

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
der Universität Tübingen**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth**

***Yersinia* YopP-induzierter Zelltod in dendritischen  
Zellen:**

**Einfluss der Cysteinproteaseaktivität von YopP,  
des Toll-like-Rezeptors 4 und der Todesrezeptoren  
TNF-R, CD95/Fas und TRAIL-R**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Sebastian Schulz**

**aus  
Engen**

**2008**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. I. B. Autenrieth

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Wesselborg



Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis:

1.	<b>Einleitung</b>	7
1.1	Dendritische Zellen (DC)	7
1.1.1	Die Rolle von DC innerhalb des Immunsystems	7
1.1.2	Aktivierung und Reifung von DC	8
1.2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	9
1.2.1	Morphologie und klinische Bedeutung	9
1.2.2	Pathogenitätsfaktoren von <i>Yersinia enterocolitica</i>	10
1.2.2.1	YopP	12
1.3	Toll-Like-Receptor (TLR) System	13
1.4	Apoptose	14
1.4.1	Morphologie	14
1.4.2	Apoptoseinduktion via Todesrezeptoren	16
1.5	Aufgabenstellung	17
2.	<b>Material und Methoden</b>	19
2.1	Mäuse	19
2.2	Gewinnung und Kultur von Dendritischen Zellen (DC)	19
2.3	Zellmedien und Zusätze	19
2.4	Zelllinien	20
2.5	Bakterienstämme und Wachstumsbedingungen	20
2.6	Infektion von Dendritischen Zellen	22
2.6.1	Caspasenhemmung	22
2.7	Apoptosemessung	22
2.7.1	Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ )	22
2.7.2	Messung der DNA-Fragmentierung	23
2.7.3	Positivkontrollen	23
2.8	NF- $\kappa$ B ELISA	24
2.8.1	Herstellung nukleärer Extrakte	24
2.8.2	Proteinbestimmung	24

2.8.3	NF- $\kappa$ B ELISA	25
2.9	Färbung von Oberflächenrezeptoren auf Zellen	26
2.9.1	Färbung mit nicht-farbstoffmarkierten Antikörpern	26
2.9.2	Färbung mit farbstoffmarkiertem Antikörper	27
2.10	Apoptoseinduktion durch Rezeptorliganden	27
2.11	Statistik	28
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1	Zeitlicher Verlauf der Apoptoseinduktion durch YopP in DC	29
3.2	NF- $\kappa$ B ELISA	31
3.3	Einfluss von Toll-like-Rezeptoren auf den YopP-vermittelten Zelltod in DC	34
3.4	Apoptosekinetik in TLR2xTLR4-defizienten DC vs. Wildtyp-DC	38
3.5	Abhängigkeit der YopP-induzierten Apoptose in TLR 2 <sup>-/-</sup> xTLR4 <sup>-/-</sup> DC vs. Wildtyp DC von Caspasen	39
3.6	Rolle der Todesrezeptoren TNFR, CD95/Fas und TRAIL bei der YopP-vermittelten Apoptoseinduktion in DC	41
3.6.1	TNF-Rezeptor	41
3.6.2	CD95/Fas-Rezeptor	46
3.6.3	TRAIL-Rezeptor	51
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>66</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>82</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>83</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Dendritische Zellen (DC)**

#### **1.1.1 Die Rolle von DC innerhalb des Immunsystems**

Für die Abwehr von Pathogenen in einem Organismus sind sowohl die angeborene als auch die erworbene, antigenspezifische Immunabwehr notwendig (39,51,68). Eine wichtige Aufgabe an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Abwehr leisten die so genannten antigenpräsentierenden Zellen (APC), da die Zellen der erworbenen Abwehr nicht in der Lage sind, eigenständig Pathogene zu erkennen.

Dendritische Zellen bilden eine einzigartige Gruppe innerhalb der APC, weil sie als einzige in der Lage sind, in lymphatischen Organen T-Zell-Aktivierung gegen Antigene hervorzurufen, die aus peripheren Regionen wie z.B der Haut oder der Mukosa stammen (8,13,14).

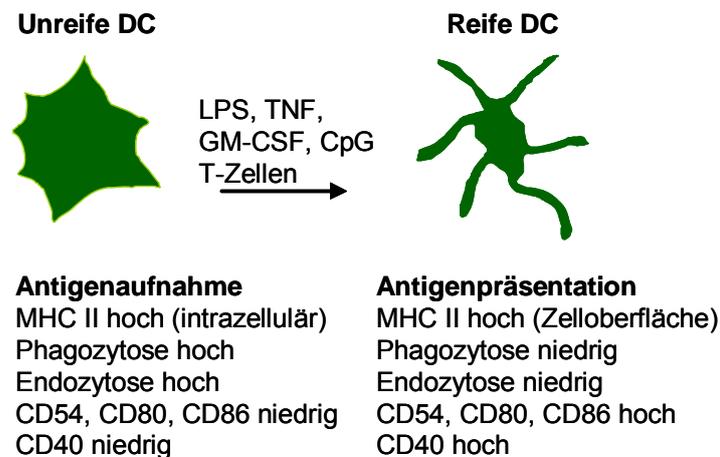
Es gibt verschiedene Unterteilungen innerhalb der DC, unterschieden und benannt nach ihrer Lokalisation im Organismus. Sie befinden sich überwiegend an der Grenze des Organismus zu seiner Umgebung (12) und zeichnen sich durch ein bestimmtes Oberflächenmolekül, CD11c, aus. DC zeigen eine ausgeprägte Phagozytosefähigkeit. Nach Aufnahme von Antigenen und deren Prozessierung werden diese mittels MHC-Molekülen auf der Oberfläche der DC T-Zellen in sekundärlymphatischen Organen präsentiert; DC aktivieren damit das erworbene Immunsystem (43,109) .

Es werden einerseits antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche dann CD8<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen regulieren, und andererseits antigenunspezifische Makrophagen, eosinophile Granulozyten sowie NK-Zellen aktiviert. Zudem sind DC an der Toleranzentwicklung des Immunsystems gegenüber körpereigenen Antigenen beteiligt (21). Vermutlich sorgen sie zusätzlich für das Überleben von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen (21) und für die Entstehung des T-Zell-Immungedächtnisses (89).

In der Entwicklung der DC werden vier Stadien unterschieden:

1. knochenmarkständige Vorläuferzellen,
2. precursor DC, die in Blut und lymphatischem System zirkulieren und bei Kontakt mit Pathogenen große Mengen von Zytokinen, wie  $\text{INF-}\gamma$ , freisetzen,
3. unreife, gewebsständige DC, die eine hohe endozytotische und phagozytotische Kompetenz auszeichnet,
4. reife DC, die in sekundärlymphatischen Organen durch die starke Expression von kostimulierenden Oberflächenmolekülen die Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung vermitteln.

### 1.1.2 Aktivierung und Reifung von DC



**Abb.1.1: Merkmale von DC, die sich während der Reifung ändern**

Unreife DC sind nicht in der Lage, Antigene zu präsentieren. MHC-Moleküle werden, bis auf eine kleine Fraktion an der Zelloberfläche (24,88), intrazellulär gespeichert. Mit der Reifung der DC, die über Rezeptoren wie Toll-Like-Rezeptoren, Fc-Rezeptoren und Zytokinrezeptoren eingeleitet wird (68,87), sind grundlegende funktionelle und morphologische Änderungen verbunden.

Antigenaufnahme, Phagozytose und Mikropinozytose sind vermindert (101), die MHC-Moleküle werden aus intrazellulären Bereichen an die Zelloberfläche verlagert, Antigenprozessierung und die Halbwertszeit von MHC-Molekülen wird gesteigert (24,88) und die Expression von T-Zell-kostimulierenden Molekülen, wie CD40, CD80 und CD86, wird erhöht. Zudem wandern die DC vom peripheren Gewebe in das sekundärlymphatische Gewebe ab.

## **1.2 *Yersinia enterocolitica***

### **1.2.1 Morphologie und klinische Bedeutung**

Zur Gattung *Yersinia* (Familie *Enterobacteriaceae*) gehören gramnegative, pleomorphe, fakultativ anaerobe, nicht sporenbildende Stäbchenbakterien. Die optimale Wachstumstemperatur dieser Bakterien liegt bei 27 bis 30°C. Es sind mit *Y. pestis*, dem Erreger der Pest, *Y. pseudotuberculosis*, dem Erreger der Pseudoappendizitis, und *Y. enterocolitica* (*Y.e.*) drei humanpathogene Arten bekannt (20).

Die Infektion mit den enteropathogenen Yersinien *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* erfolgt fäkal-oral über kontaminierte Nahrungsmittel (4,30); klinisch zeigt sich das Bild einer Yersiniose in der Regel als akute Gastroenteritis bzw. Enterocolitis und mesenterialer Lymphadenitis, welche aber zu meist selbstlimitierend ablaufen.

Sowohl chronische (52), als auch septische Verläufe, die Abszesse in Milz, Leber und anderen Organe bedingen und insbesondere bei immunsuppressiv behandelten Patienten (18,19,84) vorkommen, sind selten.

Als Spätfolge können immunpathologische Erkrankungen wie reaktive Arthritis, Erythema nodosum oder eine Uveitis auftreten (2,3,34,110).

*Y. enterocolitica* ist für Mensch und Nager gleichermaßen enteropathogen und ruft in diesen Spezies vergleichbare Symptome und Krankheitsverläufe hervor (23,50). Deshalb eignen sich gerade Mausmodelle für Untersuchungen der Pathogenität von *Y. enterocolitica*.

*Y. enterocolitica* gilt als extrazelluläres Pathogen (10,35,47), in manchen Fällen tritt es auch intrazellulär auf (63).

Nach gastrointestinaler Passage bilden die M-Zellen im Follikel-assoziierten Epithel der Peyer`schen Plaques des Dünndarms das Ziel für *Y. enterocolitica* (10,42,47), durch welche sie mittels Transzytose in die Payer`schen Plaques gelangen, ihren Vermehrungsort. Der Kontakt der Yersinien mit dem Darmepithel verursacht die Sekretion von Zytokinen (7,58), welche die Einwanderung von Monozyten und polymorphkernigen Leukozyten (PMN) bedingen (11). Die beschriebenen Zellen inklusive NK-Zellen stellen die erste Reihe der angeborenen Immunabwehr gegen *Y. enterocolitica*. *Y. enterocolitica* verfügt über mehrere Virulenzfaktoren, welche es dem Bakterium ermöglichen, die Immunabwehr des Wirtes zu überwinden. Dabei kommt es zur Dissemination der Yersinien in mesenteriale Lymphknoten und weitere Organe des retikuloendothelialen Systems, möglicherweise zellvermittelt durch B-Lymphozyten (65), PMN (99) oder dendritische Zellen (DC) (104).

### **1.2.2 Pathogenitätsfaktoren von *Yersinia enterocolitica***

Die drei humanpathogenen Yersinienarten weisen als zentralen Pathogenitätsfaktor das so genannte Yop-Virulon (*Yersinia* outer protein) auf, welches extrachromosomal auf einem 70kb großen Plasmid (pYV = plasmid *yersinia* virulence) liegt.

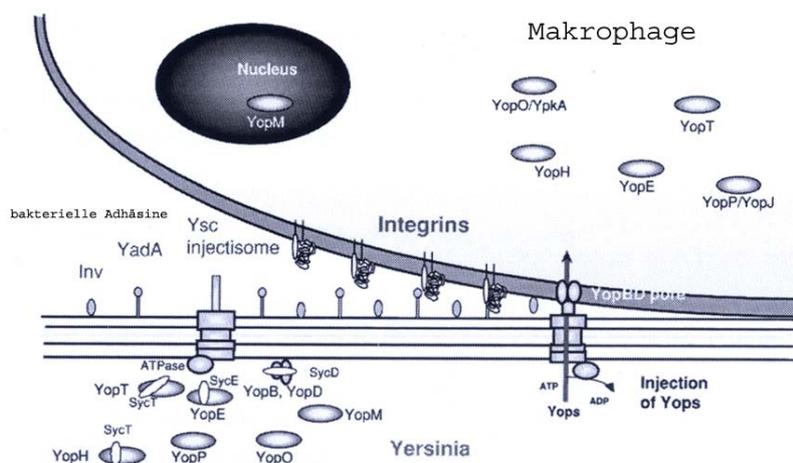
Dieses Virulon kodiert u.a. für die Proteine des sogenannten Typ III-Sekretionssystem TTSS (Type III secretion system) (29). Über dieses werden Pathogenitätsfaktoren (Yop-Effektorproteine) von extrazellulär lokalisierten *Yersinia* in das Zytosol von Wirtszellen eingeschleust. Diese Yop-Effektorproteine (Yop E, H, T, M, O, P) werden ebenfalls von Genen des Yop-Virulons kodiert. Effektor-Yops sind als intrazelluläre Faktoren beschrieben worden (92,93).

Bei den Yop-Effektorproteinen werden sechs Faktoren unterschieden, die an verschiedenen Punkten innerhalb der Zielzelle ansetzen.

Für die Faktoren YopH, YopE, YopT und YopO wurde gezeigt, dass sie mit dem Zytoskelett der Zielzelle interagieren und somit einen mindernden Einfluss auf die Phagozytose von Yersinien durch Makrophagen (15,41,91) und PMN (114) haben. Dabei liegt keine Redundanz dieser Faktoren vor – für einen optimalen antiphagozytotischen Effekt in der Zelle ist die Anwesenheit aller vier Proteine notwendig (41).

Die Phosphotyrosinphosphatase YopH (125) dephosphoryliert fokale Adhäsionsproteine wie CAS und Fyb (46); der Ansatzpunkt von YopE, YopT und der Serin-/Threoninkinase YpkA/YopO ist die Zytoskelettorganisation und damit die Phagozytose (28).

Die Synthese von Yop-Effektoren ist bei einer Temperatur von 37°C, also der menschlichen Körpertemperatur, maximal. Bei Kontakt mit entsprechenden Zielzellen haften die Yersinien, vermittelt durch ein bakterielles Adhäsion, an die Oberfläche der Zelle. Daraufhin werden die Yops durch das TTSS in die Zielzellen injiziert.



**Abb. 1.2: Sekretion der Yops durch das Ysc-Injektisom und die Translokation durch die Zellmembran des Wirtes (27)**

Bein entsprechenden Wachstumsbedingungen (37°C; angereichertes Medium) exprimieren und synthetisieren Yersinien mehrere Kopien des Ysc-Injektisoms und der Yops. Ein Kontakt zwischen Bakterium und eukaryontischer Zielzelle wird über Adhäsine (Inv, YadA) und Integrine hergestellt. Nachdem das Bakterium an die Zelloberfläche gebunden hat, werden Sekretionskanäle geöffnet und die Translokator-Yops in die Zelle transloziert. YopB und YopD bilden eine Pore in der Plasmamembran, wodurch die Effektor-Yops durch die Membran exportiert werden können.

### 1.2.2.1 YopP

Die zentrale Wirkung von YopP (YopJ in *Y. pseudotuberculosis*) ist die Hemmung des Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B). Dieser hat eine antiapoptotische Wirkung über die vermehrte Expression antiapoptotischer Proteine wie FLIP, TRAF 1/2, JNK, Bcl-x<sub>L</sub> und cIAP 1/2.

Vermittelt durch seine Proteaseaktivität verhindert YopP (Homolog zu YopJ in *Y. pseudotuberculosis*) über eine Deubiquitylierung von TRAF2 und TRAF6 indirekt die Aktivierung NF- $\kappa$ B (127). Darüber hinaus verhindert YopP die Aktivierung von NF- $\kappa$ B auf indirektem Weg, indem YopP einen verminderten Abbau des direkten Inhibitors von NF- $\kappa$ B, inhibitor kappa B  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ) durch das Proteasom verursacht. Dadurch kann NF- $\kappa$ B nicht vom Zytosol in den Zellkern translozieren (95). Diese verminderte NF- $\kappa$ B-Aktivierung sowie die Spaltung von Procaspasen führen zu apoptotischem Zelltod in Makrophagen (32) und DC (38).

Neueste Erkenntnisse zeigten, dass YopP auch upstream von I $\kappa$ -B in den NF- $\kappa$ B-Signalweg eingreift. TAK1 (TGF- $\beta$ -activated-kinase 1), ein wichtiger Aktivator von I $\kappa$ -B, wird durch YopP inaktiviert, was eine verminderte NF- $\kappa$ B- und MAP-Kinasen-Aktivität verursacht (45).

Die YopP-vermittelte Inhibition von NF- $\kappa$ B tritt in Makrophagen und DC erst mit einer Verzögerung von 60-90 Minuten nach der Infektion auf, da YopP erst von den Yersinien ins Zytoplasma transloziert werden muss. Im Gegensatz dazu wird NF- $\kappa$ B in den ersten 30 Minuten nach der Infektion vorübergehend vermehrt in den Kern transloziert und damit aktiviert (38,94). Dieser Effekt ist LPS-vermittelt und damit unabhängig von der Pathogenität des Yersinienstammes.

Interessanterweise steigerte LPS den Apoptose-induzierten Effekt von YopP um das Doppelte, wenn YopP-transfizierte Makrophagen im Anschluss an die Transfektion mit LPS behandelt wurden (95). Dass dieser proapoptotische LPS-Effekt über Toll-like-Rezeptor (TLR) 4 vermittelt sein könnte, ergaben Untersuchungen von Zhang und Bliska (123).

Für den schnellen Ablauf der YopP-induzierten Apoptose in Makrophagen ist die parallele Hemmung von MAP-Kinasen und NF- $\kappa$ B notwendig (124).

Neben der Beeinträchtigung der angeborenen Immunabwehr durch den YopP-induzierten Zelltod in APC zeigten neue Untersuchungen auch eine Hemmung der erworbenen Abwehr durch YopP-Infektion.

So zeigten beispielsweise Kramer und Wiedig (64), dass die Möglichkeit der Antigenpräsentation gegenüber T<sub>4</sub>-Helferzellen durch DC, infiziert mit *Yersinia enterocolitica*, verhindert wird. Diese Wirkung hängt hauptsächlich von YopP ab und läuft zusätzlich zum Zelltod ab. YopP verhindert außerdem das Priming von T<sub>8</sub>-Killerzellen und hemmt damit die Ausbildung des erworbenen Immunsystems, möglicherweise vermittelt durch eine Hemmung der Antigenpräsentation (111).

### **1.3 Toll-Like-Rezeptor (TLR) System**

Gramnegative Bakterien, wie z.B. Yersinien, tragen in ihrer äußeren Membran das so genannte Lipopolysaccharid (LPS), welches an bestimmte Rezeptoren von Zielzellen bindet.

Eine wichtige Gruppe dieser Rezeptoren, die auch auf Makrophagen und DC exprimiert werden (72,73), sind die Toll-like-Rezeptoren, die zur Familie der Transmembranrezeptoren Typ 1 gehören und damit nach extrazellulärer Bindung von LPS intrazelluläre Signale hervorrufen können.

Verschiedene mikrobielle Strukturen sind Liganden für diese Rezeptoren. Wichtig im Zusammenhang mit dieser Arbeit sind die Rezeptoren TLR2, an den vorwiegend LTA (Lipoteichonsäure) grampositiver Bakterien bindet, und TLR4, der LPS von gramnegativen Bakterien bindet (16).

Um das Signal von LPS in die Zelle weiterzuleiten, ist die Anwesenheit von Co-Rezeptoren notwendig wie LBP (LPS-bindendes Serumprotein) (119), MD-2 (62,105) und CD14.

Intrazellulär entsteht nach LPS-Bindung an TLR4 ein Komplex, der aus der TIR (Toll/IL-1-Receptor) Domäne des TLR4-Rezeptors und den Adaptermolekülen MyD88 und TRIF aufgebaut ist. Durch Anlagerung von LPS an den Rezeptor wird auf der internen Zellmembranseite IRAK (IL-1-receptor-associated kinase)

aktiviert; IRAK4 phosphoryliert IRAK1 (56), welches ins Zytosol dissoziiert und TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) (22) stimuliert.

TRAF6 aktiviert TAB1 und TAB2 (TAK1 binding protein 1 bzw. 2) als Adaptermoleküle. Dadurch wird die Kinase TAK1 (transforming growth factor  $\beta$  activated kinase 1) durch Phosphorylierung aktiviert. TAK1 hat einen stimulierenden Einfluss auf den I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK) aber auch auf den MAP (mitogen activated protein)-Kinasen Signalweg (118).

Der aktive IKK sorgt für die Ubiquitinylierung von I $\kappa$ B, dem Inhibitor von NF- $\kappa$ B, woraufhin sich I $\kappa$ B von der Signalsequenz von NF- $\kappa$ B (25) abspaltet und im Proteasom abgebaut wird (120,121).

NF- $\kappa$ B kann nun, in seine Untereinheiten p50 und p65 divergieren, in den Zellkern translozieren und dort als Transkriptionsfaktor die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-6 steigern. Dadurch wird das Überleben der Zelle unterstützt und der Entzündungsvorgang als Abwehr gegen die Infektion unterhalten.

## **1.4 Apoptose**

### **1.4.1 Morphologie**

Grundsätzlich wird zwischen zwei Formen des Zelltodes unterschieden. Einerseits kann die Zelle durch schädigende Einflüsse von außen, z.B. physikalische (Hitze), chemische (Säure, Laugen) oder biologische Reize (Mikroorganismen) zugrunde gehen. Dies erfolgt mit einer gleichzeitig ablaufenden Entzündung (6). Dabei kommt es zur Schwellung und Ruptur der Zelle, was eine Entzündungsreaktion bedingt. Dieser Vorgang wird als Nekrose bezeichnet.

Andererseits können bestimmte Stimuli (z.B. Zytokine, UV-Strahlen, radioaktive Strahlen, chemische Substanzen, Bakterien) einen Prozess in Gang setzen, der aktiv von der Zelle betrieben wird und ohne eine Entzündungsreaktion der Zellumgebung abläuft. Dieser Prozess ist für komplexe Organismen von hoher Bedeutung (Embryogenese, maligne Neoplasien). Apoptoti-

scher Zelltod kann extrazellulär über so genannte Todesrezeptoren erfolgen oder intrazellulär, z.B. über den mitochondrialen Weg.

Morphologisch kennzeichnet den programmierten Zelltod ein Umbau des Zytoskeletts, Schrumpfung des Zytoskeletts, das Ausstülpen von Membranabschnürungen (blebbing) (90,126), DNA-Fragmentation, Kondensation von nukleärem Chromatin und Bildung von membranumhüllten Apoptosekörperchen (apoptotic bodies). Wichtig für den entzündungsfreien Ablauf ist die Intaktheit der Zellmembran.

Die gebildeten Apoptosekörperchen werden über die Exposition von Phosphatidylserin auf der Membranoberfläche von Makrophagen erkannt und phagozytiert (102).

Zentrale Stellung im Apoptosesignalweg haben Caspasen, Aspartatproteasen, die sich in Form einer zytosolischen Kaskade entweder autokatalytisch (Caspase 8) oder gegenseitig (Caspase 3, 9) aktivieren und somit das Apoptosesignal an Moleküle weiterleiten, die mit der direkten Ausführung des Zelltodes betraut sind (z.B. APP und Rock).

Man unterscheidet nach ihrer Stelle in der Kaskade zwischen Initiatorcaspasen (Caspasen 8, 9 und 10), welche am Beginn der Kaskade stehen und Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6 und 7), die für nachfolgende Apoptosereaktionen verantwortlich sind.

Caspasen vermitteln die Unterbrechung des Zellzyklus, die Inaktivierung antiapoptotischer Moleküle der IAP-, TRAF- und Bcl-2-Familie (9,86,100) und die Aktivierung von CAD (Caspase activated Deoxyribonuclease), welche DNA zwischen den Nukleosomen durchtrennt. Die Spaltung des nukleären Lamins führt zur Schrumpfung des Zellkerns. Die Zellstruktur bricht zusammen, was durch die Spaltung von Zytoskelettproteinen wie Aktin hervorgerufen wird. Die apoptosetypischen Membranausstülpungen entstehen durch Spaltung der Kinase PAK2.

### 1.4.2 Apoptoseinduktion via Todesrezeptoren

Apoptotischer Zelltod kann grundsätzlich über zwei Hauptwege ausgelöst werden: Der mitochondriale („intrinsische“) Weg führt über die Freisetzung proapoptotischer Moleküle wie Cytochrom c aus dem Mitochondrium zur Aktivierung von Caspase 9 und nachfolgend zur Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7.

Der Todesrezeptorweg („extrinsisch“) führt über die transmembranösen Todesrezeptoren (TNF-R, CD95 (APO-1/Fas) und TRAIL (TNF $\alpha$  related apoptosis-inducing ligand)). Über die Bindung entsprechender Liganden, wie TNF $\alpha$ , Fas- und TRAIL-Ligand, an diese Todesrezeptoren wird programmierter Zelltod über Caspase 8, die Initiatorcaspase des extrinsischen Apoptoseweges, eingeleitet.

TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ), von Makrophagen sezerniert, spielt eine Rolle in der Entwicklung des Immunsystems, bei akuten Entzündungsreaktionen und der Kostimulation von Lymphozyten (17).

Die Auswirkung von TNF $\alpha$  auf Zellen ist stark von Zelltyp und deren Umgebung abhängig. Bei der Bindung von TNF $\alpha$  an den TNF-Rezeptor 1 wird NF- $\kappa$ B aktiviert und damit Apoptose verhindert. Sind jedoch Proteinbiosynthese oder der NF- $\kappa$ B-Weg der Zelle blockiert, wirkt TNF $\alpha$  proapoptotisch (112). Dabei bewirkt die Bindung des Liganden TNF $\alpha$  an TNF $\alpha$ -Rezeptor 1 eine Anlagerung von TRADD (TNF $\alpha$  receptor associated death domain) und weiterer Moleküle (TRAF 2, RIP 1) an den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors an. Der Komplex aus Rezeptor, TRADD, TRAF2 und RIP1, auch Complex 1 genannt, vermittelt die NF- $\kappa$ B-Aktivierung über den oben beschriebenen Weg via IKK und I- $\kappa$ B zu NF- $\kappa$ B und bewirkt somit Zellprotektion (83,122).

Mehr als zwei Stunden nach Bindung von TNF $\alpha$  an den Rezeptor dissoziiert Complex1 ins Zytoplasma, rekrutiert dort FADD (Fas-ligand associated death domain) und Caspase 8 und bildet mit diesen Complex 2, der Apoptose über Caspasen aktiviert (71).

Bei regelrechter NF- $\kappa$ B-Aktivierung können durch den zeitlichen Vorsprung Caspasen (3 und 9) gehemmt und antiapoptotische Proteine wie c-FLIP gebildet werden (69).

Bei Inhibition der NF- $\kappa$ B-Aktivierung führt Complex 2 zur Spaltung des antiapoptotischen Moleküls Bid, wodurch Apoptose über den mitochondrialen Weg induziert wird (33).

Ein weiterer Ligand, der die Apoptose induzieren kann, ist Fas, das zur TNF-Familie gehört (75) und an CD95 (Fas/APO-1) Rezeptor aus der TNF-Rezeptorfamilie (76) bindet.

Der Transmembranrezeptor weist auf der Zytoplasmaseite eine Todesdomäne (FADD) auf, welche die Apoptose initiiert (55,108). Es bildet sich an der Membrannenseite ein DISC (death inducing signaling complex), der aus Fas, FADD und Caspase 8 besteht und über die Caspasenkaskade Apoptose vermittelt.

Dabei ist das Signal sowohl von der Zellart (36,61,103) als auch von „lipid rafts“, Sphingolipid- und Cholesterolreiche, bewegliche Mikrodomänen in der Plasmamembran, in der Nähe des Rezeptors abhängig (5,37,53,70).

Das Protein TRAIL (TNF related apoptosis-inducing ligand) ist als weiterer Ligand eines Todesrezeptoren beschrieben; es werden fünf TRAIL-Rezeptoren (TRAIL-R1 bis R5) unterschieden, von denen aber nur TRAIL-R1 und –R2 eine intrazelluläre Todesdomäne besitzen und damit Apoptose induzieren können (82,117). Diese beiden Rezeptoren finden sich überwiegend auf entarteten Zellen wieder.

Der Weg der Apoptoseinduktion über TRAIL ist vergleichbar mit dem von CD95/Fas und kann alternativ bei blockiertem CD95/Fas-Signalweg aktiviert werden (67). Die überwiegende Präsenz von TRAIL-R1 und –R2 auf Tumorzellen bietet ein interessantes Potential in der Tumorthherapie (113).

## **1.5 Aufgabenstellung**

Für YopP aus *Yersinia enterocolitica* wurde bereits gezeigt, dass es in DC apoptotischen bzw. nekroseähnlichen Zelltod auslösen kann (38). YopP löst in

Makrophagen ebenfalls Zelltod aus, wobei die durch YopP inhibierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B eine zentrale Rolle spielt.

Da in DC ebenfalls eine YopP-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivität gezeigt werden konnte, soll in weiterführenden Experimenten geklärt werden, ob die verminderte Aktivierung von NF- $\kappa$ B nach 90 min ursächlich für die Zelltodinduktion ist oder nicht. Dazu sollen Zeitkinetiken und Infektionsversuche mit *Yersinien* in DC, die zuvor mit verschiedenen NF- $\kappa$ B-Inhibitoren vorinkubiert wurden, durchgeführt werden. Dadurch soll die NF- $\kappa$ B-Aktivierung zusätzlich zum NF- $\kappa$ B-inhibierenden Effekt von YopP unterdrückt werden unter der Vorstellung, dass in diesem Fall die YopP-bedingte Zelltodrate noch weiter ansteigen müsste.

Da bereits gezeigt wurde, dass LPS den Apoptose-induzierten Effekt von YopP um das Doppelte steigerte, wenn YopP-transfizierte Makrophagen im Anschluss an die Transfektion mit LPS behandelt wurden (95), soll untersucht werden, inwieweit die Anwesenheit von TLR4 den YopP-abhängigen Zelltod beeinflusst. Dazu soll die Zelltodrate von YopP-infizierten TLR2/4-defizienten DC im Gegensatz zu Wildtyp-DC über einen Zeitraum von 24 h gemessen werden. Zusätzlich soll kontrolliert werden, ob die Anwesenheit der intrazellulären Adaptermoleküle des TLR4-Rezeptors (MyD88 und TRIF) für den YopP-induzierten Zelltod essentiell sind, indem analog die Zelltodraten von Adapter-defizienten DC gegenüber Wildtyp-DC nach Infektion gemessen werden. Weiterhin soll die Rolle der Cysteinproteaseaktivität auf die Zelltodinduktion durch YopP mittels Infektion von DC mit einer katalytisch aktiven sowie einer katalytisch inaktiven *Yersiniamutante* untersucht werden.

Als weiterer Punkt soll der Einfluss der Todesrezeptoren (TNF-R1, CD95/Fas und TRAIL) auf den YopP-vermittelten Zelltod untersucht werden, da sie eine wichtige Rolle in der Apoptoseeinleitung in Zellen spielen.

Um diesen Einfluss zu klären, sollen erstens DC auf die Expression der entsprechenden Rezeptoren hin überprüft werden und zweitens Zelltodraten in DC, die Rezeptor-defizient (TNF-R1) sind, im Vergleich zu Wildtyp-DC ermittelt werden. Außerdem sollen DC mit *Yersinien* infiziert und zusätzlich über die entsprechenden Todesrezeptoren mittels Ligand oder aktivierenden Antikörpern stimuliert werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Mäuse**

BALB/c und C57BL/6 Mäuse wurden von der Firma Harlan Winkelmann (Borchem) bezogen. TLR2<sup>-/-</sup>xTLR4<sup>-/-</sup> (C57BL/6x129sv Zuchthintergrund) und C57BL/6x129sv Mäuse wurden von Carsten J. Kirschning bereitgestellt. MyD88<sup>-/-</sup> und TRIF<sup>lps2/lps2</sup> (letztere von Bruce Beutler bereitgestellt; beide C57BL/6 Zuchthintergrund) Mäuse sind bereits in der Literatur beschrieben (1). TNF p55<sup>-/-</sup> Mäuse (C57BL/6 Zuchthintergrund) stammten aus eigener Zucht. Für die Versuche wurden 6-10 Wochen alte, weibliche Mäuse benutzt.

### **2.2 Gewinnung und Kultur von Dendritischen Zellen (DC)**

Die DC wurden aus Knochenmarkzellen aus Tibia und Femur der entsprechenden Mäuse nach dem Protokoll von Lutz (66) gewonnen und in einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen pro 10 ml DC-Komplett-Medium (s.u.) in Petrischalen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach drei Tagen wurden 10 ml frisches Medium zugegeben. Am sechsten und achten Tag wurde das Medium gewechselt, indem 10 ml Überstand des alten Mediums abgenommen, zentrifugiert (5 min, 400 g) und dann in 10 ml frischem DC-Komplett-Medium resuspendiert und auf die Ausgangspetrischale zurückgegeben wurde. An Tag 8 waren circa 65 – 75% der Zellen CD11c positiv (DC-Oberflächenmarker).

### **2.3. Zellmedien und Zusätze**

Die Medien wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt und bei 4°C gelagert; für Versuchsansätze wurde antibiotikafreies Medium ohne GM-CSF Zugabe benutzt; fetales Kälberserum (FCS) wurde vor Gebrauch 30 min bei 56°C inaktiviert.

Tab. 2.1: Medium für Kultur von Dendritischen Zellen (DC-Komplett-Medium):

Substanz	Konzentration / Menge	Firma
VLE-RPMI 1640	500 ml	Biochrom, Berlin
Natriumpyruvat	1 mM	Biochrom, Berlin
nicht essentielle Aminosäuren	1 %	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	2 mM	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	100 U/ ml	Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	50 µM	Sigma, Taufkirchen
fetales Kälberserum (FCS)	10 %	Sigma, Taufkirchen
GM-CSF (Zellkulturüberstand der Maus-Myeloma Zelllinie P3X63)	200 U/ ml	

Tab. 2.2: Medium für T-Zellversuche:

Substanz	Konzentration / Menge	Firma
VLE-RPMI 1640	500 ml	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	2 mM	Invitrogen, Karlsruhe
FCS	5 %	Sigma, Taufkirchen
HEPES	10 mM	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	100 U/ ml	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.4 Zelllinien

Zur Kontrolle des TRAIL-Liganden wurde die humane Leukämie T-Zelllinie Jurkat J16 (freundlicherweise von S. Wesselborg bereitgestellt) benutzt (74).

## 2.5 Bakterienstämme und Wachstumsbedingungen

Tab. 2.3: Medium für Yersinienkultur (Luria-Bertani):

- Trypton	-10 g/ l
- Hefeextrakt	-5 g/ l
- Natriumchlorid	-5 g/ l
in 1 l H <sub>2</sub> O bidest. pH 7,4-7,6	

Tab. 2.4: verwendete Bakterienstämme:

<b><i>Y.enterocolitica</i></b>		
<b>Stamm</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Referenz</b>
pYV <sup>+</sup> (1)	<i>Y.enterocolitica</i> Wildtyp, Serogruppe O:8, hat pYV-Plasmid, pathogen	(49)
YopP <sup>-</sup> (1,2)	<i>Y.enterocolitica</i> Mutante, Serogruppe O:8, hat pYV-Plasmid, bei dem YopP ausgeknockt ist, apathogen	Ruckdeschel <i>et al.</i> , 2001
YopP <sup>+</sup> (1,2,3)	<i>Y.enterocolitica</i> Mutante, Serogruppe O:8, hat pYV-Plasmid, bei dem YopP ausgeknockt ist, und ein zusätzliches, YopP-tragendes Plasmid, pathogen	E. Bohn, Tübingen
P-wt (1,2)	<i>Y.enterocolitica</i> Mutante, Serogruppe O:9. YopP ist ausgeknockt, dafür wurde der Stamm mit FLAG-getaggttem YopP von <i>Y.enterocolitica</i> O:8 komplementiert, pathogen	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von K.Ruckdeschel (98)
P-CA (1,2)	<i>Y.enterocolitica</i> Mutante, Serogruppe O:9. YopP ist ausgeknockt, dafür wurde der Stamm mit Flag-getaggttem YopP, , von <i>Y.enterocolitica</i> O:8 komplementiert, welches infolge einer Punktmutation an Position 172 (Cystein-Alanin) keine Cysteinproteaseaktivität besitzt, apathogen	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von K.Ruckdeschel

für das Zuchtmedium benötigte Antibiotika:

<sup>1</sup>Nalidixinsäure (10 µg/ ml); <sup>2</sup>Chloramphenicol (25 µg/ ml); <sup>3</sup>Spectinomycin (50 µg/ ml)

Alle Stämme wurden in Luria-Bertani-Medium, versetzt mit oben genannten Antibiotika, bei 27°C und 200 rpm über Nacht kultiviert und am Versuchstag in frisches LB-Medium im Verhältnis 1:20 überimpft. Nach einer weiteren Kultivierungsphase über 90 Minuten bei 37°C und 200 rpm wurden die Bakterien zentrifugiert (5 min, 24°C, 5000 g), der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml PBS (Invitrogen, Karlsruhe) resuspendiert. In einer 1:20 Verdünnung mit PBS wurde die Bakteriensuspension photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Resultierend aus Verdünnungsreihen der entsprechenden Bakteriensuspensionen, nachfolgendem Ausplattieren und Bestimmung der cfu (colony forming units) wurde folgende Formel benutzt, um die Konzentration der Yersinien in der Bakteriensuspension zu bestimmen:

$$\text{Absorption}_{600\text{nm}} \times 100 \times 10^8 = \text{Yersinien/ml}$$

## **2.6 Infektion von Dendritischen Zellen**

Die Infektionsversuche wurden in 6-, 12-, 24- oder 48- well-Platten (BD Falcon, Franklin Lakes) durchgeführt. Hierzu wurden die DC (Tag 8 bis 10) in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  in 1 ml antibiotikafreiem Medium in die wells ausgesät und mit verschiedenen Yersinienstämmen im Infektionsverhältnis (MOI = multiplicity of infection) 10:1 infiziert. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (5 min, 24°C, 400 g) wurde sichergestellt, dass die Bakterien mit den DC in Kontakt kommen. 60 min nach Infektion wurden die extrazellulären Yersinien mittels Gentamicin (100 µg/ ml; Sigma, Taufkirchen) getötet. Die genauen Versuchsbedingungen werden im Abschnitt Ergebnisse erläutert.

### **2.6.1 Caspasenhemmung**

Um den Einfluß der Caspasen bei Infektionsversuchen zu untersuchen, wurden DC eine Stunde vor Infektion mit dem Pancaspasen-Inhibitor zVAD-fmk (100 µM, Bachem, Heidelberg) inkubiert.

## **2.7 Apoptosemessung**

### **2.7.1 Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ )**

Ein frühes Anzeichen für apoptotischen Zelltod ist das Zusammenbrechen des inneren Transmembranpotentials der Mitochondrien. Um das mitochondriale Transmembranpotential zu messen, wurden infizierte DC 15 Minuten vor Versuchsende bei 37°C mit 40 nM des ( $\Delta\Psi_m$ )-spezifischen Substrats TMRE (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert. Zusätzlich wurden spät-apoptotische bzw. nekrotische DC mit geschädigter, durchlässiger Zellmembran nach Versuchsende mit Propidiumiodid (PI; 50 ng/ ml; Calbiochem, Bad Soden) gefärbt und per Durchflusszytometer FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg) analysiert.

### **2.7.2 Messung der DNA-Fragmentierung**

Wie in der Einleitung beschrieben, ist auch der DNA-Verlust von Zellkernen ein wichtiges Merkmal der Apoptose. Um diese in den DC zu detektieren, wurde die Methode von Nicoletti (78) angewendet. Hierzu wurden die DC 24 h nach Infektion in FACS-Röhrchen (6 ml, BD Falcon, Franklin Lakes) gegeben, zentrifugiert (5 min, 24°C, 400 g), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 200 µl Nicolettireagenz (50 µg/ ml PI; 0,1 % Triton X-100; 0,1 % 2-Tri-natriumcitratdihydrogen gelöst in H<sub>2</sub>O) lysiert. Nach anschließender Zugabe von 200 µl PBS erfolgte die Auswertung durchflusszytometrisch.

Die Durchflusszytometriedaten wurden mit dem Programm WinMDI 2.8 (J.Trotter, The Scripps Institute, La Jolla, CA) ausgewertet.

### **2.7.3 Positivkontrollen**

Als Positivkontrollen zur Induktion von apoptotischem bzw. nekrotischem Zelltod wurden folgende Substanzen verwendet:

1. Staurosporin (4 µM, Sigma, Taufkirchen): Nicht-selektiver Protein-Kinase-Inhibitor, isoliert aus *Streptomyces staurosporeus*, ist ein gängiger Apoptose-induktor (40,48). So verursacht die Substanz beispielsweise über die Interaktion mit Fokaler-Adhäsions-Kinase (FAK) (57) apoptotischen Zelltod. Wurde zeitgleich mit der Infektion den DC zupipettiert.
2. Carbonyl-Cyanide-4-trifluoro-methoxy-phenylhydrazone (FCCP, 100 µM, Sigma, Taufkirch): Potenter, reversibler Inhibitor der mitochondrialen, oxidativen Phosphorylierung, was zu einer Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran führt und damit Apoptose induziert (26,60) Wurde 30 min vor Versuchsende in die Proben gegeben und bei 37°C bis Versuchsende inkubiert.
3. Erhitzen von DC auf 60°C über 10 min zur Induktion nekrotischen Zelltodes.

## 2.8 NF-κB ELISA

### 2.8.1 Herstellung nukleärer Extrakte

Jeweils  $3 \times 10^7$  DC wurden in wells einer 6-well-Platte in je 2 ml antibiotikafreiem Medium ausgesät und 60 min mit 10 mM unterschiedlicher NF-κB Inhibitoren (MG132, Parthenolid, BAY 11-7082 und BAY 11-7085 (alle von Calbiochem, Bad Soden) bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (1 µg/ml) über 90 min behandelt bzw. mit pYV<sup>+</sup> und YopP<sup>-</sup> (MOI 10:1) über 60 min infiziert und bei 37°C inkubiert. Nach Versuchsende wurden die DC mit einem Zellschaber vom Boden der wells abgekratzt, in Eppendorfgefäße überführt und zentrifugiert (5 min, 4°C, 400 g); der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 200 µl MES-Puffer resuspendiert, jeweils 200 µl MES-Puffer + Digitonin zupipettiert und die DC 10 min unter mikroskopischer Kontrolle auf Eis lysiert (>90% der Zellen Trypitanblau positiv). Danach wurden die Proben zentrifugiert (2 min, 4°C, 900 g), der Überstand abgesaugt und das verbliebene Pellet (Zellkerne und Mitochondrien) in 50 µl Westernblot-Lysispuffer resuspendiert. Nach zwanzigminütiger Lyse auf Eis wurden die Extrakte bei -20°C gelagert.

Tab. 2.5 Verwendete Puffer:

Puffer	Zusammensetzung
MES-Puffer (50 ml)	9,9 ml EGTA (0,1 M) ; 9,9 ml EDTA (0,1 M) ; 2,28g D-Mannitol ; 9,9 ml MES (0,1 M); 20,3 ml AMPUWA; sterilfiltrieren, pH 7,4
MES- Puffer + Digitonin	MES-Puffer mit 200 µg/ml Digitonin (Sigma, Taufkirchen)
Westernblot-Lysispuffer	50 mM Tris (pH 7,4); 50 mM NaCl ; 1 mM EDTA; 0,5 % NP-40; eingestellt auf pH 7,0

### 2.8.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Pierce-Methode. Die Proteinproben wurden zentrifugiert (10 min, 4°C, 20000 g), der Überstand mit den Proteinen in ein Gefäß abpipettiert und das noch verbliebene Pellet verworfen. Nach Herstellung einer 1:25 Verdünnung der Probe mit PBS (2 µl Probe und 48 µl PBS) wurden jeweils 10 µl dieser Verdünnung in eine flache 96-well-Platte pipettiert und 190 µl Piercelösung (50:1, Lösung A zu Lösung B; BCA, Pierce,

USA) zugefügt. Um eine Standardkurve zu bestimmen, wurden BSA-Standardlösungen (Pierce, USA) in den Konzentrationen 0, 100, 200, 400, 600, 800 und 1000 µg/ ml (in PBS) benutzt. Es folgte eine Inkubation von 30 min bei 37°C. Die Proteinkonzentration wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm im ELISA-Reader (Tecan sunrise, Crailsheim) gemessen.

### **2.8.3 NF-κB ELISA**

Für die NF-κB Bestimmung wurden folgende ELISA-Systeme verwendet:

-BD TransFactor NF-κB p50 kit (BD Bioscience, Palo Alto, USA)

-BD TransFactor NF-κB p65 kit (BD Bioscience, Palo Alto, USA)

Es wurden für jede Proteinprobe Doppelwerte bestimmt. Die ELISA-Platte wurden mit 150 µl 1xTransFactor/Blocking Buffer (1xTF/BB; im kit enthalten) 15 min bei Raumtemperatur vorinkubiert, der Puffer anschließend verworfen. Die nukleären Extrakte wurden entsprechend ihrer Proteinkonzentration in die Platte pipettiert und bis zu einem Endvolumen von 50 µl mit 1xTF/BB aufgefüllt, so dass von jeder Probe gleich viel Protein eingesetzt wurde. Nach Inkubation über 60 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgekippt und die Platte dreimal jeweils 4 min mit 150 µl 1xTF/BB gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurde der Puffer entfernt und 100 µl NF-κB-Primärantikörperlösung (1:500 in 1xTF/BB; Antikörper in kit enthalten) für 60 min bei Raumtemperatur in der Platte inkubiert. Nach Entfernen des Primärantikörpers wurde die Platte viermal für 4 min mit jeweils 150 µl 1xTF/BB gewaschen und der Puffer im Anschluss entfernt. Auf der Platte wurde dann der Sekundärantikörper (1:1000 in 1xTF/BB; Anti-rabbit IgG-HRP im kit enthalten) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der überschüssige Antikörper wurde viermal jeweils 4 min mit 250 µl 1xTransFactor Buffer (ohne Blocking Buffer) gewaschen und anschließend verworfen. Nach dem letzten Waschen wurden 100 µl TMB Substrat (im kit enthalten) in jedes well gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die NF-κB-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 655 nm im ELISA-Reader (Tecan sunrise, Crailsheim) gemessen.

Nach Farbumschlag in Blau wurden 100 µl 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> als Stopplösung zupipettiert und nochmals Extinktionswerte bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

## 2.9 Färbung von Oberflächenrezeptoren auf Zellen

### 2.9.1 Färbung mit nicht-farbstoffmarkierten Antikörpern

Um die Expression von bestimmten Rezeptoren (CD95/ Fas bzw. TRAIL-R1) zu quantifizieren, wurden 5x10<sup>5</sup> Zellen in 50 µl eiskaltem PBS in FACS-Röhrchen suspendiert. Die entsprechenden nichtkonjugierten, rezeptorspezifischen Primärantikörper wurden zupipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1ml eiskaltem PBS wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 4°C, 400 g) und der Überstand abgekippt. Nach Resuspension des Pellets in 50µl PBS wurden die Zellen für 10 min auf Eis mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern inkubiert. Die Inkubationsphase mit dem Sekundärantikörper wurde durch Zugabe von 200 µl eiskaltem PBS abgestoppt. Nach Zugabe von PI (50 ng/ml) wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Die Antikörperkonzentrationen, die Farbstoffe und abweichende Versuchsbedingungen werden im Teil Ergebnisse benannt.

Tab. 2.5 Primärantikörper gegen Todeswegrezeptoren

Art des Primärantikörpers	Firma
Rat monoclonal [N2B2] antibody to TRAIL	abcam
Purified anti-mouse monoclonal [Jo2] Fas	PharMingen, BD Biosciences

Tab. 2.6 Markierte Sekundärantikörper:

Primärantikörper	Art des Sekundärantikörpers	Firma
TRAIL	FITC conjugated goat Anti-Rat IgG	Jackson Immuno Research
Fas (CD 95)	FITC labelled Anti Armenian and Syrian Hamster IgG	PharMingen, BD Biosciences

Tab. 2.7 Markierte Oberflächenantikörper:

Struktur	Art des Antikörpers	Firma
CD11c	PE Anti-Mouse CD11c (Integrin $\alpha_x$ chain)	PharMingen, BD Biosciences
CD4	FITC Rat Anti Mouse CD4 (L3T4) (RM 4-5)	PharMingen, BD Biosciences
CD40	FITC Anti Mouse CD40 (HM 40-3)	PharMingen, BD Biosciences
CD86	FITC Anti Mouse CD86 (B7-2) (GL1)	PharMingen, BD Biosciences
MHCII	FITC Anti Mouse I-A / I-E (2G9)	PharMingen, BD Biosciences

Tab. 2.8 Isotypen

Struktur	Art des Isotyps	Firma
CD11c	PE Armenian Hamster IgG <sub>1,<math>\lambda</math>2</sub>	PharMingen, BD Biosciences
CD40	FITC Armenian Hamster IgM <sub><math>\lambda</math></sub>	PharMingen, BD Biosciences
CD86	FITC Rat IgG <sub>2a,<math>\lambda</math></sub>	PharMingen, BD Biosciences
MHCII	FITC Rat IgG <sub>2a,<math>\lambda</math></sub>	PharMingen, BD Biosciences
TRAIL	FITC Rat IgG <sub>2a,<math>\lambda</math></sub>	PharMingen, BD Biosciences

### 2.9.2 Färbung mit farbstoffmarkiertem Antikörper

Im Vergleich zu oben beschriebener Versuchsanordnung wurde hier ein Antikörper gegen einen Rezeptor verwandt, der bereits fluoreszenzfarbstoffmarkiert ist. Je  $5 \times 10^5$  Zellen wurden in 50  $\mu$ l eiskaltem PBS in FACS-Röhrchen verteilt. Die Zellen wurden mit dem jeweiligen Antikörper für 30 min auf Eis inkubiert, der Versuch dann mit 200  $\mu$ l eiskaltem PBS abgestoppt und die Zellen mittels FACS analysiert.

Die Antikörperkonzentrationen, die Farbstoffe und abweichende Versuchsbedingungen werden im Teil Ergebnisse benannt.

### 2.10 Apoptoseinduktion durch Rezeptorliganden

Um eine mögliche Apoptoseinduktion via Liganden des Todesrezeptorweges zu detektieren, wurden im folgenden  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml antibiotikafreiem Medium in eine 24-well-Platte ausgebracht und mit den Liganden (TNF $\alpha$ ; CD 95/Fas; TRAIL) stimuliert. Die Zellen wurden über 4 bzw. 6 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert und 15 min vor Versuchsende mit 40 nM TMRE gefärbt, direkt vor der FACS-Analyse wurden PI zupipettiert (50 ng/ml).

Als Positivkontrollen dienten FCCP (100µM)-behandelte, Staurosporin (4µM)-behandelte bzw. für 10 min bei 60°C erhitzte Zellen.

Zur Kontrolle der Funktionalität des eingesetzten TNF $\alpha$  wurden die Zellen mit 0,2 µg/ml Actinomycin D (Sigma, Taufkirchen), einem reversiblen Inhibitor von Transkriptionenzymen, für 1 h vorinkubiert. Abweichende oder zusätzliche Versuchsbedingungen werden im Teil Ergebnisse direkt besprochen.

Tab. 2.9 Liganden des Todesrezeptorweges

Ligand	Firma
TNF $\alpha$ human, recombinant expressed <i>E.coli</i>	Sigma-Aldrich, USA
TNF $\alpha$ mouse, recombinant expressed <i>E.coli</i>	Sigma-Aldrich, USA
Recombinant mouse Super Killer TRAIL	Alexis
Purified Anti-mouse monoclonal [Jo2] Fas	PharMingen, BD Biosciences

## 2.11 Statistik

Die Versuche wurden dreimal durchgeführt, Abweichungen sind bei den Versuchen direkt vermerkt. Die Signifikanz der Daten wurde über den Student-t-Test ermittelt. Eine Differenz von  $p < 0,05$  zwischen den Werten wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Zeitlicher Verlauf der Apoptoseinduktion durch YopP in DC

Nach Infektion von DC mit *Yersinia enterocolitica* pYV<sup>+</sup> erfolgt zunächst über eine Bindung von LPS an Toll-Like-Receptor 4 (TLR4) die Translokation des antiapoptotischen Transkriptionsfaktors Nuclear factor kappa B (NF-κB) in den Zellkern. Das mit einer Verzögerung von ca. 30 Minuten im Zytoplasma von DC detektierbare YopP jedoch wirkt der Aktivierung/ Translokation von NF-κB entgegen und führt zur Abnahme von NF-κB im Zellkern. So ist 30 und 60 Minuten nach pYV<sup>+</sup>-Infektion unter dem Einfluss von LPS viel NF-κB im Zellkern detektierbar, während die NF-κB-Konzentration unter dem Einfluss von YopP nach 90 Minuten stark abfällt.

Ziel dieses Versuchs war es, herauszufinden, ob der Abfall der NF-κB-Konzentration im Zellkern die Ursache oder die Wirkung YopP-vermittelten Zelltodes in DC darstellt. Wäre ein Abfall der NF-κB-Konzentration im Zellkern ursächlich für die Zelltodinduktion, müsste apoptotischer Zelltod nach dem Zeitpunkt 90 min einsetzen. Umgekehrt wäre ein Beginn apoptotischen Zelltods zum Zeitpunkt 90 min bzw. davor ein Beweis dafür, dass die Inhibition von NF-κB durch YopP nicht ursächlich für die Zelltodinduktion sein kann und vielmehr die Folge der Zelltodinduktion darstellt.

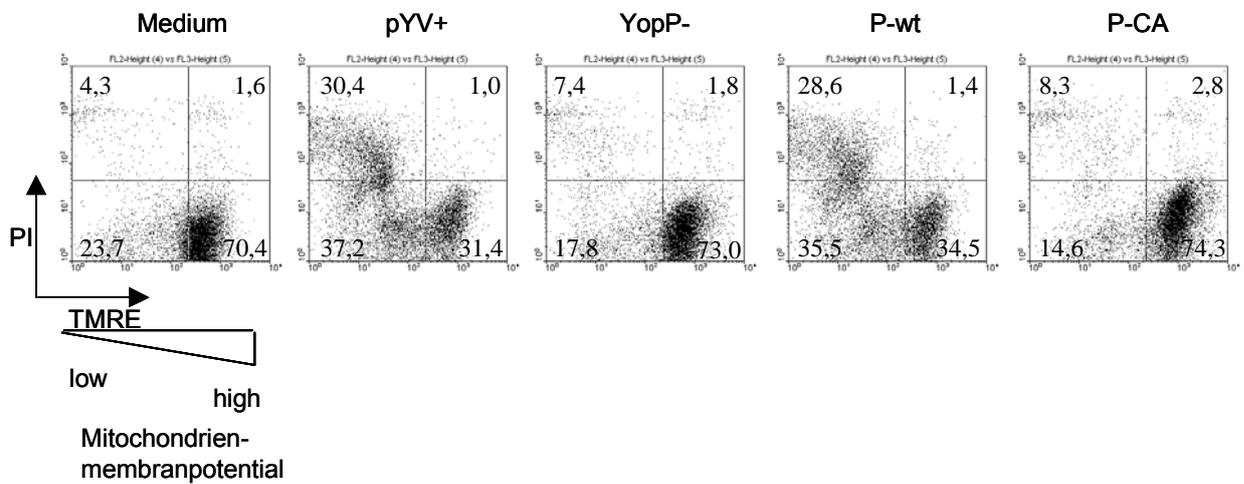
Dazu wurden  $8 \times 10^5$  DC mit dem *Yersinia enterocolitica* Wildtypstamm pYV<sup>+</sup> in einer MOI von 10:1 infiziert und die Apoptoseraten über einen Zeitraum von 3 Stunden nach TMRE und PI-Färbung per Durchflusszytometrie analysiert. Als Negativkontrollen dienten DC, die mit der Mutante YopP<sup>-</sup> (exprimiert und sezerniert kein YopP) infiziert wurden bzw. uninfizierte DC (Medium).

Um den Anteil apoptotischer bzw. nekrotischer DC zu bestimmen, wurde der Anteil PI-positiver DC (Ausdruck einer Zellmembranschädigung), sowie der Anteil an DC bestimmt, die einen Abfall des inneren, mitochondrialen Transmembranpotentials zeigten (Zeichen früher Apoptose).

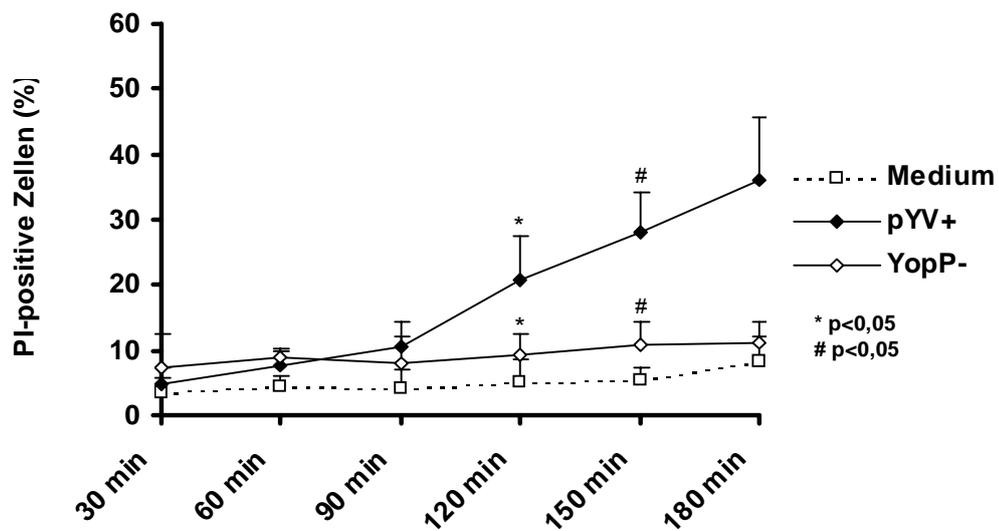
Während uninfizierte Zellen über einen Zeitraum von 3 h eine Apoptose/ Nekroserate von 5% aufwiesen, war zwischen 90 und 120 min nach Infektion mit pYV<sup>+</sup> ein Anstieg PI-positiver Zellen zu detektieren (Abb. 3.1 A, B). Die Rate

an PI-positiven Zellen nach Infektion mit dem apathogenen Stamm YopP<sup>-</sup> lag über den gesamten Messzeitraum bei ca. 8% (Abb. 3.1). Vergleichbare Ergebnisse lieferte die Analyse des Mitochondrientransmembranpotentials (signifikante Zunahme TMRE-negativer DC 120 min nach pYV<sup>+</sup>-Infektion gegenüber der Mediumkontrolle und YopP<sup>-</sup>) (Abb. 3.1 C). So wurde bestätigt, dass YopP in DC Zelltod auslöst und dass YopP-induzierter apoptotischer/nekrotischer Zelltod zwischen 90 und 120 min einsetzt.

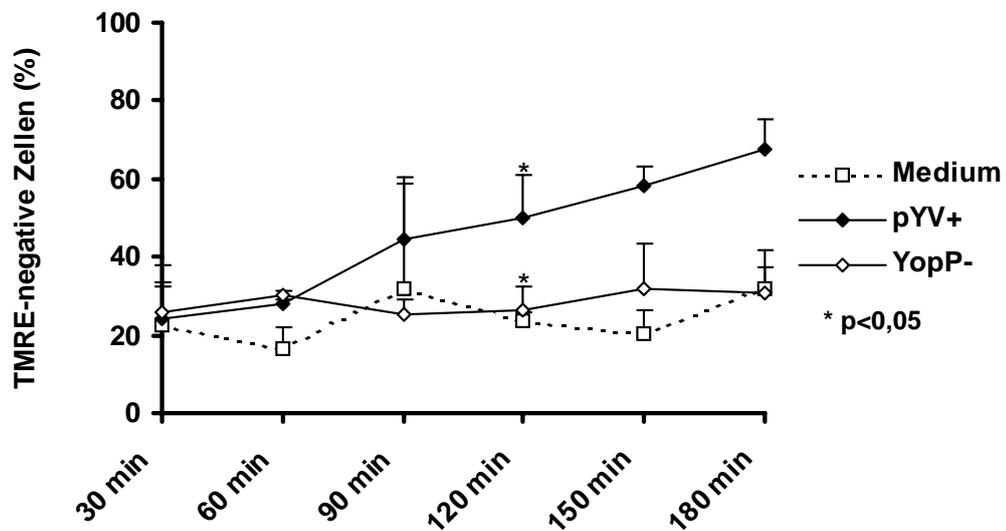
**A:**



**B:**



C:



**Abb. 3.1: YopP-abhängiger Zelltod in DC.** DC wurden mit verschiedenen *Y.enterocolitica* (pYV<sup>+</sup>, YopP<sup>-</sup>) in einer MOI von 10:1 infiziert. Zu den jeweiligen angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Färbung der Zelle mit TMRE bzw. PI. Durchflusszytometrische Analyse (A) zum Zeitpunkt 180 min nach Infektion, (B) PI-positiver Zellen und TMRE-negativer Zellen (C). Medium = uninfizierte DC. Dargestellt sind ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen (A) bzw. Mittelwerte mit Standardabweichungen aus n = 3 Versuchen (B, C).

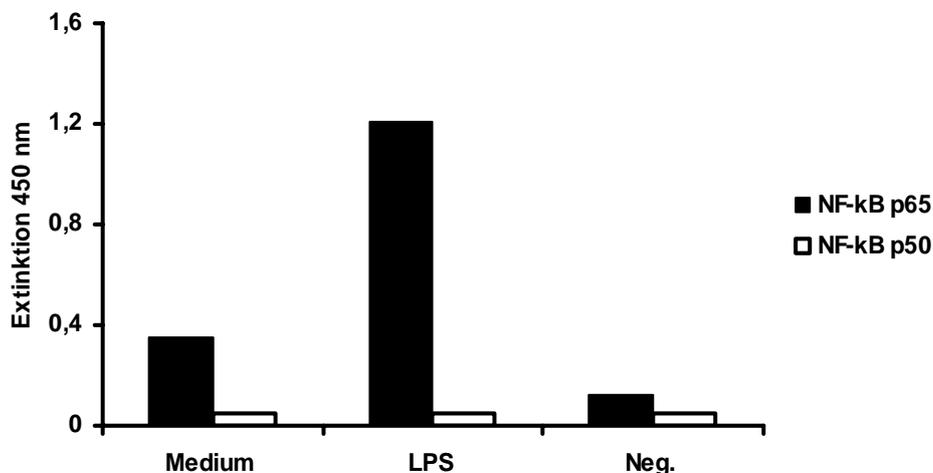
### 3.2 NF-κB ELISA

Mit den in 3.1 dargestellten Ergebnissen, die einen Beginn des YopP-vermittelten Zelltods zwischen 90 und 120 min nach Infektion zeigten, konnte nicht geklärt werden, ob die verminderte Aktivierung von NF-κB nach 90 min nun ursächlich für die Zelltodinduktion ist oder nicht. Deshalb wurden zunächst Infektionsversuche in DC durchgeführt, die zuvor mit verschiedenen NF-κB-Inhibitoren vorinkubiert worden waren. Dadurch sollte NF-κB-Aktivierung zusätzlich zum NF-κB-inhibierenden Effekt durch YopP unterdrückt werden unter der Vorstellung, dass in diesem Fall die YopP-bedingte Zelltodrate noch weiter ansteigen müsste.

Interessanterweise führte die Vorinkubation von DC mit den NF- $\kappa$ B-Inhibitoren jedoch zu einer Verringerung des YopP-vermittelten Zelltods, so dass es unwahrscheinlich ist, dass eine verminderte NF- $\kappa$ B-Aktivierung ursächlich für den YopP-vermittelten Zelltod ist (Daten von S. Gröbner, nicht dargestellt).

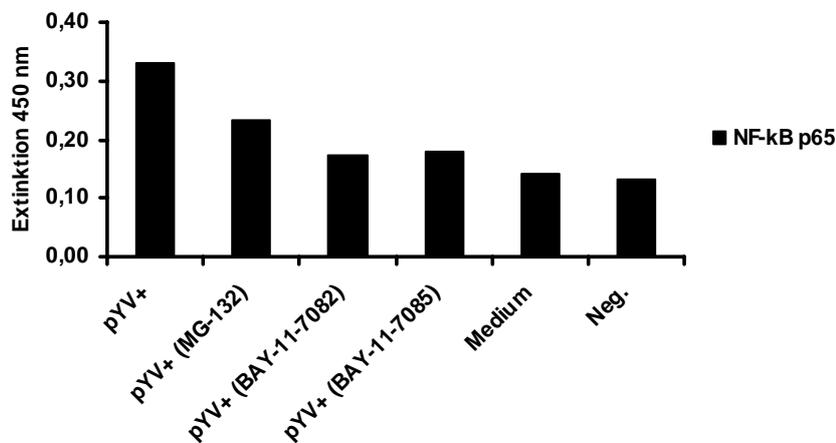
Um zu beweisen, dass nach Vorinkubation mit den NF- $\kappa$ B-Inhibitoren tatsächlich weniger NF- $\kappa$ B im Zellkern vorhanden ist, wurden NF- $\kappa$ B-ELISAs aus nukleären Extrakten durchgeführt.

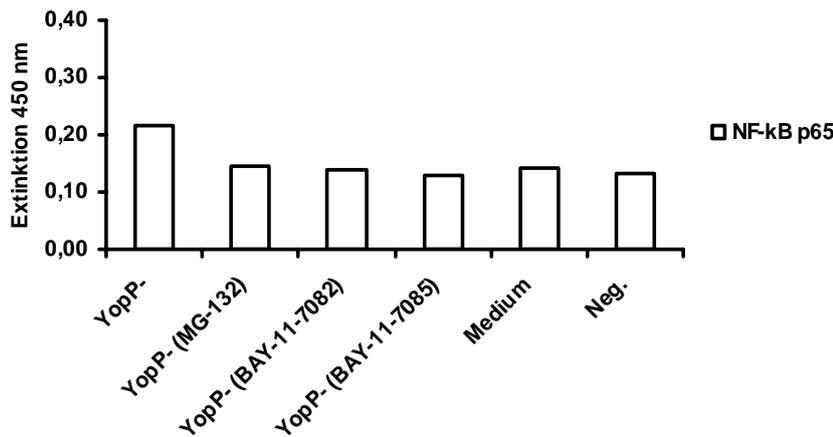
In einem ersten Versuch (Abb. 3.2.1) wurde gezeigt, dass nach 90-minütiger LPS-Stimulation die NF- $\kappa$ B-Konzentration in nukleären Extrakten von DC gegenüber der Mediumkontrolle stark (ca. dreifach) erhöht ist. Dabei steigt jedoch nur die Konzentration der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 an. Die Untereinheit p50 konnte nicht vermehrt im Nucleus detektiert werden, was darauf hindeutet, dass nach Stimulation von DC durch LPS nur die Untereinheit p65, nicht jedoch p50 in den Zellkern transloziert wird.



**Abb. 3.2.1: NF- $\kappa$ B-ELISA aus nukleären Extrakten.** DC wurden 90 min lang mit 1  $\mu$ g/ml LPS inkubiert. Anschließend Gewinnung von nukleären Proteinextrakten. Es wurden 67  $\mu$ g Protein pro Probe eingesetzt. Der Primärantikörper wurde in der Verdünnung 1:500, der Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt. P50/p65 = Untereinheiten von NF- $\kappa$ B. Medium = unbehandelte DC in Medium; Neg. = Negativkontrolle (ELISA-Puffer). Dargestellt sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen eines einzelnen Versuchs.

In weiteren Versuchen sollte die hemmende Wirkung der NF- $\kappa$ B-Inhibitoren in LPS-behandelten bzw. *Y.e.* infizierten DC untersucht werden. Als Zeitpunkt wurde 60 min nach Infektion gewählt, um ein deutliches NF- $\kappa$ B-Signal im Kern der Zellen zu detektieren, die vorher nicht mit NF- $\kappa$ B-Inhibitoren vorinkubiert wurden. Wie aus Abb. 3.2.2 ersichtlich, wurde NF- $\kappa$ B in uninfizierten Zellen (Medium) nicht aktiviert. Im Gegensatz dazu wurde NF- $\kappa$ B eine Stunde nach Infektion mit pYV<sup>+</sup> bzw. YopP<sup>-</sup> vermehrt im Kern detektiert (LPS-Effekt). In DC, die 60 min lang mit je 10 mM verschiedener NF- $\kappa$ B-Inhibitoren (MG-132, BAY-11-7082 und BAY-11-7085) vorinkubiert worden waren, war eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Konzentration im Kern um bis zu 50 % bei den pYV<sup>+</sup> bzw. YopP<sup>-</sup>-infizierten Zellen messbar. Dies deutet darauf hin, dass die eingesetzten NF- $\kappa$ B-Inhibitoren die NF- $\kappa$ B-Aktivierung tatsächlich inhibieren.





**Abb. 3.2.2 NF- $\kappa$ B-ELISA aus nukleären Extrakten von DC, die mit NF- $\kappa$ B-Inhibitoren vorinkubiert wurden.** Nach 60-minütiger Vorinkubation mit verschiedenen NF- $\kappa$ B-Inhibitoren (MG-132, BAY-11-7082 und BAY-11-7085) wurden DC 60 min mit pYV<sup>+</sup> und YopP<sup>-</sup> infiziert bzw. 90 min mit 1  $\mu$ g/ml LPS inkubiert. Anschließend Gewinnung von nukleären Proteinextrakten. Es wurden 120  $\mu$ g Protein pro Probe eingesetzt. Medium = unbehandelte DC in Medium; Neg. = Negativkontrolle (ELISA-Puffer). Dargestellt sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen eines repräsentativen Versuchs aus insgesamt 3 unabhängigen Versuchen.

### 3.3 Einfluss von Toll-like-Rezeptoren auf den YopP-vermittelten Zelltod in DC

In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass NF- $\kappa$ B in *Y. enterocolitica* infizierten DC zunächst unter dem Einfluß von LPS aktiviert und in einem zweiten Schritt durch YopP gehemmt wird. Diese NF- $\kappa$ B-Hemmung scheint aber entsprechend den in Kapitel 3.2 dargestellten Ergebnissen nicht ursächlich für den YopP-induzierten Zelltod in DC zu sein.

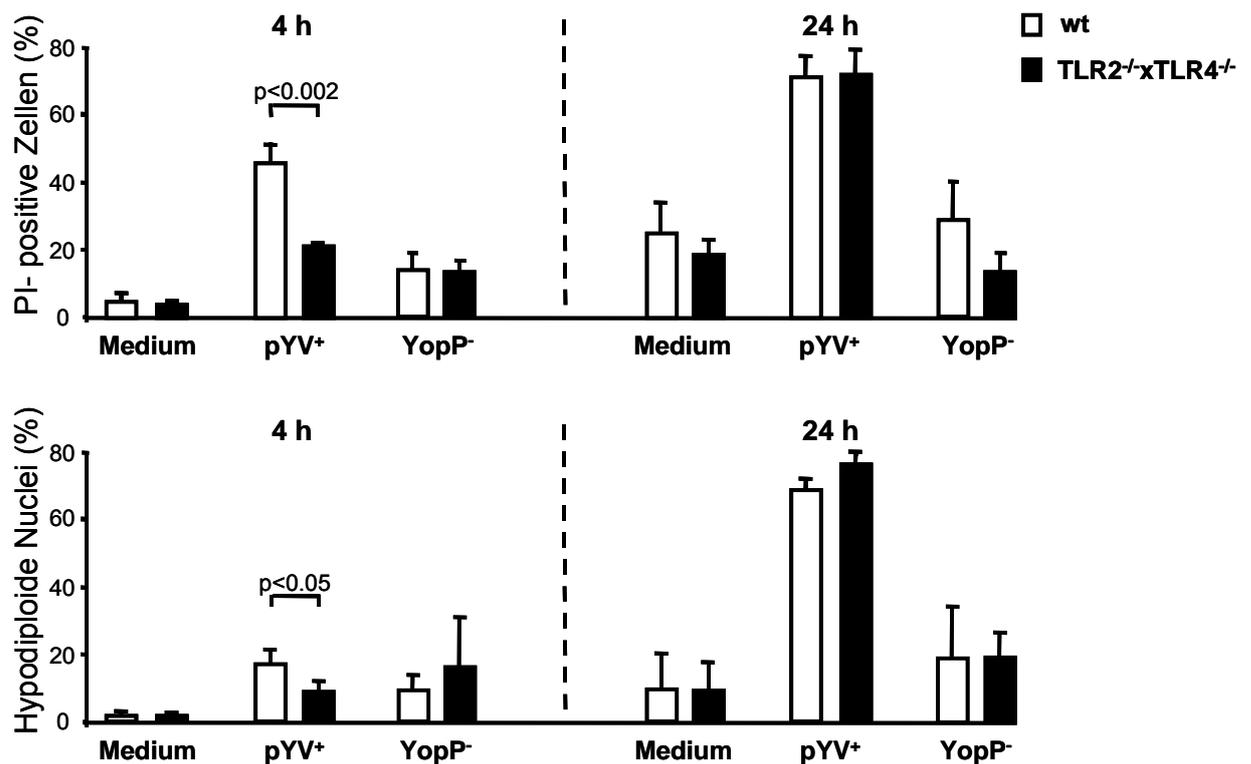
Im Folgenden sollte nun der Einfluss von LPS auf die Zelltodinduktion unabhängig von NF- $\kappa$ B untersucht werden. LPS bindet an der Oberfläche infizierten DC an TLR4, welcher das Signal über die Adaptermoleküle MyD88 und TRIF weiterleitet. Im Gegensatz dazu bindet TLR2 überwiegend Membranbestandteile grampositiver Bakterien wie z.B. Lipoproteine.

So wurden zunächst TLR2xTLR4-defiziente DC und entsprechende Wildtyp-DC mit pYV<sup>+</sup> und YopP<sup>-</sup> (MOI 10:1) infiziert und 4 bzw. 24 h nach Infektion Zelltod-

raten durchflusszytometrisch analysiert. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte DC verwendet. Um Zelltodraten zu bestimmen, wurden die DC sowohl mit TMRE und PI gefärbt, als auch nach der Methode von Nicoletti, um hypodiploide Nuclei (späte Apoptose) zu detektieren.

Abb 3.3.1 zeigt, dass sowohl bei uninfizierten TLR2xTLR4-defizienten als auch bei den Wildtyp-DC eine leichte Zunahme der Zelltodrate nach 24 h zu detektieren war, welche als spontane Apoptose gedeutet werden kann. Im Vergleich zu Wildtyp-DC zeigten TLR2xTLR4-defiziente DC, welche mit pYV<sup>+</sup> infiziert wurden, nach 4 h einen signifikant niedrigeren Anteil von PI-positiven Zellen und hypodiploiden Nuclei. Interessanterweise lagen nach 24 h die Apoptoseraten von beiden Zelltypen auf gleichem Niveau (Abb. 3.3.1), was darauf hindeutet, dass in den TLR2xTLR4-defizienten DC der Zelltod verzögert einsetzt, nicht jedoch verhindert wird. Die Rate der hypodiploiden Nuclei war sowohl bei Wildtyp-DC als auch bei TLR2xTLR4-defizienten DC 4 h nach Infektion mit pYV<sup>+</sup> niedrig (Abb. 3.3.1 unten). Diese Tatsache ist nicht überraschend, da hypodiploide Nuclei ein Zeichen später Apoptose sind. Bei den YopP<sup>-</sup>-infizierten DC war der Anteil PI-positiver Zellen bzw. hypodiploider Nuclei nach 4 bzw. 24 h vergleichbar der Negativkontrolle (Medium), was bedeutet, dass durch die YopP<sup>-</sup>- Mutante sowohl in TLR2xTLR4-defizienten DC als auch Wildtyp-DC kein Zelltod ausgelöst wurde.

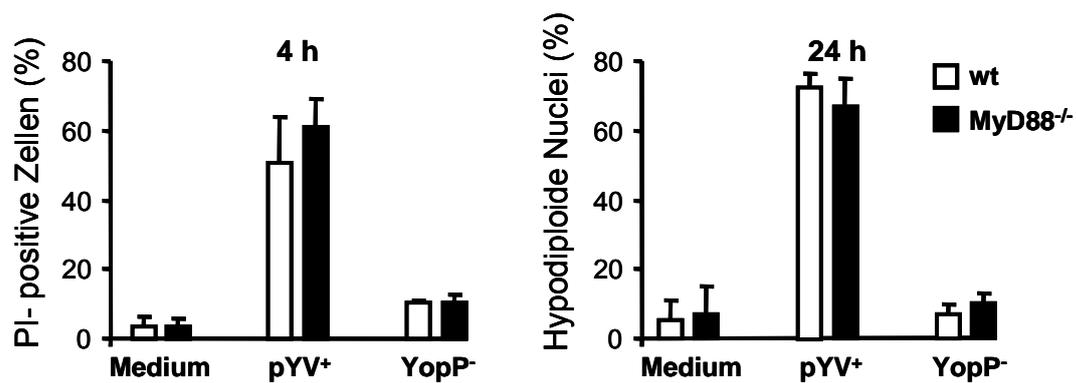
Weiterführende Versuche mit TLR2- bzw. TLR4-defizienten DC konnten zeigen, dass der Zelltod-verzögernde Effekt durch Knock-out von TLR4 und nicht durch TLR2-Knock-out bedingt ist (nicht dargestellt).



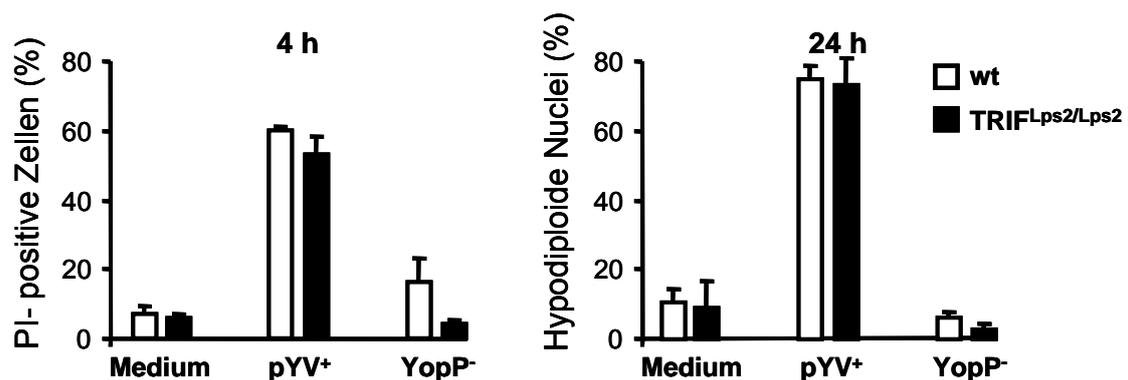
**Abb. 3.3.1: TLR abhängiger Zelltod.** TLR2<sup>-/-</sup>xTLR4<sup>-/-</sup> und Wildtyp DC wurden infiziert mit pYV<sup>+</sup> und YopP<sup>-</sup>. Durchflusszytometrische Analyse nach Färbung mit TMRE und PI bzw. nach Nicoletti. PI-positive Zellen (obere Hälfte) und hypodiploide Nuclei (untere Hälfte) 4 und 24 h nach Infektion. Medium = uninfizierte DC. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus n = 3 Versuchen.

Im Folgenden wurden verschiedene Adaptermoleküle (MyD88 und TRIF) des TLR4-Rezeptors untersucht. Dazu wurden DC aus MyD88-defizienten und TRIF-defizienten Mäusen verwendet. 4 bzw. 24 h nach Infektion mit pYV<sup>+</sup> wiesen MyD88-defiziente DC im Vergleich zu Wildtyp-DC vergleichbare Apoptoseraten (PI-Positivität, hypodiploide Nuclei) auf (Abb. 3.3.2). Die Apoptoseraten uninfizierter DC (Medium) waren niedrig, genauso wie die YopP<sup>-</sup>-infizierter DC (Abb.3.3.2).

Versuche mit TRIF-defizienten DC führten zu ähnlichen Ergebnissen. Auch hier waren 4 bzw. 24 h nach Infektion mit pYV<sup>+</sup> keine Unterschiede hinsichtlich der Zelltodraten von TRIF-defizienten DC und Wildtyp-DC zu detektieren (Abb. 3.3.3, Versuch durchgeführt von S. Gröbner).



**Abb. 3.3.2: Zelltodvermittlung über MyD88.** MyD88<sup>-/-</sup> und Wildtyp DC wurden infiziert mit pYV<sup>+</sup> und YopP<sup>-</sup>. Färbung mit TMRE und PI bzw. nach Nicoletti und anschließender durchflusszytometrischer Analyse PI-positiver Zellen (linke Hälfte) und hypodiploider Nuclei (rechte Hälfte) 4 bzw. 24 h nach Infektion. Medium = uninfizierte DC. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus n = 3 Versuchen.



**Abb. 3.3.3: Zelltodvermittlung über TRIF<sup>Lps2/Lps2</sup>.** TRIF<sup>Lps2/Lps2</sup> und Wildtyp DC wurden infiziert mit pYV<sup>+</sup> und YopP<sup>-</sup>. Färbung mit TMRE und PI bzw. nach Nicoletti und anschließender durchflusszytometrischer Analyse. PI-positiver Zellen (linke Hälfte) und hypodiploide Nuclei (rechte Hälfte) 4 bzw. 24 h nach Infektion. Medium = uninfizierte DC. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus n = 3 Versuchen.

Diesen Ergebnissen zufolge ist YopP-induzierter Zelltod in DC abhängig vom TLR4-Signalweg, da 4 h nach Infektion die Zelltodrate in TLR2xTLR4-defizienten bzw. TLR4-defizienten DC signifikant niedriger ist als in Wildtyp-DC. Da aber dieser Effekt 24 h nach Infektion wieder aufgehoben ist, muss der

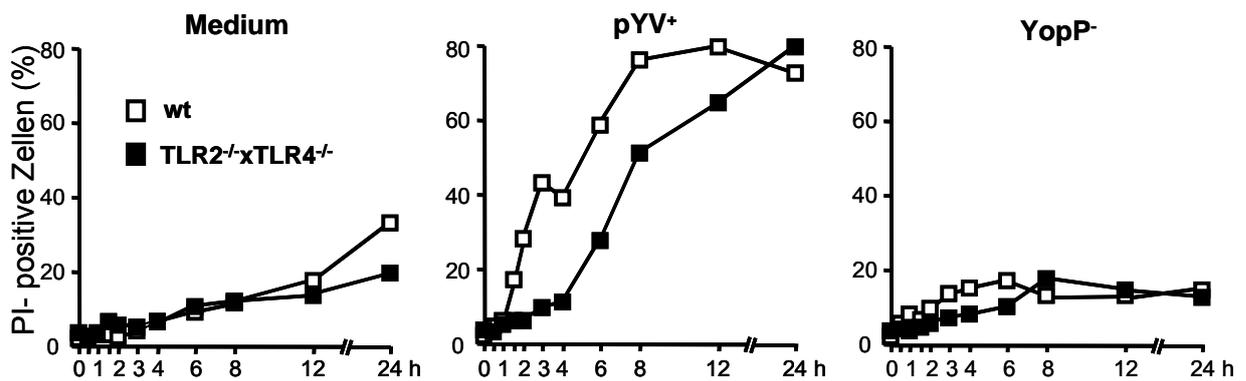
Zelltod zu späten Zeitpunkten von einer anderen Variablen abhängen. Die TLR4-Adapter-defizienten DC ( $MyD88^{-/-}$ ,  $TRIF^{-/-}$ ) zeigten zu beiden gemessenen Zeitpunkten keinen Unterschied der Zelltodrate gegenüber den Wildtyp-DC. Demzufolge reicht es für die Unterdrückung des TLR4-abhängigen Zelltods nicht, einzelne intrazelluläre Adapter auszuschalten. Das Signal könnte in diesem Fall über den jeweils anderen Adapter übermittelt werden. Andererseits ist es denkbar, dass ein weiterer TLR4-Adapter (z.B. Mal, TIRAP oder ein bislang unbekannter Adapter) für die Übermittlung des TLR4/LPS-Signals ursächlich ist.

### **3.4 Apoptosekinetik in TLR2xTLR4-defizienten DC vs. Wildtyp-DC**

Die in 3.3 gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass der YopP-induzierte Zelltod durch die Abwesenheit von TLR4 nur verzögert, nicht jedoch aufgehoben wird. Zeitkinetiken von infizierten Zellen konnten dies bestätigen. Dafür wurden  $8 \times 10^5$  DC mit  $pYV^+$  und  $YopP^-$  (MOI 10:1) infiziert und über einen Zeitraum von 24 h nach TMRE und PI-Färbung durchflusszytometrisch untersucht. Als Negativkontrolle wurden uninfizierte DC gemessen.

Uninfizierte DC zeigten einen geringgradigen Anstieg der PI-positiven Zellen über einen Zeitraum von 24 h, welcher durch Spontanapoptose begründet ist. Dabei waren keine Unterschiede zwischen Knock-out-DC und Wildtyp-DC zu detektieren (Abb. 3.4).  $YopP^-$  infizierte DC zeigten, wie die Mediumkontrolle, keinen Anstieg des Zelltodes in den beiden DC-Typen (Abb. 3.4).

Das mittlere Bild in Abb. 3.4 zeigt, dass Wildtyp *Yersinien* ( $pYV^+$ ) sowohl in DC von TLR2xTLR4-defizienten Mäusen als auch in Kontroll-DC Zelltod auslösen. Interessanterweise zeigten TLR2xTLR4-defiziente DC gegenüber Wildtyp-DC einen um 2-3 h verzögerten Anstieg des Zelltodes (Abb. 3.4), nach 24 h jedoch waren keine Unterschiede zwischen den Zelltodraten von TLR2xTLR4-defizienten DC und Wildtyp-DC zu messen.



**Abb. 3.4: Verzögerung des Zelltodes in TLR 2<sup>-/-</sup>xTLR4<sup>-/-</sup> DC gegenüber Wildtyp-DC.** DC wurden mit pYV<sup>+</sup> und YopP<sup>-</sup> infiziert. Zellen wurden mit TMRE und PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Medium = uninferierte DC. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass für die frühe Phase (bis 4 h) des YopP-induzierten Zelltod ein LPS-Signal notwendig ist, welches über TLR4 vermittelt wird, während ab einem Zeitpunkt > 4 h nach Infektion YopP-induzierter Zelltod unabhängig von TLR4 abläuft.

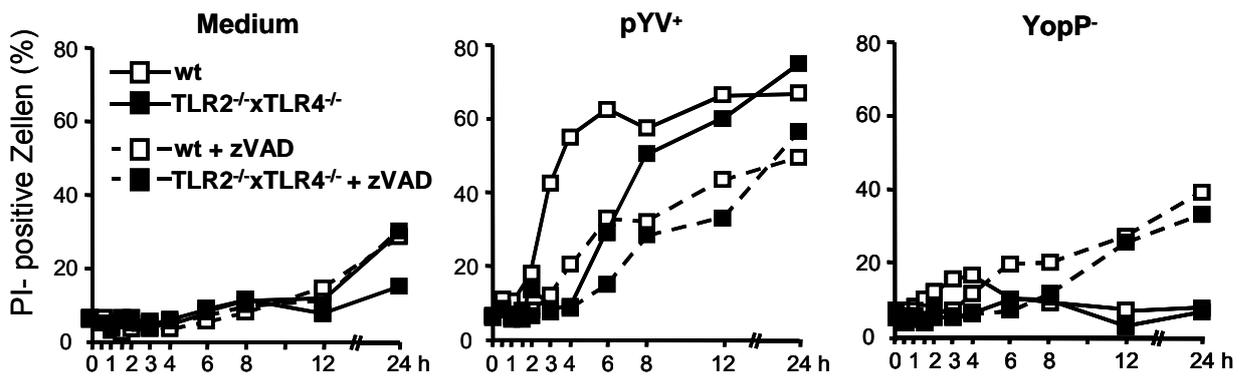
### 3.5 Abhängigkeit der YopP-induzierten Apoptose in TLR 2<sup>-/-</sup> xTLR4<sup>-/-</sup> DC vs. Wildtyp DC von Caspasen

Um weitere Einsichten in den Ablauf des „frühen“, TLR-abhängigen YopP-induzierten und des „späten“, TLR-unabhängigen YopP-induzierten Zelltodes zu gewinnen, wurde die Rolle der Caspasen in diesem Versuchsaufbau untersucht.

Dazu wurden DC aus TLR2xTLR4-defizienten und Wildtyp-Mäusen eine Stunde vor Infektion mit dem Pancaspaseninhibitor zVAD-fmk inkubiert, dann mit Yersinien (pYV<sup>+</sup>, YopP<sup>-</sup>) infiziert und die Zelltodraten (PI-Positivität) über 24 h analysiert.

DC ohne zVAD-fmk-Vorinkubation zeigten im Verlauf des Versuchs keinen bedeutenden Anstieg PI-positiver Zellen (ca. 20 % nach 24 h). YopP<sup>-</sup> infizierte DC zeigten wie die Mediumkontrolle keinen wesentlichen Anstieg des Zelltodes

(< 10 % PI-positive Zellen nach 24 h). Die Gabe von zVAD-fmk verursachte nach Infektion mit YopP<sup>-</sup> im Vergleich zu unbehandelten DC einen vermehrten Zelltod (ca. 30 % PI-Positivität, Abb. 3.5 rechts), möglicherweise zurückzuführen auf eine proapoptotische Wirkung von LPS bei gleichzeitig geblockten Caspasen. Abb. 3.5 (Mitte) zeigt, dass die Hemmung von Caspasen durch zVAD-fmk zu einer Senkung der Rate PI-positiver DC um ca. 50 % führte.



**Abb. 3.4: YopP-induzierter Zelltod in TLR 2<sup>-/-</sup>xTLR4<sup>-/-</sup> DC gegenüber Wildtyp-DC und dessen Abhängigkeit von Caspasen.** Zellen wurden 1 h vor Infektion mit 100 µM zVAD-fmk vorinkubiert. DC wurden anschließend mit pYV<sup>+</sup> und YopP<sup>-</sup> infiziert. Zellen wurden mit TMRE und PI gefärbt und nach den angegebenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch analysiert. Medium = uninfizierte DC. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass YopP-induzierter Zelltod in DC nicht nur vom Caspasenweg abhängig ist, sondern auch über einen anderen, Caspasen-unabhängigen Weg abläuft.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass sowohl in der frühen, TLR2xTLR4 abhängigen Phase, als auch in der späten, TLR2xTLR4 unabhängigen Phase des YopP-induzierten Zelltods ähnliche Mechanismen, nämlich einerseits caspasen-abhängige, andererseits caspasenunabhängige, beteiligt sind.

### **3.6 Rolle der Todesrezeptoren TNFR, CD95/Fas und TRAIL bei der YopP-vermittelten Apoptoseinduktion in DC**

In weiteren Untersuchungen wurde analog zu dem um 2 bis 3 h verzögerten Anstieg der Zelltodrate in TLR2xTLR4-defizienten DC gegenüber Wildtyp-DC (siehe 3.4 und 3.5) auch eine Verzögerung der Aktivierung der Caspasen 3 und 8 detektiert (Daten nicht gezeigt). Die Spaltung von Caspase 3 bzw. 8, und damit ihre Aktivierung, erfolgte YopP-vermittelt in TLR2xTLR4-defizienten DC 2 bis 3 h später im Vergleich zu Wildtyp-DC. Dieses Ergebnis weist auf eine wichtige Rolle von Caspase 8 beim YopP-vermittelten Zelltod hin. Da Caspase 8 über verschiedene Todesrezeptoren (TNF-R, CD95/Fas, TRAIL) aktiviert wird, wurden im Folgenden die Rolle der verschiedenen Todesrezeptoren bei der YopP-induzierten Apoptose in DC untersucht.

#### **3.6.1 TNF-Rezeptor**

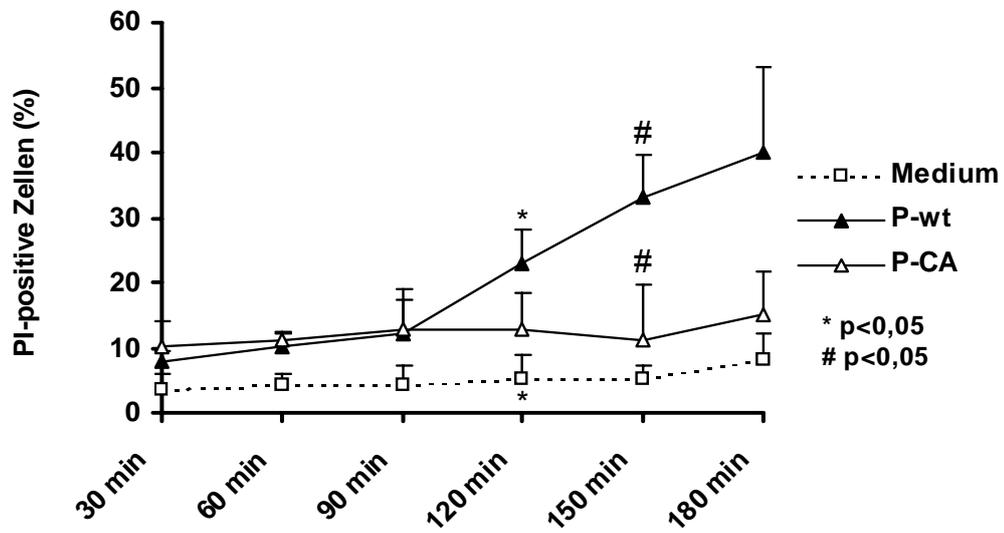
Für die Apoptoseinduktion durch einen extrazellulären Liganden spielt der TNF-R1 in bestimmten Zellen eine wichtige Rolle. In diesem Versuch sollte geprüft werden, ob auch in YopP-infizierten DC Apoptose über diesen Rezeptor induziert wird. Die Idee war, dass LPS die DC über einen TLR4-abhängigen Weg zur TNF $\alpha$ -Produktion anregt und so bei gleichzeitiger Hemmung von NF- $\kappa$ B durch YopP über einen autokrinen Loop Apoptose via TNF-R1-Rezeptoren induziert wird.

Bei diesen Versuchen wurden, anstatt der oben beschriebenen *Y. enterocolitica*-Stämme pYV<sup>+</sup> und YopP<sup>-</sup>, die Mutanten P-wt und P-CA zu Infektionszwecken verwendet. Die Mutante P-wt ist im Gegensatz zu P-CA katalytisch aktiv.

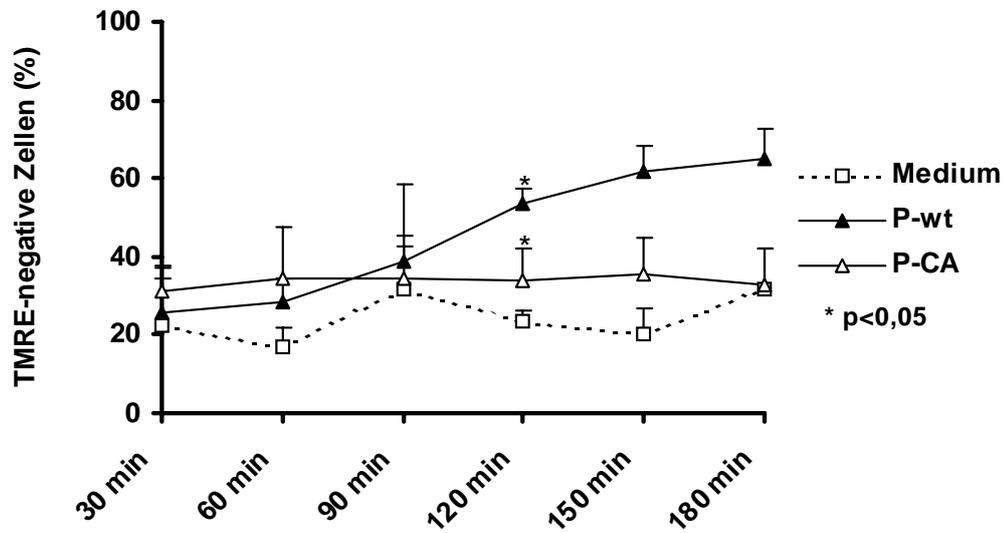
Abb. 3.6.1.1 zeigt, dass die Mutanten P-wt und P-CA gleiche Zelltodraten wie pYV<sup>+</sup> und YopP<sup>-</sup> und waren auch im Verlauf des Versuchs vergleichbar, so dass sie als einander in ihrer Wirkung entsprechend gleichgesetzt werden können.

Über die Ergebnisse in 3.1 hinaus konnte gezeigt werden, dass die Cysteinproteaseaktivität von YopP essentiell für die Zelltodinduktion durch YopP in DC ist, da die *Y.e.* Mutante ohne Cysteinproteaseaktivität (P-CA) im Gegensatz zu P-wt (funktionelles YopP) keinen Zelltod auslöste.

A:



B:



**Abb. 3.6.1.1: YopP-abhängiger Zelltod in DC.** DC wurden mit verschiedenen Y.e. (P-wt, P-CA) in einer MOI von 10:1 infiziert. Zu den jeweiligen angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Färbung der Zelle mit TMRE und PI. Durchflusszytometrische Analyse nach PI-positiven Zellen (A) und nach TMRE-negativen Zellen (B). Medium = uninfizierte DC. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus n = 3 Versuchen (A, B).

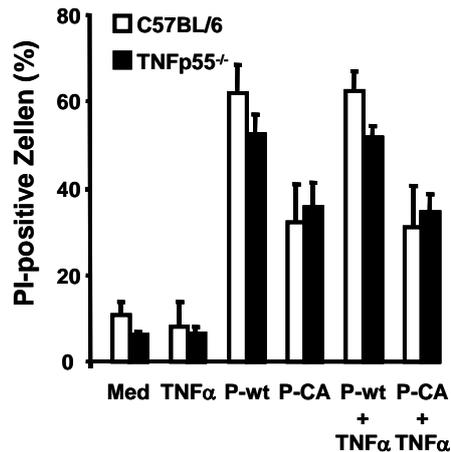
Um festzustellen, ob DC nach YopP Infektion  $\text{TNF}\alpha$  produzieren, wurden Zellen infiziert und Zellüberstände mittels  $\text{TNF}\alpha$ -ELISA untersucht (Daten von S. Gröbner). Es zeigte sich, dass nach P-wt Infektion innerhalb der ersten vier Stunden  $\text{TNF}\alpha$  sezerniert wird. Die Menge an sezerniertem  $\text{TNF}\alpha$  war verglichen mit LPS-behandelten bzw. P-CA-infizierten Zellen jedoch um ein vielfaches geringer, so dass es unwahrscheinlich ist, dass autokrines  $\text{TNF}\alpha$  in P-wt-infizierten DC ursächlich für den P-wt-induzierten Zelltod ist.

Dies wurde durch Versuche mit  $\text{TNF-R1}$ -defizienten DC ( $\text{TNF p55}^{-/-}$ ) bestätigt. Als Kontrolle dienten entsprechende Wildtyp-Mäuse (C57BL/6).  $8 \times 10^5$  DC wurden mit P-wt und P-CA infiziert, nach 6 h mit TMRE und PI gefärbt und durchflusszytometrisch ausgewertet. Als Negativkontrolle wurden uninfizierte DC gemessen. Zusätzlich wurden infizierte DC, zeitgleich mit der Infektion, mit 10 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  stimuliert, um zu bestimmen, ob YopP-induzierter Zelltod durch  $\text{TNF}\alpha$  gesteigert werden kann.

Wie aus Abb. 3.6.1.2 ersichtlich, zeigte sich nach 6 h kein signifikanter Unterschied zwischen den Rezeptordefizienten DC und Wildtyp-DC. Die Mediumkontrolle zeigt keinen Zelltod. Im Vergleich dazu lagen die mit apathogenem P-CA infizierten DC, Ergebnis 3.6.1.1 entsprechend, auf einem etwas erhöhten Zelltodniveau.

P-wt verursachte apoptotischen Zelltod (ca. 60 % PI-positive DC). Die P-wt induzierte Zelltodrate lag in  $\text{TNF-R1}$ -defizienten-DC gegenüber Wildtyp-DC zwar etwas niedriger, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die zusätzliche Gabe von  $\text{TNF}\alpha$  zur Infektion konnte keine weitere Steigerung der Zelltodraten im Vergleich zur alleinigen Infektion induzieren, jedoch zeigten P-wt-infizierte  $\text{TNF-R1}$ -defiziente DC, die zusätzlich mit  $\text{TNF}\alpha$  stimuliert wurden, eine signifikant niedrigere Zelltodrate als entsprechende Wildtyp-DC.

Insgesamt weisen diese Ergebnisse daraufhin, dass YopP in DC über den  $\text{TNF-R1}$ -Rezeptor keine Apoptose induziert.



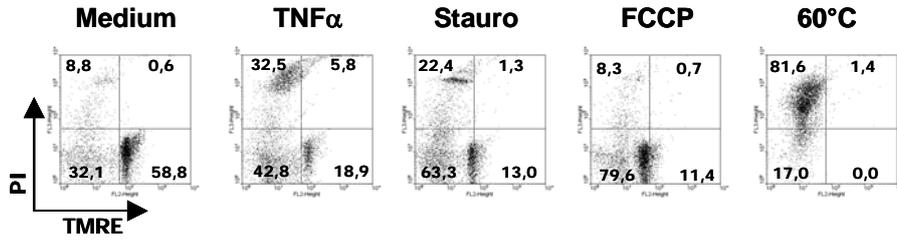
**Abb. 3.6.1.2: Apoptose in DC via TNF $\alpha$  p55-Rezeptor.** TNF p55<sup>-/-</sup> und C57BL/6 DC wurden mit P-wt und P-CA infiziert, mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert bzw. infiziert und zusätzlich mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert. Färbung mit TMRE und PI und durchflusszytometrische Messung nach 6 h. Medium = unbehandelte DC. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus n = 3 Versuchen.

Weil das verwendete TNF $\alpha$  in DC keinen apoptotischen Zelltod auslöste, sollte die Funktionsfähigkeit dieser Substanz in Thymozyten der Maus und DC überprüft werden.

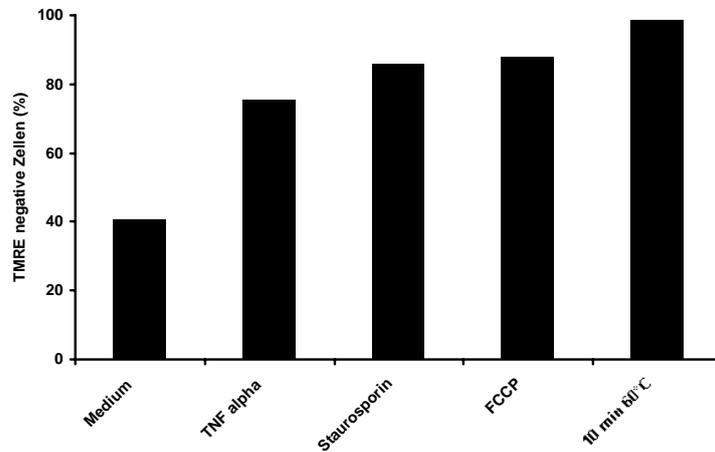
Dazu wurden T-Zellen aus dem Thymus verwendet bzw. DC mit Actinomycin D vorinkubiert und anschließend mit TNF $\alpha$  inkubiert. Die Zellen wurden nach PI und TMRE-Färbung durchflusszytometrisch analysiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Thymozyten, als Positivkontrolle dienten Thymozyten, die über 10 min auf 60°C erhitzt wurden bzw. mit FCCP oder mit Staurosporin behandelte Thymozyten.

Bei Thymozyten zeigte sich nach 5-stündiger Inkubation mit TNF $\alpha$  (100 ng/ml) eine Rate von ca. 75% TMRE-negative Zellen gegenüber ca. 40% TMRE-negative Zellen in unbehandelten Zellen (Abb. 3.6.1.3 A, B). Mit Actinomycin D vorinkubierte, TNF $\alpha$ -behandelte DC lagen mit ca. 40% PI-positiven Zellen über denen von unbehandelten DC (ca. 25% PI-Positivität, Abb 3.6.1.3 C).

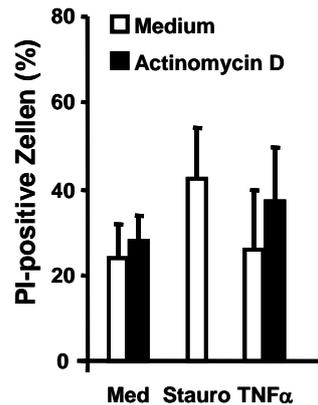
A:



B:



C:



**Abb. 3.6.1.3 Überprüfung der Funktion murinen TNF $\alpha$ .** Frisch isolierte DC aus der Maus (BALB/c) wurden 60 min/ 37°C mit 0,2  $\mu$ g/ ml Actinomycin D vorinkubiert. Zellen (DC bzw. Thymozyten) wurden 5 h lang mit 100 ng/ ml murinem TNF $\alpha$  stimuliert. Als Positivkontrollen dienten Staurosporin (4  $\mu$ M), FCCP (100 $\mu$ M) bzw. nekrotische Zellen (10 min, 60°C). TMRE-

und PI-Färbung und durchflusszytometrische Analyse. A: Thymozyten. B: Anteil TMRE-negativer Zellen aus (A) dargestellt als Balkendiagramm. C: Anteil PI-positiver DC. Medium = unbehandelte Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus n = 4 Versuchen (A, B), bzw. Mittelwerte mit Standardabweichungen aus n = 3 Versuchen (C).

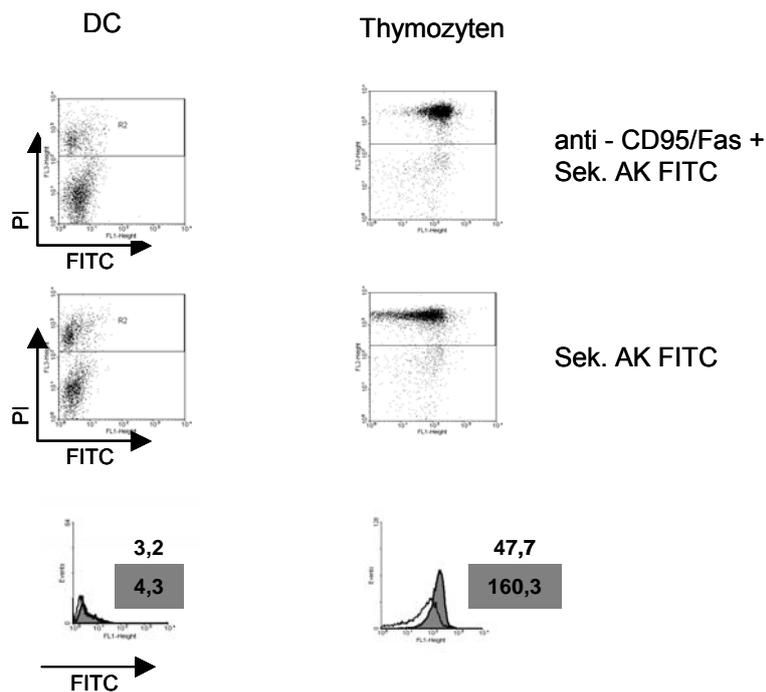
Das Ergebnis lässt darauf schließen, dass das im Versuch verwendete  $\text{TNF}\alpha$  funktionstüchtig ist.

### **3.6.2 CD95/Fas-Rezeptor**

Ein weiterer Weg Apoptose in Zellen von extrazellulär zu induzieren führt über den CD95/Fas-Rezeptor. Um zu überprüfen, ob dieser Weg in DC überhaupt in Frage kommt, wurde die Expression des Rezeptors auf DC gemessen. Als Positivkontrolle dienten T-Zellen aus dem Thymus.

DC und Thymozyten wurden mit einem unmarkierten anti-CD95/Fas-Antikörper und anschließend mit einem FITC-fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper gefärbt. Die unspezifische Bindung wurde durch alleinige Färbung mit dem FITC-markierten Sekundärantikörper ermittelt. Als Negativkontrolle wurden ungefärbte Zellen gemessen (Medium).

DC, die nur mit dem FITC-markierten Sekundärantikörper gefärbt worden waren, wiesen eine niedrige FITC-Fluoreszenzintensität auf, also ein Hinweis darauf, dass ein geringer Teil der gemessenen Zellen den FITC-Antikörper binden. Es bestand aber kein Unterschied zwischen DC, die sowohl mit CD95-Antikörper als auch mit Sekundärantikörper gefärbt wurden und solchen, die nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden (Abb. 3.6.2.1 linke Hälfte), ein Hinweis darauf, dass DC auch nicht den Primärantikörper binden und somit kein CD95/Fas exprimieren. In Thymozyten jedoch lag die mittlere Fluoreszenz in den mit Primär- und Sekundärantikörper inkubierten Zellen höher als in denen, die nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden (Abb. 3.6.2 rechte Hälfte), ein Zeichen dafür, dass Thymozyten den Primärantikörper binden und damit CD95/Fas exprimieren.



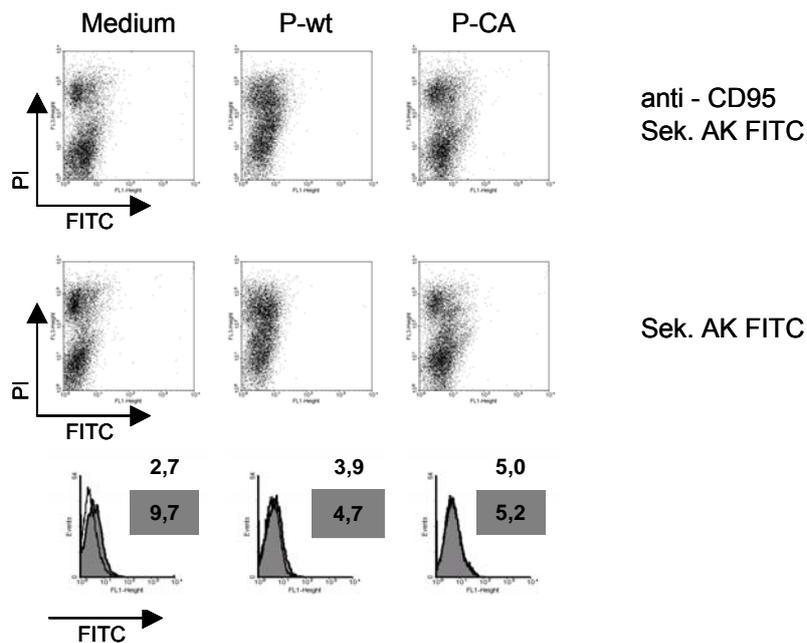
**Abb. 3.6.2.1: CD95/Fas-Rezeptorexpression.** DC und Thymozyten (C57BL/6) wurden 30 min mit 1  $\mu$ l/ 50 ml anti-CD95/Fas-Antikörper inkubiert und anschließend 20 min mit FITC-markiertem Sekundärantikörper (1:200) gefärbt. Es wurden nur PI-negative DC und Thymozyten ausgewertet. Wert im Overlay-Histogramm (unterste Reihe) gibt die mittlere FITC-Fluoreszenz an. Primär- und Sekundärantikörpergefärbte Zellen sind grau (ausgefüllte Fläche) dargestellt, nur Sekundärantikörpergefärbte Zellen weiß. Sek.AK = Sekundär-Antikörper. Dargestellt ist jeweils das Ergebnis aus n = 1 Versuchen.

Daraus kann geschlossen werden, dass DC im Gegensatz zu Thymozyten keinen CD95/Fas-Rezeptor aufweisen.

Auch wenn der vorangegangene Versuch darauf hingedeutet hatte, dass DC keinen CD95/Fas-Rezeptor exprimieren, sollte untersucht werden, ob dieser Rezeptor dennoch eine Funktion bei der Induktion von apoptotischem Zelltod in DC durch YopP hat.

Dazu wurde zunächst geprüft, ob CD95/Fas-Rezeptoren während der Infektion vermehrt exprimiert werden.  $5 \times 10^5$  DC wurden mit P-wt und P-CA (MOI 10:1) infiziert und anschließend mit dem anti-CD95/Fas-Antikörper inkubiert und mit dem Sekundärantikörper gefärbt. Als Negativkontrolle wurden nur sekundärgefärbte DC und uninfizierte Zellen gemessen.

Insgesamt zeigte sich keine Expression des CD95/Fas-Rezeptors, da kaum ein Unterschied zwischen den mittleren Fluoreszenzintensitäten von Primär- und Sekundärantikörperfärbung und alleiniger Sekundärantikörperfärbung detektierbar war. Die Infektion mit den Yersiniamutanten P-wt und P-CA beeinflusste die Expression des Rezeptors nicht (Abb. 3.6.2.2), wobei in diesem Versuch eine geringgradige CD95-Expression auf uninfizierten DC zu detektieren war.

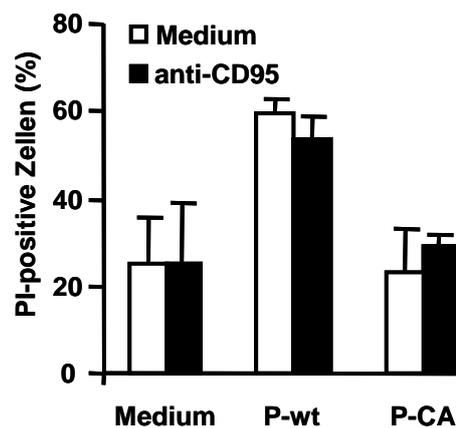


**Abb. 3.6.2.2 CD95/Fas-Expression in DC nach Infektion mit YopP.** DC (BALB/c) wurden 4 h mit P-wt und P-Ca infiziert, daraufhin 30 min mit 1  $\mu$ l/ 50 CD95-Antikörper inkubiert und anschließend 20 min mit FITC-markiertem Sekundärantikörper (1:200) gefärbt. Der Wert im Overlay-Histogramm gibt die mittlere FITC-Fluoreszenz an. Primär- und sekundärgefärbte Zellen werden grau (ausgefüllte Fläche) dargestellt, nur sekundärgefärbte Zellen weiß. Sek.AK = Sekundär-Antikörper. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus n = 3 Versuchen.

Gleichzeitig wurden  $5 \times 10^5$  DC mit einem stimulierenden anti-CD95/Fas-Antikörper inkubiert und anschließend mit P-wt und P-CA (MOI 10:1) infiziert. Als Kontrolle dienten DC, die nur infiziert und nicht über CD95/Fas stimuliert wurden. Zelltod wurde 4 h nach Infektion in TMRE und PI gefärbten Zellen per FACS gemessen. Negativkontrolle waren uninfizierte DC.

Im Vergleich zu den vorherigen Versuchen lag hier die Rate der apoptotischen Zellen in der Mediumkontrolle mit etwa 25 % PI-positiven Zellen recht hoch. Die mit dem apathogenen Stamm P-CA infizierten DC zeigten ähnlich hohe Zelltodraten (Abb. 3.6.2.3). P-wt infizierte DC wiesen zu etwa 60 % apoptotischen Zelltod auf, es gab aber keinen Unterschied zwischen Wildtyp-DC und denen, welche mit dem stimulierenden anti-CD95/Fas-Antikörper inkubiert worden waren (Abb. 3.6.2.3).

Dieser Versuch weist zusätzlich daraufhin, dass der YopP-induzierte apoptotische Zelltod in DC nicht über den CD95/Fas-Rezeptor beeinflusst wird. Die hohe Spontanapoptoserate der DC liegt am ehesten an den DC-Kulturen (z.B. zu geringe GM-CSF-Konzentrationen o.ä.).



**Abb. 3.6.2.3: Apoptotischer Zelltod über CD95/Fas-Rezeptor.** DC (BALB/c) wurden 10 min/ 37°C mit 1µg/ 50µl CD95-Antikörper bzw. in Medium vorinkubiert. Infektion mit P-wt und P-CA. Färbung mit TMRE und PI 4 h nach Infektion und anschließende durchflusszytometrische Analyse. Medium=uninfizierte DC. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus n = 3 Versuchen.

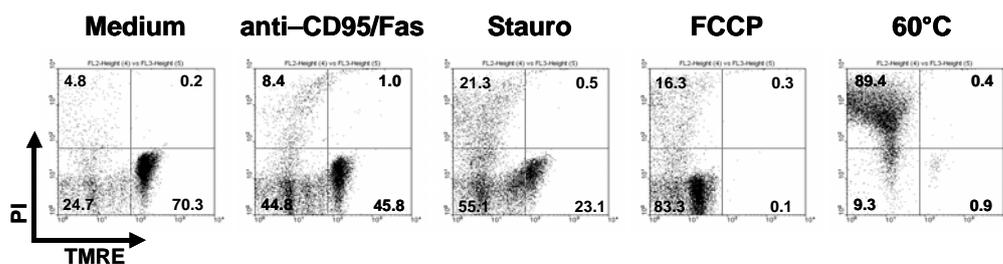
In den oben beschriebenen Versuchen konnte kein vermehrter Zelltod in *Y. enterocolitica*-infizierten DC, die zusätzlich über CD95/Fas-Rezeptoren stimuliert worden waren, detektiert werden.

Nachdem in Abb. 3.6.2.1 bereits gezeigt wurde, dass Thymozyten den CD95/Fas-Rezeptor exprimieren, sollte die Apoptose-induzierende Wirkung des anti-CD95/Fas-Antikörpers in Thymozyten kontrolliert werden.

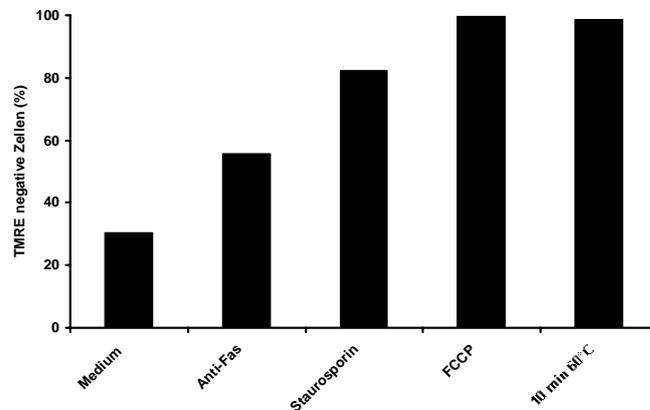
Dazu wurden  $5 \times 10^5$  Zellen 5 h mit anti-CD95/Fas-Antikörper inkubiert. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Zellen gemessen. Positivkontrolle waren Thymozyten, die über 10 min auf  $60^\circ\text{C}$  erhitzt wurden oder mit FCCP bzw. Staurosporin behandelt wurden. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch nach Färbung mit PI und TMRE.

Die mit anti-CD95/Fas-Antikörper behandelten Thymozyten zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle eine höhere Zelltodrate (53% versus 29% TMRE-negativer Zellen) (Abb 3.6.2.4 A, B). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass der anti-CD95/Fas-Antikörper eine zelltodinduzierende Wirkung hat. Die Tatsache, dass nur rund 60 % der Zellen ein niedriges inneres Mitochondrialmembranpotential, und damit apoptotischen Zelltod, aufweisen, könnte damit erklärt werden, dass nicht alle T-Zellen einen CD95/Fas-Rezeptor exprimieren und dass zu einem verhältnismäßig frühen Zeitpunkt (5 h nach anti-CD95/Fas-Antikörperstimulation) gemessen wurde.

**A:**



**B:**



**Abb. 3.6.2.4 Überprüfung des stimulierenden anti-CD95/Fas Antikörpers.** Frisch isolierte Thymozyten aus der Maus wurden 5 h mit 1 µg/ml anti-CD95/Fas-Antikörper bzw. 4 µM Staurosporin (Positivkontrolle) inkubiert. Als weitere Positivkontrollen dienten FCCP 100 µM (30 min) und Erhitzung auf 60°C über 10 min. DC wurden TMRE und PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (A). Darstellung des Anteils TMRE-negativer DC aus (A) als Balkendiagramm (B). Medium = unbehandelte Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus n = 3 Versuchen.

### 3.6.3 TRAIL-Rezeptor

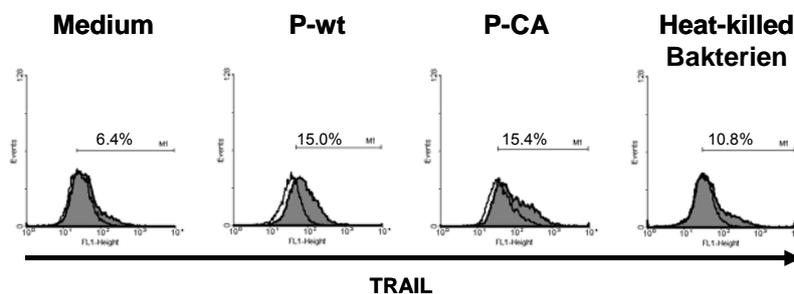
Ein weiterer Weg, von extrazellulär her apoptotischen Zelltod zu induzieren, ist der Weg über den TRAIL-Rezeptor. Da in der Literatur bislang wenig über TRAIL-Expression in DC beschrieben wurde, sollte zunächst die Expression des Rezeptors in uninfizierten DC bestimmt werden.

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob DC nach Infektion mit YopP vermehrt TRAIL-Rezeptoren exprimieren. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  DC mit P-wt und P-CA (MOI 10:1) bzw. mit Heat-killed *Y.e.* infiziert, anschließend mit anti-TRAIL-R-Antikörper inkubiert und daraufhin mit einem Sekundärantikörper gefärbt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt worden waren. Die DC wurden durchflusszytometrisch analysiert.

Uninfizierte DC zeigten eine TRAIL-R-Expressionsrate von 6,4%. Infektion mit P-wt bzw. P-CA führte zu einer Steigerung der Expressionsraten um mehr als

das Doppelte. In den mit Heat-killed *Y.e.* behandelten DC lag die Expressionsrate gegenüber den uninfizierten DC ebenfalls geringgradig höher, was darauf hindeutet, dass ein Teil der gesteigerten TRAIL-R-Expressionsraten auf einen Effekt durch LPS zurückzuführen ist.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein bestimmter Teil (ca. 10 bis 15 %) der DC unter Einfluß von LPS TRAIL-Rezeptoren exprimiert, da sowohl YopP tragende Bakterien, als auch apathogene Stämme (P-CA und Heat-killed *Y.e.*) diesen Effekt induzieren (Abb. 3.6.3.1).



**Abb. 3.6.3.1 Expression des TRAIL-Rezeptors in DC nach Infektion mit *Y.e.*** DC (BALB/c) wurden mit P-wt, P-CA und Heat-killed *Y.e.* infiziert. 4 h nach Infektion wurden die Zellen 30 min lang mit 2 µl/ 50 µl anti-TRAIL-Antikörper inkubiert und anschließend 20 min mit FITC-markierten Sekundärantikörper (1:200) gefärbt. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Primär- und sekundärgefärbte DC sind im Overlay-Histogramm grau, nur sekundärgefärbte DC weiß dargestellt. Wert im Histogramm gibt den Anteil der Zellen mit TRAIL-Rezeptorexpression an. Medium = nicht-infizierte Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus n = 3 Versuchen.

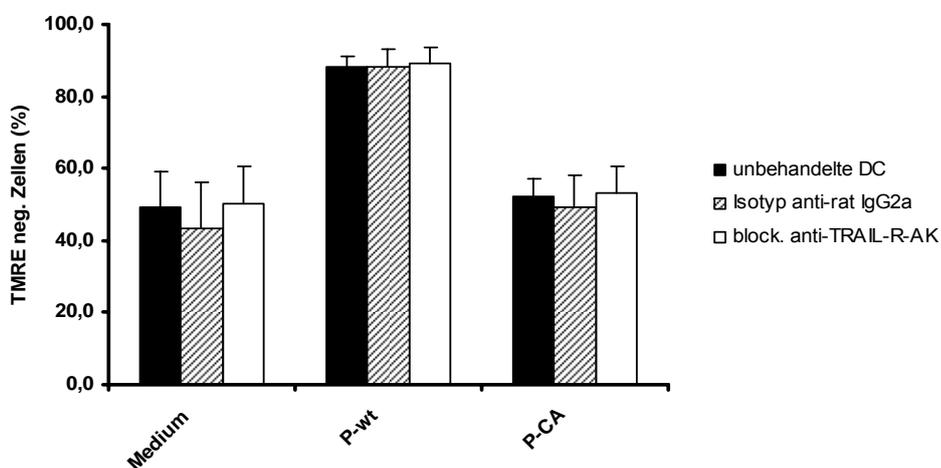
Obwohl der vorherige Versuch ergab, dass nur ein geringer Anteil von DC den TRAIL-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren, sollte die Bedeutung dieses Rezeptor bei einer Infektion der DC mit YopP in einem separaten Versuch geklärt werden.

Hierzu wurden  $1 \times 10^6$  DC mit einem blockierenden anti-TRAIL-R-Antikörper (um einen „Knock out Effekt“ zu simulieren) oder dessen Isotyp vorinkubiert und anschließend mit P-wt und P-CA infiziert. Die Zelltodrate wurde nach Färbung mit TMRE und PI durchflusszytometrisch bestimmt. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte DC untersucht.

Die Versuche zeigten für die Mediumkontrolle eine hohe Rate an Zellen mit niedrigem inneren Mitochondrienmembranpotential, die nicht durch die Inkubation mit dem Anti-TRAIL-R-Antikörper oder mit dem Isotypen beeinflusst wurde (Abb. 3.6.3.2). Die P-CA infizierten Zellen starben zu einer vergleichbaren Quote, auch hier zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Antikörperbehandlung (Abb. 3.6.3.2). Zellen, die mit P-wt infiziert wurden, beschrieben eine hohe Rate an apoptotischem Zelltod (Abb. 3.6.3.2), es waren aber auch hier keine Unterschiede zwischen Zellen, deren TRAIL-Rezeptor geblockt war und jenen, die unbehandelt waren.

Die hohe Spontanapoptoserate in den unbehandelten Zellen ist am ehesten auf die Versuchsbedingungen (mehrere Waschschrte für die Antikörperinkubation) zurückzuführen.

In Kombination mit dem Versuch zur TRAIL-Rezeptorexpression begründet dieses Ergebnis zusätzlich die Annahme, dass in Dendritischen Zellen YopP-induzierte Apoptose nicht in kausalem Zusammenhang mit dem TRAIL-Rezeptor steht.



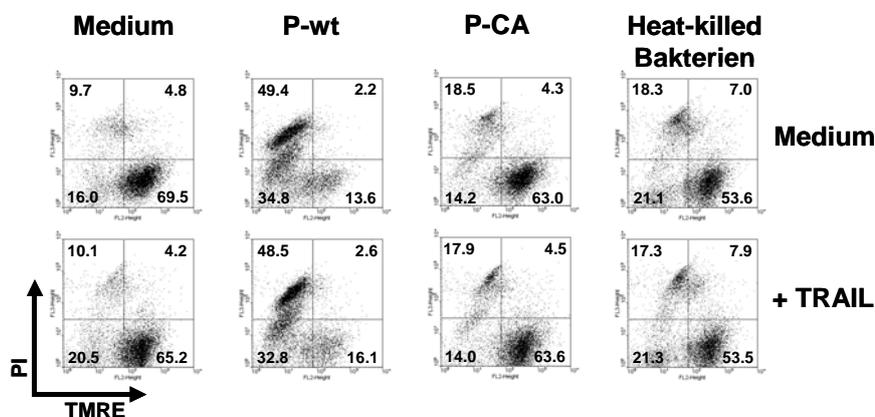
**Abb 3.6.3.2 YopP-vermittelte Apoptose via TRAIL-Rezeptor.** DC (BALB/c), unbehandelt bzw. 30 min auf Eis mit 2µg/ 50µl blockierendem anti-TRAIL-Antikörper bzw. 1µg/ 50µl Anti-rat IgG<sub>2a</sub>-Isotyp vorinkubiert. Die Zellen wurden dann mit P-wt und P-CA infiziert. 4 h nach Infektion Färbung mit TMRE und PI und anschließende durchflusszytometrische Analyse. Medium = uninferzierte DC. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus n = 3 Versuchen.

Da sich eine geringgradige Steigerung der TRAIL-Rezeptorexpression in DC nach Infektion mit YopP gezeigt hatte (Abb. 3.6.3.1), sollte untersucht werden, ob DC bei zusätzlicher Gabe von TRAIL-Liganden vermehrt Zelltod zeigt.

Dazu wurden  $1 \times 10^6$  DC mit P-wt, P-CA und Heat-killed *Y.e.* infiziert und gleichzeitig mit TRAIL-Ligand (SuperKillerTRAIL) behandelt. Als Negativkontrolle wurden uninfizierte Zellen gemessen. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch nach Färbung mit TMRE und PI.

Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den mit TRAIL-Ligand stimulierten DC und den unstimulierten Zellen (Abb. 3.6.3.3). Die Mediumkontrolle zeigte geringgradigen Zelltod (Spontanapoptose). Die apathogenen Stämme (P-CA und Heat-killed *Y.e.*) verursachten jeweils in ca. 30 bis 40 % der DC Zelltod. P-wt induzierte in ca. 80 bis 85 % der DC Zelltod (Abb. 3.6.3.3), was oben beschriebenen Raten entspricht.

Diese Ergebnisse könnten damit erklärt werden, dass der exprimierte TRAIL-Rezeptor keine Funktion aufweist oder der verwendete Ligand funktionslos ist.



**Abb. 3.6.3.3 TRAIL-induzierter Zelltod in YopP-infizierten DC.** DC (BALB/c) wurden mit P-wt, P-CA und Heat-killed *Y.e.* infiziert. Ein Teil der DC wurde zusätzlich zur Infektion mit 500 ng/ml stimulierendem TRAIL-Ligand behandelt. 4 h nach Infektion TMRE- und PI-Färbung und durchflusszytometrische Analyse. Medium = uninfizierte DC. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus n = 2 Versuchen.

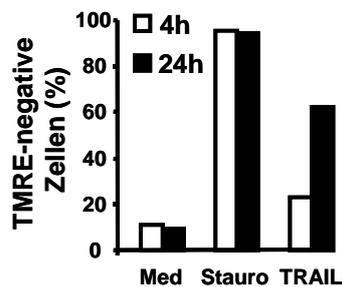
Da der verwendete TRAIL-Ligand in DC keinen apoptotischen Zelltod auslöste, wurde die Funktionsfähigkeit des Liganden in Jurkatzellen (humane T-Zellen)

überprüft, da sich auch in Thymozyten aus Mäusen nach Gabe von Super-KillerTRAIL (TRAIL-Ligand) kein Zelltod zeigte.

Dazu wurden  $1 \times 10^6$  Jurkatzellen 4 bzw. 24 h mit SuperKillerTRAIL inkubiert. Die Zellen wurden nach PI und TMRE-Färbung durchflusszytometrisch analysiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Jurkatzellen, als Positivkontrolle dienten Jurkatzellen, die mit Staurosporin behandelt wurden.

Die Zelltodrate in den unbehandelten Zellen (Medium) lag sowohl nach 4 als auch nach 24 h mit ca. 10 % TMRE-negativen Zellen niedrig. Staurosporin löste schon zum frühen Zeitpunkt in fast allen Zellen (ca. 90 % TMRE-negative Zellen) Zelltod aus, der auch nach 24 h nicht mehr anstieg.

Zellen, die mit SuperKillerTRAIL behandelt wurden, zeigten 4 h nach Behandlung eine moderate Zelltodrate (ca. 25 % der Zellen), diese stieg nach 24 h auf 60 % TMRE-negative Zellen an (Abb. 3.6.3.4).



**Abb. 3.6.3.4 Überprüfung von SuperKillerTRAIL in humanen T-Zellen.** T-Zellen (Jurkat J16) wurden mit 500 ng/ml TRAIL-Ligand inkubiert. Als Positivkontrolle diente Staurosporin (4 $\mu$ M). Die Zellen wurden nach 4 bzw. 24 h mit TMRE und PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Med = unbehandelte Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte aus n = 2 Versuchen.

Mit diesem Ergebnis konnte gezeigt werden, dass der TRAIL-Ligand funktions-tüchtig ist.

#### 4. Diskussion

Das gram-negative Bakterium *Yersinia enterocolitica* ist durch verschiedene Pathogenitätsfaktoren in der Lage, das Immunsystem seines Wirtsorganismus zu beeinflussen. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass *Yersinia enterocolitica* im Wirt überleben kann.

Ein wichtiger Pathogenitätsfaktor von *Yersinia enterocolitica* ist YopP, welches indirekt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors „nuclear factor kappa B“ (NF- $\kappa$ B) verhindert (127). Über diesen Weg und über die Aktivierung von Caspasen wird apoptotischer Zelltod in murinen Makrophagen ausgelöst (94, 95).

In einem ersten Schritt sollte geklärt werden, zu welchem Zeitpunkt nach Yersinieninfektion YopP-vermittelter Zelltod in DC einsetzt. YopP-abhängig fällt die NF- $\kappa$ B-Konzentration 90 min nach Infektion im Zellkern stark ab (38). Durch Infektion von DC mit dem *Y. enterocolitica* Wildtypstamm und anschließender Bestimmung einer Zelltodkinetik sollte ermittelt werden, ob Zelltod vor dem Zeitpunkt 90 min nach Infektion einsetzt und damit der Abfall des NF- $\kappa$ B im Zellkern nicht ausschließlich ursächlich für den Zelltod sein kann. Andererseits würde ein YopP-vermittelter Zelltod nach mehr als 90 min nach Infektion dafür sprechen, dass der Abfall der NF- $\kappa$ B-Konzentration im Zellkern die Ursache für den Zelltod in DC darstellt.

Die Infektionsversuche zeigten, dass Zelltod zwischen 90 und 120 min nach Infektion mit YopP einsetzte. Dazu wurden sowohl PI-positive Zellen gemessen (Verlust der Zellmembranintegrität) als auch der Abfall des inneren, mitochondrialen Transmembranpotentials, ein Zeichen früher Apoptose, bestimmt.

Mithilfe dieser Ergebnisse, die zeigten, dass der Zeitpunkt des Zelltodbeginns mit dem Abfall der NF- $\kappa$ B-Konzentration im Zellkern zusammenfällt, konnte nicht abschließend geklärt werden, ob die verminderte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in DC ursächlich für den Zelltod in DC ist.

Deshalb wurden weiterführende Infektionsversuche in DC durchgeführt, die zuvor mit verschiedenen NF- $\kappa$ B-Inhibitoren vorinkubiert worden waren. Dadurch sollte die NF- $\kappa$ B-Aktivierung zusätzlich zum NF- $\kappa$ B-inhibierenden Effekt durch YopP unterdrückt werden. Wäre die Ursache für den YopP-vermittelten Zelltod

in DC der Abfall der NF- $\kappa$ B-Konzentration, sollte die YopP-vermittelte Zelltodrate durch Vorinkubation mit NF- $\kappa$ B-Inhibitoren noch weiter ansteigen.

Nachdem mittels NF- $\kappa$ B-ELISA die NF- $\kappa$ B-hemmende Wirkung der Inhibitoren überprüft worden war, zeigte sich entgegen den Erwartungen, dass die Zelltodraten nach *Y. enterocolitica*-Infektion in DC, die mit NF- $\kappa$ B-Inhibitoren vorinkubiert wurden, gegenüber unbehandelten DC niedriger lagen.

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der YopP-induzierte Zelltod nicht von einer verminderten NF- $\kappa$ B-Konzentration abhängig ist. Im Zusammenhang mit bereits publizierten Artikeln gesehen, ist dieses Versuchsergebnis durchaus interessant, da der Abfall der NF- $\kappa$ B-Konzentration zumindest in murinen Makrophagen bislang als zentrale Ursache für die Einleitung von Apoptose gesehen wurde (94-96).

Da in Makrophagen bereits gezeigt werden konnte, dass YopP (YopJ in *Yersinia pseudotuberculosis*) mittels seiner Cysteinproteaseaktivität in die Signalwege der Wirtszelle eingreift (79,80) und apoptotischen Zelltod auslöst (32,95,98), sollte in DC der Einfluss der Cysteinproteaseaktivität auf die Zelltod-induzierende Wirkung von *Yersinia* YopP untersucht werden.

Dafür wurden Infektionsversuche in DC mit zwei Yersinienmutanten durchgeführt, einer katalytisch aktiven (P-wt) und einer katalytisch inaktiven Mutante (P-CA) (98).

Die Infektion mit der P-CA-Mutante führte im Vergleich zur P-wt-Mutante zu deutlich verminderten Zelltodraten in DC (vergleichbar mit uninfizierten Zellen). Von daher wurde gezeigt, dass die Cysteinproteaseaktivität von YopP essentiell für die Zelltodinduktion durch YopP in DC ist.

Als ein weiterer Punkt wurde der Einfluß von Toll-like-Rezeptoren (TLR2 und TLR4) auf den YopP-vermittelten Zelltod in DC untersucht.

Dazu wurden Infektionsversuche mit TLR2/TLR4-defizienten DC durchgeführt. Die Zelltodraten wurden dabei mittels PI-Färbung (Verlust der zellulären Membranintegrität) bzw. anhand der Rate hypodiploider Nuclei bestimmt. Die Zelltodraten lagen nach Infektion mit Wildtypyersinien (pYV<sup>+</sup>) in den Knock-out-

Zellen, im Vergleich zu Wildtyp-DC, zu frühen Zeitpunkten (bis 4 h nach Infektion) signifikant niedriger.

Mit einer Verzögerung von 2 bis 3 h gegenüber Wildtyp-DC setzte jedoch auch in den TLR2/TLR4-defizienten DC 4 h nach Infektion YopP-vermittelter Zelltod ein. Weiterführende Untersuchungen an DC von TLR2- bzw. TLR4-knock-out-Mäusen ergaben, dass TLR4, und nicht TLR2, essentiell für die frühe Phase (bis 4 h nach Infektion) des YopP-vermittelten Zelltods ist. Im Gegensatz dazu scheint der YopP-vermittelte Zelltod zu späteren Zeitpunkten, also mehr als 4 h nach Infektion, unabhängig vom TLR4-Signalweg zu sein.

Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Infektionsversuchen in Makrophagen, die zeigen konnten, dass der YopP-vermittelte Zelltod in Makrophagen über TLR4 vermittelt wird (44,123). Als Ursache für den TLR4-vermittelten Zelltod in Makrophagen wird das Zusammenspiel von TLR4-vermitteltem LPS-Signal und gleichzeitiger Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch YopP/J (95,127) diskutiert. Dieses Zusammenspiel ist auch in DC zumindest in der frühen, TLR4-abhängigen Phase der YopP-abhängig Zelltodinduktion nicht ausgeschlossen, da NF- $\kappa$ B-Aktivierung in DC ebenfalls durch YopP induziert wird (38).

Die intrazellulären Adaptermoleküle MyD88 und TRIF spielen für die Weiterleitung des TLR4-Signals eine bedeutende Rolle. So wurde kürzlich in Makrophagen entdeckt, dass MyD88 und TRIF an der LPS/YopP-abhängigen Apoptosevermittlung beteiligt sind (96,97).

Infektionsversuche mit DC aus MyD88- bzw. TRIF-defizienten Mäuse zeigten jedoch keine Unterschiede der YopP-vermittelten Zelltodraten gegenüber entsprechender Wildtyp-DC.

Eine Erklärung hierfür wäre, dass die beiden Adaptermoleküle in ihrer Signalfunktion redundant sind, also die Anwesenheit eines Adapters für die Weiterleitung des LPS-Signals ausreichend ist. Andererseits wäre es vorstellbar, dass weitere Adaptermoleküle in den TLR4-Signalweg eingebunden sind, beispielsweise TIRAP oder Mal (59).

Untersuchungen an Makrophagen deuten darauf hin, dass die Aktivierung von Caspase 8 den durch LPS ausgelösten, YopP-vermittelten Zelltod von Makrophagen bedingen (32,44,96,97).

Untersuchungen in TLR2/TLR4-defizienten DC zeigten, dass die Spaltung von Caspase 3 und Caspase 8 nach YopP-Infektion gegenüber Wildtyp-DC um ca. 90 min verzögert ist. Diese Ergebnisse im Zusammenhang gesehen mit den Resultaten des verzögerten Zelltods in TLR2/4-defizienten DC deuten darauf hin, dass Caspase 8 Aktivierung einen wichtigen Bestandteil der YopP-induzierten Apoptose in DC darstellt.

Um weitere Einsichten in die Mechanismen frühen TLR4-abhängigen, bzw. späten YopP-vermittelten Zelltod in DC zu gewinnen und die Rolle der Caspasen vertiefend zu klären, wurden TLR2/TLR4-defiziente bzw. Wildtyp-DC eine Stunde vor Infektion mit dem Pancaspaseninhibitor zVAD-fmk inkubiert. Es zeigte sich, dass die Inhibition der Caspasen durch zVAD-fmk vor der Infektion mit pYV<sup>+</sup> eine Reduktion der PI-positiven DC um ca. 50 % verursachte. Damit ist YopP-vermittelter Zelltod in DC nicht ausschließlich Caspasen-abhängig, sondern zum Teil auch Caspasen-unabhängig. Die Tatsache, dass der Caspaseninhibitor die Rate der PI-positiven DC sowohl zu frühen (bis 4 h nach Infektion) als auch zu späten (mehr als 4 h nach Infektion) Zeitpunkten senkt, legt nahe, dass die Mechanismen des frühen, TLR4-abhängigen und des späten, TLR-unabhängigen YopP-induzierten Zelltods in DC ähnlich sind.

Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten, um den TLR4-unabhängigen, verzögerten Zelltod in DC zu erklären. Einerseits könnte YopP, da ja ein mögliches LPS-Signal durch Fehlen des TLR4-Rezeptors blockiert ist, alleine den Zelltod vermitteln. Andererseits könnte LPS unter Umgehung des TLR4-Rezeptors über einen bislang unbekanntem Weg Zelltod in DC einleiten. Diese Vermutung könnte auch aus Versuchen mit TLR4-defizienten Makrophagen abgeleitet werden. In diesen Makrophagen war der Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  und die Aktivierung der MAP-Kinase JNK nach Infektion mit einer YopJ-defizienten Mutante von *Y. pseudotuberculosis* verzögert, nicht jedoch verhindert (123).

FADD (Fas-associated death domain), welches die Caspase 8 Aktivierung vermittelt, spielt eine wichtige Rolle bei LPS-vermitteltem, YopP-induziertem Zelltod in Makrophagen (44,96). Da die YopP-induzierte Aktivierung von Caspase 8 durch TLR4 beeinflusst wird, könnte eine bisher unbekannte Verbindung zwischen dem TLR4-Rezeptor und FADD bestehen, welche den frühen, TLR4-abhängigen Zelltod in DC verursacht. Neueste Studien über den YopP/J-induzierten Zelltod in Makrophagen und DC lassen vermuten, dass YopP direkt oder indirekt die Bildung des death inducing signalling complex (DISC) verursacht und damit Caspase 8 aktiviert (32,44,96).

DISC wird an den intrazellulären Domänen von Todesrezeptoren klassischerweise nach Stimulation der Todesrezeptoren über den entsprechenden Liganden formiert.

Deshalb sollte untersucht werden, ob der YopP-vermittelte Zelltod in DC auch vom Signalweg der Todesrezeptoren (TNF-Rezeptor, CD95/Fas und TRAIL-R) beeinflusst wird.

Todesrezeptoren binden Todesliganden ( $\text{TNF}\alpha$ , FasL und TRAIL) und vermitteln auf diese Weise extrinsische Signale über eine Signalkaskade, in der die Caspase 8 eine zentrale Funktion einnimmt. Auf diese Weise werden in der Zelle Vorgänge induziert, die zum apoptotischen Untergang der Zelle führen.

Zunächst sollte untersucht werden, inwiefern der TNF-Rezeptor den YopP-induzierten Zelltod in DC beeinflusst.  $\text{TNF}\alpha$  wird von vielen Zellen (z.B. Makrophagen, Mastzellen, Endothelzellen u.a.) gebildet und kann durch Bindung über den TNF-Rezeptor Apoptose einleiten (69,116). LPS und andere bakterielle Produkte können die Produktion von großen Mengen an  $\text{TNF}\alpha$  durch die beschriebenen Zellen induzieren (116). LPS könnte DC auf diesem Weg TLR4-abhängig zur  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion anregen. So könnte bei gleichzeitiger Hemmung von NF- $\kappa$ B durch YopP über einen autokrinen  $\text{TNF}\alpha$ -Loop Apoptose via TNF-R1-Rezeptoren induziert werden.

Die Durchführung von  $\text{TNF}\alpha$ -ELISAs aus Zellkulturüberständen *Yersinia enterocolitica*-infizierter DC ergab, dass *Yersinia enterocolitica*-Wildtyp-infizierte DC zwar geringe Mengen  $\text{TNF}\alpha$  sezernierten, verglichen mit der Sekretion durch DC, die

mit YopP-defizienten *Y.e.* infiziert worden waren, bzw. verglichen mit LPS-behandelten DC war die Menge um ein vielfaches geringer. Es ist daher unwahrscheinlich, dass autokrin produziertes TNF $\alpha$  in *Y.e.* Wildtyp-infizierten DC für den Zelltod verantwortlich ist. Dieses Ergebnis wurde dadurch bestätigt, dass TNF-R1-defiziente DC gegenüber Wildtyp-DC nach Infektion mit *Y.e.* Wildtyp keine Unterschiede hinsichtlich der Zelltodrate aufwiesen.

Zudem steigerte rekombinantes, murines TNF $\alpha$  die YopP-induzierte Zelltodrate in infizierten DC nicht, so dass gefolgert werden kann, dass YopP-vermittelter Zelltod in DC nicht abhängig vom TNF-Rezeptor1 ist.

Im Folgenden wurde die Abhängigkeit des YopP-vermittelten Zelltods in DC vom CD95/Fas-Rezeptor untersucht. Der CD95/Fas-Rezeptor vermittelt über einen „death inducing signalling complex“ (DISC) die Aktivierung von Caspasen und damit apoptotischen Zelltod (55,108).

Aus der Literatur ist bekannt, dass durch Infektion mit dem Humanen Cytomegalie Virus (HCMV) die Expression von CD95/Fas-Ligand deutlich gesteigert werden kann (85).

Eigene Versuche mit mouse DC zeigten, dass ca. 13% der uninfizierten DC den CD95/Fas-Rezeptor exprimieren, die Expressionsrate konnte aber nach *Y.e.*-Infektion nicht gesteigert werden. Die Inkubation von DC mit stimulierendem CD95/Fas-Antikörper konnte weder in uninfizierten DC (lediglich zusammen mit Actinomycin D), noch in YopP-infizierten DC die Zelltodrate erhöhen.

Diese Ergebnisse werden durch eine Reihe von bereits veröffentlichten Studien gestützt. So wurde in DC gezeigt, dass die Expression des CD95/Fas-Rezeptors wohl abhängig von dem Reifegrad der DC ist. CD95/Fas-abhängige Apoptose scheint nur in Phasen früher DC-Differenzierung von Bedeutung zu sein (94).

Außerdem sind mouse DC, die aus dem Knochenmark gewonnen wurden, resistent gegenüber Apoptose über den CD95/ Fas-Rezeptor (8). Zwar exprimieren die DC große Menge an Fas-Ligand an ihrer Oberfläche, sind aber relativ unsensitiv gegenüber CD95/Fas-vermitteltem Zelltod. Damit unterscheiden sich DC erheblich von anderen Antigen-präsentierenden Zellen.

Die apoptoseinduzierenden TRAIL-Rezeptoren wurden bislang in der Literatur überwiegend auf Tumorzellen beschrieben. So wurde untersucht, ob über diesen Rezeptor relativ selektiv in Tumorzellen Apoptose induziert werden kann (31,115). Ähnlich wie über den CD95/Fas-Rezeptor wird auch über den TRAIL-Rezeptor via einen death inducing signalling complex (DISC) caspasen-abhängig Apoptose induziert (106).

Es wurde gezeigt, dass aktivierte Makrophagen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose sensibel sind. So konnten TRAIL-exprimierende Tumorzellen in murinen Makrophagen Apoptose induzieren (107). Weitere Versuche ergaben, dass Viren (z.B. Influenzavirus) und Zytokine in der Lage sind, in normalen Zellen das Muster der TRAIL-Rezeptoren so zu verändern, dass Zellen, die gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose bislang nicht sensibel waren, nach der Infektion TRAIL-vermittelt starben (54).

Entsprechend sollte in DC untersucht werden, ob TRAIL-Rezeptoren (TRAIL-R) den YopP-induzierten Zelltod in DC beeinflussen. In einem ersten Schritt sollte dazu die Expression von TRAIL-R auf DC gemessen werden.

Durchflusszytometrische Analysen ergaben, dass TRAIL-R nur von ca. 6 % der murinen DC exprimiert wird. Nach Infektion mit *Yersinia enterocolitica* steigerte sich die TRAIL-Expression von DC zwar um das Doppelte (ca. 15 % TRAIL-R-Expression), jedoch ließ sich über rekombinantes TRAIL (TRAIL-R-Ligand) keine Steigerung der YopP-vermittelten Apoptose in DC auslösen.

Entsprechend der niedrigen TRAIL-R-Expressionsrate von DC waren auch infizierte DC nicht über den TRAIL-R stimulierbar, während 60 % humaner T-Zell-Lymphomzellen (Jurkat J16) 24 h nach Stimulation mit rekombinatem TRAIL apoptotisch wurden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass auf DC ein sogenannter „decoy“ TRAIL-R exprimiert wird, ein Rezeptor, welcher keine intrazelluläre Domäne besitzt (81).

Da YopP-vermittelter Zelltod nicht von den Todesrezeptoren abzuhängen scheint, ist beispielsweise denkbar, dass YopP durch Bindung eines bislang unbekanntem intrazellulären Faktors die Aktivierung der Caspasenkaskade vermittelt. Möglich wäre eine YopP-vermittelte, Todesrezeptor-unabhängige

Formation des death inducing signalling complex (DISC), woraufhin Caspasen-vermittelt Apoptose eingeleitet wird.

Aus der vorliegenden Arbeit lässt sich also folgern, dass YopP in DC Zelltod auslöst, und zwar 90 bis 120 min nach der Infektion mit *Yersinia enterocolitica*. Dabei ist es unwahrscheinlich, dass die nach 90 min einsetzende, verminderte NF- $\kappa$ B-Aktivierung ursächlich für den YopP-induzierten Zelltod ist.

Darüberhinaus konnte demonstriert werden, dass die Cysteinproteaseaktivität von YopP essentiell für die Induktion von Zelltod in DC ist.

Anhand der Versuche mit den Todesrezeptoren konnte gezeigt werden, dass YopP-vermittelter Zelltod in dendritischen Zellen nicht von der Anwesenheit der Todesrezeptoren TNF-R1, CD95/Fas und TRAIL-R abhängig ist.

## 5. Zusammenfassung

Das Bakterium *Yersinia enterocolitica* verfügt über Pathogenitätsfaktoren, *Yersinia* outer proteins (Yop), welche von *Y. e.* in Zielzellen transloziert werden. *Y. e.* beeinträchtigt die Immunabwehr des Wirtes insofern, als die translozierten Yops Signalwege beeinflussen und YopP Zelltod in antigenpräsentierenden Zellen (APC), beispielsweise Makrophagen oder DC, auslöst.

Die vorliegende Arbeit sollte, aufbauend auf bisherigen Erkenntnissen zur Zelltodinduktion durch YopP in APC, untersuchen, welchen Einfluss die Cysteinproteaseaktivität von YopP auf die Zelltodinduktion in dendritischen Zellen von Mäusen hat. Weiterhin sollte die Bedeutung des Toll-like-Rezeptors 4 und der Todesrezeptoren TNF-R, CD95/Fas und TRAIL-R bei der Induktion von YopP-vermitteltem Zelltod in DC geklärt werden.

Mithilfe entsprechender Yersinienmutanten konnte geklärt werden, dass die Cysteinproteaseaktivität von YopP essentiell für YopP-vermittelten Zelltod in infizierten DC ist. Weiterhin wurde festgestellt, dass YopP zwischen 90 und 120 min nach Infektion Zelltod in DC auslöst. In diesem Zusammenhang konnte die Bedeutung der YopP-vermittelten, verminderten Aktivierung von NF- $\kappa$ B, die ebenfalls 90 min nach Infektion einsetzt, in DC nicht abschließend geklärt werden.

Versuche mit DC von TLR2/TLR4-, TLR2- und TLR4-defizienten Mäusen ergaben, dass für den YopP-vermittelten Zelltod in DC TLR4 bis ca. 4 h nach Infektion von entscheidender Bedeutung ist. Zu späteren Zeitpunkten hingegen vermittelt YopP Zelltod in DC unabhängig von TLR4.

Aufgrund der Verzögerung der YopP-abhängigen Caspasenaktivierung in TLR2/TLR4-defizienten DC, sollte geklärt werden, ob Todesrezeptoren (TNF-R, CD95/Fas und TRAIL-R) an YopP-vermitteltem Zelltod beteiligt sind. Durchflusszytometrische Analysen der Expression von CD95/Fas und TRAIL-R und Infektionsversuche mit DC aus TNF-R1-defizienten Mäusen ergaben jedoch, dass die Todesrezeptoren für den YopP-vermittelten Zelltod in mouse DC keine entscheidende Rolle spielen.

Angesichts dieser Ergebnisse ist es vorstellbar, dass die Cysteinprotease YopP direkt Caspasen aktiviert und dadurch Zelltod in DC einleitet; ein Prozess, der LPS-vermittelt über den TLR4-Rezeptor-Signalweg beschleunigt wird.

## 6. Abkürzungen

AK	Antikörper
APC	antigen-presenting cell
APP	amyloid precursor proteins
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCA	bicinchoninic acid
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia-2
BSA	bovine serum albumine
CAD	caspase activated deoxyribonuclease
CAS	Crk-associated substrate
CCR	chemokine (C-C motif) receptor
CD	cluster of differentiation
c-FLIP	cellular FLICE-like inhibitory protein
clAP	cellular inhibitor of apoptosis
CpG	unmethyliertes Cytidin-Guanosin Dinukleotid
DC	dendritic cell
DISC	death inducing signalling complex
DNA	desoxyribo nucleic acid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis (2-aminoethylenether)-N,N,N,N'-Tetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-ligand associated death domain
FAK	Focal adhesion kinase
Fas-L	Fas-Ligand
FCCP	Carbonyl-Cyanide-4-trifluoro-methoxy-phenylhydrazone
FcR	Fc-receptor
FCS	fetal calf serum
FITC	fluoresceineisothiocyanate

FLICE	Fas-associated death domain-like IL-1 converting enzyme
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
FL-Kanal	Fluoreszenz-Kanal
Fyb	fyn-binding protein
GM-CSF	granulocyte/macrophage colony-stimulating factor
HEPES	4- (2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethan-Sulfonsäure
IAP	inhibitory apoptotic protein
Ig	Immunglobulin
IKK	I $\kappa$ B-Kinase-Komplex
I $\kappa$ B	inhibitor of nuclear factor kappa B
IL	Interleukin
Inv	Invasin
IRAK	IL-1-receptor-associated kinase
JNK	c-Jun amino (N) terminal kinase
LBP	LPS-bindendes Serumprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
Mal	T-lymphocyte maturation associated protein
MAP	mitogen activated protein
MD-2	Myeloid differentiation factor 2
MHC	major histocompatibility complex
MOI	multiplicity of infection
MyD88	myeloid differentiation primary response protein 88
M-Zelle	microfold-Zelle
NF- $\kappa$ -B	nuclear factor kappa B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAK	p21 associated kinase
PBS	phosphate-buffered saline
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
pYV	plasmid Yersinia virulence

RIP	receptor interacting protein
Rock	Rho kinase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TAB	TAK1 binding protein
TAK	TGF- $\beta$ -activated-kinase
TGF	transforming growth factor $\beta$
TRADD	TNF $\alpha$ receptor associated death domain
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRIF	TIR domain-containing adapter inducing IFN $\beta$
TIR	Toll/IL-1 receptor
TIRAP	TIR adaptor molecules
TLR	Toll-like-receptor
TMRE	Tetramethylrhodaminester
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TRAIL	TNF $\alpha$ related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TNF $\alpha$ related apoptosis-inducing ligand-Rezeptor
TTSS	type three secretion system
UV	Ultraviolett
VLE	very low endotoxine
Y.	<i>Yersinia</i>
YadA	<i>Yersinia</i> adhesin A
Y.e.	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Yop	<i>Yersinia</i> outer proteins
Ysc	<i>Yersinia</i> secretion; type III secretion apparatus
ZVAD-fmk	z-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone

## Einheiten

°C	Grad Celsius
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
l	Liter
μ	mikro
m	milli
min	Minuten
M	Mol l <sup>-1</sup> ; molar
n	nano
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
U	units

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Adachi, O., T. Kawai, K. Takeda, M. Matsumoto, H. Tsutsui, M. Sakagami, K. Nakanishi, and S. Akira.** 1998. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*. **9**:143-150.
2. **Ahvonen, P. and K. Dickhoff.** 1974. Uveitis, episcleritis and conjunctivitis associated with Yersinia infection. *Acta Ophthalmol. Suppl* **123**:209-212.
3. **Ahvonen, P., K. Sievers, and K. Aho.** 1969. Arthritis associated with Yersinia enterocolitica infection. *Acta Rheumatol. Scand.* **15**:232-253.
4. **Aleksic, S. and J. Bockemuhl.** 1990. [Microbiology and epidemiology of Yersinia infections]. *Immun. Infekt.* **18**:178-185.
5. **Algeciras-Schimnich, A., L. Shen, B. C. Barnhart, A. E. Murmann, J. K. Burkhardt, and M. E. Peter.** 2002. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol. Cell Biol.* **22**:207-220.
6. **Alison, M. R. and C. E. Sarraf.** 1994. Liver cell death: patterns and mechanisms. *Gut* **35**:577-581.
7. **Arnold, R., J. Scheffer, B. Konig, and W. Konig.** 1993. Effects of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* on cytokine gene expression and release from human polymorphonuclear granulocytes and epithelial (HEp-2) cells. *Infect. Immun.* **61**:2545-2552.
8. **Ashany, D., A. Savir, N. Bhardwaj, and K. B. Elkon.** 1999. Dendritic cells are resistant to apoptosis through the Fas (CD95/APO-1) pathway. *J. Immunol.* **163**:5303-5311.
9. **Ashkenazi, A. and V. M. Dixit.** 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**:1305-1308.
10. **Autenrieth, I. B. and R. Firsching.** 1996. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J. Med. Microbiol.* **44**:285-294.
11. **Autenrieth, I. B., V. Kempf, T. Sprinz, S. Preger, and A. Schnell.** 1996. Defense mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against *Yersinia enterocolitica* involve integrins and cytokines. *Infect. Immun.* **64**:1357-1368.
12. **Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka.** 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**:767-811.

13. **Banchereau, J. and R. M. Steinman.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245-252.
14. **Bell, D., J. W. Young, and J. Banchereau.** 1999. Dendritic cells. *Adv. Immunol.* **72**:255-324.
15. **Bliska, J. B. and D. S. Black.** 1995. Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. *Infect. Immun.* **63**:681-685.
16. **Bochud, P. Y. and T. Calandra.** 2003. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ* **326**:262-266.
17. **Bodmer, J. L., P. Schneider, and J. Tschopp.** 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **27**:19-26.
18. **Bottone, E. J.** 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:257-276.
19. **Bouza, E., A. Dominguez, M. Meseguer, L. Buzon, D. Boixeda, M. J. Revillo, R. L. de, and J. Martinez-Beltran.** 1980. *Yersinia enterocolitica* Septicemia. *Am. J. Clin. Pathol.* **74**:404-409.
20. **Brenner, D. J.** 1979. Speciation in *Yersinia*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **5**:33-43.
21. **Brocker, T., M. Riedinger, and K. Karjalainen.** 1997. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J. Exp. Med.* **185**:541-550.
22. **Cao, Z., J. Xiong, M. Takeuchi, T. Kurama, and D. V. Goeddel.** 1996. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* **383**:443-446.
23. **Carter, P. B.** 1975. Animal model of human disease. *Yersinia enterocolitica*. Animal model: oral *Yersinia enterocolitica* infection of mice. *Am. J. Pathol.* **81**:703-706.
24. **Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters, and A. Lanzavecchia.** 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388**:782-787.
25. **Chen, C. L., F. E. Yull, and L. D. Kerr.** 1999. Differential serine phosphorylation regulates I $\kappa$ B- $\alpha$  inactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**:798-806.
26. **Collins, T. J., P. Lipp, M. J. Berridge, W. Li, and M. D. Bootman.** 2000. Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release is inhibited by mitochondrial depolarization. *Biochem. J.* **347**:593-600.

27. **Cornelis, G. R.** 2002. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:742-752.
28. **Cornelis, G. R.** 2002. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J. Cell Biol.* **158**:401-408.
29. **Cornelis, G. R. and G. F. Van.** 2000. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:735-774.
30. **Cover, T. L. and R. C. Aber.** 1989. *Yersinia enterocolitica*. *N. Engl. J. Med.* **321**:16-24.
31. **Cretney, E., A. Shanker, H. Yagita, M. J. Smyth, and T. J. Sayers.** 2006. TNF-related apoptosis-inducing ligand as a therapeutic agent in autoimmunity and cancer. *Immunol. Cell Biol.* **84**:87-98.
32. **Denecker, G., W. Declercq, C. A. Geuijen, A. Boland, R. Benabdillah, G. M. van, M. P. Sory, P. Vandenabeele, and G. R. Cornelis.** 2001. *Yersinia enterocolitica* YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid. *J. Biol. Chem.* **276**:19706-19714.
33. **Deng, Y., X. Ren, L. Yang, Y. Lin, and X. Wu.** 2003. A JNK-dependent pathway is required for TNF $\alpha$ -induced apoptosis. *Cell* **115**:61-70.
34. **Dequeker, J., R. Jamar, and M. Walravens.** 1980. HLA-B27, arthritis and *Yersinia enterocolitica* infection. *J. Rheumatol.* **7**:706-710.
35. **Devenish, J. A. and D. A. Schiemann.** 1981. HeLa cell infection by *Yersinia enterocolitica*: evidence for lack of intracellular multiplication and development of a new procedure for quantitative expression of infectivity. *Infect. Immun.* **32**:48-55.
36. **Doan, J. E., D. A. Windmiller, and D. W. Riches.** 2004. Differential regulation of TNF-R1 signaling: lipid raft dependency of p42mapk/erk2 activation, but not NF-kappaB activation. *J. Immunol.* **172**:7654-7660.
37. **Eramo, A., M. Sargiacomo, L. Ricci-Vitiani, M. Todaro, G. Stassi, C. G. Messina, I. Parolini, F. Lotti, G. Sette, C. Peschle, and M. R. De.** 2004. CD95 death-inducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells. *Eur. J. Immunol.* **34**:1930-1940.
38. **Erfurth, S. E., S. Grobner, U. Kramer, D. S. Gunst, I. Soldanova, M. Schaller, I. B. Autenrieth, and S. Borgmann.** 2004. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect. Immun.* **72**:7045-7054.

39. **Fearon, D. T. and R. M. Locksley.** 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**:50-53.
40. **Finkel, E.** 2001. The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science* **292**:624-626.
41. **Grosdent, N., I. Maridonneau-Parini, M. P. Sory, and G. R. Cornelis.** 2002. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect. Immun.* **70**:4165-4176.
42. **Grutzkau, A., C. Hanski, H. Hahn, and E. O. Riecken.** 1990. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* **31**:1011-1015.
43. **Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery, and S. Amigorena.** 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:621-667.
44. **Haase, R., C. J. Kirschning, A. Sing, P. Schrottner, K. Fukase, S. Kusumoto, H. Wagner, J. Heesemann, and K. Ruckdeschel.** 2003. A dominant role of Toll-like receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteria-faced macrophages. *J. Immunol.* **171**:4294-4303.
45. **Haase, R., K. Richter, G. Pfaffinger, G. Courtois, and K. Ruckdeschel.** 2005. *Yersinia* outer protein P suppresses TGF-beta-activated kinase-1 activity to impair innate immune signaling in *Yersinia enterocolitica*-infected cells. *J. Immunol.* **175**:8209-8217.
46. **Hamid, N., A. Gustavsson, K. Andersson, K. McGee, C. Persson, C. E. Rudd, and M. Fallman.** 1999. YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microb. Pathog.* **27**:231-242.
47. **Hanski, C., U. Kutschka, H. P. Schmoranzler, M. Naumann, A. Stallmach, H. Hahn, H. Menge, and E. O. Riecken.** 1989. Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect. Immun.* **57**:673-678.
48. **Harkin, S. T., G. M. Cohen, and A. Gescher.** 1998. Modulation of apoptosis in rat thymocytes by analogs of staurosporine: lack of direct association with inhibition of protein kinase C. *Mol. Pharmacol.* **54**:663-670.
49. **Heesemann J. and Grüter L.** 1987. Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* **40**:37-41.

50. **Heesemann, J., K. Gaede, and I. B. Autenrieth.** 1993. Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rodents: a model for human yersiniosis. *APMIS* **101**:417-429.
51. **Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway, and R. A. Ezekowitz.** 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**:1313-1318.
52. **Hoogkamp-Korstanje, J. A., K. J. de, and J. Heesemann.** 1988. Persistence of *Yersinia enterocolitica* in man. *Infection* **16**:81-85.
53. **Hueber, A. O., A. M. Bernard, Z. Herincs, A. Couzinet, and H. T. He.** 2002. An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep.* **3**:190-196.
54. **Ishikawa, E., M. Nakazawa, M. Yoshinari, and M. Minami.** 2005. Role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune response to influenza virus infection in mice. *J. Virol.* **79**:7658-7663.
55. **Itoh, N. and S. Nagata.** 1993. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* **268**:10932-10937.
56. **Jiang, Z., H. J. Johnson, H. Nie, J. Qin, T. A. Bird, and X. Li.** 2003. Pellino 1 is required for interleukin-1 (IL-1)-mediated signaling through its interaction with the IL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4)-IRAK-tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) complex. *J. Biol. Chem.* **278**:10952-10956.
57. **Kabir, J., M. Lobo, and I. Zachary.** 2002. Staurosporine induces endothelial cell apoptosis via focal adhesion kinase dephosphorylation and focal adhesion disassembly independent of focal adhesion kinase proteolysis. *Biochem. J.* **367**:145-155.
58. **Kampik, D., R. Schulte, and I. B. Autenrieth.** 2000. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in *Yersinia* infections. *Infect. Immun.* **68**:2484-2492.
59. **Kawai, T. and S. Akira.** 2006. TLR signaling. *Cell Death. Differ.* **13**:816-825.
60. **Keij, J. F., C. Bell-Prince, and J. A. Steinkamp.** 2000. Staining of mitochondrial membranes with 10-nonyl acridine orange, MitoFluor Green, and MitoTracker Green is affected by mitochondrial membrane potential altering drugs. *Cytometry* **39**:203-210.

61. **Ko, Y. G., J. S. Lee, Y. S. Kang, J. H. Ahn, and J. S. Seo.** 1999. TNF- $\alpha$ -mediated apoptosis is initiated in caveolae-like domains. *J. Immunol.* **162**:7217-7223.
62. **Kobayashi, M., S. Saitoh, N. Tanimura, K. Takahashi, K. Kawasaki, M. Nishijima, Y. Fujimoto, K. Fukase, S. Kashi-Takamura, and K. Miyake.** 2006. Regulatory roles for MD-2 and TLR4 in ligand-induced receptor clustering. *J. Immunol.* **176**:6211-6218.
63. **Koornhof, H. J., R. A. Smego, Jr., and M. Nicol.** 1999. Yersiniosis. II: The pathogenesis of Yersinia infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:87-112.
64. **Kramer, U. and C. A. Wiedig.** 2005. *Y. enterocolitica* translocated Yops impair stimulation of T-cells by antigen presenting cells. *Immunol. Lett.* **100**:130-138.
65. **Lundgren, E., N. Carballeira, R. Vazquez, E. Dubinina, H. Branden, H. Persson, and H. Wolf-Watz.** 1996. Invasin of Yersinia pseudotuberculosis activates human peripheral B cells. *Infect. Immun.* **64**:829-835.
66. **Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler.** 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* **223**:77-92.
67. **Mariani, S. M., B. Matiba, E. A. Armandola, and P. H. Krammer.** 1997. Interleukin 1 beta-converting enzyme related proteases/caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells. *J. Cell Biol.* **137**:221-229.
68. **Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr.** 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **9**:4-9.
69. **Micheau, O. and J. Tschopp.** 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**:181-190.
70. **Muppidi, J. R. and R. M. Siegel.** 2004. Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death. *Nat. Immunol.* **5**:182-189.
71. **Muppidi, J. R., J. Tschopp, and R. M. Siegel.** 2004. Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity.* **21**:461-465.

72. **Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, V. C. van't, G. Penton-Rol, L. P. Ruco, P. Allavena, and A. Mantovani.** 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* **164**:5998-6004.
73. **Muzio, M., N. Polentarutti, D. Bosisio, M. K. Prahladan, and A. Mantovani.** 2000. Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* **67**:450-456.
74. **Nagasawa, K., A. Howatson, and T. W. Mak.** 1981. Induction of human malignant T-lymphoblastic cell lines MOLT-3 and jurkat by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate: biochemical, physical, and morphological characterization. *J. Cell Physiol* **109**:181-192.
75. **Nagata, S.** 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**:355-365.
76. **Nagata, S. and P. Golstein.** 1995. The Fas death factor. *Science* **267**:1449-1456.
77. **Nat, R., E. Radu, T. Regalia, and L. M. Popescu.** 2002. Apoptosis in the immune system: 1. Fas-induced apoptosis in monocytes-derived human dendritic cells. *J. Cell Mol. Med.* **6**:223-234.
78. **Nicoletti, I., G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani, and C. Riccardi.** 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **139**:271-279.
79. **Orth, K.** 2002. Function of the Yersinia effector YopJ. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:38-43.
80. **Orth, K., Z. Xu, M. B. Mudgett, Z. Q. Bao, L. E. Palmer, J. B. Bliska, W. F. Mangel, B. Staskawicz, and J. E. Dixon.** 2000. Disruption of signaling by Yersinia effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* **290**:1594-1597.
81. **Pan, G., J. Ni, Y. F. Wei, G. Yu, R. Gentz, and V. M. Dixit.** 1997. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* **277**:815-818.
82. **Pan, G., K. O'Rourke, A. M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni, and V. M. Dixit.** 1997. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* **276**:111-113.
83. **Poyet, J. L., S. M. Srinivasula, J. H. Lin, T. Fernandes-Alnemri, S. Yamaoka, P. N. Tschlis, and E. S. Alnemri.** 2000. Activation of the I $\kappa$ B kinases by RIP via IKK $\gamma$ /NEMO-mediated oligomerization. *J. Biol. Chem.* **275**:37966-37977.

84. **Rabson, A. R., A. F. Hallett, and H. J. Koornhof.** 1975. Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. *J. Infect. Dis.* **131**:447-451.
85. **Raftery, M. J., M. Schwab, S. M. Eibert, Y. Samstag, H. Walczak, and G. Schonrich.** 2001. Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity.* **15**:997-1009.
86. **Rathmell, J. C. and C. B. Thompson.** 1999. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **17**:781-828.
87. **Regnault, A., D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Thery, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli, and S. Amigorena.** 1999. Fc $\gamma$  receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* **189**:371-380.
88. **Rescigno, M., S. Citterio, C. Thery, M. Rittig, D. Medaglini, G. Pozzi, S. Amigorena, and P. Ricciardi-Castagnoli.** 1998. Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:5229-5234.
89. **Ridge, J. P., R. F. Di, and P. Matzinger.** 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4<sup>+</sup> T-helper and a T-killer cell. *Nature* **393**:474-478.
90. **Robertson, A. M., C. C. Bird, A. W. Waddell, and A. R. Currie.** 1978. Morphological aspects of glucocorticoid-induced cell death in human lymphoblastoid cells. *J. Pathol.* **126**:181-187.
91. **Rosqvist, R., A. Forsberg, M. Rimpilainen, T. Bergman, and H. Wolf-Watz.** 1990. The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol. Microbiol.* **4**:657-667.
92. **Rosqvist, R., A. Forsberg, and H. Wolf-Watz.** 1991. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect. Immun.* **59**:4562-4569.
93. **Rosqvist, R., K. E. Magnusson, and H. Wolf-Watz.** 1994. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.* **13**:964-972.
94. **Ruckdeschel, K., S. Harb, A. Roggenkamp, M. Hornef, R. Zumbihl, S. Kohler, J. Heesemann, and B. Rouot.** 1998. *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF- $\kappa$ B: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the

- macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J. Exp. Med.* **187**:1069-1079.
95. **Ruckdeschel, K., O. Mannel, K. Richter, C. A. Jacobi, K. Trulzsch, B. Rouot, and J. Heesemann.** 2001. Yersinia outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J. Immunol.* **166**:1823-1831.
  96. **Ruckdeschel, K., O. Mannel, and P. Schrottner.** 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.
  97. **Ruckdeschel, K., G. Pfaffinger, R. Haase, A. Sing, H. Weighardt, G. Hacker, B. Holzmann, and J. Heesemann.** 2004. Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages. *J. Immunol.* **173**:3320-3328.
  98. **Ruckdeschel, K., K. Richter, O. Mannel, and J. Heesemann.** 2001. Arginine-143 of *Yersinia enterocolitica* YopP crucially determines isotype-related NF-kappaB suppression and apoptosis induction in macrophages. *Infect. Immun.* **69**:7652-7662.
  99. **Russmann, H., K. Ruckdeschel, and J. Heesemann.** 1996. Translocation of *Yersinia enterocolitica* through an endothelial monolayer by polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* **64**:1016-1019.
  100. **Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata.** 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**:96-99.
  101. **Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia.** 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**:389-400.
  102. **Savill, J., I. Dransfield, N. Hogg, and C. Haslett.** 1990. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* **343**:170-173.
  103. **Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer, and M. E. Peter.** 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**:1675-1687.

104. **Schoppet, M., A. Bubert, and H. I. Huppertz.** 2000. Dendritic cell function is perturbed by *Yersinia enterocolitica* infection in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* **122**:316-323.
105. **Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto.** 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **189**:1777-1782.
106. **Sprick, M. R., E. Rieser, H. Stahl, A. Grosse-Wilde, M. A. Weigand, and H. Walczak.** 2002. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J.* **21**:4520-4530.
107. **Strebel, A., F. Bachmann, M. Wernli, and P. Erb.** 2002. Tumor necrosis factor-related, apoptosis-inducing ligand supports growth of mouse mastocytoma tumors by killing tumor-infiltrating macrophages. *Int. J. Cancer* **100**:627-634.
108. **Tartaglia, L. A., T. M. Ayres, G. H. Wong, and D. V. Goeddel.** 1993. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**:845-853.
109. **Thery, C. and S. Amigorena.** 2001. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **13**:45-51.
110. **Toivanen, A., K. Granfors, R. Lahesmaa-Rantala, R. Leino, T. Stahlberg, and R. Vuento.** 1985. Pathogenesis of *Yersinia*-triggered reactive arthritis: immunological, microbiological and clinical aspects. *Immunol. Rev.* **86**:47-70.
111. **Trulzsch, K., G. Geginat, T. Sporleder, K. Ruckdeschel, R. Hoffmann, J. Heesemann, and H. Russmann.** 2005. *Yersinia* outer protein P inhibits CD8 T cell priming in the mouse infection model. *J. Immunol.* **174**:4244-4251.
112. **Varfolomeev, E. E. and A. Ashkenazi.** 2004. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* **116**:491-497.
113. **Vignati, S., A. Codegani, F. Polato, and M. Brogini.** 2002. Trail activity in human ovarian cancer cells: potentiation of the action of cytotoxic drugs. *Eur. J. Cancer* **38**:177-183.
114. **Visser, L. G., A. Annema, and F. R. van.** 1995. Role of Yops in inhibition of phagocytosis and killing of opsonized *Yersinia enterocolitica* by human granulocytes. *Infect. Immun.* **63**:2570-2575.
115. **Vogler, M., K. Durr, M. Jovanovic, K. M. Debatin, and S. Fulda.** 2006. Regulation of TRAIL-induced apoptosis by XIAP in pancreatic carcinoma cells. *Oncogene* .

116. **Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich.** 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death. Differ.* **10**:45-65.
117. **Walczak, H., M. A. gli-Esposti, R. S. Johnson, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, M. S. Timour, M. J. Gerhart, K. A. Schooley, C. A. Smith, R. G. Goodwin, and C. T. Rauch.** 1997. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* **16**:5386-5397.
118. **Wang, C., L. Deng, M. Hong, G. R. Akkaraju, J. Inoue, and Z. J. Chen.** 2001. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**:346-351.
119. **Wright, S. D., P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, and R. A. Ramos.** 1989. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* **170**:1231-1241.
120. **Yamaoka, S., G. Courtois, C. Bessia, S. T. Whiteside, R. Weil, F. Agou, H. E. Kirk, R. J. Kay, and A. Israel.** 1998. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* **93**:1231-1240.
121. **Yaron, A., A. Hatzubai, M. Davis, I. Lavon, S. Amit, A. M. Manning, J. S. Andersen, M. Mann, F. Mercurio, and Y. Ben-Neriah.** 1998. Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase. *Nature* **396**:590-594.
122. **Zhang, S. Q., A. Kovalenko, G. Cantarella, and D. Wallach.** 2000. Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity.* **12**:301-311.
123. **Zhang, Y. and J. B. Bliska.** 2003. Role of Toll-like receptor signaling in the apoptotic response of macrophages to Yersinia infection. *Infect. Immun.* **71**:1513-1519.
124. **Zhang, Y., A. T. Ting, K. B. Marcu, and J. B. Bliska.** 2005. Inhibition of MAPK and NF-kappa B pathways is necessary for rapid apoptosis in macrophages infected with Yersinia. *J. Immunol.* **174**:7939-7949.
125. **Zhang, Z. Y., J. C. Clemens, H. L. Schubert, J. A. Stuckey, M. W. Fischer, D. M. Hume, M. A. Saper, and J. E. Dixon.** 1992. Expression, purification, and physicochemical characterization of a recombinant Yersinia protein tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* **267**:23759-23766.
126. **Zheng, L. M., A. Zychlinsky, C. C. Liu, D. M. Ojcius, and J. D. Young.** 1991. Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J. Cell Biol.* **112**:279-288.

127. **Zhou, H., D. M. Monack, N. Kayagaki, I. Wertz, J. Yin, B. Wolf, and V. M. Dixit.** 2005. Yersinia virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF-kappa B activation. *J. Exp. Med.* **202**:1327-1332.

## **8. Danksagung**

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Sabine Gröbner für die freundliche und unermüdliche Betreuung, ihre Geduld, sei es bei ausufernden Versuchen oder der Korrektur des Manuskriptes und nicht zuletzt für die Schaffung einer familiären Atmosphäre in der Arbeitsgruppe danken.

Herrn Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth gilt mein Dank für die Überlassung des Themas, hilfreiche Anregungen und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen am Institut.

Bei Daniela Gunst möchte ich mich herzlich für die zahlreichen Tipps, ihr unschätzbare Wissen um die Welt der Durchflusszytometrie und ihre immerwährende Hilfsbereitschaft bedanken.

Ferner danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe und auch den nichtgenannten Institutsmitgliedern für ihre offene, herzliche und hilfsbereite Art.

## **9. Lebenslauf**

Sebastian Schulz

geboren am 29.08.1980

in Engen

### **Schulbildung**

08.1987 - 07.1989	Elly-Heuss-Knapp-Schule Darmstadt
08.1989 – 07.1991	Grundschule Essen-Fischlaken
08.1991 – 07.1995	Gymnasium Essen-Werden
09.1995 – 06.2000	Immanuel-Kant-Gymnasium Tuttlingen
06.2000	Allgemeine Hochschulreife

### **Wehrdienst**

07.2000 – 04.2001	Wehrdienst in Germersheim, Meßstetten und Karlsruhe
-------------------	---

### **Hochschulbildung**

04.2001 – 11.2007	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
03.2003	Physikum
23.11.2007	Ärztliche Prüfung

### **Promotion**

11.2005 – 11.2007	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Eberhard-Karls-Universität Tübingen Prof. Dr. I. B. Autenrieth
-------------------	---