- markiertem rLcrV sowohl mit Nod2- EGFP als auch nach indirekter Immunfluoreszenzfärbung von Nod1/2 mit den entsprechenden FITC- gekoppelten Antikörpern in pNod1oder pNod2/pCD14/pTLR2- transfizierten HEK 293- Zellen erzielt.

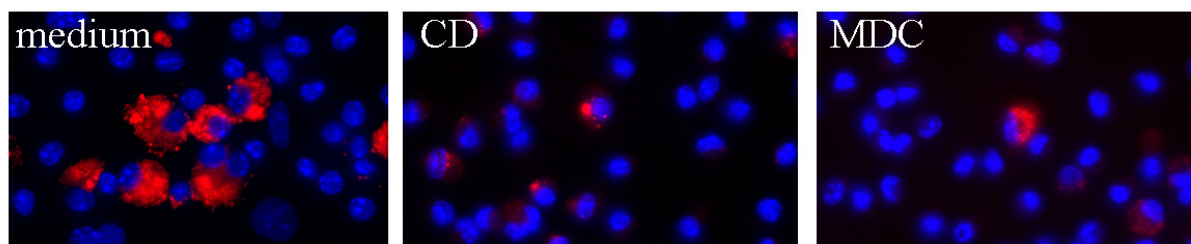


**Abb. 38** Nach TLR2- abhängiger Internalisierung kolokalisiert LcrV mit Nod. J774A.1 Makrophagen wurden mit pNod1- EGFP transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Rhodamin- gekoppeltem rLcrV 30 min. inkubiert (A-C) oder unstimuliert gelassen (D), fixiert und mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht. \* zeigt eine Zelle, die kein Rhodamin- markiertes rLcrV aufgenommen hat.

### 5.4.3 Bedeutung der Transportfunktion von TLR2 für die LcrV- vermittelte Nod- Aktivierung

Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, wie die beiden untersuchten Prozesse, die TLR2- abhängige LcrV- Endozytose und die NF- $\kappa$ B- Aktivierung über intrazelluläre Nod- Rezeptoren miteinander verknüpft sein könnten. Da LcrV nach TLR2-

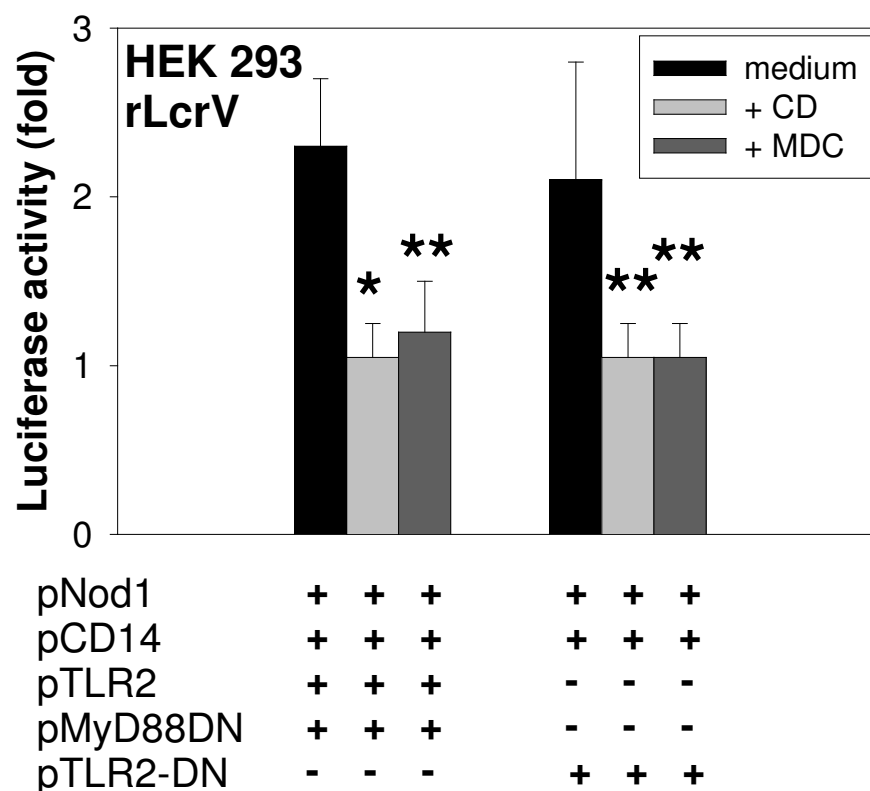
vermittelter Aufnahme intrazellulär in Vesikeln lokalisiert ist, wurde überprüft, ob bei Inhibierung intrazellulärer Transportprozesse oder der Endosomenentstehung eine durch LcrV ausgelöste NF- $\kappa$ B- Aktivierung über Nod- Rezeptoren unterdrückt werden kann. Hierzu wurde Cytochalasin D (CD), ein Hemmstoff der Aktinpolymerisierung, und Monodansylcadaverin (MDC) verwendet. MDC greift als Transglutaminaseinhibitor in Prozesse proximal der Endosomenentstehung ein und interferiert u.a. mit Clathrin- abhängigen Prozessen (Davies et al. 1980). Als erster Schritt wurde in einem Kontrollexperiment bestätigt, dass CD (30  $\mu$ M= 15  $\mu$ g/mL) und MDC (250  $\mu$ M) die Aufnahme von Rhodamin- gekoppeltem rLcrV in murine Peritonealmakrophagen hemmen (s. Abb. 39). Bei Cytochalasin D war die Aufnahme von rLcrV bereits ab einer Konzentration von 3  $\mu$ g/mL inhibiert.



**Abb. 39 Cytochalasin D und MDC hemmen die Aufnahme von LcrV in die Zelle.** C57BL/6 PPMs wurden wie angegeben entweder mit Cytochalasin D (30  $\mu$ M), MDC (250  $\mu$ M) oder Medium als Kontrolle vorbehandelt und dann 30 min. mit Rhodamin- konjugiertem rLcrV inkubiert. Nach Fixierung und DAPI- Färbung wurden die Zellen mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen TLR2- vermittelter LcrV- Aufnahme und Nod- abhängigem LcrV- Signalling zu untersuchen, wurde die NF- $\kappa$ B- Aktivierung auf rLcrV- Stimulation hin in pTLR2/pCD14/pNod1- transfizierten HEK 293-R-Zellen in Anwesenheit von kotransfiziertem pMyD88-DN betrachtet. Wie erwartet verhindert pMyD88-DN, welches das TLR- abhängige Signalling blockiert (Takeda et al. 2003), eine rLcrV- induzierte NF- $\kappa$ B- Aktivierung in pCD14/pTLR2- transfizierten HEK 293-R- Zellen gänzlich (Daten nicht gezeigt). Erst nach einer Kotransfektion mit pNod1 reagieren pCD14/pTLR2/pMyD88-DN- transfizierte Zellen auf rLcrV- Stimulation. Sowohl MDC als auch CD inhibieren diese rLcrV- Antwort völlig, was mit pTLR2DN/pCD14/pNod1- transfizierten Zellen bestätigt werden konnte

(s. Abb. 40). Ähnliche Ergebnisse wurden mit pNod2/pCD14/pTLR2/pMyD88-DN-transfizierten HEK 293-R-Zellen erzielt (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 40 CD und MDC blockieren die LcrV- vermittelte Zellaktivierung über Nod1 in Abwesenheit von TLR2- MyD88- abhängigem Signalling.**

HEK 293- Zellen wurden transient mit pNod1/pCD14/pTLR2/pMyD88-DN transfiziert. 24h nach der Transfektion wurde CD (30  $\mu$ M) oder MDC (250  $\mu$ M) 30 min. vor Stimulation mit rLcrV (5  $\mu$ g/mL) zugegeben. In allen Ansätzen wurde die DNA- Menge konstant gehalten. Die angezeigten Werte repräsentieren die Induktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zu unstimulierten Zellen (1-fach). \* zeigt P-Werte <0.05 an, \*\* P- Werte <0.01 im Vergleich zu rLcrV- behandelten Zellen ohne CD- oder MDC- Behandlung.

Diese Messungen sprechen dafür, dass nach TLR2- vermittelter LcrV- Aufnahme, die unabhängig vom TLR2- Signalling stattfindet, aktin- und clathrin- abhängige Prozesse ablaufen müssen, bevor LcrV eine NF- $\kappa$ B- Aktivierung auslösen kann.

Um diese Befunde weiter zu untermauern, wurde in LcrV- stimulierten C57BL/6- bzw. MyD88-/- Peritonealmakrophagen eine NF- $\kappa$ B- Translokation in den Kern nach Behandlung mit CD oder MDC immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. MyD88-/- Makrophagen zeigen kein TLR2- abhängiges Signalling, während andere TLR2- Funktionen wie z.B. Internalisierung kaum verändert sein sollten. Ein signifikanter



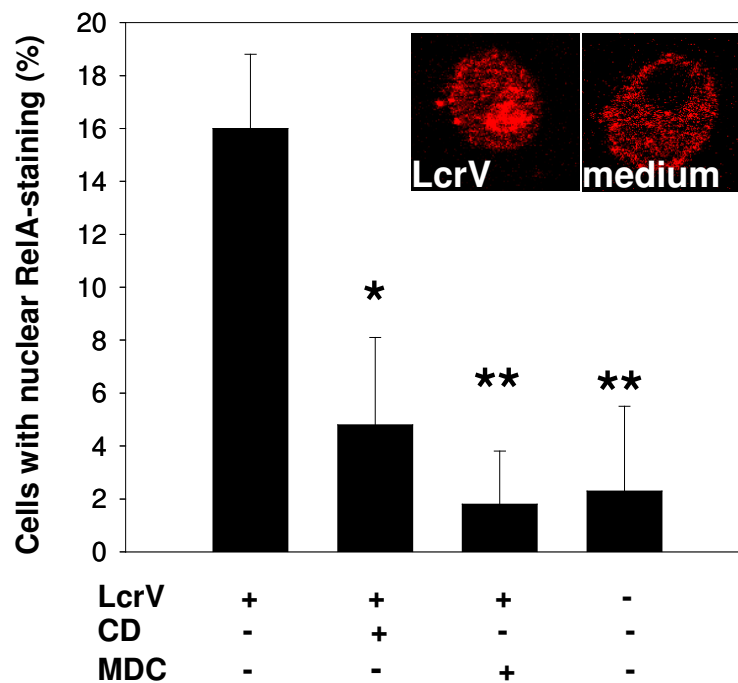
Prozentsatz der MyD88<sup>-/-</sup> Makrophagen zeigte auf eine rLcrV- Stimulation (5 µg/mL) hin eine NF-κB- Translokation in den Kern (s. Abb. 41). Sowohl CD (90 µM) als auch MDC (1 mM) inhibierten, wenn auch erst in im Vergleich zum Aufnahmeexperiment erhöhten Konzentrationen, in MyD88<sup>-/-</sup> und C57BL/6-Wildtyp- Makrophagen diese NF-κB- Translokation stark bis vollständig (s. Tab. 4 und Abb. 41). Wie zu erwarten war die NF-κB- Translokation in TLR2<sup>-/-</sup> PPMs auf rLcrV- Stimulation hin nicht verändert (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass LcrV nach seiner Internalisierung in primären Makrophagen MyD88- unabhängig eine NF-κB- Translokation in den Kern auslöst.

Vorbehandlung	C57BL/6	MyD88 <sup>-/-</sup>
unbehandelt	29,5 +/- 9,2 %	16,0 +/- 2,8 %
+ CD	16,1 +/- 6,5 %	4,7 +/- 3,1 %
+ MDC	4,1 +/- 1,4 %	1,8 +/- 2,0 %

**Tab. 4 CD und MDC hemmen die LcrV- abhängige NF-κB- Translokation in den Kern in C57BL/6- und MyD88<sup>-/-</sup> Peritonealmakrophagen.**

PPMs wurden entweder unbehandelt gelassen oder 30 min. mit CD (90 µM) oder MDC (1 mM) vorbehandelt. Dann wurden die Zellen 2 h mit rLcrV (5 µg/mL) stimuliert. Eine NF-κB- Translokation in den Zellkern wurde mit Hilfe von RelA-spezifischem Ratten-Antiserum mittels Immunfluoreszenzmikroskopie detektiert. Der Prozentsatz der Zellen mit RelA-spezifischer Kernfärbung ist angegeben.



**Abb. 41 Cytochalasin D und MDC blockieren LcrV- abhängige NF- $\kappa$ B-Translokation in den Kern in MyD88- defizienten Peritonealmakrophagen.**

MyD88<sup>-/-</sup> PPMs wurden entweder unbehandelt gelassen oder 30 min. mit CD (90 $\mu$ M) oder MDC (1mM) vorbehandelt. Dann wurden die Zellen 2h mit rLcrV (5 $\mu$ g/mL) stimuliert. Eine NF- $\kappa$ B-Translokation in den Zellkern wurde mittels Immunfluoreszenz visualisiert. Der Prozentsatz der Zellen mit RelA- spezifischer Kernfärbung ist angegeben. \* zeigt P-Werte <0.05 an, \*\* P- Werte <0.01 im Vergleich zu rLcrV- behandelten Zellen ohne CD- oder MDC- Behandlung.

Insgesamt lassen die gewonnenen Ergebnisse folgendes Arbeitsmodell plausibel erscheinen:

LcrV kann über TLR2 von aussen die Zelle stimulieren und so zur IL-10- Produktion veranlassen. Weiter kann LcrV TLR2- abhängig endocytiert werden, um dann innerhalb der Zelle über einen Nod1/2- abhängigen Signalweg zunächst NF $\kappa$ B zu aktivieren und dann IL-10 zu induzieren. LcrV ist damit der dritte definierte bakterielle Faktor, der durch Nod1 oder Nod2 erkannt wird, und das erste bekannte mikrobielle Protein, das über Nod1/2 immunmodulierend wirken kann.

## 6 Diskussion

Da der Säugetierorganismus kontinuierlich mit der physiologischen Normalflora und gelegentlich mit Pathogenen konfrontiert wird, muss er zur Aufrechterhaltung seiner Integrität in der Lage sein, mit Hilfe des Immunsystems eindringende Mikroben unter Schonung des eigenen Wirtsorganismus möglichst schnell und effektiv zu eliminieren. Die adaptive Immunität tritt erst nach einer bestimmten Anlaufzeit (ca. eine Woche) in Aktion und kann nach vorausgegangenen Mikrobenkontakten individuell erlernte, sehr unterschiedliche mikrobeassoziierte „Muster“ bzw. Epitope von mikrobiellen Antigenen erkennen. Die angeborene Immunität hingegen ist sofort einsatzbereit und kann eine möglichst grosse Anzahl unterschiedlicher Mikroorganismen über hochkonservierte Strukturen erkennen und bekämpfen. Die Makrophagen gelten als zelluläre „Generalisten“ (Rosenberger et al. 2003) und können pathogene Erreger direkt durch Phagozytose oder indirekt durch Induktion proinflammatorischer Zytokine wie z.B. TNF- $\alpha$  bekämpfen. Diese Zytokininduktion leitet zunächst eine lokale, dann u.U. eine systemische Immunantwort ein. Einen weiteren für das angeborene Immunsystem wichtigen Immunzelltyp stellen polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) dar.

Pathogene Bakterien können im Gegensatz zu apathogenen dieses erste Erkennungs- und Effektorsystem der angeborenen Immunität umgehen. Zum einen entkommen sie durch Veränderung von PAMPS auf ihrer Oberflächenstruktur (z.B. Modifikation von LPS), durch Modulation von Signalkaskaden (Wilson et al. 1998) oder durch intrazelluläres Überleben dem Erkennungssystem der Immunzellen. Zum anderen lähmen sie das Effektorsystem der angeborenen Immunantwort, indem sie die für die humorale oder zelluläre Immunantwort zuständigen Zellen „umprogrammieren“. Die extrazellulär lebenden Yersinien inhibieren die Phagozytosefähigkeit der Makrophagen, unterdrücken die Produktion proinflammatorischer Zytokine und induzieren Apoptose in Makrophagen, indem sie bei Zell- Zell- Kontakt die verschiedenen Effektor- Yops injizieren. Mit dem sezernierten und deshalb Zell- Zell- kontaktunabhängigen Effektorprotein LcrV besitzen die Yersinien eine weitreichende „Waffe“ zum Kampf gegen die angeborene Immunantwort. Die vorliegende Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, die immunmodulatorische Wirkung von LcrV genauer zu untersuchen.

## 6.1 LcrV nutzt Induktion von IL-10 zur Immunevasion

*In vivo* beruht die erfolgreiche Immunantwort des Wirtes gegen eine Yersinieninfektion auf der adäquaten Produktion von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Dies konnte im Mausmodell gezeigt werden, da eine Gabe von Anti- TNF- $\alpha$  und/oder Anti- IFN- $\gamma$  Antikörpern zu einer Verschlimmerung einer *Y. enterocolitica*- Infektion führte (Autenrieth et al. 1992). Die Suppression von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  ist Teil der Strategie pathogener Yersinien, die Immunantwort des Wirtes zu schwächen, um sich besser im Wirt ausbreiten zu können. Im Mauspestmodell konnte die wichtige Rolle von LcrV bei dieser Immunsuppression durch Yersinien anhand zweier tierexperimenteller Ergebnisse bestätigt werden:

1. Wildtyp- *Y. pestis*- infizierte Mäuse weisen signifikant niedrigere TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ - Spiegel auf als mit pYV- negativen *Y. pestis*- infizierte Mäuse; dies zeigt, dass die genetische Information für den immunsupprimierenden Faktor auf dem Virulenzplasmid liegen muss (Nakajima et al. 1993).
2. Nach Injektion von rLcrV kommt es zu einer TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ - Suppression in Mäusen bei gleichzeitiger IL-10- Induktion (Nakajima et al. 1995; Nedialkov et al. 1997).

Diese von der Gruppe um Brubaker publizierten Ergebnisse zur Pest in Mäusen stellten einen völlig neuen Pathomechanismus einer proteinabhängigen Immunsuppression dar. Da die experimentellen Ergebnisse einer klassischen Endotoxintoleranz ähnelten, musste der Verdacht ausgeräumt werden, dass es sich bei dem beobachteten Phänomen durch LcrV nicht um ein LPS-kontaminationsbedingtes Artefakt handeln könnte (Brubaker 2003). Diesen Verdacht konnten Befunde von Sing et al. widerlegen, die unter Zellkulturbedingungen den immunsuppressiven Effekt von *Y. enterocolitica* LcrV (O:8) auf Peritonealmakrophagen von LPS- nonresponder- Mäusen (C3H/HeJ) nachweisen konnten. Ausserdem war die rLcrV- Präparation, wie auch die in dieser Arbeit verwendete, LPS- frei (< 0,1 ng/mL) und laut MALDI-TOF- Analyse nicht modifiziert. Bei den Versuchen unterdrückte rLcrV in C3H/HeJ PPMs dosisabhängig eine durch

den TLR2- Agonisten Zymosan A ausgelöste TNF- $\alpha$ - Produktion. Ausserdem induzierte rLcrV dosisabhängig IL-10 in Makrophagen. Durch thermische oder proteolytische Behandlung wie auch nach Fällung mit Anti- LcrV- Antiserum wurde der immunsuppressive Effekt der rLcrV- Präparation vollständig aufgehoben. Deshalb konnte dieser Effekt ausschliesslich der Proteinkomponente der rLcrV- Präparation zugeschrieben werden, da LPS im Gegensatz zu rLcrV hitze- und proteinasestabil ist.

Um die Frage nach den Zielzellen der TNF- $\alpha$ - supprimierenden Wirkung von LcrV zu klären, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Monozyten- Zelllinie, nämlich humane Mono-Mac-6-Monozyten (Ziegler- Heitbrock et al. 1988), verwendet. Dies stellt einen Vorteil zu Peritonealmakrophagen dar, da bei der Gewinnung von Peritonealexsudatzellen aus Mäusen die Möglichkeit einer Beimischung anderer Zelltypen nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Da auch bei Mono- Mac-6-Monozyten eine LcrV- bedingte TNF- $\alpha$ - Suppression beobachtet werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass LcrV für die Entfaltung seiner TNF- $\alpha$ - supprimierenden Wirkung keine weiteren Zelltypen benötigt. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu einem murinen Peritonealmakrophagenmodell, bei dem eine LcrV- vermittelte TNF- $\alpha$ - Suppression abhängig vom Beisein aktivierter T- Zellen war (Schmidt et al. 1999). Auch eine andere Arbeitsgruppe konnte ohne Beteiligung weiterer Zelltypen bei murinen Peritonealmakrophagen durch Vorbehandlung mit *Y. pestis* LcrV eine Unterdrückung einer LPS- ausgelösten TNF- $\alpha$ - Produktion beobachten (Sharma et al. 2004). Da Makrophagen als Hauptquelle für TNF- $\alpha$  im Säugetierorganismus gelten, und die beschriebenen Befunde sowohl bei murinen Makrophagen (Sing et al. 2002a) als auch bei humanen Mono- Mac-6-Monozyten (Reithmeier- Rost et al. 2004) nachgewiesen werden konnten, stellen Makrophagen die natürlichen Zielzellen von LcrV bei einer Immunsuppression im Wirt dar.

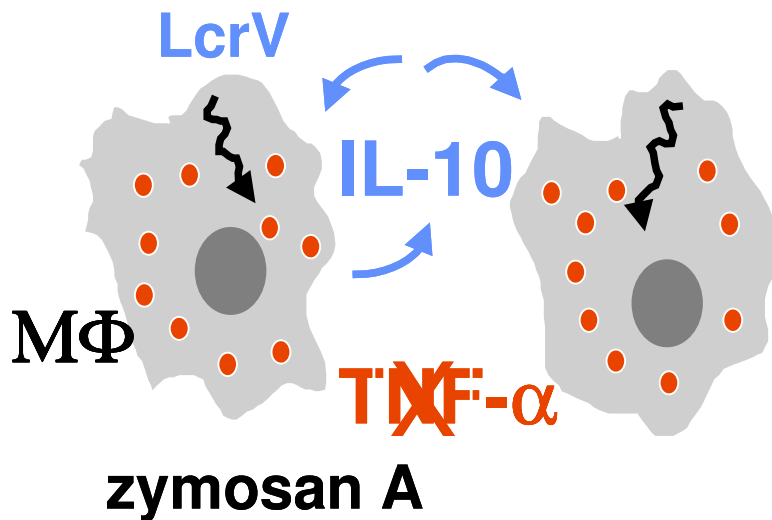
Als wichtigstes anti- inflammatorisches Zytokin ist IL-10 an der Eindämmung einer Entzündungsreaktion beteiligt. Es stellt das Zytokinegleichgewicht im Wirtsorganismus wieder her und bewahrt diesen vor einer möglicherweise lebensbedrohlichen systemischen Überreaktion. Dabei übt IL-10 eine Vielzahl an Funktionen aus: Es inhibiert eine NF- $\kappa$ B- Aktivierung und eine TLR- Synthese, deaktiviert Makrophagen/Monozyten, verhindert die Produktion von Zytokinen wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 selbst, IL-12, IL-18, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, TNF- $\alpha$  etc. bzw. von verschiedenen Chemokinen. Desweiteren veranlasst IL-10 eine Induktion von

Zytokinantagonisten wie IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1RA) sowie eine Verringerung der MHC II- Expression, was zu einer verringerten Antigenpräsentation durch dendritische Zellen (DCs) führt. Eine IL-10- Induktion vermittelt also dem Wirtsorganismus, die Entzündungsreaktion könne beendet werden, da die Infektion unter Kontrolle sei. Die Ausnutzung von endogenem, Makrophagen- produziertem IL-10 erweist sich deshalb als eine sehr effektive Strategie eines Erregers, sich relativ ungehindert im Wirt ausbreiten zu können, da dieser auf die Ausschüttung IL-10 hin seine Immunantwort herunterfährt.

Eine Beteiligung von Makrophagen- produziertem IL-10 am Zustandekommen der immunsuppressiven Wirkung von LcrV auf Makrophagen konnte durch folgende Befunde dieser Arbeit erhärtet werden:

1. rLcrV induziert dosisabhängig IL-10 in humanen Monozyten.
2. rLcrV induziert in murinen J774- Makrophagenzelllinie den IL-10- Promotor-EGFP- Reporter.
3. eine LcrV- bedingte TLR- Homo- bzw. Hetero- Toleranz ist in IL-10- defizienten Makrophagen nicht oder nur eingeschränkt auslösbar.

Da hierbei Makrophagen die Quelle für IL-10 und TNF- $\alpha$  darstellen und Anti- IL-10- Antikörper die LcrV- Wirkung auf die Zymosan A- induzierte TNF- $\alpha$ - Produktion aufheben, kann folgendes Pathogenitätsprinzip von LcrV angenommen werden: LcrV induziert zunächst IL-10 in TLR2- exprimierenden Immunzellen ( Makrophagen, B- Zellen etc.), welches in para- und/oder autokriner Weise auf Makrophagen zurückwirkt, diese deaktiviert und so die angeborene Immunantwort des Wirtes drosselt (s. Abb. 42).



**Abb. 42: Modell zum Pathomechanismus von LcrV: Induktion von IL-10 in Makrophagen (MΦ), das para- und/oder autokrin auf Makrophagen zurückwirkt und diese so deaktiviert.**

Der Missbrauch von endogenem IL-10 zur Induktion einer Toleranz gegen die proinflammatorischen Eigenschaften mikrobieller Produkte erweist sich als höchst effektiv, wenn es sich beim Mechanismus einer IL-10-vermittelten Immunsuppression um ein allgemeines, für viele mikrobielle Produkte gültiges Prinzip handelt. Um dies zu untersuchen, wurde das Toleranzinduktionsmodell über den TLR2-Agonisten Zymosan A (Sing et al. 2002a) hinaus in dieser Arbeit auf weitere mikrobielle Produkte wie den TLR2-Agonisten Pam3Cys und den TLR4-Agonisten LPS erweitert. rLcrV war dabei in der Lage, murine und humane Makrophagen refraktär sowohl gegen einen TLR2-wirksamen Zweitstimulus (rLcrV, Pam3Cys und wie schon bekannt Zymosan A) als auch gegen einen TLR4-wirksamen Zweitstimulus (LPS) zu machen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass rLcrV sowohl TLR-Homo- als auch Heterotoleranz in Makrophagen auslösen kann.

Am Zustandekommen dieser TLR-Toleranzphänomene war IL-10 unterschiedlich stark beteiligt. Durch Verwendung von IL-10<sup>-/-</sup> Mausemakrophagen konnte gezeigt werden, dass IL-10 nicht nur bei LcrV-induzierten, sondern auch bei anderen Toleranzphänomenen, bei denen z.B. Pam3Cys oder LPS als Erststimulus den toleranzauslösenden Faktor darstellen, eine Rolle spielt. Bei fehlendem IL-10 waren alle beobachteten Toleranzphänomene nur sehr eingeschränkt ausgeprägt. Um die Stärke der IL-10-Abhängigkeit der einzelnen TLR-Homo- und

Heterotoleranzphänomene genauer zu erfassen, wurde die Toleranzinduktion in IL-10- defizienten Makrophagen mit der in Wildtyp- Makrophagen induzierten verglichen. Das Fehlen von IL-10 wirkt sich am stärksten bei der LcrV- vermittelten TLR2- Homotoleranzinduktion gegen Pam3Cys aus, während die LcrV- abhängige TLR- Auto- und Heterotoleranz weniger stark IL-10- abhängig sind. Es kann angenommen werden, dass TLR- Auto- und Heterotoleranz im Gegensatz zur LcrV- abhängigen TLR2- Homotoleranz (gegen Zymosan A oder Pam3Cys) weniger stark IL-10- abhängig sind, weil möglicherweise durch LcrV oder LPS zusätzliche intrazelluläre Signalwege aktiviert werden, die zu einer TNF- $\alpha$ - Produktion führen können und IL-10- unabhängig verlaufen.

Das hier vorgeschlagene Makrophagen- „silencing“ durch Induktion von antiinflammatorischem IL-10 wird durch mehrere Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen untermauert. Die immunsupprimierende Wirkung von endogenem IL-10 wurde nicht nur in Bezug auf die LPS- Toleranz (Randow et al. 1995, Shnyra et al. 1998) sondern auch für eine Toleranzinduktion gegenüber anderen TLR- Liganden beschrieben (Murthy et al. 2000, Shimauchi et al. 1998). Desweiteren wurde berichtet, dass die Inhibierung von endogenem IL-10 mittels Anti- IL-10- Antikörpern im LPS- Homotoleranzmodell eine TNF- $\alpha$ - Suppression verhindert oder zumindest drastisch reduziert (Karp et al. 1998, Randow et al. 1995). Die durch *Borrelia burgdorferi*- Lysat induzierte TLR2- Homotoleranz konnte ebenfalls z.T. durch Anti-IL-10- Antikörper verhindert werden (Diterich et al. 2003). Auch die durch *Porphyromonas gingivalis* LPS (TLR2- Agonist) ausgelöste TLR- Homotoleranz und Heterotoleranz gegen *E. coli* LPS konnte durch Anti-IL-10- Antikörper vollständig verhindert werden (Shimauchi et al. 1998). Im Gegensatz dazu wurde in einem LPS/Lipoteichonsäure TLR- Homo- bzw. Heterotoleranzmodell keine Beteiligung eines löslichen Mediators wie IL-10 gefunden (Lehner et al. 2001).

Auch IL-10- defiziente Mäuse wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen verwendet, um die IL-10- Abhängigkeit einer TLR- Toleranz zu untersuchen. In einem *in vivo*- Modell zur klassischen LPS- Toleranz wurden vor dem LPS- Zweitstimulus zwei unterschiedliche vorstimulierende LPS- Dosen verabreicht. Die beobachtete LPS- Toleranz war dabei nicht strikt IL-10- abhängig. Exogenes IL-10 hatte lediglich einen potenzierenden Effekt auf die Induktion einer LPS- Toleranz (Berg et al. 1995). Wysocka et al. berichteten eine vergleichbare TNF- $\alpha$ - Suppression nach einem LPS- Zweitstimulus (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in IL-10-/- wie in Wildtyp- Milzzellen, die jeweils 20 h lang mit



LPS (100 ng/mL) vorstimuliert worden waren (Wysocka et al. 2001). *In vivo* jedoch waren hierbei in IL-10<sup>-/-</sup> Mäusen die TNF- $\alpha$ - Serumspiegel nach Toleranzinduktion und Zweitstimulus weniger stark reduziert wie in Wildtyp- Mäusen. Desweiteren wurden in Wildtyp und IL-10<sup>-/-</sup> Peritonealmakrophagen nach 24- stündiger Toleranzinduktion durch LPS (100 ng/mL) oder dem TLR2- Agonisten MALP-2 (macrophage activating lipopeptide-2, 3 ng/mL) in gleichem Masse TLR- Homo- und Heterotoleranz ausgelöst (Sato et al. 2002). Diese Unterschiede bezüglich der Beteiligung von IL-10 an einer TLR- Toleranzinduktion in murinen Peritonealmakrophagen könnten durch die unterschiedlichen Dosen an TLR- Agonisten, die verwendet wurden, oder wahrscheinlicher durch die sehr unterschiedliche Zeitspanne zur Toleranzinduktion (24h bei Sato, 3h in der vorliegenden Arbeit) erklärt werden. Daher kann spekuliert werden, dass IL-10 v.a. in der ersten Desensibilisierungsphase wichtig für eine Toleranzinduktion ist, während bei längerem Kontakt der Makrophagen mit dem TLR- Agonisten andere Faktoren oder Mechanismen wie die Interferenz intrazellulärer Signalwege bei einer Toleranzinduktion stärker zum Tragen kommen als IL-10.

Mit der Immunsuppression über LcrV- induziertes IL-10 scheinen die Yersinien einen allgemeinen Mechanismus zur Begrenzung einer Immunantwort auszunutzen, um ihr eigenes Überleben zu sichern. Dies gelingt besonders gut, da der Wirtsorganismus nach LcrV- Kontakt bei einer Yersinieninfektion auch gegen die bei der Infektion zusätzlich frei werdenden anderen bakteriellen Komponenten wie LPS, Lipoprotein usw. refraktär reagiert und so eine Immunreaktion abgeschwächt werden kann.

Für das Zustandekommen einer TLR- Toleranz werden noch zwei weitere Mechanismen diskutiert: zum einen die verringerte Expression oder der Abbau der für den Zweitstimulus relevanten TLRs, zum anderen die Modulation intrazellulärer Signalkaskaden.

Weiterhin wurde eine mögliche LcrV- vermittelte Expressionsverminderung von TLR2 oder TLR4 im Rahmen einer TLR- Homo- bzw. Heterotoleranz postuliert. Außerdem wurde in murinen Peritonealmakrophagen eine LcrV und YopB- vermittelte Induktion von TLR2 auf mRNA- und Proteinebene beschrieben, während die TLR4- Expression unverändert bleibt (Sharma et al. 2004). In Mono-Mac-6- Monozyten konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nach verschieden langer rLcrV- Behandlung keine Expressionsveränderung von TLR2 oder TLR4 auf Proteinebene in FACS- bzw. Western Blot- Analysen beobachtet werden. Die von Sharma et al. beobachtete

TLR2- Expressionsinduktion auf LcrV- Stimulus hin widerspricht jedoch dem Konzept einer TLR- Toleranzinduktion durch TLR- Expressionsverminderung. In Anbetracht der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten kann davon ausgegangen werden, dass eine Modulation der TLR- Expression bei einer LcrV- induzierten TLR- Toleranz zumindest bei humanen Monozyten keine Rolle spielt.

Zusätzlich zu LcrV wird auch für YopP/J von Yersinien eine TNF- $\alpha$ - supprimierende Wirkung beschrieben. YopP/J und LcrV ergänzen sich in ihrer Wirkung, da sich der Mechanismus bei YopP/J prinzipiell von dem hier vorgestellten unterscheidet. YopP/J wirkt nur kontaktabhängig, also nach Injektion von YopP/J in die Wirtszelle („short distance effect“). Im Gegensatz dazu konnte von LcrV unter Verwendung einer bakterienundurchlässigen Anopore™ Filtermembran gezeigt werden, dass von Yersinien sezerniertes LcrV auch kontakunabhängig auf sog. „by- stander cells“ wirkt („long distance effect“; Reithmeier- Rost et al. 2004). YopP/J verhindert die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Verhinderung der Aktivierung von MAPKs, während LcrV über IL-10- Induktion vorgeformtes NF- $\kappa$ B inaktivieren kann. Ausserdem spielt YopP/J zumindest im Pestmodell keine essentielle Rolle für die Pathogenität der Yersinie. YopP- defiziente *Y. pestis* sind z.B. in ihrer Virulenz im Vergleich zu Wildtyp- Yersinien nicht abgeschwächt (Brubaker 2003). Die LcrV zugeschriebene IL-10- abhängige Immunsuppression zur Umgehung der Wirtsimmunantwort scheint hingegen für das Krankheitsgeschehen der Pest und in der Strategie der enteropathogenen Yersinien eine entscheidende Rolle zu spielen. Dies lässt sich indirekt aus den Experimenten mit IL-10- defizienten Mäusen schließen, die bei einer *Y. enterocolitica* Infektion ein wesentlich schwächeres Krankheitsbild zeigten als Wildtyp- Mäuse (Sing et al. 2002a).

Ausser für LcrV und YopP/J wurde von zwei Arbeitsgruppen auch für YopB eine TNF- $\alpha$ - suppressive Wirkung beschrieben. In dem einen Fall wurde jedoch kein rekombinantes YopB , sondern Bakterienüberstand für die Versuche verwendet (Beuscher et a. 1995). Im anderen Fall wurde in einem nicht TLR4- bzw. LPS- freien Peritonealmakrophagensystem gearbeitet und evtl. deshalb viele für LcrV und YopB identische Funktionen (Zytokinmodulation, TLR2/4- Expressionssteigerung etc.) beobachtet (Sharma et al. 2004, Sodhi et al. 2004).

Zusammenfassend konnte mit den hier vorliegenden Ergebnissen zur IL-10- abhängigen Immunsuppression durch LcrV gezeigt werden, dass ein

virulenzassoziiertes bakterielles Protein endogenes, makrophagenabhängiges IL-10 zur Suppression der Wirtsimmunantwort und damit ein allgemeines Makrophagen-Deaktivierungsprogramm ausnützt. Die Bedeutung von LcrV für die Pathogenität *in vivo* wurde bislang nur im Pestmodell gezeigt, wo sich LcrV im Gewebe infizierter Nager angereichert findet. In den hier vorliegenden Experimenten wurde LcrV von *Y. enterocolitica* verwendet und die pathogenetische Rolle von IL-10 im Darmsiniosenmodell gezeigt.

## **6.2 LcrV nutzt CD14 und TLR2, Rezeptoren der angeborenen Immunität mit extrazellulärer Erkennungsdomäne, zur Immunevasion aus**

Da für LcrV sowohl *in vivo* (Nedialkov et al. 1997) als auch *in vitro* (Reithmeier-Rost et al. 2004, Schmidt et al. 1999) ein endotoxintoleranzähnliches Phänomen beschrieben ist, lag zu Beginn der hier vorliegenden Arbeit die Vermutung nahe, LPS und LcrV könnten ähnliche Signaltransduktionswege aktivieren. Zunächst wurden Komponenten wie LBP, CD14, und TLR4/MD2, die am LPS-Effekt beteiligt sind (Fan et al. 2004), auf eine mögliche Funktion bei der LcrV-bedingten Wirkung untersucht. Die durch LcrV in Mono-Mac-6-Zellen induzierte TNF- $\alpha$ -Suppression erwies sich als LBP-unabhängig. Aus Transfektionsexperimenten mit HEK 293-Zellen konnte auch eine LcrV-Signalkaskade über TLR4/MD2 ausgeschlossen werden. Durch zusätzliche Testung der bis dato bekannten TLRs 1-10 hinsichtlich einer Beteiligung an einer LcrV-vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Transfektionsassay in An- oder Abwesenheit von kotransfiziertem CD14 wurden zwei entscheidende Erkenntnisse gewonnen:

1. Der Transmembranrezeptor TLR2 wurde als pattern recognition receptor (PRR) für die LcrV-bedingte Signaltransduktion identifiziert.
2. Die LcrV-abhängige Signaltransduktion über TLR2 war streng CD14-abhängig.

Folglich kann davon ausgegangen werden, dass LcrV von CD14/TLR2 erkannt wird. Da CD14 mangels intrazellulärer Komponente nicht als Signaltransduktionsrezeptor in Frage kommt, leitet der Transmembranrezeptor TLR2 mit

Signaltransduktionsdomäne das durch LcrV induzierte Signal in der Wirtszelle weiter, so dass es zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B kommen kann.

Diese Ergebnisse wurden auch im murinen und humanen Makrophagenmodell untermauert. Eine Beteiligung von TLR2 an der LcrV- ausgelösten IL-10- Induktion konnte in Experimenten mit TLR2-/- PPMs gezeigt werden. Diese reagierten im Gegensatz zu Wildtyp- Makrophagen auf LcrV- Stimulation mit nur sehr geringer IL-10-Produktion. Diese IL-10- Induktion blieb auch bei Verwendung von CD14-/- PPMs auf LcrV- Stimulation hin aus. Auch in humanen Mono-Mac-6-Monozyten konnten sowohl Anti- TLR2- als auch Anti- CD14- Antikörper die LcrV- induzierte IL-10-Produktion unterdrücken(Reithmeier- Rost et al. 2004). In diesem Zellsystem konnte zusätzlich die TLR2- abhängige IL-10- Induktion durch LcrV mit der dadurch ausgelösten TNF- $\alpha$ - Suppression verknüpft werden (Sing et al. 2002a).

Bei den meisten in TLR2-/- Mäusen untersuchten Infektionsmodellen wie z. B. dem einer *S. aureus*- Sepsis (Takeuchi et al. 2000) oder einer Lyme- Borreliose (Wooten et al.2002) war TLR2 notwendig für das Zustandekommen einer angemessenen Immunantwort. Für den Verlauf einer Darmyersiniose stellte sich dagegen der Besitz von TLR2 als nachteilig für den Wirt heraus. Inzwischen ist der Einfluss von TLR2 auf verschiedene bakterielle, parasitäre, fungale und virale Infektionen untersucht. Meist hilft der Besitz von TLR2 als pattern recognition receptor (PRR) dem Wirt, die Infektion zu überstehen. Eine Ausnahme bildet hierbei z.B. die *Candida albicans*- Sepsis, wenn i.v. hohe Dosen appliziert werden. Im Candidasepsismodell war wie beim hier vorgestellten Yersiniosemmodell eine TLR2- abhängige IL-10- Induktion für den negativen Infektionsverlauf mitverantwortlich (Netea et al. 2004c). Für das *C. albicans*- Infektionsmodell ist jedoch kein TLR2- Agonist als Pathogenitätsfaktor beschrieben, wahrscheinlich wirkt *C. albicans* wie das PAMP Zymosan als TLR2- Agonist. TLR2 nimmt also unterschiedlichen Einfluss auf den Ausgang einer Infektion, was auf dem prinzipiellen Unterschied zwischen PAMP und Virulenzfaktor oder zwischen fakultativ pathogenen und opportunistisch pathogenen Mikroorganismen beruht (Kopp et al. 2002). Im angeborenen Immunsystem haben TLRs die Aufgabe, hochkonservierte Moleküle, die PAMPs verschiedener Mikroorganismen zu erkennen und im Wirt Abwehrmassnahmen gegen diese einzuleiten. Nach Induktion von TLR2- Signalling werden apathogene bzw. fakultativ pathogene Mikroorganismen eliminiert und die Immunantwort wird durch IL-10 beendet. Beides ist protektiv für den Wirtsorganismus. Im Falle einer Infektion mit

einem obligat pathogenen Erreger wie *Yersinia* spp. kann das IL-10- Milieu vom Pathogen dazu benutzt werden, sich im Wirt zu vermehren. Der TLR des angeborenen Immunsystems kann in diesem Falle seine Aufgabe zur Schonung des Wirtes nicht erfüllen, sondern wird vom Pathogen für seine Zwecke ausgenutzt (Kopp et al.). Im Falle der *C. albicans* Infektion war bei geringen Dosen der Besitz von TLR2 protektiv, bei hohen Keimzahlen wie nach systemischer Dissemination des Erregers schädigte jedoch die durch die PAMP- Erkennung über TLR2 eingeleitete überschüssende Zytokininduktion den Wirtsorganismus vergleichbar einem Endotoxinschock. Bei der effektiven Strategie der Yersinien wird deutlich, dass sie den Wirtsorganismus ausnutzen, um das eigene Überleben und die Vermehrung im Wirt sicherzustellen, indem sie durch den endogenen Effektor IL-10 die Immunantwort des Wirts über eine TNF- $\alpha$ - Suppression unterdrücken. Dabei wird ein Rezeptor (TLR2) des angeborenen Immunsystems, der eigentlich als Frühwarnrezeptor den Wirt vor einer Ausbreitung eingedrungener Mikroorganismen schützen soll, zur Immunsuppression missbraucht. Für LcrV wurde also erstmals in dieser Arbeit ein auf das TLR- System abzielender Pathomechanismus eines bakteriellen Virulenzfaktors beschrieben. Mittlerweile wurden für einige Viren bzw. virale Proteine das TLR- System ausnutzende Pathomechanismen aufgedeckt. So induziert z.B. das retrovirale Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) TLR4- abhängig IL-10 und kann so sein Überleben in C3H/HeN- Mäusen sichern, was ihm in TLR4- defekten C3H/HeJ- Mäusen nicht gelingt (Jude et al. 2003).

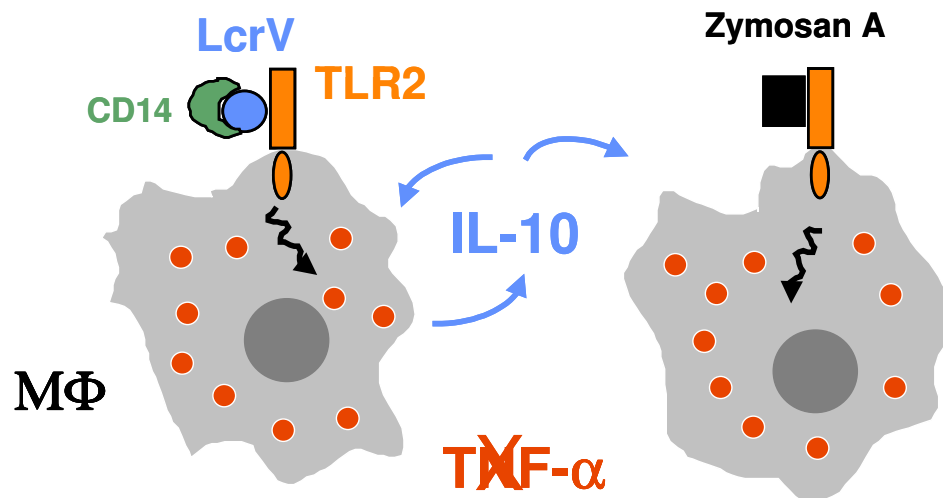
Betrachtet man das LcrV- homologe rPcrV des opportunistischen Erregers *P. aeruginosa*, das in den vorliegenden Experimenten als Kontrolle eingesetzt wurde, stellt man fest, dass rPcrV im Gegensatz zu rLcrV der obligat pathogenen Yersinien nicht in der Lage ist, über CD14/TLR2 NF- $\kappa$ B zu aktivieren. Dieser fakultativ pathogene Erreger scheinen demgegenüber nicht über eine TLR2/IL-10- Strategie zu verfügen.

Die hier aufgeklärte LcrV- bedingte IL-10- Induktion unterscheidet sich in einigen Punkten von dem anderer TLR2- Agonisten:

1. bei LcrV wird kein zusätzlicher TLR wie z.B. TLR1 bzw. TLR6 wie bei di- bzw. tri- acylierten Lipoproteinen zur NF- $\kappa$ B- Aktivierung benötigt.
2. Im Gegensatz zu den TLR4- TLR2/TLR6- und TLR2/TLR1- Agonisten LPS, tri- oder di- acylierte Lipopeptide (Schröder et al. 2004) spielt LBP keine Rolle für die LcrV- Wirkung

3. Da LcrV einen Virulenzfaktor darstellt, ist die Interaktion mit TLR2 nicht als normale PAMP- Erkennung anzusehen, sondern als Teil der Strategie von Yersinien zur Ausnutzung eines angeborenen Erkennungsmechanismus. Bei TLR2- Defizienz sollte eine Yersiniose deshalb einen anormalen Verlauf nehmen.

Das bisher vorgestellte Modell konnte um die Erkennungsrezeptoren für LcrV erweitert werden:



**Abb. 43 Modell zum Pathomechanismus von LcrV:**  
Induktion von endogenem IL-10 in Makrophagen (MΦ) über einen Rezeptor des angeborenen Immunsystems (CD14/TLR2) zur Immunsuppression im Wirtsorganismus.

## 6.3 Lokalisation der TLR2- aktiven Domäne von LcrV

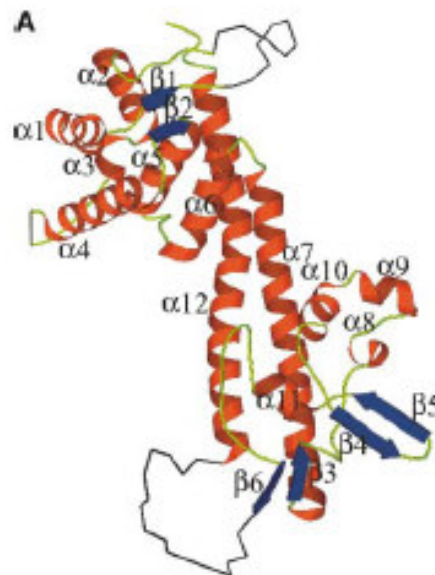
Als LcrV- Homolog des opportunistischen Erregers *P. aeruginosa* besitzt PcrV ähnliche Funktionen wie LcrV. Es ist ebenfalls an der Translokation von Proteinen in die Wirtszelle und zusammen mit PopB und PopD an der Porenbildung in Wirtszellmembranen beteiligt (Schoehn et al. 2003, Goure et al. 2004). PcrV ist auch als protektives Antigen beschrieben (Sawa et al. 1999). Allerdings ist PcrV nicht in der Lage, die für LcrV in dieser Arbeit beschriebenen immunmodulierenden Effekte auszulösen:

1. rPcrV führt weder zu einer IL-10- Induktion noch zu einer TNF- $\alpha$ - Suppression in murinen oder humanen Makrophagen.
2. In CD14/TLR2- transfizierten HEK 293-R- Zellen bewirkt rPcrV keine NF- $\kappa$ B- Aktivierung.
3. Intrazelluläres PcrV induziert keine NF- $\kappa$ B- Aktivierung über Nod1/2 (wie unter 3.3 beschrieben).

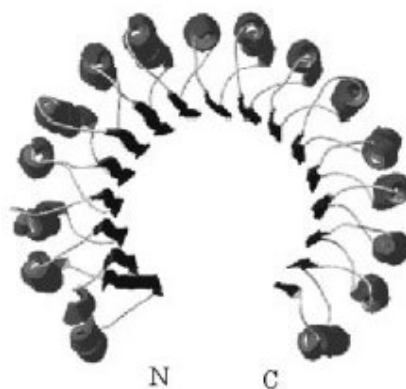
Um eine mögliche Ursache für die beobachteten Unterschiede zwischen LcrV und PcrV zu finden, wurde zunächst ein Sequenzvergleich der beiden Proteine durchgeführt. Es fielen je eine 13 Aminosäuren umfassende N- terminale und eine 17 Aminosäuren grosse C-terminale Domäne in der LcrV- Sequenz auf, die bei PcrV fehlt. Die aktive Domäne von LcrV konnte in dieser Arbeit mit Hilfe synthetischer Peptide in Versuchen mit CD14/TLR2- transfizierten HEK 293-R- Zellen auf die N-terminale Aminosäureregion aa31-aa57 eingegrenzt werden. Die immunmodulatorisch aktive Region von LcrV umfasst damit einen Grossteil der  $\alpha$ 1- Helix und des  $\beta$ 1- Faltblattes von LcrV (vgl. Derewenda et al. 2004). In Anbetracht der hufeisenförmigen Struktur der LRRs von TLR2 erscheint eine spezifische Interaktion dieser LcrV- Domäne mit dem Rezeptor plausibel (Abb. 44).

Viele LRR- Proteine sind in Protein- Protein- Interaktionen involviert. Die Anzahl der LRRs in den jeweiligen Proteinen variiert dabei von 2 bis 45, die Länge der LRRs beträgt jeweils 20 bis 30 aa. Die konkaven Innenseite des LRR- Bogens wird durch parallele  $\beta$ - Stränge gebildet, während  $\alpha$ - Helices an der Aussenseite des „Hufeisens“ liegen (s. Abb. 44B; Enkhbayar et al. 2004). Die konkave Innenseite des LRR- Bogens und die angrenzenden Loops sind die häufigsten Protein-

Interaktionsstellen bei LRR- Proteinen. Besonders die konkave Innenseite der LRRs ist ideal für Interaktionen mit einer  $\alpha$ - Helix (Kobe u. Kajava 2001). Diese Situation wäre bei einer Interaktion der LRRs von TLR2 mit der  $\alpha$ 1- Helix des in dieser Arbeit untersuchten *Y. enterocolitica* LcrV gegeben.



**Abb. 44A** Strukturmodell von *Y. pestis* LcrV (nach Derewenda et al. 2004).t



**Abb. 44B** Prinzipieller Aufbau von LRR- Proteinen (Enkhbayar et al. 2004).

Zur erfolgreichen Kristallisation von *Y. pestis* LcrV mussten drei nach aussen zeigende benachbarte Aminosäuren (nämlich K40, D41 und K42) durch eine Mutagenese in Alanin umgewandelt werden. Dadurch fielen die langen Seitenketten weg, die diese Position im Wildtyp- LcrV einnehmen. Diese drei Positionen liegen in



der hier postulierten aktiven Region des LcrV von *Y. enterocolitica*. Das Vorhandensein langer Seitenketten an den besagten Aminosäurepositionen ist geeignet für eine Interaktion mit den Aminosäuren der LRRs von TLR2. Ausserdem muss herausgestellt werden, dass es sich bei der in dieser Arbeit gefundenen aktiven Domäne von *Y. enterocolitica* LcrV (Helix  $\alpha$ 1 und Faltblatt  $\beta$ 1) um eine geordnete Region innerhalb der LcrV- Struktur handelt, die im Molekül nach aussen zeigt, und so eine mögliche Interaktionsstelle für die LRRs darstellen könnte. Um den endgültigen Beweis zu erbringen, dass es sich bei der LcrV- Region aa31-aa57 tatsächlich um die für die immunsuppressive Wirkung von LcrV verantwortliche Domäne handelt, wurde in der vorliegenden Arbeit wie unter 3.3 beschrieben eine Yersinien-LcrV-Mutante mit einer Punktmutation an Aminosäureposition 42 (Austausch K $\rightarrow$ Q) konstruiert, die ihre immunmodulatorischen Effekte verloren hat.

In Übereinstimmung mit den hier gewonnenen Befunden wurde in Vakzinierungsstudien mit *Y. pestis*- LcrV eine zwischen den Aminosäuren 2 bis 135 gelegene protektive Region gefunden (Hill et al. 1997). Die N- terminale Region von LcrV scheint also sowohl für seine immunmodulatorische als auch für die Funktion als protektives Antigen bedeutsam zu sein.

Durch die Verwendung synthetischer und somit in bakterienfreien Systemen hergestellter Peptide beim Nachweis einer CD14/TLR2- Aktivität wird einerseits die Spezifität der immunmodulatorischen Wirkung von LcrV gegenüber PcrV gezeigt, andererseits nochmals untermauert, dass die TLR2- Wirkung von LcrV nicht durch mögliche bakterielle Kontaminationen ausgelöst wird.

## 6.4 Bedeutung der TLR2- vermittelten Immunsuppression bei einer *Y. enterocolitica*- Infektion im Mausmodell

Die Relevanz der in dieser Arbeit gefundenen LcrV- vermittelten Immunmodulation für den Ausgang einer *Y. enterocolitica*- Infektion konnte nur mit einer mutierten Yersinie untersucht werden, deren LcrV seine TLR2- Aktivität verloren hatte. Alle anderen Funktionen, die das LcrV für die Pathogenität der Yersinien besitzt, sollten unbeeinflusst bleiben. Um eine geeignete Mutationsstelle im LcrV zu finden, wurde ausgehend vom Peptid V7 (aa31-aa49) die TLR2- stimulatorische Aktivität durch Aminosäureaustausch variiert und Peptide an CD14/TLR2- transfizierten HEK-293-R- Zellen verglichen. Mittels eines solchen Peptidassays konnte bereits die TLR2- aktive Domäne von LcrV eingegrenzt werden (Sing et al. 2002b). Einige Aminosäureaustausche hatten geringen bis keinen hemmenden Effekt auf die TLR2- Aktivität. Der Austausch von Lysin (K) der Aminosäureposition 42 in Glutamin (K42Q) führte nicht zu einer TLR2- Aktivität des Peptids V74:

1. Im Luciferaseassay zeigte sich das V74- Peptid ohne CD14/TLR2- Aktivität.
2. Das davon abgeleitete rekombinante LcrV- Protein mit entsprechender Aminosäureaustausch (rLcrV O:8 K42Q) hatte im Luciferaseassay ebenfalls nur eine schwach CD14/TLR2- stimulierende Wirkung.
3. Im Mausmakrophagensystem konnte rLcrV O:8 K42Q keine IL-10- Induktion auslösen.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde eine Yersinienmutante mit eben diesem Aminosäureaustausch konstruiert. Um bestmögliche Vergleichbarkeit zwischen LcrV- Mutante und auf gleichem Weg hergestellter Kontroll- Yersinie sicherzustellen, wurde sowohl das im LcrV mutierte Virulenzplasmid als auch das Virulenzplasmid der Kontroll- Yersinie in den gleichen WA-C- Stamm elektroporiert. Die erhaltenen Stämme waren hinsichtlich ihrer Protein- Sekretions- und Translokationsfähigkeit untereinander wie mit einer Wildtyp- Yersinie vergleichbar.

WAC-M74 und WAC-O:8 konnten daher bezüglich ihrer Mauspathogenität verglichen werden, um die Frage nach der tatsächlichen *in vivo* Relevanz eines LcrV-

übermittelten, TLR2- abhängigen und IL-10- induzierenden Pathomechanismus zu überprüfen.

Mehrere *in vivo* Beobachtungen sprechen zum einen für eine in C57BL/6 Mäusen verringerte Pathogenität des WAC-M74- Stammes und zum anderen für einen *in vivo* TLR2- abhängigen, IL-10- vermittelten Pathomechanismus von LcrV:

1. Die Peyer`schen Plaques waren bei WAC-M74- infizierten C57BL/6- Mäusen deutlich vergrößert, was für eine verstärkte- bzw. für eine durch das mutierte LcrV weniger supprimierte- Immunantwort/Entzündungsreaktion sprechen könnte.
2. Bei peroraler Infektion mit letaler Dosis war die Bakterienlast in Peyer`schen Plaques, Milz und Leber bei WAC-M74- infizierten C57BL/6- Mäusen deutlich geringer als bei WAC-O:8- infizierten.
3. Die Überlebensdauer von C57BL/6- Mäusen bei i.p.- Infektion mit letaler Dosis war beim WAC-M74- Infektionsstamm länger als beim WAC-O:8- Stamm.
4. Die Überlebensrate von C57BL/6- Mäusen bei p.o.- Infektion mit letaler Dosis war beim WAC-M74- Infektionsstamm signifikant höher als beim WAC-O:8- Stamm.
5. Bei TLR2-/- als auch bei IL-10-/- Mäusen waren weder bei p.o.- noch bei i.p.- Infektion Unterschiede in der Bakterienlast der Organe noch in der Überlebensdauer- bzw. -rate zwischen WAC-O:8- und WAC-M74- Infektion zu beobachten.

Diese Ergebnisse sprechen für eine Minderung der Virulenz durch den K42Q Austausch im LcrV, die wahrscheinlich auf eine fehlende TLR2- Stimulation durch LcrV K42Q zurückzuführen ist. Es ist die Tendenz zu erkennen, dass C57BL/6- Mäuse bei Infektion mit WAC-M74 im Vergleich zur Infektion mit WAC-O:8 eine verstärkte Antwort durch das angeborene Immunsystem zeigen, durch welche sie eine bessere Chance haben, die Bakterien einzudämmen oder sie zumindest an einer ungehinderten Invasion zu hindern. Die Tatsache, dass der Unterschied in der Bakterienlast zwischen den zwei Infektionsstämmen nach p.o. Infektion in den Peyer`schen Plaques am deutlichsten ist, lässt sich dadurch erklären, dass in den Peyer`schen Plaques, der Eintrittspforte in den Wirtsorganismus, sehr viele Makrophagen, B- Zellen und andere Immunzellen sitzen, die im Falle von WAC-M74

durch das mutierte LcrV nicht über eine TLR2- vermittelte IL-10- Induktion gelähmt werden und so auf die Bakterien mit angemessener Entzündungsreaktion reagieren können. Die in den Peyer`schen Plaques vorhandenen Phagozyten sind bei einer WAC-M74-Infektion durch die Bakterien aktiviert und können neue Phagozyten zum Infektionsherd rekrutieren, was auch die beobachtete Anschwellung der Peyer`schen Plaques erklären konnte. Auf diese Weise könnte die Bakterienzahl bei einer WAC-M74- Infektion von C57BL/6 Mäusen in den Peyer`schen Plaques eingedämmt werden.

Durch die Überlebensversuche wird deutlich, dass einerseits die Wirkung von LcrV *in vivo* eine Relevanz für den Ausgang einer Yersinieninfektion hat, und dass andererseits die aktive Region des LcrV in der Aminosäureregion um Position 42 liegen muss, da hier eine Mutation zu einem drastischen Verlust der LcrV- vermittelten Immunsuppression und so zu einer abgeschwächten Pathogenität der Yersinie führt.

Bei Infektion von TLR2-/- und IL-10-/- Mäusen war zwischen WAC-M74 und WAC-O:8 kein Unterschied in der Pathogenität zu erkennen. Dadurch konnte bewiesen werden, dass *Y. enterocolitica* mittels LcrV eine TLR2- abhängige Immunmodulation bewirkt, indem es endogenes IL-10 ausnützt, um die Immunantwort des Wirtes zu unterwandern. Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnte der bereits nach Experimenten mit *Y. enterocolitica* O:8 WA-314- infizierten IL10-/- und TLR2-/- Mäusen geäußerte Verdacht bestätigt werden, dass *Y. enterocolitica* über eine TLR2- vermittelte IL-10-Induktion einen für den Ausgang einer *Y. enterocolitica*- Infektion wichtigen Pathomechanismus ausübt.

Vergleicht man den in dieser Arbeit vorgenommenen Austausch von Aminosäuren im V- Antigen an Position 40 und 42 mit der LcrV-Sequenz natürlich vorkommender Yersinien aus der Literatur oder mit Sequenzen von Patientenisolaten, die in der Arbeitsgruppe Sing sequenziert wurden (aa1-aa100), so stellt man fest, dass die Mutation im LcrV an Aminosäureposition 42 in der Natur wahrscheinlich nicht vorzukommt. Wie in der vorliegenden Arbeit beobachtet, inhibiert diese Mutation die CD14/TLR2- abhängige Immunmodulation völlig und schwächt die Yersinie so in ihrer Pathogenität ab. Dies stellt in natürlicher Umgebung einen Selektionsnachteil dar, weshalb es nicht verwunderlich ist, in Patientenisolaten keine Yersinie mit derartiger LcrV- Sequenz zu finden. Ein Aminosäureaustausch an Position 40 im

LcrV verringerte die TLR2- abhängige Immunsuppression nur, löschte sie aber in den in dieser Arbeit verwendeten Assays nicht völlig aus. In den N- terminalen LcrV- Regionen der Patientenisolat waren an dieser Position ein wie in dieser Arbeit durchgeführter Austausch von K→Q zu finden. Die N- terminalen Regionen der Patientenisolat können aufgrund der Unterschiede an den Aminosäurepositionen 40, 43, 53 und 61 in 7 Typen eingeteilt werden:

Typ	Aminosäureposition 40—43—53—61	Yersinienstämme aus Datenbanken bzw. Patientenisolaten (N: Anzahl)
I	K—N—R—N	<i>Y.pestis</i> : N= 10, <i>Y.pseudotuberculosis</i> .: N= 11
II	K—K—K—N	<i>Y.enterocolitica</i> O3: N= 36, O6: N= 1, O9: N= 4
III	K—K—K—D	<i>Y.enterocolitica</i> O9: N= 9, O1: N= 1, O2: N= 2, O3: N= 1
IV	K—K—K—E	<i>Y.enterocolitica</i> O8: N= 3
V	Q—K—Q—D	<i>Y.enterocolitica</i> O9: N= 1
VI	Q—K—K—D	<i>Y.enterocolitica</i> O5/27: N= 1
VII	Q—K—Q—N	<i>Y.enterocolitica</i> O3 : N= 1

**Tab. 5 N- terminal verschiedene LcrV- Proteine: 7 Typen mit Unterschieden an Aminosäurepositionen 40—43—53—61.**

Die *lcrV*- Gene verschiedener Yersinienisolat wurden im Bereich Kodon 1-100 sequenziert und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen verglichen.

Auffallend beim Vergleich der N- terminalen LcrV- Regionen ist, dass Stämme mit Aminosäure Q an Position 40 im LcrV, welche das LcrV laut der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse in seiner Wirkung abschwächt, seltener zu finden sind als Stämme mit K an Position 40 des LcrV. Eine Mutation an Aminosäureposition 42 war überhaupt nicht zu finden.

Da LcrV K40Q noch eine TLR2- Restaktivität besaß, wurde die *in vivo*- Untersuchung des Einflusses der LcrV- Aminosäuresequenz der aktiven Region auf den Ausgang einer *Y. enterocolitica* Infektion im Mausmodell auf die LcrV O:8 K42Q- Mutation beschränkt. Diese verringerte die LcrV- Wirkung sowohl im Transfektionsassay als Peptid (V74) und als rekombinantes Protein (LcrV K42Q) als auch im Mausmakrophagenassay am stärksten.

## 6.5 LcrV moduliert die Wirtsimmunantwort über die intrazellulären Rezeptoren des angeborenen Immunsystems Nod1/2

Da LcrV als sezerniertes Protein nicht nur aus der Yersinie ausgeschleust, sondern auch in die Wirtszelle transloziert wird (Fields et al. 1999b), besteht die Möglichkeit, dass neben dem Transmembranrezeptor TLR2 auch intrazelluläre Rezeptoren mit LcrV interagieren können. TLRs und Nod- Proteine erkennen beide mit Hilfe ihrer LRRs hochkonservierte mikrobielle Bestandteile und lösen daraufhin eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung in der Zelle aus. Daher lag die Vermutung nahe, dass LcrV auch über Nod1/2 immunmodulierend wirken könnte. Als erstes Indiz dafür konnte gezeigt werden, dass hochreines internalisiertes rLcrV und ein die 130 N- terminalen Aminosäuren umfassendes rLcrV- Fragment, nicht aber rPcrV sowohl über Nod1 als auch über Nod2 NF- $\kappa$ B aktivieren können. Um sicherzugehen, dass es sich bei der beobachteten Nod- abhängigen Zellaktivierung nicht um ein kontaminationsbedingtes Artefakt handelt, wurden die Ergebnisse in einem zweiten System bestätigt, bei dem mittels eukaryotischer Expressionsvektoren die entsprechenden Proteine intrazellulär von der Wirtszelle selbst exprimiert wurden. So konnte gezeigt werden, dass die Nod1/2- wirksame Domäne innerhalb der 130 N- terminalen Aminosäuren von LcrV liegt, und die 100 C- terminalen Aminosäuren von LcrV wie auch PcrV keine Nod- Wirksamkeit aufweisen. Die Zellaktivierung durch Nod1/2 wird über CARD- CARD- Interaktionen des jeweiligen Nod mit RIP2 vermittelt. Wie zu erwarten war, konnte dominant negatives RIP2 die durch intrazelluläres LcrV ausgelöste NF- $\kappa$ B- Aktivierung vollständig hemmen, was durch dominant negatives MyD88 nicht möglich war. Demzufolge ist RIP2, nicht aber MyD88 Teil der Nod- abhängigen Signalkaskade. Eine Beteiligung von RIP2, nicht aber von MyD88 an der Nod- induzierten Zellaktivierung wurde auch in anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Girardin et al. 2003b, Inohara et al. 2001, Opitz et al. 2004).

In der vorliegenden Studie gelang erstmals der Nachweis einer räumlichen Assoziation von Nod1/2 mit einem seiner Agonisten:

1. nach intrazellulärer Expression ließen sich LcrV, seine 130 N- terminalen, nicht aber die 100 C- terminalen Aminosäuren von LcrV bzw. PcrV mit Nod1/2 koimmunpräzipitieren. Dies zeigt einerseits eine Assoziation von LcrV mit seinen Rezeptoren Nod1/2, andererseits weist es darauf hin, dass die Nod-

wirksame Domäne ebenso wie die TLR2- aktive N- terminal innerhalb der ersten 130 Aminosäuren von LcrV liegt.

2. In murinen Makrophagen liess sich nach 30- minütiger Inkubation mit rLcrV dieses mit endogenem Nod1/2 koimmunpräzipitieren.
3. In verschiedenen Zellen kolokalisierte Rhodamin- gekoppeltes rLcrV mit EGFP- fusioniertem Nod1 oder Nod2.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LcrV über eine Interaktion mit CD14/TLR2 eine IL-10- Induktion im Wirtsorganismus induzieren kann. Da LcrV auch mit Nod1/2 interagiert, stellte sich die Frage, ob LcrV in der Lage ist, auch über Nod- Rezeptoren IL-10- Produktion auszulösen. Eine über den Nod- Signalweg erfolgende IL-10- Induktion durch LcrV konnte durch folgende drei Befunde direkt oder indirekt nachgewiesen werden:

1. In mit einem IL-10- EGFP- Reporter transfizierten HEK 293- Zellen aktivierte intrazellulär exprimiertes LcrV über Nod1/2 den IL-10- Promoter.
2. LcrV induzierte NF $\kappa$ B- Translokation in den Zellkern in murinen MyD88- defizienten Makrophagen. Dies deutet auf die Existenz eines LcrV- vermittelten alternativen TLR2- und MyD88- unabhängigen Signalweges hin, der zu IL-10- Produktion führen könnte.
3. Transfektion von dominant negativen Nod1- oder Nod2- bzw. RIP2- Konstrukten in murinen J774A.1 Makrophagen oder humanen MM6- Zellen verringerte eine LcrV- abhängige IL-10- Produktion drastisch.

Die hier gewonnenen Ergebnisse werden durch Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen gestützt, die eine Nod2- abhängige IL-10- Induktion über den Nod- Agonisten Peptidoglykan und den TLR2- Agonisten Pam3Cys-KKKK, nicht aber über den TLR4- Agonisten LPS beschreiben: in Experimenten mit mononukleären Blutzellen von Morbus Crohn- Patienten mit der 3020insC- Frameshift- Mutation im *NOD2*- Gen ist auf Stimulation mit den genannten Nod2- bzw. TLR2- Stimuli eine verringerte IL-10- Produktion zu messen. Dies erlaubt den Rückschluss, dass intaktes Nod2 für die normale IL-10- Antwort benötigt wird (Netea et al. 1004c).

Nach unseren Beobachtungen war die Frage zu klären, wie LcrV als sezerniertes Protein eines extrazellulären Bakteriums in Kontakt mit den intrazellulär gelegenen Nod- Rezeptoren kommen könnte. In den ersten Arbeiten zur Nod- abhängigen Aktivierung tauchte dieses Problem nicht auf, da mit intrazellulären Erregern wie

Shigellen und enteroinvasiven *E. coli* gearbeitet wurde (Girardin et al. 2001, Kim et al. 2004). Ausserdem konnte in diesen Arbeiten das Nod-aktive Agens nicht genau eingegrenzt werden. In den nachfolgenden Studien zur Nod-Aktivierung durch Peptidoglykan war dieser Frage ebenfalls nicht nachgegangen worden. Vor kurzem jedoch konnte in menschlichen Colonzellen ein für die Aufnahme von MDP verantwortlicher Peptidtransporter (hPepT1) identifiziert werden (Vavricka et al. 2004). Bei dem nicht-invasiven Bakterium *H. pylori* wird das Peptidoglykan über einen TypIV-Sekretionsapparat in die Zellen injiziert, wo es dann Nod1 aktiviert (Viala et al. 2004). Demgegenüber gelangt LcrV unabhängig vom TTSS in die Zellen (Fields et al. 1999b). Da LcrV wie in dieser Arbeit gezeigt über den Transmembranrezeptor TLR2 wirkt, war es möglich, dass TLR2 an der Einschleusung von LcrV in die Zellen beteiligt war. Es war bereits für TLR4 bekannt, dass diese nicht nur an der Zelloberfläche, sondern auch in intrazellulären Kompartimenten zu finden war (Hornef et al. 2002, Lien et al. 2002), und dass TLR2 und TLR4 schnell zwischen Zellmembran und intrazellulären Kompartimenten hin- und herwandern können (Latz et al. 2002). Für eine Signaltransduktion über TLR4 waren diese Trafficking-Prozesse jedoch nicht notwendig (Latz et al. 2002).

Eine TLR2-abhängige LcrV-Aufnahme konnte in transfizierten HEK 293-Zellen und in primären murinen Makrophagen (Peritoneal- und Knochenmarksmakrophagen) beobachtet werden. Zunächst befand sich LcrV dabei in vesikulären Strukturen und verteilte sich später im Falle der HEK293-Zellen homogen im Zytoplasma, wo das LcrV in Kontakt zu Nod1/2 kommen konnte. Die LcrV-Aufnahme über TLR2 verlief sowohl im Transfektionsmodell als auch im physiologischeren Makrophagenmodell unabhängig vom TLR2-MyD88-abhängigen Signalling: Dominant negatives MyD88 inhibierte die LcrV-Aufnahme nicht, ausserdem konnten transfizierte HEK293-Zellen auch über dominant negatives TLR2 mit mutierter TIR-Domäne, das kein TLR2-Signal in der Zelle weiterleitet, LcrV internalisieren. Ebenso war die Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem LcrV in MyD88-/- Makrophagen nicht gestört. Auch wenn für TLR4 (Latz et al. 2002), TLR9 (Latz et al. 2004) bzw. auch für TLR2 (Latz et al. 2002) intrazelluläres Trafficking beschrieben wurde, wurden bislang die entsprechenden TLRs nicht für die Aufnahme anderer mikrobieller Produkte verantwortlich gemacht. LPS und CpG-DNA scheinen im Gegensatz zu LcrV unabhängig von ihren TLRs, TLR4 bzw. TLR9, in die Zelle aufgenommen zu werden (Dunzenhofer et al. 2004, Ahmad-Nejad et al. 2002, Häcker et al. 1998). Jedoch ist die CD14-abhängige LPS-

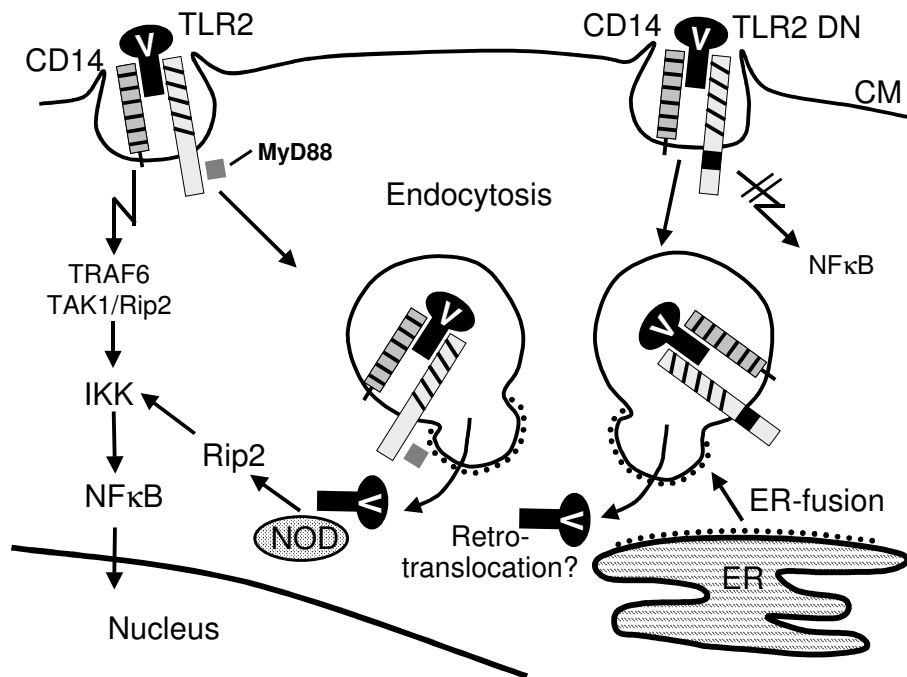


Aufnahme, an der im weiteren Verlauf Endosomen, Lysosomen und der Golgi-Apparat beteiligt sind (Kitchens et al. 1998, Poussin et al. 1998, Vasselon et al. 1999), in TLR4- defekten/ defizienten Zellen gestört (Thieblemont et al. 1997). Eine intrazelluläre Aufnahme zusammen mit TLR2 in sog. „Lipid- rafts“ wurde kürzlich für Lipoteichonsäure (Triantafilou et al. 2004) bzw. für nicht genauer beschriebene TLR2- Agonisten (Soong et al. 2004) beschrieben. „Lipid- rafts“ sind in der Zellmembran eingelagerte bewegliche Mikrodomänen, in denen sich räumlich konzentriert Rezeptoren und Kinasen separiert von anderen Membranregionen befinden. Von diesen „Lipid- rafts“ werden eine Reihe intrazellulärer Prozesse wie endozytotische Ereignisse oder eine Zellaktivierung initiiert (Helms et al. 2004, Manes et al. 2003, Triantafilou et al. 2002). In den Publikationen von Triantafilou und Soong wird jedoch nicht näher untersucht, ob das Beisein von TLR2 in den Lipid rafts notwendig für die Aufnahme des jeweiligen TLR2- Liganden ist. Dagegen ist bekannt, dass TLR2 Liganden in den MHCII- Antigenpräsentationsweg einschleusen kann (Schjetne et al. 2003).

Weiter war zu klären, wie die beiden Prozesse der TLR2- abhängigen Aufnahme von LcrV und die intrazelluläre Aktivierung von Nod- Rezeptoren verknüpft sind. Um diese Prozesse sauber analysieren zu können, sollten die beiden Funktionen von TLR2 einerseits als Signaltransduktionsrezeptor, andererseits als Aufnahmerezeptor für LcrV voneinander getrennt werden. Dies wurde durch Kotransfektion von dominant negativem MyD88 in CD14/TLR2/Nod- oder von dominant negativem TLR2 in CD14/Nod- transfizierten HEK 293-R Zellen bewerkstelligt. Ausserdem wurden MyD88-/- Makrophagen mit Wildtypmakrophagen bezüglich LcrV- Aufnahme und LcrV- induzierter Zytokinproduktion (IL-10, TNF- $\alpha$ ) bzw. NF- $\kappa$ B- Aktivierung verglichen. So konnte gezeigt werden, dass die TLR2- abhängige LcrV- Aufnahme unabhängig von der Signalling- Funktion von TLR2 abläuft. Unter Verwendung von Inhibitoren intrazellulärer Transportprozesse bzw. der Endosomenbildung wurde sowohl im Transfektionsmodell als auch im Makrophagenmodell nachgewiesen, dass nach Aufnahme von LcrV vor der NF- $\kappa$ B- Aktivierung über Nod1/2 aktin- und clathrin- involvierende Schritte ablaufen müssen. Damit kann für TLR2 eine neuartige „Shuttle- Funktion“ zugeordnet werden. Aufgrund dieser „Shuttle- Funktion“ transportiert TLR2 LcrV zu intrazellulären Kompartimenten und macht es somit zugänglich für eine weitere Erkennung durch zytosolische Nod- Rezeptoren. Für dendritische Zellen wurden Mikrotubuli als Transportweg für TLR2 und TLR4

vorgeschlagen, da diese Rezeptoren in zytoplasmatischen tubulovesikulären Strukturen beobachtet werden konnten und ein intaktes Mikrotubulisystem für die durch *Neisseria meningitidis* ausgelöste IL-12-Produktion erforderlich ist (Uronen-Hansson et al. 2004).

Gegenwärtig ist der genaue Mechanismus dafür noch ungeklärt, wie nach der Aufnahme in vesikulösen Strukturen befindliches LcrV ins Zytosol gelangt, um dort Nod-Rezeptoren zu stimulieren. Möglich wäre eine Lyse der Vesikelmembran oder ein Protein-Retro-Translokationsvorgang (Tsai et al. 2002) unter Fusion von ER- und Phagosomenmembran (Desjardins et al. 2003). Letzterer dient z.B. auch als Erklärung für den im Rahmen der Antigenpräsentation ablaufenden „phagosome-to-cytosol pathway“ und ist in der hypothetischen Modellabbildung für den extra- und intrazellulären Signaltransduktionsweg von LcrV berücksichtigt (s. Abb.45).



**Abb. 45 Modell des LcrV- Signaltransduktionswegs über TLR2 und Nod1/2.**

Links ist die TLR2- abhängige Signalkaskade dargestellt, rechts die von der Signaltransduktionsfähigkeit unabhängige TLR2- vermittelte LcrV- Endozytose mit hypothetischer Retro- Translokation bzw. ER- Fusion und anschließender Nod- Aktivierung. CM= Zytoplasmamembran, ER= Endoplasmatisches Reticulum, V= LcrV.

Aus den Beobachtungen zur Interaktion von LcrV mit dem Nod- System lässt sich schließen, dass LcrV mittels TLR2 endozytiert wird, um dann intrazellulär über Nod1/2 IL-10 zu induzieren. Die bislang beschriebenen Nod- Agonisten stellen Abbauprodukte von Peptidoglykan, also hochkonservierte PAMPS dar. Bei LcrV handelt es sich daher um das erste mikrobielle Protein, das über Nod1/2 immunmodulierend wirkt. Die angeborene Immunantwort wird hierbei doppelt ausgenutzt, da über Rezeptoren des angeborenen Immunsystems mittels IL-10-Induktion die Immunantwort des Wirtes supprimiert wird. Durch die Aufnahme von LcrV in die Zelle wird möglicherweise auch eine Erkennung und Bekämpfung durch die adaptive Immunität umgangen. Die Strategie von *Y. enterocolitica* erscheint sehr effektiv: das Bakterium nutzt sowohl Transmembran- als auch intrazelluläre Rezeptoren des angeborenen Immunsystems aus, um auf zwei Wegen eine Lähmung der Immunabwehr zu erreichen, was auch eine Aktivierung der adaptiven Immunität verzögern könnte.

## 7 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation konnte der immunsuppressive Effekt von LcrV, über IL-10- Induktion eine TNF- $\alpha$ - Suppression auszulösen, auf TLR2 und Nod1/2 zurückgeführt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass ein bakterieller Virulenzfaktor den für die Vermeidung einer überschüssigen Immunreaktion wichtigen Mechanismus einer TLR- Toleranz im Rahmen einer TLR- Homo- bzw. Heterotoleranzinduktion für seine Zwecke ausnutzt. Weiter konnte die LcrV-induzierte Signaltransduktion analysiert werden. Hierbei wurde herausgefunden, dass das LcrV- Signaling CD14- und TLR2- abhängig ist. Die in der Arbeit dargestellten *in vitro* und *in vivo*- Ergebnisse zeigen, dass Yersinien TLR2 ausnutzen, um über diesen Rezeptor der angeborenen Immunität die erste Immunantwort des Wirtes zu unterwandern. Als nicht- lipidiertes Protein eines Gram-negativen Bakteriums begründet LcrV nicht nur eine neue Klasse von bakteriellen TLR2- Agonisten, sondern als virulenz- assoziiertes Protein auch eine neue bakterielle Strategie, Rezeptoren (TLR2) und auch Effektoren (IL-10, TNF $\alpha$ ) des angeborenen Immunsystems zur Umgehung der Wirtsimmunantwort zu nutzen. Für das LcrV-homologe Protein PcrV des opportunistischen Erregers *P. aeruginosa*, das weder eine IL-10- Induktion noch eine TNF- $\alpha$ - Suppression zeigte, konnte eine CD14/TLR2- Aktivität ausgeschlossen werden. Der Vergleich dieser Proteine zeigt auf, dass die Ausnutzung wirtseigener Effektoren eine pathogenetische Strategie ist, die obligat pathogene Bakterien von opportunistischen Erregern unterscheidet.

Aufgrund der Diskrepanz in der immunmodulatorischen Wirkung von LcrV und PcrV wurde eine N-terminal lokalisierte LcrV- Domäne, die bei PcrV fehlt, als mögliche CD14/TLR2- aktive Domäne gefunden und näher untersucht. Unter Verwendung synthetischer Oligopeptide gelang es, die aktive Region von LcrV für das immunmodulierende CD14/TLR2- Signalling auf die Aminosäureregion aa31-aa57 einzugrenzen und durch punktmutierte Peptide und die zugehörigen Proteine mit voller LcrV- Länge schliesslich an der Existenz bestimmter Aminosäuren festzumachen. Ausserdem wurde hiermit der erste Nachweis einer TLR- Stimulierbarkeit durch nicht- lipidierte Peptide erbracht. Der endgültige Beweis für eine immunsupprimierende Wirkung der aktiven Region von LcrV über TLR2 wurde durch Konstruktion einer Yersinien- Mutante mit einem Aminosäureaustausch an

Position 42 von LcrV erbracht, die keine LcrV- abhängige Immunmodulation über CD14/TLR2 mehr zeigte. Diese konnte in Mausinfektionsversuchen auch die Relevanz der LcrV- Wirkung für den Ausgang einer *Y. enterocolitica* Infektion beweisen. So konnte mit einer Yersinie mit TLR2- inaktivem LcrV, das alle übrigen Funktionen jedoch noch erfüllte, der nicht unbeträchtliche Beitrag von LcrV zur Gesamtpathogenität einer Yersinie verdeutlicht werden. Durch Verwendung von TLR2-/- und IL-10-/- Mäusen konnte auch die entscheidende Rolle von TLR2 und des endogenen Effektors IL-10 für die LcrV- induzierte Immunsuppression im Wirtsorganismus bewiesen werden.

Auf der Suche nach möglichen intrazellulären Rezeptoren für LcrV wurden Nod1 und Nod2 identifiziert. Die Nod- aktive Region konnte auf die N- terminalen 130 Aminosäuren von LcrV eingegrenzt werden. *Y. enterocolitica* scheint die angeborene Immunantwort mit Hilfe des N- Terminus von LcrV doppelt- über den Transmembranrezeptor TLR2 und über die intrazellulären, löslichen Rezeptoren Nod1 und Nod2 zur Induktion einer Immunmodulation über IL-10 zu nutzen. Bei der Untersuchung der Frage, wie LcrV in die Zelle gelangt, wurde eine neuartige Shuttle-Funktion von TLR2 entdeckt, welches LcrV der Nod- Signalkaskade zuführt. Damit wurde erstmals gezeigt, dass ein TLR für die intrazelluläre Aufnahme eines bakteriellen Liganden benötigt wird. Darüber hinaus stellt LcrV das erste bekannte Protein und den dritten mikrobiellen Faktor dar, der von Nod1/2 erkannt wird.

Insgesamt gesehen wurde in dieser Arbeit die elaborierte Strategie eines pathogenen Erregers genauer beleuchtet, der Effektoren (IL-10 im Rahmen einer TLR-Toleranz- Induktion) und extra- sowie intrazelluläre Rezeptoren des angeborenen Immunsystems ausnutzt, um so durch Vortäuschung des Endes einer Bedrohung durch ein Pathogen das Immunsystem zu überlisten und sich im Wirt auszubreiten. Aus der Arbeit können neue Einsichten in die Pathogen- Wirts- Interaktionen und in Struktur- Wirkungsbeziehungen von bakteriellen Proteinen in ihren Rezeptorinteraktionen mit LRR- haltigen Rezeptoren gewonnen werden. Es werden Ansatzpunkte geliefert, um durch Manipulation des TLR- bzw. Nod- Systems neue therapeutische Strategien zu entwickeln. Im Hinblick auf die Mutation im *NOD2*- Gen, die mit Morbus Crohn in Verbindung gebracht wird, kann die vorliegende Arbeit neue Ideen für die Ursachenforschung entzündlicher Erkrankungen liefern.

Die in dieser Arbeit gewonnenen grundlegenden Erkenntnisse über die Wirkung eines bakteriellen Virulenzfaktors am Beispiel humanpathogener Yersinien auf das

angeborene Immunsystem, hier speziell über das TLR- und Nod- Rezeptorsystem, können als Grundlage zur Impfstoffentwicklung (Pulendran et al. 2004) und zur Therapie überschüssiger Immunreaktionen dienen. Hierbei könnten LcrV oder davon abgeleitete Peptide Verwendung finden, wie z.B. der Einsatz von LcrV zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion nach einer Transplantation im Tierversuch bereits gezeigt hat (Motin et al.1997). Eine Schwierigkeit für den Einsatz von LcrV oder davon abgeleiteten evtl. in ihrer Aktivität verbesserten Peptide als lokal oder systemisch anwendbare Immunsuppressiva stellt allerdings die Protein-/Peptid-Natur dar, so dass geeignete Formulierungen gefunden werden müssen, die LcrV vor proteolytischer Degradation schützen und es so je nach Anwendung sinnvoll applizierbar machen. Aus galenischer Sicht bietet sich dabei vor allem die Verabreichung als parenterales Depotpräparat, z.B. in Form von Mikropartikeln, an (Reithmeier et al. 2001). Das Protein wird dabei durch Umhüllung mit einem Hilfsstoff vor hydrolytischer und proteolytischer Degradation geschützt und nach Injektion der Zubereitung kontrolliert über einen Zeitraum von Tagen bis hin zu Monaten aus der Zubereitung freigesetzt. Es könnte auch möglich sein, LcrV in einer derartigen Formulierung als Depot-Injektionspräparat einzusetzen. Eine weitere Möglichkeit aus galenischer Sicht würde die kovalente Bindung von LcrV an eine Polyoxyethylenglykolkette (=PEGylierung) darstellen, wodurch der Abbau des Proteins durch sterische Hinderung von proteolytischen Enzymen verringert wird und sich dadurch die Plasmahalbwertszeit erhöht (Harris u. Chess 2003, Rosendahl et al. 2005).

## 8 Literaturverzeichnis

Abreu MT, Arditi M. 2004. Innate immunity and toll-like receptors: clinical implications of basic science research. *J. Pediatr.* 144: 421-429.

Achtmann M, Morelli G, Zhu P, Wirth T, Diehl I, Kusecek B, Vogler AJ, Wagner DM, Allender CJ, Easterday WR, Chenal- Francisque V, Worsham P, Thomson NR, Parkhill J, Lindler LE, Carniel E, Keim P. 2004. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110: 17837-17842.

Aepfelbacher M, Zumbihl R, Ruckdeschel K, Jacobi CA, Barz C, Heesemann J. 1999. The tranquilizing injection of *Yersinia* proteins: a pathogen's strategy to resist host defence. *Biol. Chem.* 380: 795-802.

Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. 2002. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J. Infect. Dis.* 186: 1522-1525.

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. *Eur. J. Immunol.* 32: 1958-1968.

Akira S, Yamamoto M, Takeda K. 2003. Role of adaptors in toll-like receptor signalling. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 637-642.

Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 499-511.

Amer AO, Swanson MS. 2002. A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 56-61.

Anisimov AP, Lindler LE, Pier GB. 2004. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 434-464.

Autenrieth IB, Heesemann, J. 1992. *In vivo* neutralization of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma abrogates resistance to *Yersinia enterocolitica* infection in mice. *Med. Microbiol. Immunol. Berl.* 181: 333-338.

Beeson PB. 1947. Tolerance to bacterial pyrogens. I. Factors influencing its development. *J. Exp. Med.* 86: 9-38

Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM. 2003. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* 24: 528-533.

Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Rossi G, Mambula SS, Vecchi A, Mantovani A, Levitz SM, Romani L. 2004. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J. Immunol.* 172: 3059-3069.

- Bergman T, Hakansson S, Forsberg A, Norlander L, Macellaro A, Backman A, Bolin I, Wolf-Watz H. 1991. Analysis of the V antigen *lcrGVH-yopBD* operon of *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for a regulatory role of LcrH and LcrV. *J. Bacteriol.* 173: 1607-1616.
- Berlato C, Cassatella MA, Kinjyo I, Gatto L, Yoshimura A, Bazzoni F. 2002. Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *J. Immunol.* 168: 6404-6411.
- Bertin J, Nir WJ, Fischer CM, Tayber OV, Errada PR, Grant JR, Keilty JJ, Gosselin ML, Robison KE, Wong GH, Glucksmann MA, DiStefano PS. 1999. Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 274: 12955-12958.
- Beuscher HU, Rödel F, Forsberg A, Röllinghoff M. 1995. Bacterial evasion of host immune defense: *Yersinia enterocolitica* encodes a suppressor for tumor necrosis factor alpha expression. *Infect. Immun.* 63: 1270-1277.
- Beutler B, Poltorak A. 2000. The search for Lps: 1993-1998. *J. Endotoxin Res.* 6: 269-293.
- Beutler B, Rietschel ET. 2003. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 169-176.
- Beutler B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 40: 845-859.
- Bleves S, Cornelis GR. 2000. How to survive in the host: the *Yersinia* lesson. *Microbes Infect.* 2: 1451-1460.
- Boland A, Sory MP, Iriarte M, Kerbouch C, Wattiau P, Cornelis GR. 1996. Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *EMBO J.* 15: 5191-5201.
- Bottone EJ. 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 257-276.
- Bottone EJ. 1999. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect.* 1: 323-333.
- Bouma G, Strober W. 2003. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 521-533.
- Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J. Exp. Med.* 197: 1119-1124.
- Brubaker RR. 2003. Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to *Yersinia*: roles of Yops and LcrV (V antigen). *Infect. Immun.* 71: 3673-3681.



- Burrows TW. 1956. An antigen determining virulence in *Pasteurella pestis*. *Nature* 177: 426- 427.
- Buwitt-Beckmann U, Heine H, Wiesmuller KH, Jung G, Brock R, Akira S, Ulmer AJ. 2004. Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. *Eur. J. Immunol.* 35: 282-289.
- Campos MA, Closel M, Valente EP, Cardoso JE, Akira S, Alvarez-Leite JI, Ropert C, Gazzinelli RT. 2004. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J. Immunol.* 172: 1711-1718.
- Carneiro LA, Travassos LH, Philpott DJ. 2004. Innate immune recognition of microbes through Nod1 and Nod2: implications for disease. *Microbes Infect.* 6: 609-616.
- Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes Infect.* 3: 561-569.
- Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ. 2003a. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell. Microbiol.* 5: 581-592.
- Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, Ogura Y, Kawasaki A, Fukase K, Kusumoto S, Valvano MA, Foster SJ, Mak TW, Nuñez G, Inohara N. 2003b. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* 4: 702-707.
- Chin AI, Dempsey PW, Bruhn K, Miller JF, Xu Y, Cheng G. 2002. Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses. *Nature* 416: 190-194.
- Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. 2004. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat. Immunol.* 5: 975-979.
- Cornelis GR. 1998. The *Yersinia* deadly kiss. *J. Bacteriol.* 180: 5495-5504.
- Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, Sory MP, Stainier I. 1998. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1315-1352.
- Cornelis GR 2002a. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 742-752.
- Cornelis GR 2002b. The *Yersinia* Ysc-Yop virulence apparatus. *Int. J. Med. Microbiol.* 291: 455-462.
- Cornelis GR. 2002c. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J. Cell Biol.* 158: 401-408.
- Coutinho A, Forni L, Melchers F, Watanabe T. 1977. Genetic defect in responsiveness to the B cell mitogen lipopolysaccharide. *Eur. J. Immunol.* 7: 325-328.

- Cross AS. 2002. Endotoxin tolerance - current concepts in historical perspective. *J. Endotoxin Res.* 8: 83-98.
- Darrah PA, Monaco MC, Jain S, Hondalus MK, Golenbock DT, Mosser DM. 2004. Innate immune responses to *Rhodococcus equi*. *J. Immunol.* 173: 1914-1924.
- Darville T, O'Neill JM, Andrews CW Jr, Nagarajan UM, Stahl L, Ojcius DM. 2003. Toll-like receptor-2, but not Toll-like receptor-4, is essential for development of oviduct pathology in chlamydial genital tract infection. *J. Immunol.* 171: 6187-6197.
- Davies PJ, Davies DR, Levitzki A, Maxfield FR, Milhaud P, Willingham MC, Pastan IH. 1980. Transglutaminase is essential in receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin and polypeptide hormones. *Nature* 283 : 162-167.
- DeBord KL, Lee VT, Schneewind O. 2001. Roles of LcrG and LcrV during type III targeting of effector Yops by *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 183: 4588-4598.
- Derewenda U, Mateja A, Devedjiev Y, Routzahn KM, Evdokimov AG, Derewenda ZS, Waugh DS. 2004. The structure of *Yersinia pestis* V-antigen, an essential virulence factor and mediator of immunity against plague. *Structure* 12: 301-306.
- Desjardins M. 2003. ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 280-291.
- Dobrovolskaia MA, Vogel SN. 2002. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect.* 4: 903-914.
- Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, Cuesta N, Toshchakov V, Ren T, Cody MJ, Michalek SM, Rice NR, Vogel SN. 2003. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signalling pathway components. *J. Immunol.* 170: 508-519.
- Drennan MB, Nicolle D, Quesniaux VJ, Jacobs M, Allie N, Mpagi J, Fremont C, Wagner H, Kirschning C, Ryffel B. 2004. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am. J. Pathol.* 164: 49-57.
- Dunzendorfer S, Lee HK, Soldau K, Tobias PS. 2004. TLR4 is the signaling but not the lipopolysaccharide uptake receptor. *J. Immunol.* 173: 1166-1170.
- Enkhbayar P, Kamiya M, Osaki M, Matsushima N. 2004. Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins. *Proteins* 54: 394-403.
- Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W, Landmann R. 2002. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J. Infect. Dis.* 186: 798-806.
- Edelson BT, Unanue ER. 2002. MyD88-dependent but Toll-like receptor 2-independent innate immunity to *Listeria*: no role for either in macrophage listericidal activity. *J. Immunol.* 169: 3869-3875.

Fan H, Cook JA. 2004. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J. Endotoxin Res.* 10: 71-84.

Favorite, GO, Morgan HR. 1942. Effects produced by the intravenous injection in man of a toxic antigenic material derived from *Bordetella typhosa*: clinical, hematological, chemical and serological studies. *J. Clin. Invest.* XXI: 589-599.

Feng CG, Scanga CA, Collazo-Custodio CM, Cheever AW, Hieny S, Caspar P, Sher A. 2003. Mice lacking myeloid differentiation factor 88 display profound defects in host resistance and immune responses to *Mycobacterium avium* infection not exhibited by Toll-like receptor 2 (TLR2)- and TLR4-deficient animals. *J. Immunol.* 171: 4758-4764.

Fields KA, Nilles ML, Cowan C, Straley SC. 1999a. Virulence role of V antigen of *Yersinia pestis* at the bacterial surface. *Infect. Immun.* 67: 5395-5408.

Fields KA, Straley SC. 1999b. LcrV of *Yersinia pestis* enters infected eukaryotic cells by a virulence plasmid-independent mechanism. *Infect. Immun.* 67: 4801-4813.

Fredriksson-Ahomaa M, Koch U, Klemm C, Bucher M, Stolle A. 2004. Different genotypes of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 strains widely distributed in butcher shops in the Munich area. *Int. J. Food Microbiol.* 95: 89-94.

Freudenberg MA, Salomao R, Sing A, Mitov I, Galanos C. 1998. Reconciling the concepts of endotoxin sensitization and tolerance. *Prog. Clin. Biol. Res.* 397: 261-268.

Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. 2003. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol. Ther.* 100: 171-194.

Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp Med.* 197: 1107-1117.

Gao JJ, Xue Q, Zuvanich EG, Haghi KR, Morrison DC. 2001. Commercial preparations of lipoteichoic acid contain endotoxin that contributes to activation of mouse macrophages in vitro. *Infect. Immun.* 69: 751-757.

Gerke C, Falkow S, Chien YH. 2005. The adaptor molecules LAT and SLP-76 are specifically targeted by *Yersinia* to inhibit T cell activation. *J Exp Med.* 201: 361- 371.

Girardin SE, Tournebize R, Mavris M, Page AL, Li X, Stark GR, Bertin J, DiStefano PS, Yaniv M, Sansonetti PJ, Philpott DJ. 2001. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep.* 2: 736-742.

Girardin SE, Sansonetti PJ, Philpott DJ. 2002. Intracellular vs extracellular recognition of pathogens--common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol.* 10: 193-199.

Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ. 2003a. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol.* 24: 652-658.

Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zahringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ,

Girardin SE, Travassos LH, Herve M, Blanot D, Boneca IG, Philpott DJ, Sansonetti PJ, Mengin-Lecreulx D. 2003c. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J. Biol. Chem.* 278: 41702-41708.

Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti, PJ. 2003d. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 278: 8869-8872.

Goure J, Pastor A, Faudry E, Chabert J, Dessen A, Attree I. 2004. The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect. Immun.* 72: 4741-4750.

Grassl GA, Bohn E, Muller Y, Buhler OT, Autenrieth IB. 2003. Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasins beyond invasion. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 41-54.

Häcker 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.

Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, Wilson CB, Miller SI. 2002. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat. Immunol.* 3: 354-359.

Harris JM, Chess RB. 2003. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov.* 2: 214- 221.

Heesemann J, Laufs R. 1983. Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J. Bacteriol.* 155: 761-767

Heesemann J, Keller C, Morawa R, Schmidt N, Siemens HJ, Laufs R. 1983. Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 147:107-115.

Heesemann J, Laufs R. 1985. Double Immunofluorescence Microscopic Technique for Accurate Differentiation of Extracellularly and Intracellularly Located Bacteria in Cell Culture: *J. of Clinical Microbiol.* 22: 168-175.

Heesemann J, Gross U, Schmidt N, Laufs R. 1986. Immunochemical Analysis of Plasmid- Encoded Proteins Released by Enteropathogenic *Yersinia* sp. Grown in Calcium- Deficient Media. *Infection and Immunity* 54: 561-567.

Heesemann J. 2001. Die Gattung *Yersinia*, Yersiniosen. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G. Medizinische Mikrobiologie. 8. Auflage. Urban & Fischer Verlag. München, Jena: S. 315-329.

Heesemann J, Rakin A. 2002. Epidemiologie, Klinik und mikrobiologische Diagnostik der Pest. *Antibiotika Monitor* 18:  
[http://www.antibiotikamonitor.at/12\\_02/12\\_02\\_02.htm](http://www.antibiotikamonitor.at/12_02/12_02_02.htm)

Heine H, Lien E. 2003. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int Arch. Allergy Immunol.* 130: 180-192.

Helms JB, Zurzolo C. 2004. Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic.* 5: 247-254.

Hensel A, Nikolaou K, Bartling C, Petry T, Arnold T, Rosler U, Czerny CP, Truyen U, Neubauer H. 2004. The prevalence of anti-yersinia outer protein antibodies in Bavarian slaughter pigs. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 117 : 30-8.

Heppner G, Weiss D. 1965. High susceptibility of strain A mice to endotoxin and endotoxin-red blood cell mixtures. *J. Bacteriol.* 90: 696-703.

Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A. 1999. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 2396-2401.

Hill J, Leary SE, Griffin KF, Williamson ED, Titball RW. 1997. Regions of *Yersinia pestis* V antigen that contribute to protection against plague identified by passive and active immunization. *Infect. Immun.* 65: 4476-4482.

Hoiczky E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A, Heesemann J. 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* Yad A and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO.* 19: 5989- 5999.

Hoiczky E, Blobel G. 2001. Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 4669-4674.

Holmström A, Olsson J, Cherepanov P, Maier E, Nordfelth R, Pettersson J, Benz R, Wolf-Watz H, Forsberg, A. 2001. LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol. Microbiol.* 39: 620-632.

Hoffmann R, van Erp K, Trülzsch K, Heesemann J. 2004. Transcriptional responses of murine macrophages to infection with *Yersinia enterocolitica*. *Cell Microbiol.* 6: 377- 390

Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. 2002a. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 3: 1033-1040.

Hornef MW, Frisan T, Vandewalle A, Normark S, Richter-Dahlfors A. 2002b. Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.* 195: 559-570.

Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 168: 4531-4537.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 162: 3749-3752.

Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nuñez G. 1999. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.* 274: 14560-14567.

Inohara N, Koseki T, Lin J, del Peso L, Lucas PC, Chen FF, Ogura Y, Nuñez G. 2000. An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 275: 27823-27831.

Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nuñez G. 2001. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* 276: 2551-2554.

Inohara N, Ogura Y, Nuñez G. 2002. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 76-80.

Inohara N, Nuñez G. 2003a. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 371-382.

Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nuñez G. 2003b. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2: implications for Crohn's disease. *J. Biol. Chem.* 278: 5509-5512.

Jacinto R, Hartung T, McCall C, Li L. 2002. Lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced tolerance and cross-tolerance: distinct alterations in IL-1 receptor-associated kinase. *J. Immunol.* 168: 6136-6141.

Janeway CA, Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197-216

Jude BA, Pobezinskaya Y, Bishop J, Parke S, Medzhitov RM, Chervonsky AV, Golovkina TV. 2003. Subversion of the innate immune system by a retrovirus. *Nat. Immunol.* 4: 573-578.

Juris SJ, Shao F, Dixon JE. 2002. *Yersinia* effectors target mammalian signalling pathways. *Cell. Microbiol.* 4: 201-211.

Karp CL, Wysocka M, Ma X, Marovich M, Factor RE, Nutman T, Armant M, Wahl L, Cuomo P, Trinchieri G. 1998. Potent suppression of IL-12 production from monocytes and dendritic cells during endotoxin tolerance. *Eur. J. Immunol.* 28: 3128-3136.

Kim JG, Lee SJ, Kagnoff MF. 2004. Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect. Immun.* 72: 1487-1495.

Kimbrell DA, Beutler B. 2001. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat. Rev. Genet.* 2: 256-267.

Kirschning CJ, Wesche H, Merrill Ayres T, Rothe M. 1998. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 188: 2091-2097.

Kitchens RL, Wang P, Munford RS. 1998. Bacterial lipopolysaccharide can enter monocytes via two CD14-dependent pathways. *J. Immunol.* 161: 5534-5545.

Knapp S, Wieland CW, van 't Veer C, Takeuchi O, Akira S, Florquin S, van der Poll T. 2004. Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense. *J. Immunol.* 172: 3132-3138.

Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA Jr, Medzhitov R, Flavell RA. 2002a. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell.* 110: 191-202.

Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, Galan JE, Nuñez G, Janeway CA, Medzhitov R, Flavell RA. 2002b. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* 416: 194-199.

Kobe B, Kajava AV. 2001. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol.* 11: 725- 732.

Koedel U, Angele B, Rupprecht T, Wagner H, Roggenkamp A, Pfister HW, Kirschning CJ. 2003. Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis. *J. Immunol.* 170: 438-444.

Kopp E, Medzhitov R. 2002. A plague on host defense. *J. Exp Med.* 196: 1009-1012.

Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, Arnold MM, Knipe DM, Finberg RW. 2004. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 1315-1320.

Latz E, Visintin A, Lien E, Fitzgerald KA, Monks BG, Kurt-Jones EA, Golenbock DT, Espevik T. 2002. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the Toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J. Biol. Chem.* 277: 47834-47843.

Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* 5: 190-198.

Lawton DG, Longstaff C, Wallace BA, Hill J, Leary SE, Titball RW, Brown KA. 2002. Interactions of the type III secretion pathway proteins LcrV and LcrG from *Yersinia pestis* are mediated by coiled-coil domains. *J. Biol. Chem.* 277: 38714-38722.

Leary SE, Williamson ED, Griffin KF, Russell P, Eley SM, Titball RW. 1995. Active immunization with recombinant V antigen from *Yersinia pestis* protects mice against plague. *Infect. Immun.* 63: 2854-2858.

Lee VT, Tam C, Schneewind O. 2000. LcrV, a substrate for *Yersinia enterocolitica* type III secretion, is required for toxin targeting into the cytosol of HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 275: 36869-36875.

Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR, Hartung T. 2001. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol.* 166: 5161-5167.

Lemaitre B. 2004. The road to Toll. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 521-527.

Li L, Cousart S, Hu J, McCall CE. 2000. Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells. *J. Biol. Chem.* 275: 23340-23345.

Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR, Golenbock DT. 2000. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 105: 497-504.

Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. 2000. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect. Immun.* 68: 6398-6401.

Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. 2002. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch. Intern. Med.* 162: 1028-1032.

Matson JS, Nilles ML. 2001. LcrG-LcrV interaction is required for control of Yops secretion in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 183: 5082-5091.

Mancuso G, Midiri A, Beninati C, Biondo C, Galbo R, Akira S, Henneke P, Golenbock D, Teti G. 2004. Dual role of TLR2 and myeloid differentiation factor 88 in a mouse model of invasive group B streptococcal disease. *J. Immunol.* 172: 6324-6329.

Manes S, del Real G, Martinez-A C. 2003. Pathogens: raft hijackers. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 557-568.

Marenne MN, Journet L, Mota LJ, Cornelis GR. 2003. Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: role of LcrV, YscF and YopN. *Microb Pathog.* 35: 243-258.



Martin M, Katz J, Vogel SN, Michalek SM. 2001. Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *J. Immunol.* 167:5278-5285.

Matson JS, Nilles ML. 2001. LcrG-LcrV interaction is required for control of Yops secretion in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 183: 5082-5091.

Mazzoni A, Segal DM. 2004. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J. Leukoc. Biol.* 75: 721-730.

Medvedev AE, Lentschat A, Wahl LM, Golenbock DT, Vogel SN. 2002. Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J Immunol.* 169: 5209-5216.

Medvedev AE, Lentschat A, Kuhns DB, Blanco JC, Salkowski C, Zhang S, Arditi M, Gallin JI, Vogel SN. 2003. Distinct mutations in IRAK-4 confer hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and interleukin-1 in a patient with recurrent bacterial infections. *J. Exp. Med.* 198: 521-531.

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.

Meier A, Kirschning CJ, Nikolaus T, Wagner H, Heesemann J, Ebel F. 2003. *Cell Microbiol.* 5: 561- 570.

Morgan HR. 1948. Resistance to the action of the endotoxins of enteric bacilli in man. *J. Clin. Invest.* 27: 706-709

Morr M, Takeuchi O, Akira S, Simon MM, Muhlradt PF. 2002. Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by toll-like receptors. *Eur. J. Immunol.* 32: 3337-3347.

Motin VL, Nakajima R, Smirnov GB, Brubaker RR. 1994. Passive immunity to yersiniae mediated by anti-recombinant V antigen and protein A-V antigen fusion peptide. *Infect. Immun.* 62: 4192-4201.

Motin VL, Kutas SM, Brubaker RR. 1997. Suppression of mouse skin allograft rejection by protein A-*Yersiniae* V antigen fusion peptide. *Transplantation.* 63: 1040-1042.

Mun HS, Aosai F, Norose K, Chen M, Piao LX, Takeuchi O, Akira S, Ishikura H, Yano A. 2003. TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Int. Immunol.* 15: 1081-1087.

Munro S. 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell.* 115: 377-388.

Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K. 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* 3: 667-672.

- Naitza S, Ligoxygakis P. 2004. Antimicrobial defences in *Drosophila*: the story so far. *Mol. Immunol.* 40: 887-896.
- Nakajima R, Brubaker RR. 1993. Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* 61: 23-31.
- Nakajima R, Motin VL, Brubaker RR. 1995. Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. *Infect. Immun.* 63: 3021-3029.
- Nedialkov YA, Motin VL, Brubaker RR. 1997. Resistance to lipopolysaccharide mediated by the *Yersinia pestis* V antigen-polyhistidine fusion peptide: amplification of interleukin-10. *Infect. Immun.* 65: 1196-1203.
- Netea MG, van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. 2004a. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J. Leukoc. Biol.* 75: 749-755.
- Netea MG, Kullberg BJ, De Jong DJ, Franke B, Sprong T, Naber TH, Drenth JP, Van Der Meer JW. 2004b. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur. J. Immunol.* 34: 2052-2059.
- Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, van Krieken JH, Hartung T, Adema G, Kullberg BJ. 2004c. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol.* 172: 3712-3718.
- Neyt C, Cornelis GR. 1999. Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol. Microbiol.* 33: 971-981.
- Nilles ML, Williams AW, Skrzypek E, Straley SC. 1997. *Yersinia pestis* LcrV forms a stable complex with LcrG and may have a secretion-related regulatory role in the low-Ca<sup>2+</sup> response. *J. Bacteriol.* 179: 1307-1316.
- Nilles ML, Fields KA, Straley SC. 1998. The V antigen of *Yersinia pestis* regulates Yop vectorial targeting as well as Yop secretion through effects on YopB and LcrG. *J. Bacteriol.* 180: 3410-3420.
- Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K, Akira S. 2000. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J. Immunol.* 164:3476-3479.
- Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nuñez G. 2001. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 276: 4812-4818.
- O'Neill LA, Fitzgerald KA, Bowie AG. 2003. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol.* 24: 286-290.

Opitz B, Püschel A, Schmeck B, Hocke AC, Rosseau S, Hammerschmidt S, Schumann RR, Suttorp N, Hippenstiel S. 2004. Nucleotide-binding Oligomerization Domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 279:36426-36432.

Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 13766-13771.

Pauleau AL, Murray PJ. 2003. Role of Nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. *Mol. Cell. Biol.* 23: 7531-7539.

Perry RD, Fetherston JD. 1997. *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 35-66.

Persson C, Nordfelth R, Holmstrom A, Hakansson S, Rosqvist R, Wolf-Watz H. 1995. Cell-surface-bound *Yersinia* translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarized mechanism into the target cell. *Mol. Microbiol.* 18: 135-150.

Pettersson J, Holmstrom A, Hill J, Leary S, Frithz-Lindsten E, von Euler-Matell A, Carlsson E, Titball R, Forsberg A, Wolf-Watz H. 1999. The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol. Microbiol.* 32: 961-976.

Philpott DJ. 2003b. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science.* 300: 1584-1587.

Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku CL, Bustamante J, Yang K, Soudais C, Dupuis S, Feinberg J, Fieschi C, Elbim C, Hitchcock R, Lammas D, Davies G, Al-Ghonaïm A, Al-Rayes H, Al-Jumaah S, Al-Hajjar S, Al-Mohsen IZ, Frayha HH, Rucker R, Hawn TR, Aderem A, Tufenkeji H, Haraguchi S, Day NK, Good RA, Gougerot-Pocidal MA, Ozinsky A, Casanova JL. 2003. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 299: 2076-2079.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.

Poussin C, Foti M, Carpentie JL, Pugin J. 1998. CD14-dependent endotoxin internalization via a macropinocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 273: 20285-20291.

Prentice MB, Gilbert T, Cooper A. 2004. Was the Black Death caused by *Yersinia pestis*? *Lancet Infect. Dis.* 4: 72.

Price SB, Cowan C, Perry RD, Straley SC. 1991. The *Yersinia pestis* V antigen is a regulatory protein necessary for Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent growth and maximal expression of low-Ca<sup>2+</sup> response virulence genes. *J. Bacteriol.* 173: 2649-2657.

Puel A, Picard C, Ku CL, Smahi A, Casanova JL. 2004. Inherited disorders of NF-kappaB-mediated immunity in man. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 34-41.

Pulendran B. 2004. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunol. Rev.* 199: 227-250.

Radow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C, Volk HD. 1995. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* 181: 1887-1892.

Raoult D, Drancourt M. 2002. Cause of Black Death. *Lancet Infect. Dis.* 2: 459.

Rehli M. 2002. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol.* 23: 375-378.

Reiling N, Holscher C, Fehrenbach A, Kroger S, Kirschning CJ, Goyert S, Ehlers S. 2002. Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 169: 3480-3484.

Reithmeier H, Herrmann J, Göpferich A. 2001. Lipid microparticles as a parenteral device for peptides. *J. Control Release.* 15: 339-350.

Reithmeier-Rost D, Bierschenk S, Filippova N, Schröder-Braunstein J, Sing A. 2005. *Yersinia V* antigen induces both TLR homo- and heterotolerance in an IL-10-involving manner. *Cell. Immunol.*

Roggenkamp A, Geiger AM, Leitritz L, Kessler A, Heesemann J. 1997. Passive immunity to infection with *Yersinia* spp. mediated by anti-recombinant V antigen is dependent on polymorphism of V antigen. *Infect. Immun.* 65: 446-451.

Roggenkamp A, Leitritz L, Sing A, Kempf VAJ, Baus K, Heesemann J. 1999. Anti-recombinant V antigen serum promotes uptake of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 by macrophages. *Med. Microbiol. Immunol.* 188: 151-159.

Ropert C, Closel M, Chaves AC, Gazzinelli RT. 2003. Inhibition of a p38/stress-activated protein kinase-2-dependent phosphatase restores function of IL-1 receptor-associate kinase-1 and reverses Toll-like receptor 2- and 4-dependent tolerance of macrophages. *J. Immunol.* 171: 1456-1465.

Rosenberger CM, Finlay BB. 2003. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4: 385-396.

Rosendahl MS, Doherty DH, Smith DJ, Carlson SJ, Chipala EA, Cox GN. 2005. A long- acting, highly potent interferon alpha-2 conjugate created using site- specific PEGylation. *Bioconjug. Chem.* 16: 200-207.

Rosqvist R, Magnusson KE, Wolf-Watz H. 1994. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia YopE* cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.* 13: 964-972.

- Rosqvist R, Persson C, Hakansson S, Nordfeldt R, Wolf-Watz H. 1995. Translocation of the *Yersinia* YopE and YopH virulence proteins into target cells is mediated by YopB and YopD. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 13: 230-234.
- Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Schubert S, Heesemann J. 1996. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect. Immun.* 64: 724-733.
- Ruckdeschel K, Mannel O, Schrottner P. 2002. Divergence of apoptosis-inducing and preventing signals in bacteria-faced macrophages through myeloid differentiation factor 88 and IL-1 receptor-associated kinase members. *J. Immunol.* 168: 4601-4611.
- Rusmann H. 2003. Toxine. Biogene Gifte und potenzielle Kampfstoffe. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz* 46: 989-996.
- Sabroe I, Read RC, Whyte MK, Dockrell DH, Vogel SN, Dower SK. 2003. Toll-like receptors in health and disease: complex questions remain. *J. Immunol.* 171: 1630-1635.
- Sambrook, Fritsch, Maniatis. 1989. *Molekular Cloning. A Laboratory Manual.*
- Sandor F, Latz E, Re F, Mandell L, Repik G, Golenbock DT, Espevik T, Kurt-Jones EA, Finberg RW. 2003. Importance of extra- and intracellular domains of TLR1 and TLR2 in NFkappa B signaling. *J. Cell. Biol.* 162: 1099-1110.
- Sansonetti P. 2001. Phagocytosis of bacterial pathogens: implications in the host response. *Semin. Immunol.* 13: 381-390.
- Sarker MR, Neyt C, Stainier I, Cornelis GR. 1998. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J. Bacteriol.* 180: 1207-1214.
- Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Muhlradt PF, Takeda K, Akira S. 2000. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J. Immunol.* 165:7096-7101.
- Sato S, Takeuchi O, Fujita T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. 2002. A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways. *Int. Immunol.* 14: 783-791.
- Sawa T, Yahr TL, Ohara M, Kurahashi K, Gropper MA, Wiener-Kronish JP, Frank DW. 1999. Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat. Med.* 5: 392-398.
- Schjetne KW, Thompson KM, Nilsen N, Flo TH, Fleckenstein B, Iversen JG, Espevik T, Bogen B. 2003. Cutting edge: link between innate and adaptive immunity: Toll-like receptor 2 internalizes antigen for presentation to CD4+ T cells and could be an efficient vaccine target. *J. Immunol.* 171: 32-36.
- Schmidt A, Röllinghoff M, Beuscher HU. 1999. Suppression of TNF by V antigen of *Yersinia* spp. involves activated T cells. *Eur. J. Immunol.* 29: 1149-1157.

- Schoehn G, Di Guilmi AM, Lemaire D, Attree I, Weissenhorn W, Dessen A. 2003. Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *EMBO J.* 22: 4957-4967.
- Schröder NW, Heine H, Alexander C, Manukyan M, Eckert J, Hamann L, Gobel UB, Schumann RR. 2004. Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses. *J. Immunol.* 173: 2683-2691.
- Schubert S, Rakin A, Heesemann J. 2004. The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol.* 294: 83-94.
- Sharma RK, Sodhi A, Batra HV, Tuteja U. 2004. Effect of rLcrV and rYopB from *Yersinia pestis* on murine peritoneal macrophages in vitro. *Immunol. Lett.* 93: 179-187.
- 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.
- Sing A, Roggenkamp A, Geiger AM, Heesemann J. 2002a. *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J. Immunol.* 168: 1315-1321.
- Sing A, Rost D, Tvardovskaia N, Roggenkamp A, Wiedemann A, Kirschning CJ, Aepfelbacher M., Heesemann J. 2002b. *Yersinia* V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin-10 mediated immunosuppression. *J. Exp. Med.* 196: 1017-1024.
- Sing A, Tvardovskaia N, Rost D, Kirschning CJ, Wagner H, Heesemann J. 2003a. Contribution of toll-like receptors 2 and 4 in an oral *Yersinia enterocolitica* mouse infection model. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 341-348.
- Sing A, Rost D, Tvardovskaia N, Roggenkamp A, Geiger AM, Kirschning CJ, Wiedemann A, Aepfelbacher M, Heesemann J. 2003b. Mechanisms of *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen. *Adv. Exp. Med. Biol.* 529: 165-167.
- Skrzypek E, Straley SC. 1995. Differential effects of deletions in *lcrV* on secretion of V antigen, regulation of the low-Ca<sup>2+</sup> response, and virulence of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 177: 2530-2542.
- Sly LM, Rauh MJ, Kalesnikoff J, Song CH, Krystal G. 2004. LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance. *Immunity.* 21: 227-239.
- Sodhi A, Sharma RK, Batra HV, Tuteja U. 2004. Mechanism of rLcrV and rYopB mediated immunosuppression in murine peritoneal macrophages. *Mol. Immunol.* 41: 767-774.

- Soong G, Reddy B, Sokol S, Adamo R, Prince A. 2004. TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 113: 1482-1489.
- Sory MP, Cornelis GR. 1994. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol. Microbiol.* 14: 583-594.
- Stojiljkovic I, Hantke K. 1992. Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB- dependent systems in gram- negative bacteria. *EMBO J.* 11: 4359-4367.
- Sugawara I, Yamada H, Li C, Mizuno S, Takeuchi O, Akira S. 2003. Mycobacterial infection in TLR2 and TLR6 knockout mice. *Microbiol. Immunol.* 47: 327-336.
- Takada H, Yokoyama S, Yang S. 2002. Enhancement of endotoxin activity by muramyl dipeptide. *J. Endotoxin Res.* 8: 337-342.
- Takakuwa T, Knopf HP, Sing A, Carsetti R, Galanos C, Freudenberg MA. 1996. Induction of CD14 expression in Lpsn, Lpsd and tumor necrosis factor receptor-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 26: 2686-2692.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21:335-376.
- Takeda K, Akira S. 2004. Microbial recognition by Toll-like receptors. *J. Dermatol. Sci.* 34: 73-82.
- Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol.* 165: 5392-5396.
- Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* 13: 933-940.
- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.* 169: 10-14.
- Tanabe T, Chamillard M, Ogura Y, Zhu L, Qiu S, Masumoto J, Ghosh P, Moran A, Predergast MM, Tromp G, Williams CJ, Inohara N, Nunez G. 2004. Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J.* 23: 1587-1597.
- Tardy F, Hombie F, Neyt C, Wattiez R, Cornelis GR, Ruyschaert JM, Cabiaux V. 1999. *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *EMBO J.* 18: 6793-6799.
- Thieblemont N, Wright, SD. 1997. Mice genetically hyporesponsive to lipopolysaccharide (LPS) exhibit a defect in endocytic uptake of LPS and ceramide. *J. Exp. Med.* 185: 2095-2100.

- Titball RW, Hill J, Lawton DG, Brown KA. 2003. *Yersinia pestis* and plague. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 104-107.
- Torres D, Barrier M, Bihl F, Quesniaux VJ, Mailliet I, Akira S, Ryffel B, Erard F. 2004. Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.* 72: 2131-2139.
- Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, Blanot D, Nahori MA, Werts C, Boneca IG. 2004. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* 5: 1000-1006.
- Triantafilou M, Brandenburg K, Gutschmann T, Seydel U, Triantafilou K. 2002. Innate recognition of bacteria: engagement of multiple receptors. *Crit. Rev. Immunol.* 22: 251-268.
- Triantafilou M, Manukyan M, Mackie A, Morath S, Hartung T, Heine H, Triantafilou K. 2004. Lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 internalization and targeting to the Golgi is lipid raft dependent. *J. Biol. Chem.* 279: 40882-40889.
- Trülsch K, Sporleder T, Igwe EI, Rüssmann H, Heesemann J. 2004. Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect Immun.* 72: 5227-5234.
- Tsai B, Ye Y, Rapoport TA. 2002. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 246-255.
- Twigg G. 2003. The Black Death and DNA. *Lancet Infect. Dis.* 3: 11.
- Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401: 811-815.
- Underhill DM, Ozinsky A. 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 825-852.
- Underhill DM. 2004. Toll-like receptors and microbes take aim at each other. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 483-487.
- Une T, Brubaker RR. 1984. Roles of V antigen in promoting virulence and immunity in yersiniae. *J. Immunol.* 133: 2226-2230.
- Une T, Nakajima R, Brubaker RR. 1987. Roles of V antigen in promoting virulence in Yersiniae. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 9: 179-185.
- Uronen-Hansson H, Allen J, Osman M, Squires G, Klein N, Callard RE. 2004. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 are present inside human dendritic cells, associated with microtubules and the Golgi apparatus but are not detectable on the cell surface: integrity of microtubules is required for interleukin-12 production in response to internalized bacteria. *Immunology.* 111: 173-178.



Vasselon T, Hailman E, Thieringer R, Detmers PA. 1999. Internalization of monomeric lipopolysaccharide occurs after transfer out of cell surface CD14. *J. Exp. Med.* 190: 509-521.

Vavricka SR, Musch MW, Chang JE, Nakagawa Y, Phanvijhitsiri K, Waypa TS, Merlin D, Schneewind O, Chang EB. 2004. hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology.* 127: 1401-1409.

Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Memet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL. 2004. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat. Immunol.* 5: 1166-1174.

Villamon E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE, Fradelizi D, Gil ML. 2004. Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes Infect.* 6: 1-7.

Wang G, Ma Y, Buyuk A, McClain S, Weis JJ, Schwartz I. 2004. Impaired host defense to infection and Toll-like receptor 2-independent killing of *Borrelia burgdorferi* clinical isolates in TLR2-deficient C3H/HeJ mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 231: 219-225.

Wang JH, Doyle M, Manning BJ, Di Wu Q, Blankson S, Redmond HP. 2002. Induction of bacterial lipoprotein tolerance is associated with suppression of toll-like receptor 2 expression. *J. Biol. Chem.* 277:36068-36075.

Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. 2004. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat. Immunol.* 5: 800-808.

Weiss DS, Raupach B, Takeda K, Akira S, Zychlinsky A. 2004. Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J. Immunol.* 172: 4463-4469.

Wiedemann A, Linder S, Grassl G, Albert M, Authenrieth I, Aepfelbacher M. 2001. *Yersinia enterocolitica* invasin triggers phagocytosis via  $\beta$ 1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages. *Cell. Microbiol.* 3: 693-702.

Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Travchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ. 2001. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2- dependent mechanism. *Nat Immunol.* 2: 346-352.

Wilson M, Seymour R, Henderson B. 1998. Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infect Immun.* 66: 2401-2409.

Winkle S. Kulturgeschichte der Seuchen. Artemis & Winkler. München, Düsseldorf, Zürich. 1997

Wolfert MA, Murray TF, Boons GJ, Moore JN. 2002. The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 277: 39179-39186.

- Wood J, DeWitte-Avina S. 2003. Was the Black Death yersinial plague? *Lancet Infect. Dis.* 3: 327-328.
- Wooten RM, Ma Y, Yoder RA, Brown JP, Weis JH, Zachary JF, Kirschning CJ, Weis JJ. 2002. Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*. *J. Immunol.* 168: 348-355.
- Wren BW. 2003. The yersiniae- a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 1: 55-64.
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431-1433.
- Wysocka M, Robertson S, Riemann H, Caamano J, Hunter C, Mackiewicz A, Montaner LJ, Trinchieri G, Karp CL. 2001. IL-12 suppression during experimental endotoxin tolerance: dendritic cell loss and macrophage responsiveness. *J Immunol.* 166: 7504-7513.
- Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, Tong L. 2000. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 408: 111-115.
- Yamamoto M, Takeda K, Akira S. 2004. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol. Immunol.* 40: 861-868.
- Yang S, Tamai R, Akashi S, Takeuchi O, Akira S, Sugawara S, Takada H. 2001. Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infect. Immun.* 69: 2045-2053.
- Yeo SJ, Yoon JG, Hong SC, Yi AK. 2003. CpG DNA induces self and cross-hyporesponsiveness of RAW264.7 cells in response to CpG DNA and lipopolysaccharide: alterations in IL-1 receptor-associated kinase expression. *J. Immunol.* 170: 1052-1061.
- Zhang M, Tracey KJ. 1998. Tumor necrosis factor. In: Thomson AW. The cytokine handbook. 3. Auflage. Academic Press, San Diego-London: S. 517-548.
- Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Futterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmüller G. 1988. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int. J. Cancer.* 41: 456-461.

## **Mein herzlicher Dank gilt:**

Herrn Prof. J. Heesemann, der mich während der gesamten Arbeit motiviert, bestens betreut und immer wieder auf den „richtigen Kurs“ in der Forschung gebracht hat.

Herrn Prof. H. Grobecker, für die effiziente Betreuung der Arbeit als Erstgutachter, die sehr schöne Stadtführung in Zürich und die sehr nette Betreuung während der letzten Phase der Dissertation.

Andreas Sing für das optimale Arbeitsklima, die freundschaftliche Zusammenarbeit und die menschlich sehr nette und kompetente Unterstützung.

Suse Bierschenk für ihr außergewöhnliches Engagement in der Forschung und die freundschaftliche und lustige Zusammenarbeit.

Hicham Bouabe für die Konstruktion der hilfreichen Nod- EGFP- Konstrukte.

Natalia Tvardovskaja für ihre Freundschaft.

Gottfried Wilharm und Klaus Ruckdeschel für ihre kompetente Hilfe bei allen Fragen und Problemen.

Allen Mitarbeitern des MvP, die zum guten Arbeitsklima und dem Gelingen der Arbeit beigetragen haben, insbesondere Percy Schröttner, dem Literaturkreis (Nina Weber, Katharina Werber, Hanna Scheller, Beatrix Lehnert, Kathy Niedung und Sandra Lechner), Jutta Schröder- Braunstein und Rudi Haase (für die unbegrenzte Bereitstellung neuer Zellen).

Meiner Familie für die mentale und finanzielle Unterstützung, durch welche die Doktorarbeit ermöglicht wurde, insbesondere meinem Ehemann Helmut Reithmeier für die Geduld während der gesamten Doktorarbeit.