TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

Immunevasionsmechanismen von *Yersinia enterocolitica*: Hemmung der Funktion natürlicher Killerzellen als neues pathogenetisches Prinzip bakterieller Krankheitserreger

Isabel Koch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät des Wissenschaftszentrums Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. H. D. Meyer

Prüfer der Dissertation:

- 1. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer
- 2. Priv.-Doz. Dr. R. Hoffmann
- 3. apl. Prof. Dr. H. Rüssmann

(Ludwig-Maximilians-Universität München)

Die Dissertation wurde am 18.06.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät des Wissenschaftszentrums Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 27.11.2008 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Bakteriologie am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von PD Dr. R. Hoffmann im Zeitraum August 2004 bis Mai 2007 angefertigt.

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät des Wissenschaftszentrums Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Immunevasionsmechanismen von *Yersinia enterocolitica*: Hemmung der Funktion natürlicher Killerzellen als neues pathogenetisches Prinzip bakterieller Krankheitserreger

in der Abteilung für Bakteriologie des Max von Pettenkofer-Institutes für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität unter der Anleitung und Betreuung durch PD Dr. Reinhard Hoffmann ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

- (x) Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.
- () Die vollständige Dissertation wurde in veröffentlicht. Die Fakultät für hat der Vorveröffentlichung zugestimmt.
- (x) Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den

Inhaltsv	erzeichnis	i
Abkürz	ungsverzeichnis	viii
Abbildu	ungsverzeichnis	X
Tabelle	nverzeichnis	xiii
A Einl	eitung	1
<u>A.1</u>	Die Gattung Yersinia	1
A.1.1	Y. enterocolitica	1
A.1.1.1	Vorkommen und Verbreitung	1
A.1.1.2	Infektion und klinisches Bild der Yersiniose	2
A.1.2	Die Virulenz von <i>Y. enterocolitica</i>	2
A.1.2.1	Adhärenz und Invasion	2
A.1.2.2	Typ III Sekretionssystem und Ysc-Sekretionsapparat	3
A.1.2.3	Yop-Effektor-Proteine und Yop Translokation	4
A.1.2.4	Zusammenfassung	9
<u>A.2</u>	Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen	10
A.2.1	Die Zelltypen und Rezeptoren der erworbenen Immunantwort	12
A.2.2	First line of defense: die angeborene Immunantwort	13
A.2.3	NK-Zellen an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität	14
A.2.3.1	Entwicklung und Funktionen	14
A.2.3.2	Die unterschiedlichen NK-Zell-Rezeptor-Familien muriner NK-Zellen	15
A.2.3.3	Regulation von NK-Zellen durch das Zusammenspiel inhibierender und	16
A.2.3.4	Signalkaskaden-vermittelte Immunantwort: II 12 und II 18 als wichtige Stimulatoren	
	bei bakteriellen Infektionen	18
A.2.4	Die Immunologie der Yersinien-Infektion	20
A.2.4.1	Die Funktionen des Schleimhaut-assoziierten lymphoiden Gewebe	20
A.2.4.2	Die Antigenpräsentation findet in den peripheren lymphatischen Organen statt	21

Inha	lts\/0rz	aichnis
II II IQ	1131012	

A.2.4.3	Die Pathogenitätsfaktoren der Yersinien während der Infektion	22
<u>A.3</u>	Zielsetzung dieser Arbeit	23
B Ma	terial und Methoden	24
<u>B.1</u>	Reagenzien	24
<u>B.2</u>	Bakterien	24
B.2.1	Yersinienstämme	24
B.2.2	Nährmedien und Zusätze	25
B.2.3	Kultivierung von Yersinien	26
B.2.4	Anlegen einer Stammsammlung	26
B.2.5	Anlegen einer Bakterienkultur für <i>in vivo</i> Infektionen	26
B.2.6	Bestimmung der Bakterienzahl für <i>in vivo</i> Infektionsversuche	27
B.2.7	Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen für <i>in vitro</i> Infektionsversuche	, 27
B.2.8	Herstellung transformationskompetenter Yersinien	27
B.2.9	Elektroporation	27
<u>B.3</u>	Arbeiten mit Nukleinsäuren	28
B.3.1	Oligonukleotide, Probes, Puffer und Kits	28
B.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Schnelllyse	
B.3.3	Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA über Qiagen-Säulen	
B.3.4	Isolation von RNA mittels Trizol® für RT-PCR	
B.3.5	Isolation von RNA mittels RNeasy Mikro Kit für Microarrays	29
B.3.6	Photometrische Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren	
B.3.7	Agarose-Gelelektrophorese von RNA	
B.3.8	Erststrang cDNA-Synthese für RT-PCR mit Random Hexameren	
B.3.9	Real Time PCR (TaqMan-Analyse)	31
B.3.10	Erst- und Zweitstrang cDNA-Synthese für Microarrays	31
B.3.11	In vitro Transkription und Markierung der cDNA für Microarrays	
<u>B.4</u>	Analyse von Affymetrix Microarrays	33
B.4.1	Puffer und Lösungen	

B.4.2	Microarray-Analysen	34
B.4.3	GeneChip® Microarrays (Affymetrix)	34
B.4.4	GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array	35
B.4.5	Hybridisierung der Proben	36
B.4.6	Waschen und Färben der Microarrays	36
B.4.7	Statistische Analyse	37
B.4.7.1	Normalisierung	37
B.4.7.2	Qualitätskontrolle der Normalisierung	37
B.4.7.3	Berechnung von Genexpressionswerten	37
B.4.7.4	False discovery rate	38
B.4.7.5	Analyse von Experimenten mit >1 experimentellen Faktor	38
B.4.7.6	Hierarchische Clusteranalyse	38
B.4.7.7	Überrepräsentation funktioneller Gengruppen	38
<u>B.5</u>	Allgemeine Zellkulturtechniken	39
B.5.1	Zelllinien	39
B.5.2	Medien, Zusätze und Kits	39
B.5.3	Allgemeine Kulturbedingungen	40
B.5.4	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	40
B.5.5	Aufbewahrung eukaryontischer Zellen	40
B.5.6	Zytospinzentrifugation	40
B.5.7	Anreicherung muriner NK-Zellen mittels MACS (Miltenyi Biotec)	41
B.5.8	Kultivierung muriner NK-Zellen	42
B.5.9	Infektion muriner NK-Zellen	42
<u>B.6</u>	Proteinbiochemische Arbeitstechniken	43
B.6.1	Puffer, Lösungen und Kits	43
B.6.2	Herstellung von Zelllysat aus eukaryotischen Zellen	43
B.6.3	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	44
B.6.4	Proteintransfer auf PVDF-Membran: Western Blot Analyse	44
B.6.5	Detektion spezifischer Proteine mittels Immunoblotting	45

<u>B.7</u>	Tierexperimentelle Arbeiten	46
B.7.1	Mausstämme	46
B.7.2	Infektion der Versuchstiere und Organentnahme	46
B.7.3	Fixierung der Gewebeproben	47
B.7.4	Anfertigen von Gewebeschnitten	48
B.7.5	Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten	48
<u>B.8</u>	Allgemeine immunologische Techniken	<u>50</u>
B.8.1	Puffer, Lösungen und Kits	50
B.8.2	Durchflusszytometrie	51
B.8.3	Quantifizierung der intrazellulären IFN-y Produktion stimulierter NK-Zellen nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i> im Durchflusszytometer	52
B.8.4	Apoptosemessung im Durchflusszytometer	53
B.8.5	In vitro Stimulation der NK-Zellen: Quantifizierung der IFN-Y Sekretion (ELISA) nach Infektion mit Y. enterocolitica	54
B.8.5.1	Stimulation mit Interleukinen	54
B.8.5.2	Stimulation mit NK-Zell-spezifischen Antikörpern	54
B.8.6	<i>In vitro</i> Stimulation der NK-Zellen mit aktivierenden und inhibierenden Antikörpern: Quantifizierung der IFN-γ Sekretion (ELISA)	55
B.8.7	JAM-Assay zur Ermittlung der spezifischen Zytotoxizität muriner NK-Zellen	55
C Erg	ebnisse	56
<u>C.1</u>	Analyse der zellulären Immunantwort einer Y. enterocolitica Infektion	56
C.1.1	Veränderungen der Milzstruktur während einer Yersinien-Infektion	57
C.1.1.1 C.1.1.2	Die Größe der Milz nimmt im Laufe der Infektion zu Immunfluoreszenz-Analyse der Milzarchitektur während der Infektion	57 57
C.1.2	Zelluläre Zusammensetzung der Milz und Verteilung verschiedener Zell- populationen während der Infektion	60
C.1.2.1	Makrophagen verbleiben in der roten Pulpa	60
C.1.2.2	Neutrophile Granulozyten werden zu den Abszessen in der Milz rekrutiert	63
C.1.2.3	Dendritische Zellen wandern in die Milz ein	66
C.1.2.4	Die Größe der T-Zell-Population nimmt nur bei C57BL/6 Mäusen ab	69
C.1.2.5	In den Milzen der C57BL/6 Mäusen kann eine Co-Lokalisation von CD4+ T-Zellen	71
		/ 1

C.1.2.6	Die Größe der B-Zell-Population nimmt nur bei BALB/c Mäusen ab	72
C.1.2.7	NK-Zellen stellen nur eine kleine Zellpopulation in der Milz dar	75
C.1.3	Zusammenfassung	76
<u>C.2</u>	Isolation, Kultivierung und Charakterisierung von NK-Zellen aus BALB/c und	
	<u>C57BL/6 Mäusen</u>	77
C.2.1	Anreicherung muriner NK-Zellen mittels MACS-Technologie und Kultivierung über 7 Tage	77
C.2.2	Charakterisierung der Expression spezifischer NK-Zell-Marker während der Kultivierung über 7 Tage	78
C.2.3	Zusammenfassung	79
<u>C.3</u>	Y. enterocolitica interagiert mit NK-Zellen	80
C.3.1	WA(pYV) bindet an die Zelloberfläche von murinen NK-Zellen	80
C.3.2	Die Bindung der Yersinien erfolgt über Interaktion des <i>Yersinia</i> -Invasins an die NK-Zellen	81
C.3.3	Zusammenfassung	82
<u>C.4</u>	Y. enterocolitica hemmt elementare Funktionen von NK-Zellen	83
C.4.1	Apoptoseverhalten von NK-Zellen nach Infektion mit Y. enterocolitica	83
C.4.2	Etablierung eines Nachweisverfahrens der zellvermittelten Zytotoxizität von NK-Zellen: der JAM-Assay	84
C.4.3	Abhängigkeit der Hemmung der Zytotoxizität von der <i>multiplicity of infection</i> (MOI)	85
C.4.4	Quantifizierung der IFN-γ Produktion von NK-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation mit IL12 + IL18	86
C.4.5	Quantifizierung der IFN-y produzierenden NK-Zellen und Abhängigkeit der Anzahl an IFN-y produzierenden NK-Zellen von der <i>multiplicity of infection</i> (MOI)	87
C.4.6	Y. enterocolitica WA(pYV) aber nicht Y. enterocolitica WA(pTTS, pP60) inhibiert die IFN-y Produktion von NK-Zellen	88
C.4.7	Zusammenfassung	89
<u>C.5</u>	Identifikation des für die NK-Zell-Hemmung verantwortlichen Yops	90
C.5.1	YopP ist hauptverantwortlich für die Hemmung der NK-Zellen nach Stimulation mit IL12 + IL18	90

C.5.1.1 C.5.1.2	Einfluß verschiedener Yops auf die Anzahl IFN-y produzierender NK-Zellen Einfluss verschiedener Yops auf die Menge an sezernierten IFN-y	90 92
C.5.2	Die YopP vermittelte Hemmung der IFN-y Induktion ist nicht spezifisch für IL12 + IL18	94
C.5.2.1 C.5.2.2 C.5.2.3	YopP hemmt die IFN-y Induktion nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin YopP hemmt die IFN-y Produktion nach Ligation aktivierender NK-Zell-Rezeptoren YopP hemmt die IFN-y Expression nach Stimulation mit IL12	94 98 99
C.5.3	Der YopP Hemmeffekt findet bereits auf mRNA Ebene statt	102
C.5.4	YopP hemmt IL12 und IL18 vermittelte Signaltransdutionskaskaden durch Hemmung der Phosphorylierung wichtiger Signalproteine	104
C.5.4.1	Nach 30 Minuten Stimulation ist ein Effekt der Yersinien auf die Phosphorylierung wichtiger Signaltransduktionskaskaden nachweisbar	104
0.0.4.2	3 Stunden Stimulation aufgehoben	105
C.5.5	Zusammenfassung	106
<u>C.6</u>	Transkriptom-Analysen von BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen	107
C.6.1	Kontrolle der Versuchsbedingungen	107
C.6.2	Qualitätskontrolle der Microarray-Daten	108
C.6.3	Vergleichende Mikroarray-Analysen von NK-Zellen nach Stimulation mit IL12 + IL18 oder agonistischem Antikörper a-NKG2D	111
C.6.4	Microarray-Analysen von IL12 + IL18 stimulierten NK-Zellen nach Infektion mit Y. enterocolitica	113
C.6.5	Microarray-Analysen von NKG2D stimulierten NK-Zellen nach Infektion mit Y. enterocolitica	116
C.6.6	Zusammenfassung	117
<u>C.7</u>	Der YopP-vermittelte Hemmeffekt findet auch in vivo statt	118
C.7.1	Ex vivo Analysen in vivo infizierter BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen	118
C.7.2	Zusammenfassung	119
D Disk	ussion	. 120
<u>D.1</u>	Vergleichende Analysen der zellulären Immunantwort der Milz von BALB/c und C57BL/6 Mäusen auf Infektion mit Y. enterocolitica	120
<u>D.2</u>	<u>Charakterisierung der unterschiedlichen Aktivierbarkeit von BALB/c und</u>	120

D.2.1	BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen produzieren nach Stimulation mit IL12 und IL18 unterschiedliche Mengen an IFN- γ	124
D.2.2	Vergleichende Analysen der Transkriptionsantwort von BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen nach Stimulation mit IL12 + IL18 und NKG2D	127
<u>D.3</u>	<u>Charakterisierung des Einflusses von Y. enterocolitica auf essentielle</u> <u>Funktionen von NK-Zellen</u>	131
D.3.1	Y. enterocolitica bindet an NK-Zellen und inhibiert durch die Translokation von Yops Zytotoxizität und IFN-γ Produktion	131
D.3.2	NK-Zell-Funktionen werden durch YopP-vermittelte Hemmung unterschiedlichster Signaltransduktionskaskaden supprimiert	133
<u>D.4</u>	Transkriptionsantwort von NK-Zellen nach Infektion mit Y. enterocolitica	137
D.4.1	Yersinien verändern die Genexpression NKG2D stimulierter NK-Zellen	138
D.4.2	Yersinien beeinflussen das Genexpressionsprofil IL12 + IL18 stimulierter NK-Zellen	140
<u>D.5</u>	Die Hemmung der NK-Zellen findet auch <i>in vivo</i> statt	142
E Zusc	ammenfassung	. 144
F Liter	aturverzeichnis	. 146
G Anh	ang	. 161
<u>G.1</u>	<u>Tabellarische Darstellung der differentiell exprimierten Gene aller</u> <u>Microarryanalysen</u>	161
G.1.1	Differentiell exprimierte Gene IL12 + IL18 bzw. NKG2D stimulierter NK-Zellen	161
G.1.2	Differentiell exprimierte Gene von IL12 + IL18 stimulierten NK-Zellen nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	168
G.1.3	Differentiell exprimierte Gene von NKG2D stimulierten NK-Zellen nach Infektion mit Y. enterocolitica	173
<u>G.2</u>	Veröffentlichungen	177
<u>G.3</u>	Danksagung	179
<u>G.4</u>	Lebenslauf	180

Abkürzungsverzeichnis

μF	Mikrofahrenheit
hð	Mikrogramm
Å	Angström
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
AK	Antikörper
AP1	activating protein 1
amp	Ampicillin
BHI	brain-heart-infusion
BSA	Rinderserumalbumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
bzw.	beziehungsweise
cfu	colony forming units
cm	Chloramphenicol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleinacid
dNTP	2´-desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbend assay
EtOH	Ethanol
FACS	fluoescence activated cell sorting
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
FCS	fetal calf serum
GAP	GTPase aktivierendes Protein
gfp	green fluorescent protein
gm	Gentamicin
HPI	high pathogenicity island
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IKK	IKB Kinase
lκB	Inhibitor von ĸB
IL	Interleukin
IL12R/ IL18R	Interleukin12/18-Rezeptor
ITAM	immunoreceptor tyrosine activating motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine inhibitory motif
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kan	Kanamycin
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
kV	Kilovolt
LB	Luria Bertani
MALT	mucosa associated lymphoid tissue
MAPK	mitogen-activated protein kinase

MEK	mitogen-activated protein/ ERK kinase kinase
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
Min.	Minute
MKK	mitogen-activated kinase kinase
ml	Milliliter
MOI	multiplicity of infection
ΝϜκΒ	nuclear factor ĸB
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PP	Peyer´scher Plaque
RBD	Rho bindende Domänen
RNA	ribonucleinacid
RNaseA	Ribunuklease A
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction
Sek.	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp	Spectinomycin
STAT4	signal transducer and activator of transcription protein 4
Std.	Stunde
TAK	TGF-β activated kinase
TLR	toll-like receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TTSS	type three secretion system
TZR	T-Zell-Rezeptor
üΝ	über Nacht
U	Units/ Umdrehungen
UV	Ultraviolett
V	Volt
Үор	Yersinia outer protein
Ysc	Yersinia secretion complex
ZTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
Ω	Ohm

Abbildungsverzeichnis

Abbildung A-1	Darstellung des Typ III Sekretionssystems aus Troisfontaines & Cornelis, 2005	3
Abbildung A-2	Schematische Darstellung der Yop-Translokation in die Wirtszelle und Modulation der Wirtszell-Signalkaskaden.	6
Abbilduna A-3	Vereinfache Darstellung der MAPK- und NFkB-Signalwege und die YopP-	
	vermittelten Hemm-Mechanismen	8
Abbildung A-4	Schematische Darstellung der Hämatopoese	11
Abbildung A-5	Schematische Darstellung des B- und T-Zell-Rezeptors	13
Abbildung A-6	Schematische Darstellung der murinen NK-Zell-Rezeptoren und	
Ũ	Signaltransduktionskaskaden, verändert aus Vivier <i>et al.</i> , 2004	16
Abbildung A-7	Schematische Darstellung der NK-Zell-Aktivierung aus Raulet & Vance,	
	2006	. 17
Abbildung A-8	Vereinfachte Darstellung des synergistischen Effektes von IL12 und IL18	. 19
Abbildung A-9	Schematische Darstellung eines Milzquerschnittes	21
Abbildung B-1	RNA-Agarose-Gel	. 30
Abbildung B-2	Schematische Darstellung der Affymetrix GeneChip® Herstellung	
	(Affymetrix)	. 35
Abbildung B-3	Beispielhafte Darstellung der Synthese unterschiedlicher Probes (Affimetrix)	35
Abbildung B-4	Schematische Dar-stellung eines Probe Pairs (Affymetrix)	36
Abbildung B-5	Schematische Darstellung der Anreicherung von Zellpopulationen mittels	
	Depletion durch das MACS-System.	41
Abbildung B-6	Schematischer Aufbau eines Semi-dry-Blots zum Proteintransfer auf	
	PVDF-Membran	44
Abbildung B-7	Infektion der Versuchstiere und Organentnahme	47
Schema B-1	Protokoll für die Immunfluoreszenz-Färbung von Kryoschnitten	49
Abbildung C-1	Veränderung des Milzgewichtes während einer Y. enterocolitica-	
	Infektion	57
Abbildung C-2	Übersichtsaufnahmen immunfluoreszenzgefärbter Milzquerschnitte aus	
	BALB/c und C57BL/6 Mäusen im Verlaufe einer Yersinien-Infektion	59
Abbildung C-3	Vergrößerungen aus Abbildung C-2	60
Abbildung C-4	Anteil von Makrophagen an Milzzellen während der Yersinien-Infektion	61
Abbildung C-5	Lokalisation von Makrophagen im Verlauf einer Y. enterocolitica-	
-	Infektion in der Milz von BALB/c und C57BL/6 Mäusen mit Hilfe von	
	Übersichtsaufnahmen immunfluoreszenzgefärbter Milzquerschnitte	62
Abbildung C-6	Anteil von neutrophilen Granulozyten an Milzzellen während der	
-	Yersinien-Infektion	64

Abbildung C-7	Lokalisation der neutrophilen Granulozyten im Verlauf einer	
	Y. enterocolifica-Intektion in der Milz von BALB/c und C5/BL/6 Mausen	
	mit Hilfe von Übersichtsaufnahmen immunfluoreszenzgefärbter	=
) (
)
Abbildung C-9	Antell von denaritischen Zellen an Milizzellen wahrend der Yersinien-	,
Abbildung C 10	Lokalisation von dondritischen Zollen im Verlauf einer V. onterecolitica	
Abbildung C-10	Infektion in der Milz von BALB/c und C57BL/6 Mäusen mit Hilfe von	
		ł
Abbildung C-11	Anteil von T-Zellen an Lymphozyten während der Versinien-Infektion	, ,
Abbildung C-12	Arren von Ezellen an Eynphozyten warren a der reisiner internetion in der	,
Abbildung C-12	Milz von BALB/c und C57BL/6 Mäusen mit Hilfe von Übersichtsaufnahmen	
	immunfluoreszenzgeförbter Milzguerschnitte	ı
	Lokalisation von dondritischen Zellen und TZellen an Tag 3 einer	,
Abbildung C-13	V optoropolitica Infolation in dar Milz von BALP/o und C57PL/6 Mäuron	
	Milaguerree nitte	,
	Milzquerschnine	<u>'</u>
Abbildung C-14	Antell von B-zeilen an Lymphozyten wahrend der Versinien-Intektion)
Abbildung C-15	Lokalisation von B-zeilen im Verlaut einer <i>Y. enterocolitica</i> -intektion in der	
	Milz von BALB/c und C5/BL/6 Mausen mit Hilfe von Übersichtsautnahmen	
	Immuntluoreszenzgetarbter Milzquerschnitte	ļ
Abbildung C-16	Anteil von NK-Zellen an Lymphozyten während der Yersinien-Infektion)
Abbildung C-17	FSC-SSC-Analyse der angereicherten NK-Zellen im Durchtlusszytometer//	
Abbildung C-18	Kontrolle der angereicherten NK-Zellen im Durchflusszytometer	3
Abbildung C-19	Die Expression der Oberflächenmarker DX5 und 2B4 im Zeitverlauf	>
Abbildung C-20	Immunfluoreszenzaufnahme einer <i>Yersinia</i> -infizierten NK-Zelle)
Abbildung C-21	Mikroskopische Analyse der Infektion von NK-Zellen mit verschiedenen	
	Yersinia-Adhäsin-Mutanten)
Abbildung C-22	Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils apoptotischer NK-Zellen	
	nach Infektion mit <i>Y. enterocolitica</i>	ļ
Abbildung C-23	Ermittlung der optimalen Target : Effektor-Ratio bei gleichzeitiger	
	Minimierung der H ³ -Thymidin-Dosis	5
Abbildung C-24	Das Ausmaß der Hemmung der Zytotoxizität von NK-Zellen durch	
	Y. enterocolitica ist abhängig von der multiplicity of infection (MOI)85	5
Abbildung C-25	Quantifizierung der INF-y Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten	
	nach Stimulation mit IL12 + IL18 im ELISA86	ζ
Abbildung C-26	Y. enterocolitica inhibiert die IFN-y Produktion in Abhängigkeit von der	
	multipilcity of infection (MOI)87	7
Abbildung C-27	Der Yersinien-vermittelte Hemmeffekt auf NK-Zellen ist abhängig vom	
	Virulenz-Plasmids pYV	>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung C-28	Intrazelluläre IFN-y Färbung zur Determination Zytokin-produzierender		
	NK-Zellen nach Infektion mit verschiedenen Yersinia-Stämmen	91	
Abbildung C-29	Quantifizierung der IFN-y Produktion mittels ELISA nach Infektion mit		
	verschiedenen Yersinia-Stämmen zur Identifikation des für die Hemmung		
	der IFN-y Produktion verantwortlichen Yops	93	
Abbildung C-30	FACS Analysen infizierter NK-Zellen nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin		
	zur Bestimmung der Anzahl an IFN-y produzierender Zellen	95	
Abbildung C-31	Quantifizierung der IFN-y Produktion nach Stimulation mit PMA/		
	lonomycin mit verschiedenen Yersinien-Stämmen	97	
Abbildung C-32	Quantifizierung der IFN-y Produktion nach Stimulation mit agonistischen		
	Antikörpern mittels ELISA	98	
Abbildung C-33	FACS Analysen infizierter NK-Zellen nach Stimulation mit IL12 zur		
	Bestimmung der Anzahl an IFN-γ produzierender Zellen	100	
Abbildung C-34	Quantifizierung der IFN- γ Produktion nach Stimulation mit IL12 mit		
	verschiedenen Yersinien-Stämmen	101	
Abbildung C-35	Real Time RT-PCR-Analyse der IFN-y mRNA-Expression nach Infektion mit		
	Y. enterocolitica und Stimulation mit IL12 + IL8 und IL12	103	
Abbildung C-36	Y. enterocolitica inhibiert die Phosphorylierung wichtiger		
	Signaltransduktionsproteine der MAPK-Kinase und Jak-STAT-Pathways	105	
Abbildung C-37	Die Y. enterocolitica-vermittelte Hemmung der NK-Zellen ist ein		
	transienter Effekt	106	
Abbildung C-38	Kontrolle der Versuchsbedingungen	108	
Abbildung C-39	MvA-Plot nach der Methode der Quantilennormalisierung von Bolstad		
	und Irizarry		
Abbildung C-40	Einfluss experimenteller Variablen auf das Genexpressionsmuster von		
	NK-Zellen	110	
Abbildung C-41	Microarrayanalysen von IL12 + IL18 und NKG2D stimulierten NK-Zellen aus		
	BALB/c und C57BL/6 Mäusen	112	
Abbildung C-42	Microarrayanalysen von IL12 + IL18 stimulierten NK-Zellen aus BALB/c und		
	C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit WA(pYV)	114	
Abbildung C-43	Microarrayanalysen von NKG2D stimulierten NK-Zellen aus BALB/c und		
	C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit WA(pYV)	117	
Abbildung C-44	Analysen des YopP-vermittelten Hemmeffekt in vivo	119	
Abbildung D-1	Rolle der NK-Zellen bei der Polarisierung der Immunantwort		
	(schematisiert).	126	
Abbildung D-2	Schematische Darstellung der YopP-vermittelten Hemmung der Jak-		
	STAT-Signaltransduktionskaskade	134	

Tabellenverzeichnis

Tabelle A-1:	Yersinia-Effektor-Proteine	10
Tabelle B-1:	Yersinienstämme	24
Tabelle B-2:	Medien für die Bakterienkultur	25
Tabelle B-3:	Antibiotika für die Bakterienkultur	26
Tabelle B-4:	Oligonukleotide, Probes, Puffer und Kits für die Molekularbiologie	28
Tabelle B-5:	Puffer und Lösungen für die Analyse von Affymetrix Microarrays	33
Tabelle B-6:	Eukaryotische Zelllinien	39
Tabelle B-7:	Medien, Zusätze und Kits für die Zellkultur	39
Tabelle B-8:	Puffer, Lösungen und Kits für die Proteinbiochemie	43
Tabelle B-9:	Antikörper für die Western Blot Analyse	45
Tabelle B-10:	Mausstämme	46
Tabelle B-11:	Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen	49
Tabelle B-12:	Puffer, Lösungen und Kits für die Immunologie	50
Tabelle B-13:	Antikörper für die Durchflusszytometrie	51
Tabelle B-14:	Agonistische Antikörper für die Stimulation muriner NK-Zellen	54
Tabelle G-1:	Differentiell exprimierte Gene zu Abbildung C-41	161
Tabelle G-2:	Differentiell exprimierte Gene zu Abbildung C-42	168
Tabelle G-3:	Differentiell exprimierte Gene zu Abbildung C-43	173

A.1 Die Gattung Yersinia

Yersinien sind gram-negative Stäbchenbakterien, die seit 1964 der Familie der Enterobacteriaceae zugeordnet werden. Die 11 Arten (Y. enterocolitica; -pseudotuberculosis; -pestis; -fredericksenii; -intermedia; -kristensii; -mollaretii; -bercovieri; -aldovae; -rhodei; -ruckeri) umfassende Gattung Yersinia wurde nach Alexandre J. Yersin benannt, der 1894 den Pestbazillus Y. pestis in Menschen und in Ratten beschrieb (Yersin, 1994).

Drei dieser Arten sind humanpathogen: der Pesterreger Y. pestis und die enteropathogenen Arten Y. pseudotuberculosis und Y. enterocolitica (Brubaker, 2003). Im Gegensatz zu Y. pestis sind die enteropathogenen Yersinien peritrich begeißelt und bei 25 °C beweglich, synthetisieren jedoch bei 37°C keine Flagellen mehr. Yersinien können sich in einem Temperaturbereich von 4-43°C vermehren, die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 28-30°C. Essentiell für die Virulenz aller drei humanpathogenen Arten ist ein 70 kb großes Virulenzplasmid (pYV), welches unter anderem für ein Typ III-Sekretionssystem (TTSS) und bakterielle Effektor-Proteine (Yersinia outer proteins, Yops) kodiert (Cornelis, 2002).

A.1.1 Y. enterocolitica

A.1.1.1 Vorkommen und Verbreitung

Υ. enterocolitica ist ubiquitär verbreitet, eine Isolation ist aus unterschiedlichen Umweltquellen wie kontaminiertem Wasser oder Pflanzenoberflächen möglich. Zu den natürlichen Wirten gehören verschiedene Hausund Wildtiere, wobei das Schwein eines der Hauptreservoire darstellt (Shayegani et al., 1981).

Y. entercolitica wird aufgrund phänotypischer Charakteristika in 6 Biovare (1A, 1B, 2, 3, 4, und 5) unterteilt. Das Biovar 1B mit den medizinisch bedeutsamen Serotyen O:4, O:8, O:13, O:18, O:20 und O:21 ist in Nordamerika vertreten, die Biovare 2 und 4 mit den Serotypen O:3, O:5,27 und O:9 sind in Europa verbreitet. Die Biovare 3 und 5 sind in der Regel tierpathogen (Chinchilla, Ziege, Hase).

A.1.1.2 Infektion und klinisches Bild der Yersiniose

Y. enterocolitca stellt neben *Salmonella* und *Campylobacter* den dritthäufigsten Erreger einer bakteriellen Enteritis in Deutschland dar. Die Infektion mit *Y. enterocolitica* erfolgt oral über kontaminierte Nahrungsmittel und führt nach einer Inkubationszeit von 7-10 Tagen zu einer akuten Yersiniose (Black *et al.*, 1978). Die dabei auftretenden unspezifischen Symptome sind Bauchschmerzen, Fieber, wässriger Durchfall und Erbrechen. Weitere klinische Krankheitsbilder sind mesenteriale Lymphadenitis, terminale lleitis und Enterocolitis. Neben diesen selbstlimitierenden Formen der Yersiniose kann es vor allen bei Patienten mit Vorerkrankungen (Immunsuppression, Diabetes mellitus, Leberzirrhose, hämolytische Anämie und Dialyse-Patienten) zu septischen Infektionen und schweren Verlaufsformen kommen. Die Symptome der Yersiniose sind abhängig von Alter, Immunsystem und Geschlecht des Patienten (Heesemann, 1994).

A.1.2 Die Virulenz von Y. enterocolitica

A.1.2.1 Adhärenz und Invasion

Nach der oralen Aufnahme gelangen die Yersinien in den unteren Dünndarmabschnitt und binden dort an die in der Mukosa der Peyer´schen Plaques (PP) gelegenen M-Zellen. Die Bindung an das β1-Integrin der M-Zellen erfolgt mit Hilfe des chromosomal kodierten 130 kDa großem Invasin-Außenmembranproteins (Isberg & Barnes, 2001). Nach erfolgter Adhärenz an die Wirtszelle werden die Yersinien in die - in der Submukosa gelegenen - PP transloziert und vermehren sich dort extrazellulär (Cornelis *et al.*, 1998; Pujol & Bliska, 2005). Es bilden sich makroskopisch erkennbare Abszesse, die sich einerseits in das Darmlumen entleeren und andererseits die Dissemination der Yersinien in mesenteriale Lymphknoten, Milz, Leber und Blutbahn verursachen können.

Auch das pYV-Plasmid-kodierte Protein *Yersinia* Adhäsin (YadA) vermittelt die Bindung an verschiedene extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen, Fibronektin und Laminin und kann über β1-Integrine die Internalisierung von *Yersinia* ermöglichen. Des Weiteren trägt es durch Hemmung der Komplement-vermittelten Opsonierung der Bakterienzelle zur Phagozytoseresistenz bei.

A.1.2.2 Typ III Sekretionssystem und Ysc-Sekretionsapparat

Die Pathogenitätsfaktoren von *Y. enterocolitica* ermöglichen durch einen modulatorischen Effekt auf die wirtseigene Immunantwort das extrazelluläre Überleben und die Proliferation der Bakterien in lymphatischen Organen (Brubaker, 2003). Diese Pathogenität der Yersinien ist an das Vorhandensein des Virulenzplasmides pYV gekoppelt, das unter anderem für ein TTSS kodiert (Bleves & Cornelis, 2000). Das TTSS stellt ein komplexes Proteintransportsystem dar, welches aus 25 Proteinen, einschließlich der Regulatorproteine, gebildet wird. Diese sind strukturell und funktionell eng mit dem Flagellenapparat verwandt (Cornelis & Van, 2000).

Der Yersinia secretion complex (Ysc) besteht aus einem Basalkörper, welcher die Peptidoglykanschicht und die zwei Bakterienmembranen durchspannt und einer "molekularen Nadel", die an der Bakterienoberfläche herausragt (Cornelis, 2002). Dabei wird der proximale Bereich des Basalkörpers aus den Yersinia secretion proteins YscD, YscR, YscS, YscT, YscU und YscV gebildet, der distale Bereich ist eine oligomerisierte Matrix aus YscC. Die Nadel besteht aus einem Polymer aus YscF und ist 600-800 Å lang. An der Bildung einer Translokationspore in der Wirtszellmembran sind die Translokatorproteine YopB und YopD - welche hydrophobe Bereiche aufweisen und LcrV beteiligt (Cornelis, 2002; Cornelis & Van, 2000; Galan & Wolf-Watz, 2006; Mueller *et al.*, 2005).



Abbildung A-1

Darstellung des Typ III Sekretionssystems aus Troisfontaines & Cornelis, 2005

A Schematischer Aufbau des Yersinia-Sekretionsapparates, welcher die innere Membran, Peptidoglycanschicht und äußere Membran durchspannt und an der Bakterienoberfläche herausragt.

B Der *Yersinia*-Sekretionsapparat während der Translokation der Effektor-Proteine durch die Translokationspore in das Zytosol der Wirtszelle.

C Elektronenmikroskopische Aufnahme der Injektionsnadeln des TTSS auf der Bakterienoberfläche.

A.1.2.3 Yop-Effektor-Proteine und Yop Translokation

Durch den Ysc werden nach Adhärenz der Yersinien an die Wirtszellen über die Translokationspore verschiedene Effektorproteine - die sogenannten *Yersinia outer proteins* (Yops) - in das Zytosol der Wirtszelle transloziert. Für den Transport der Effektorproteine YopT, YopE und YopH sind Chaperone notwendig. Es wird vermutet, dass diese mit ihren zugehörigen Yops einen Komplex bilden, sie zum TTSS rekrutieren und für die richtige Proteinstruktur bei der Translokation verantwortlich sind (Cornelis, 2000). Im Zytosol binden die Yops an verschiedene Zellstrukturen und interferieren so mit unterschiedlichen Signalkaskaden innerhalb der Zelle. Die Wirkungsweisen der einzelnen Yops werden nachfolgend vorgestellt und zur Übersicht in Tabelle A-1 zusammengefasst:

Die Cysteinprotease **YopT** wirkt zytotoxisch und führt zur Zerstörung des Aktinzytoskeletts der Wirtszelle (Adkins *et al.*, 2007; Cornelis, 2002). Indem posttranslational Lipid-modifizierte, membrangebundene Rho GTPasen nahe dem Carboxyl-Ende geschnitten werden, lösen sich die GTPasen von der Zellmembran und werden so inaktiviert. Dieser Effekt resultiert in einer Aktindepolymerisierung in der Wirtszelle, welche sich durch Abrundung der Zelle zeigt (Fueller *et al.*, 2006; Shao *et al.*, 2003). YopT interagiert *in vivo* hauptsächlich mit membrangebundenen RhoA, in Gegensatz zur *in vitro* Aktivität von YopT gegenüber CDC42 und Rac scheint die Hemmung dieser GTPasen *in vivo* keine große Rolle zu spielen (Aepfelbacher, 2004; Aepfelbacher *et al.*, 2005).

Auch **YopE** interagiert mit Rho, aber auch mit CDC42 und insbesondere mit Rac (Aepfelbacher, 2004; Black & Bliska, 2000). Die erhöhte Aktivität gegen Rac im Vergleich zu den anderen GTPasen *in vivo* könnte dadurch erklärt werden, dass YopE mittels eines hydrophoben Bereiches, welcher als intrazelluläre Zielsequenz wirkt, an perinukleare Membranen bindet (Krall *et al.*, 2004). Aufgrund der Lokalisation in der Wirtszelle ist so eine Substrat-Spezifität für unterschiedliche Rho GTPasen möglich. YopE wirkt als GAP (GTPase aktivierendes Protein) und inaktiviert die GTPasen RhoA, CDC42 und Rac durch effektive Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP (Aepfelbacher, 2004). Dadurch kommt es letztendlich zur Depolymerisation von Aktin-Mikrofilamenten, dies führt zur Abrundung und dem Ablösen der Zelle von der extrazellulären Matrix. Auch die Produktion proinflammatorischer Zytokine wird durch YopE gehemmt (Viboud *et al.*, 2003). So wurde gezeigt, dass die Caspase-1 abhängige Reifung von Prointerleukin-1β durch die Deaktivierung von Rac1 in Makrophagen inhibiert wird (Schotte *et al.*, 2004). Neue Studien weisen außerdem darauf hin, dass die Ubiquitinylierung von YopE und der dadurch vermittelte Abbau

durch das Proteasom eine Möglichkeit darstellt, die Wirtszellantwort zu reprimieren (Angot *et al.*, 2007; Ruckdeschel *et al.*, 2006; Smalle & Vierstra, 2004; Veiga & Cossart, 2005). YopE-Deletions-Mutanten sind nach oraler Infektion im *in vivo* Maus-Model in ihrer Virulenz abgeschwächt, allerdings verursachen sie dennoch systemische Infektionen mit Abszess-Bildung in Leber und Milz. Nach 12 Tagen sind in diesen Organen keine Yersinien mehr nachweisbar und nach einer weiteren Woche befinden sich keine Bakterien mehr im Dünndarm. (Logsdon & Mecsas, 2003; Trulzsch *et al.*, 2004). YopE stellt eine wichtige Komponente für die Resistenz von Yersinien gegen die angeborene Immunität dar.

YopM ist überwiegend aus so genannten leucin-rich-repeats aufgebaut. Bisher konnte YopM als einzigem Effektorprotein keine enzymatische Aktivität zugewiesen werden. YopM kann über einen Vesikel-assoziierten Transportweg in den Zellkern gelangen, die genaue Funktion und Wirkungsweise von YopM ist hier unbekannt (Skrzypek et al., 2003). Microarray-Analysen infizierter Makrophagen lieferten divergierende Ergebnisse. So konnte einerseits gezeigt werden, dass YopM Gene für den Zellzyklus und Zellwachstum reguliert (Sauvonnet et al., 2002b), in einer anderen Arbeit dagegen wurde kein Anhaltspunkt einer YopM vermittelten Gen-Regulation nachgewiesen (Hoffmann et al., 2004). Weiterhin bildet YopM mit den Kinasen PRK2 und RSK1 einen Proteinkomplex und aktiviert diese. PRK2 und RSK1 sind Bestandteile von Signalkaskaden zur Regulation von Zellwachstum, Apoptose und Translationsvorgängen, ob aber durch den PRK2-YopM-RSK1-Komplex zelluläre Funktionen reguliert werden, ist bisher noch unbekannt (McDonald et al., 2003). YopM bindet außerdem an extrazelluläres Thrombin und vermittelt dadurch eine Hemmung der Thrombozytenaggregation, dieser Effekt scheint jedoch bei der Entstehung einer Infektion eine eher untergeordnete Rolle zu spielen (Reisner & Straley, 1992).

YopM ist essentiell für die volle Virulenz von Y. enterocolitica in Mäusen. YopM-Deletionsmutanten sind *in vivo* deutlich attenuiert und nach Infektion sind zu keinem Zeitpunkt in Milz und Leber Yersinien nachweisbar. Jedoch findet eine anhaltende Kolonisation des Dünndarms statt (Trulzsch *et al.*, 2004). Nach i.v. Infektion mit Y. pestis konnte eine systemische Depletion der natürlichen Killer-Zellen (NK) gezeigt werden, dieser Effekt wurde auf die Aktivität von YopM zurückgeführt. Gleichzeitig verringerte sich die Produktion an proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere IL12, IL18 und IFN-Y. Ob diese Effekte auf die Interaktion von YopM mit Makrophagen, NK-Zellen oder beiden Zelltypen zurückzuführen sind, ist bisher unbekannt (Kerschen *et al.*, 2004). Unbestritten ist allerdings die Tatsache, dass YopM wichtig für die Resistenz von Yersinien gegen die angeborene Immunität ist.



Abbildung A-2

Schematische Darstellung der Yop-Translokation in die Wirtszelle und Modulation der Wirtszell-Signalkaskaden.

Nach Adhärenz der Bakterie an die Wirtszelle werden die sechs Effektorproteine durch den Ysc und die Translokationspore ins Zytosol der Wirtszelle transloziert. Dort interagieren die Yops mit verschiedenen Zellstrukturen, wodurch es zu Veränderungen des Zytoskeletts und letztendlich zu einer Hemmung der Phagozytose kommt. Die Immunantwort wird durch Beeinflussung wichtiger Signalkaskaden für die Produktion von Zytokinen zugunsten der Yersinien verändert.

YopT verhindert Phagozytose, indem es die Isoprenyl-Gruppe von RhoA schneidet, so die GTPase von der Zellmembran löst und infolgedessen inaktiviert. YopE hemmt Phagozytose und Zytokin-Produktion durch Interaktion als GAP mit Rho, Rac und CDC42. YopM gelangt in den Zellkern und bildet des Weiteren einen Komplex mit PRK2 und RSK1. Die Serin/ Threonin-Kinase YopO interagiert mit Rho und Rac und hemmt die Phagozytose. YopP blockiert die Signaltransduktionskaskaden von MAPK und NFkB und verhindert so die Produktion von Zytokinen. YopH inhibiert Phagozytose, indem unter anderem der β1-Intergrin-Pathway durch die Protein-Tyrosin-Phosphatase-Aktivität von YopH gehemmt wird.

Das aus multiplen funktionellen Domänen aufgebaute **YopO** enthält im N-terminalen Bereich eine Domäne, welche als autophosphorylierende Serin/ Threonin-Kinase wirkt (Fallman *et al.*, 1997). Für die Aktivierung der YopO Kinase Aktivität *in vitro* wirkt Aktin als Cofaktor, nach der Aktivierung phosphoryliert sich die Kinase selbst und kann anschließend basische Substrate – einschließlich Aktin – phosphorylieren (Juris *et al.*, 2002). Weiterhin vermittelt der N-Terminus von YopO eine Interaktion mit der Wirtszellmembran. Im C-Terminus von YopO befindet sich eine Region mit Homologien zu RBDs (Rho bindende Domänen). Durch die Bindung mit den GTPasen RhoA und Rac1 werden diese vermutlich inaktiviert, es erfolgt eine Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts (Dukuzumuremyi *et al.*, 2000). Die genaue Wirkung von YopO auf die zellulären Funktionen der Wirtszelle ist allerdings nach wie vor nur unvollständig bekannt.

Einen wichtigen immunmodulatorischen Effekt auf die Regulation der Immunantwort vermittelt YopP. Es induziert Apoptose in Makrophagen (Andor et al., 2001; Mills et al., 1997; Monack et al., 1997; Zhang et al., 2005; Zhang & Bliska, 2005) und dendritischen Zellen (Adkins et al., 2007; Erfurth et al., 2004) und inhibiert die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF-a durch Makrophagen und IL8 durch Endothelzellen (Orth, 2002; Palmer et al., 1998; Ruckdeschel, 2002). Dieses Ergebnis wurde lange als direkte Wirkung der Cystein-Protease-Aktivität von YopP sowohl auf die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK: ERK, JNK, p38) als auch auf die NFkB-Signaltransduktionskaskade gedeutet (Orth et al., 1999; Ruckdeschel et al., 1998; Viboud & Bliska, 2005; Yoon et al., 2003). Dabei wurde davon ausgegangen, dass YopP Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnliche Modifikationen von Signalproteinen in der Wirtszelle entfernt und so Signaltransduktionskaskaden inhibiert, welche zu einer Aktivierung von MAPK und NFkB führen (Orth, 2002). In Übereinstimmung mit dieser These konnte gezeigt werden, dass die Translokation von NFkB - ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem die Produktion proinflammatorischer Zytokine reguliert - in den Zellkern durch die Deubiquitinierung der NFxB-aktivierenden Kinase IKKβ durch YopP unterbunden wird (Carter et al., 2003; Yoon et al., 2003). Auch die Inhibition der MAPK - welche die TNF-a-Produktion kontrollieren - konnte durch Hemmung der Phosphorylierung der MAPK-aktivierenden MAPK-Kinasen (MEK) durch YopP erklärt werden (Boland & Cornelis, 1998; Ruckdeschel et al., 1997a).



Abbildung A-3

Vereinfache Darstellung der MAPK- und NFĸB-Signalwege und die YopP-vermittelten Hemm-Mechanismen.

Gezeigt werden sowohl die Funktion von YopP als Acetyltransferase als auch als Ubiquitinase und die Möglichkeit, daß TAk1 von YopP über einen unbekannten Mechanismus gehemmt wird.

Die kürzlich veröffentlichen Ergebnisse von Mukherjee zeigen jedoch, dass *in vitro* die Inaktivierung der MKKs durch YopP-vermittelte Acetylierung erfolgt (Mukherjee *et al.*, 2006). YopP wirkt dieser Arbeit zufolge als Acetyltransferase und modifiziert mit Hilfe von CoA Serin- und Threonin-Reste in den Aktivierungsdomänen von MKKs. Diese Acetylierung verhindert wiederum die Phosphorylierung und somit eine Aktivierung der Kinasen. Ob YopP auch unter physiologischen Bedingungen spezifisch nur auf MKKs wirkt, ist fraglich, so wurde im Fall des NFkB-Pathways vorab gezeigt, dass YopP diesen schon auf dem Level von TAk1 hemmt (Haase *et al.*, 2005; Thiefes *et al.*, 2006). Dessen ungeachtet scheint YopP das erste Enzym zu sein, für welches gezeigt wurde, dass es Serin und Threonin-Reste in Proteinen acetyliert (Mukherjee *et al.*, 2007).

Im murinen Mausmodel zeigen sich YopP-Deletionsmutanten im Vergleich zu voll virulenten WA(pYV) nur schwach attenuiert und verursachen ebenfalls systemische Infektionen mit Besiedlung von Milz und Leber (Trulzsch *et al.*, 2004). YopP-Deletionsmutanten rufen jedoch starke CD8⁺ T-Zell-Antworten hervor, so dass für den Infektionsverlauf die Interferenz von YopP mit dem erworbenen Immunsystem wichtiger zu sein scheint als die mit dem angeborenen Immunsystem (Trulzsch *et al.*, 2005).

Die katalytische Domäne der Protein-Tyrosin-Phosphatase von **YopH** hat eine ähnliche Struktur wie die eukaryotischer Protein-Tyrosin-Phosphatasen (Guan & Dixon, 1990; Zhang, 2003). Zusätzlich dazu besitzt sie zwei weitere Eigenschaften: einen Bereich, welcher YopH zu fokalen Komplexen leitet (Persson *et al.*, 1999) und eine zweite *substrate targeting site*, welche direkt an Tyrosin-phosphorylierte Proteine bindet (Ivanov *et al.*, 2005). Dieser hochkomplexe Aufbau macht es YopH möglich, Substrate im vielschichtigen Milieu der Wirtszelle zu lokalisieren und zu modifizieren.

YopH dephosphoryliert Proteine des fokalen Adhäsionskomplexes (Paxillin, FAK, p130^{cas}), dadurch werden adhäsionsregulierte Signalwege, welche für die Phagozytose der Bakterien durch die Wirtszelle verantwortlich sind, unterbrochen (Aepfelbacher *et al.*, 2005; Cornelis, 2002; Fallman *et al.*, 1997). So wird auch der β1-Integrin-Pathway, welcher durch Interaktion von Invasin mit der Wirtszelle aktiviert wird, durch YopH gehemmt. Zusätzlich unterdrückt YopH Ca²⁺ *signaling* in Neutrophilen und verhindert auf diese Weise Degranulation und in der Folge Phagozytose der Bakterien (Persson *et al.*, 1999). Auch die Produktion von *macrophage chemoattractant protein-1* und der *oxidative burst* in *Yersinia*-infizierten Makrophagen wird durch YopH inhibiert (Sauvonnet *et al.*, 2002a).

Neben der Inhibition von Zellen des angeborenen Immunsystems interagiert YopH mit Tyrosin-phosphorylierten Proteinen in aktivierenden Signalkaskaden von T- und B-Zellen (Cornelis, 2002). So wird eine Antigen-vermittelte Aktivierung von T- und B-Zellen nach Infektion mit *Y. enterocolitica* verhindert. Bei T-Zellen wird die T-Zell-Rezeptor-vermittelte IL2 Produktion drastisch reduziert, während B-Zellen nach Kontakt mit YopH nicht mehr in der Lage sind, die Expression der costimulatorischen Moleküle B7.2 und CD69 auf der Zelloberfläche zu induzieren (Sauvonnet *et al.*, 2002a; Yao *et al.*, 1999; Zumbihl *et al.*, 1999). Nach oraler Infektion ist die YopH-Deketionsmutante nicht in der Lage, zu disseminieren und systemische Infektionen zu verursachen. Darm und PP werden initial besiedelt, jedoch sind nach Tag 12 bereits keine Yersinien in den PP nachweisbar (Logsdon & Mecsas, 2003; Trulzsch *et al.*, 2004). Insgesamt scheint YopH wichtig für die Resistenz der Yersinien sowohl gegen die angeborene als auch die erworbene Immunität zu sein.

A.1.2.4 Zusammenfassung

Eine schützende Immunantwort in Mäusen gegen Y. enterocolitica erfordert eine frühe Reaktion der Zellen des angeborenen Immunsystems, speziell von Neutrophilen und aktivierten Makrophagen. Yersinien umgehen diese Immunantwort, indem sie die Phagozytose der Bakterien verhindern, die Produktion von Zytokinen hemmen und Apoptose in Yersinia-infizierten Zellen induzieren. Dabei translozieren Yersinien sechs Effektor-Proteine in das Zytosol der Wirtszelle, dort erfüllen diese unterschiedliche Funktionen: die Veränderungen der Signaltransduktionskaskaden durch YopP, YopE und YopM führen zu einer Modulation des Immunsystems zugunsten der Yersinien, indem die proinflammatorische Immunantwort geschwächt wird. Die Interaktionen von YopT, YopE, YopO und YopH mit Wirtsproteinen führen zu Umlagerungen des Zytoskeletts. Infolgedessen wird die Phagozytose der Yersinien durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten und Makrophagen gehemmt. *In vivo* Studien zeigen unterschiedliche Relevanz der einzelnen Yops für die volle Virulenz von *Y. enterocolitica* in Mäusen. So scheinen YopE, YopM und YopH essentiell für die frühe Virulenz zu sein, während YopT, YopO und YopP eine größere Rolle in der Resistenz gegen die erworbene Immunität spielen (Viboud & Bliska, 2005).

Yop Effektorprotein	Molekularmasse in kD	Interaktion mit Zellstrukturen/ enzymatische Aktivität	zellulärer Effekt
YopT	35,3	Cysteinprotease Modifiziert die GTPasen RhoA, Rac und CDC42	Phagozytosehemmung
YopE	22,9	GTPase aktivierendes Protein	Phagozytosehemmung
ҮорМ	60,1	Proteinkomplex mit PRK2 und RSK1	ungeklärt
YopO	81,7	Serin/ Threonin-Kinase Phosphorylierung von Aktin	Phagozytosehemmung
YopP	32,5	Hemmung von MAPK und NFĸB Signalkaskaden → Cysteinprotease → Acetyltransferase	Immunsuppressive Aktivität Apoptose bei Makro- phagen und dendritische Zellen
ҮорН	51	Phosphotyrosinphosphatase Dephosphoryliert FAK und p130Cas	Phagozytosehemmung

Tabelle A-1: Yersinia-Effektor-Proteine

A.2 Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen

Alle multizellulären Organismen sind täglich Vielzahl einer an Mikroorganismen ausgesetzt, von denen ein kleiner Teil pathogen wirken kann. Der sogenannten kommensalen Lebensraum der Mikroorganismen – welche lebensnotwendig für den Wirt sein können – beschränkt sich auf die Oberfläche des Wirtes und eine intakte Epithelbarriere verhindert das Vordringen von Bakterien in subepitheliale Schichten. Invasive pathogene Erreger dagegen haben Mechanismen entwickelt, diese Barriere zu überwinden und in tiefere Gewebsschichten vorzudringen (Sansonetti & Di Santo, 2007). Das Überleben des Wirtsorganismus hängt von der Fähigkeit ab, das Eindringen solcher Erreger zu verhindern und bereits eingedrungene Erreger zu eliminieren. Die Bildung effektiver Immunantworten gegen pathogene Mikroorganismen, aber auch das Erkennen und Dulden von harmlosen Antigenen ist Aufgabe des Immunsystems. So kann die fehlende Aktivierung gegen

pathogene Erreger für den Organismus ebenso fatale Auswirkungen haben wie eine falsche Aktivierung gegen harmlose oder körpereigene Strukturen.



Abbildung A-4

Schematische Darstellung der Hämatopoese

Alle Zellen des Immunsystems und die zellulären Bestandteile des Blutes haben ihren Ursprung im Knochenmark. Durch Teilung pluripotenter, hämatopoetischer Stammzellen entstehen zwei spezialisierte Typen von Vorläuferzellen. Zum einen eine gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle, aus der sich T- und B-Lymphozyten und eine dritte Linie von lymphozytenähnlichen Zellen – die natürlichen Killerzellen (NK) - entwickeln, zum anderen eine gemeinsame myeloide Vorläuferzelle, aus der die unterschiedliche Typen der Leukozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten hervorgehen.

Zu den Zellen der adaptiven Immunantwort gehören die T-Zellen, welche im Thymus ausdifferenzieren und die B-Zellen, welche im Knochenmark reifen. Das angeborene Immunsystem umfasst Monozyten, dendritsche Zellen und Granulozyten, diese drei Zelltypen zirkulieren im Blut, des Weiteren die NK-Zellen.

Die Unterscheidung zwischen anzugreifenden und zu tolerierenden Strukturen wurde als *self non-self discrimiation* beschrieben und beinhaltet eine Differenzierung zwischen "Fremd" und "Selbst" (Bretscher & Cohn, 1970). Bei genauer Betrachtung reicht diese Art der Fremd-Selbst-Unterscheidung jedoch nicht aus, denn tatsächlich wird nur ein geringer Teil der Fremd-Strukturen vom Immunsystem angegriffen. Viele Fremdstrukturen werden toleriert oder ignoriert, so dass aufgrund dieser Beobachtungen Polly Matzinger die These aufstellte, dass nicht die

Unterscheidung zwischen "Fremd" und "Selbst" das entscheidende Kriterium für eine Aktivierung des Immunsystem ist, sondern der Unterschied zwischen "gefährlich" und "harmlos" (Matzinger, 1994).

Traditionell wird das Immunsystem in eine angeborene, unspezifische und eine adaptive, spezifische Komponente unterteilt. Der wesentliche Unterschied zwischen diesen beiden Komponenten liegt in den Mechanismen und Rezeptoren zur Immunerkennung und dadurch bedingt in der Zeitspanne zwischen Erkennen des Antigens und der entsprechenden Reaktion der Effektorzelle.

A.2.1 Die Zelltypen und Rezeptoren der erworbenen Immunantwort

Im adaptiven Immunsystem entwickeln sich T- und B-Zellen aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle (Übersicht zur Hämatopoese siehe Abbildung A-4). Bei Säugetieren wandern die T-Vorläuferzellen zur Differenzierung in den Thymus, während B-Zellen im Knochenmark reifen. Die T- und B-Zell-Rezeptoren dieser Zellen werden durch somatische Rekombination generiert, so dass jeder Lymphozyt einen strukturell einzigartigen Rezeptor erhält (in Abbildung A-5 sind B- und T-Zell-Rezeptor schematisch dargestellt). Dieses Rezeptor-Repertoire wird während einer Immunantwort durch somatische Hypermutation weiter diversifiziert, so dass eine Vielzahl an Rezeptoren mit unterschiedlichen Spezifitäten entsteht. Hierdurch kann das Immunsystem eine Vielzahl unterschiedlicher Antigene erkennen. Diese Rezeptoren sind überdies für die zellulären Kooperationen zwischen B- und T-Zellen oder zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen verantwortlich. Um Autoimmunreaktionen zu verhindern, werden während der Entwicklung der T-Zellen im Thymus und der B-Zellen im Knochenmark Zellen mit Rezeptoren, welche "Selbst" erkennen, ausselektiert. Im Verlaufe einer Immunantwort kommt es zur klonalen Expansion der Lymphozyten, welche spezifische Rezeptoren für das Antigen tragen. Die adaptive Immunantwort ist also hochspezifisch und erfolgt aufgrund der erforderlichen Proliferation der entsprechenden T- und B-Zell-Klone erst im späteren Verlauf der Infektion.



Abbildung A-5

Schematische Darstellung des B- und T-Zell-Rezeptors

A B-Zellen besitzen Membranständige Immunglobuline. Diese bestehen aus 2 identischen leichten (L) und schweren (H) Peptidketten. Die variablen Regionen (VL und VH, blau) bilden die Antigen-Bindungsstelle.

B T-Zellen besitzen den T-Zell-Rezeptor (TZR), der gleichzeitig nicht nur spezifisch "Fremd" (ein fremdes Peptid), sondern auch "Eigen" erkennt. Der TZR besteht aus einem heterodimeren Molekül aus alphaund beta-Ketten (oder gamma- und delta-Ketten). Die variablen N-terminalen Enden der beiden Ketten (blau) bilden die Bindungsstelle zum Antigen, das von MHC-Molekülen präsentiert wird, woran Corezeptoren (CD4 oder CD8) binden. Der assoziierte CD3-Komplex ist für die Signaltransduktion wichtig.

A.2.2 First line of defense: die angeborene Immunantwort

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören Monozyten, Granulozyten und dendritische Zellen, welche sich aus der myeloiden Vorläuferzelle entwickeln, sowie NK-Zellen, welche zu den Lymphozyten gehören (Übersicht zur Hämatopoese siehe Abbildung A-4). Die angeborene Immunantwort wird über Keimbahn-kodierte Mechanismen und Rezeptoren vermittelt, so dass ein bestimmter Satz an Rezeptoren bei allen Zellen desselben Typs vorkommt. Das angeborene Immunsystem verfügt weder über die Rezeptorvielfalt noch die feinen Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen unterschiedlichen Antigenen des adaptiven Immunsystems. Auch ist keine klonale Proliferation nach Kontakt mit dem Antigen erforderlich, die Zellen des angeborenen Immunsystems reagieren ohne zeitliche Verzögerung und bilden so den ersten Wall in der Immunantwort.

Die **Rezeptoren** des angeborenen Immunsystems erkennen allgemein vorkommende Merkmale von Krankheitserregern, die sogenannten *pathogen associated molecular pattern* (PAMP) und besitzen eine Reihe unterschiedlicher Funktionen: (i) chemotaktische Rezeptoren, welche beispielsweise neutrophile Granulozyten zu den Infektionsherden lotsen, (ii) Rezeptoren, welche die Aufnahme von Pathogenen stimulieren, dabei handelt es sich meist um Rezeptoren von Phagozyten und (iii) Rezeptoren, welche die Expression von Effektorproteinen induzieren. Zu den drittgenannten Rezeptoren gehören beispielsweise die *Toll-like* Rezeptoren, welche wiederum zwischen angeborener und erworbener Immunität vermitteln.

Die humoralen Komponenten der angeborenen Immunantwort beinhalten Komplement-Faktoren und Zytokine. Bei den Zytokinen handelt es sich um kleine Proteine von etwa 25 kD, die auf einen Aktivierungsreiz hin aus verschiedenen Zelltypen freigesetzt werden und über verschiedene Rezeptoren autokrin, parakrin und/ oder endokrin auf Zellen wirken. Sie werden in Chemokine und Interleukine unterteilt. Unter Interleukinen versteht man von Leukozyten sezernierte oder auf Leukozyten wirkende Moleküle. Sie können sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken und sind wichtige Modulatoren des Immunsystems.

A.2.3 NK-Zellen an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität

A.2.3.1 Entwicklung und Funktionen

NK-Zellen gehen nicht aus der myeloiden Linie hervor, sondern haben eine gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle mit T-Zellen. Während T-Zellen zur weiteren Differenzierung in den Thymus wandern, verbleiben NK-Zellen im Knochenmark und differenzieren zu großen, granulären Lymphozyten aus (Colucci et al., 2003; Spits et al., 1998). NK-Zellen haben große Ähnlichkeit zu T-Zellen, so ist der killing-Mechanismus vergleichbar mit dem CD8+ zytotoxischer T-Lymphozyten (ZTL): beide Zell-Typen nutzen Perforin und Granzym zur Lyse der Zielzellen. Jedoch benötigen NK-Zellen im Gegensatz zu ZTL keine vorausgehende antigenspezifische Stimulation, NK-Zellen lysieren ihre Zielzellen sofort (Trinchieri, 1989). Auch die Sekretion von IFN-y und anderer Zytokine ist NK-Zellen mit ZTL und CD4+ T-Zellen gemein, jedoch sind NK-Zellen nicht zur Produktion von IL2 fähig. Die auf den NK-Zellen zuerst entdeckten, so genannten NK-Zell-Rezeptoren finden sich ebenfalls auf unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen und dienen unter anderem dem Erkennen von MHC-Molekülen. Aufgrund ihrer Verwandtschaft zu T-Zellen, dem Rezeptor-Repertoire und den Effektor-Funktionen scheinen NK-Zellen ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität zu sein (Lanier, 2005).

Die bisher beschriebene Hauptfunktion von NK-Zellen ist die unspezifische Abwehr von Protozoen und Viren, aber auch von intrazellulären Bakterien (Kos, 1998; Vankayalapati *et al.*, 2005). Im Verlauf viraler Infektionen in Mäusen begrenzen NK-Zellen die Virusvermehrung, bis etwa ab Tag 5 - 6 die adaptive Immunantwort einsetzt. Auch in der frühen Abwehr bakterieller Infektionen mit pathogenen Erregern wie *Listeria monocytogenes* oder *Staphylococcus aureus* sind NK-Zellen involviert

(Dunn & North, 1991; Haller *et al.*, 2002). Sowohl die zytotoxische Aktivität gegen infizierte Zellen als auch die Sekretion von immunmodulatorischen Zytokinen, insbesondere IFN-γ, durch NK-Zellen spielen eine große Rolle in der Immunantwort während der frühen Infektionsphase (Biron *et al.*, 1999; Lanier, 2005).

A.2.3.2 Die unterschiedlichen NK-Zell-Rezeptor-Familien muriner NK-Zellen

Grob lassen sich die Rezeptoren von NK-Zellen in zwei Typen einteilen: aktivierende und inhibierende Rezeptoren. Bei Mäusen gehören die meisten bekannten NK-Zell-Rezeptoren zur C-Typ-Lektin-Superfamilie und sind auf dem NK Gene Komplex kodiert (Brown *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 1998). Sie werden als über Disulfid-Brücken gebundene Dimere exprimiert. Murine NK-Zellen erkennen MHC-Klasse I Moleküle mit inhibitorischen Ly49 und CD94/ NKG2-Rezeptoren (Yokoyama, 1995). Während Ly49-Rezeptoren klassische MHC-I Moleküle als Liganden binden, erkennt der CD94/ NKG2A-Rezeptor das nicht-klassische MHC-Klasse I Molekül Qa-1 (Braud *et al.*, 1998; Karlhofer *et al.*, 1992; Vance *et al.*, 1998). Der Signalmechanismus der **inhibitorischen Rezeptoren** ist konserviert: der zytoplasmatische Teil der Rezeptoren enthält ein *immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif* (ITIM), welches bei Rezeptor-Kreuzvernetzung phosphoryliert wird und über Aktivierung der Tyrosin-Phosphatase SHP-1 zur Hemmung aktivierender Kaskaden führt (Long, 1999; Vely & Vivier, 1997).

Inzwischen sind unterschiedliche Klassen an aktivierenden Rezeptoren bei NK-Zellen bekannt: (i) Ly49H erkennt von viralen Pathogenen kodierte Moleküle, welche auf der Oberfläche infizierter Zellen exprimiert werden (Arase et al., 2002; Brown et al., 2001), (ii) von NKG2D werden Selbst-Proteine erkannt, welche bei gesunden Zellen nur in geringer Menge, bei infizierten oder Tumor-Zellen jedoch in erhöhtem Ausmaß exprimiert werden (Raulet, 2003) und (iii) der hoch-affin bindende FcyRIII, welcher durch Bindung an den Fc-Teil von IgG Antikörper-abhängige Zytotoxizität (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) vermittelt (Perussia, 1998). Durch diese ADCC können NK-Zellen an der Antigen-spezifischen Antwort teilnehmen, ohne selbst Spezifität für das entsprechende Antigen zu besitzen. Der Signalmechanismus der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren ist dem der Antigenrezeptoren von T- und B-Zellen ähnlich. Durch Interaktion des Rezeptors mit Adaptorproteinen, welche ein immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) enthalten, werden über die Tyrosin-Kinasen Syk und ZAP70 aktivierende Kaskaden für Degranulation und Zytokintranskription induziert (Lanier et al., 1998).



Gezeigt sind aktivierende Rezeptoren (grün und blau), welche mit ITAM-enthaltenden Adaptorproteinen wechselwirken. Die inhibierenden Rezeptoren (rot) sind nicht auf die Interaktion mit einem Adaptermolekül angewiesen, sie haben im zytoplasmatischen Bereich ein ITIM.

A.2.3.3 <u>Regulation von NK-Zellen durch das Zusammenspiel inhibierender und</u> <u>aktivierender Rezeptoren und die Hypothese des "missing self"</u>

NK-Zellen werden durch Zytokine, Pathogen-assoziierte Substanzen und nach Kontakt mit Zielzellen, welche Liganden für aktivierende NK-Zell-Rezeptoren exprimieren, aktiviert. Es ist die Balance zwischen Signalen von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren, welche festlegt, wie die NK-Zell Antwort ausfällt (Raulet & Vance, 2006). Kärre entdeckte initial, dass die Abwesenheit von MHC-Klasse I Molekülen auf Tumorzellen NK-Zellen derart aktiviert, dass sie diese Zellen lysieren (Karre *et al.*, 1986). So kam es zur *missing self*-Hypothese, die aussagt, dass manche der inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren MHC-Klasse I erkennen und eine Aktivierung der NK-Zelle verhindern. MHC-Klasse I Moleküle kommen auf fast allen gesunden Zellen des Organismus vor, die Anzahl an MHC-Klasse I Molekülen kann jedoch durch virale Infektionen oder Tumortransformation von der Zell-Oberfläche verringert werden. Durch diese Fähigkeit fehlende oder erniedrigte MHC-Klasse I Expression zu erkennen, stellen NK-Zellen ein zu T-Zellen funktionell komplementäres System dar, welches pathologisch veränderte Zellen gerade dann erkennen kann, wenn diese für T-Zellen "unsichtbar" sind.
Diese Hypothese wurde aufgrund weiterer Beobachtungen weiter verfeinert. Allein die Abwesenheit von MHC-Klasse I Molekülen auf der Oberfläche der Zielzelle ist kein ausreichendes Signal für die Lyse durch NK-Zellen. Es verhält sich eher so, dass für die Aktivierung der NK-Zelle die Bindung zwischen einem aktivierenden Rezeptor der NK-Zelle und dem entsprechenden spezifischen Liganden auf der Zielzelle notwendig zu sein scheint. So exprimieren beispielsweise Erythrozyten keine MHC-Klasse I Moleküle, werden aber nicht von NK-Zellen als Zielzellen erkannt. Theoretische Erklärungsmöglichkeiten wären entweder fehlende Liganden für aktivierende NK-Zell-Rezeptoren auf der Erythrozytenoberfläche oder eine Hemmung der NK-Zellen durch bisher unbekannte, inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren, welche mit undefinierten Liganden interagieren (Lanier, 2005). In weiteren experimentellen Ansätzen wurde untersucht, wie NK-Zellen trotz der Interaktion von MHC-Klasse I und inhibitorischen Rezeptoren aktiviert werden können. Dazu wurden bei gleichzeitiger Bindung von inhibierenden Rezeptoren an MHC-Klasse I Moleküle zum einen verschiedene aktivierende NK-Zell-Rezeptoren simultan an die entsprechenden Liganden gebunden (Lanier et al., 1997) und zum anderen eine ausreichende Anzahl eines effektiven aktivierenden NK-Zell-Rezeptors stimuliert (Cerwenka et al., 2001; Diefenbach et al., 2001). In beiden Fällen lysierten die NK-Zellen die Zielzellen, trotz Vorhandensein und Bindung an MHC-Klasse I Moleküle.



Liganden auf der Zielzelle führen, so dass die Signalstärke der aktivierenden Rezeptoren im Vergleich zu der der inhibitorischen Rezeptoren dominiert und die NK-Zelle aktiviert wird (*induced self*).

Daraus lässt sich schließen, dass die Menge an aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf der NK-Zelle und die Menge der Liganden auf der Zielzelle, wie auch die qualitativen Unterschiede in der Signaltransduktion das Ausmaß der NK-Zell Antwort bestimmen. So wird der Aktivitätszustand einer NK-Zelle durch die Summe aller positiven und negativen Rezeptor-vermittelten Signale bestimmt.

A.2.3.4 <u>Signalkaskaden-vermittelte Immunantwort: IL12 und IL18 als wichtige</u> <u>Stimulatoren bei bakteriellen Infektionen</u>

Die Aktivierung von NK-Zellen verläuft neben der Interaktion der NK-Zell-Rezeptoren mit den entsprechenden zellgebundenen Liganden auch über Zytokine, welche von Makrophagen und dendritischen Zellen nach Kontakt mit Pathogenen sezerniert werden (Miettinen *et al.*, 1998). Eine große Rolle bei der Zytokin-vermittelten NK-Zell-Aktivierung spielen hierbei die Interleukine IL12 und IL18 (Akira *et al.*, 2006; Trinchieri, 1995). Durch die Bindung von IL12 bzw. IL18 an den jeweiligen Rezeptor setzen Signaltransduktionskaskaden ein, welche untereinander vernetzt sind und letzen Endes zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IFN-γ führen (Nakahira *et al.*, 2002).

IL12, zuerst als NK-Zell-Stimulus beschrieben, wird besonders bei bakteriellen und parasitären Infektionen freigesetzt und spielt eine große Rolle in der Modulation der angeborenen und erworbenen Immunantwort (Trinchieri, 1995). Die Signaltransduktion durch IL12 verläuft über den Jak-STAT-Pathway (Cho et al., 1996). Nach Bindung von IL12 an den IL12-Rezeptor (IL12R), welcher keine intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität aufweist (Ihle, 1995; Johnston et al., 1996), werden durch die - an den Rezeptor assoziierten und aktivierten - Signalproteine Jak2 und Tyk2 Tyrosin-Reste am IL12R phosphoryliert (Bacon et al., 1995a; Schindler & Darnell, Jr., 1995). Diese phosphorylierten Tyrosin-Reste stellen Bindestellen für die SH2-Domänen des rezeptorgebundenen signal transducer and activator of transcription-Proteins 4 (STAT4) dar und vermitteln eine Phosphorylierung des Tyrosin-Restes 693 von STAT4 (Bacon et al., 1995b; Jacobson et al., 1995). Dieses bildet nach der Tyrosin-693-Phosphorylierung intermolekulare Dimere und wird in den Zellkern transloziert, wo es die Genexpression reguliert (Bacon et al., 1995b; Ihle et al., 1995; Schindler & Darnell, Jr., 1995).



Für optimale Transkriptionsaktivität von STAT4 muss jedoch nicht nur der Tyrosin-693, sondern auch Serin-721 phosphoryliert werden (Cho et al., 1996; Morinobu et al., 2002). Dieser Rest befindet sich in einem Konsensus-Bereich MAPK-vermittelte für Phosphorylierung, diese wird im Fall von STAT4 durch p38 induziert. Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte Ende der 90-er Jahre gezeigt werden, dass IL12 auch p38 über MKK6 aktiviert, der genaue Mechanismus ist allerdings bis heute ungeklärt (Visconti et al., 2000; Zhang & Kaplan, 2000). Des Weiteren muss für die IFN-y Produktion im murinen Modell STAT4 mit Serin-phosphorylierten c-Jun/ AP-1 einen Komplex bilden, welcher hochaffin an die AP-1-Bindestelle im IFN-y-Promotor bindet, da der murine IFN-y-Promotor, im Gegensatz zum humanen, über keine direkte STAT4-Bindestelle verfügt. IL12 allein ist jedoch nicht

in der Lage den c-Jun/ AP-1 Komplex zu phosphorylieren (Nakahira et al., 2002).

IL18 wurde ursprünglich als IFN-γ induzierender Faktor beschrieben und wird bei bakteriellen und viralen Infektionen sezerniert (Okamura *et al.*, 1995; Takeda *et al.*, 1998). Für sich ist IL18 nur ein ausgesprochen schwacher Stimulus für die IFN-γ Produktion. IL18 aktiviert nach Bindung an der IL18-Rezptor (IL18R) den NFκB-Pathway und veranlasst Serin-Phosphorylierung des c-Jun/ AP-1 Komplexes (Adachi *et al.*, 1998; Matsumoto *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 1997). In Abwesenheit von phosphoryliertem STAT4 bindet dieser Komplex nur sehr schwach an den IFN-γ-Promotor und vermittelt keine nachweisbare IFN-γ Produktion (Nakahira *et al.*, 2002).

Zusammen wirken beide Interleukine synergistisch als starke Stimulatoren für die IFN-y Produktion (Zhang *et al.*, 1997). Der essentielle Mechanismus dafür ist die Interaktion zwischen phosphoryliertem STAT4 und phosphoryliertem c-Jun/ AP-1 (Nakahira *et al.*, 2002). Dies erklärt auch die geringe IFN-y Produktion, wenn eines der beiden Interleukine allein eingesetzt wird: (i) nach Stimulation nur mit IL12 bindet phosphoryliertes STAT4 an nicht-phosphorylierte c-Jun/ AP-1 Komplexe, die Bindungsaffinität dieses Komplexes an den IFN-γ-Promotor ist nur schwach und (ii) IL18 wirkt zwar als starker Induktor auf die Phosphorylierung von c-Jun/ AP-1, ist aber nicht in der Lage STAT4 zu phosphorylieren, so dass es zu keiner Komplexbildung kommt und die Transkription von IFN-γ mRNA unterbleibt (Nakahira *et al.*, 2002). Eine weitere Folge des synergistischen Effektes von IL12 und IL18 ist die reziprok induzierte Expression des entsprechenden Zytokin-Rezeptors (Lawless *et al.*, 2000). In murinen T-Zellen wurde gezeigt, dass IL12 die Transkription von IL18R-mRNA verursacht, so eine erhöhte Expression des IL18R auf der Zelloberfläche bewirkt und umgekehrt (Nakahira *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 1998).

A.2.4 Die Immunologie der Yersinien-Infektion

A.2.4.1 Die Funktionen des Schleimhaut-assoziierten lymphoiden Gewebe

Das angeborene Immunsystem spielt eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung der Unversehrtheit der inneren Schleimhäute und Schutz des Wirtes vor einer großen Zahl an potentiellen Pathogenen der Darmflora. Der Darm ist ein extrem komplexes Organ und stellt die größte Oberfläche des Körpers dar. Diese besteht in erster Linie aus Epithelzellen, welche zu einer aus mehr als 400 Spezies bestehenden Mikroflora exponiert sind. Die Beziehung zwischen Wirt und Mikroflora ist eine hochkomplexe, gut ausbalancierte Symbiose, welches unter normalen Umständen für beide Seiten von Vorteil ist (Hooper & Gordon, 2001). Doch die mucosalen Oberflächen sind Ziel vieler unterschiedlicher Pathogene. So ist es nicht weiter verwunderlich, dass sich eine große Zahl an lymphatischen Zellen in der Umgebung der mucosalen Gewebe befindet und dort das MALT (mucosaassociated lymphoid tissue) bilden (MacDonald, 2003). Das MALT hat zwei Hauptfunktionen: (i) es löst Abwehrmechanismen gegen mikrobielle Pathogene aus und (ii) vermittelt Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen wie Nährstoffen. Während der Infektion mit enterischen Pathogenen wie Y. enterocolitica spielt das MALT eine kritische Rolle im Eindämmen und Abheilen der Infektion. So wird die Produktion pathogenspezifischer Immunglobuline induziert und die Entwicklung von zytotoxischen T-Zellen und T-Helfer-Zellen veranlasst (Autenrieth & Schmidt, 2000; MacDonald, 2003). Studien mit mucosalen Pathogenen deuten darauf hin, dass mikrobielle Pathogene die Abwehrfunktionen des MALT unterbinden, um Zugang in den Wirtsorganismus zu erhalten (Sherman & Kalman, 2004).

eines

A.2.4.2 Die Antigenpräsentation findet in den peripheren lymphatischen Organen statt

Das Eindringen in und die Vermehrung im Wirtsorganismus kennzeichnet im Allgemeinen eine bakterielle Infektion, welche krankheitserregende, meist entzündliche Reaktionen hervorruft. Dies kann an beliebiger Stelle im Wirtsorganismus geschehen, aber die Präsentation des Antigens durch antigenpräsentierende Zellen findet in spezialisierten Geweben statt, den sogenannten peripheren lymphatischen Organen. Zu den peripheren lymphatischen Organen gehören die Lymphknoten, die PP des MALT und die Milz.



In der Milz findet die Antigenpräsentation der Antigen-tragenden Zellen in der periateriolar lymphoid sheath Region (PALS) der weißen Pulpa statt. In diesem Bereich befinden sich hauptsächlich T-Zellen, während die follikulären Bereiche der weißen Pulpa von B-Zellen gebildet werden. Durch die Präsentation der Antigene wird eine adaptive Immunantwort ausgelöst, diese ist gekennzeichnet durch eine Antigeninduzierte Differenzierung und Proliferation von B- und T-Zellen. Auch die Struktur der Milz verändert sich im Laufe einer Infektion je nach Infektionsstatus, so vergrößern sich beispielsweise die B-Zell-Follikel, wenn die B-Zellen proliferieren und Keimzentren bilden und das gesamte lymphatische Organ schwillt an. Wie schnell und effektiv sich ein Pathogen im Wirt vermehrt, hängt zum einen von der Abwehrlage des Wirtes, zum anderen aber auch von der Pathogenität des Erregers ab (Muller et al., 2005; Sansonetti & Di Santo, 2007)

A.2.4.3 Die Pathogenitätsfaktoren der Yersinien während der Infektion

Bedingt durch den extrazellulären Lebensraum, welcher hochkomplexe Strategien zur Umgehung der Wirts-Immunantwort erfordert, ist die Pathogenität der enteropathogenen Yersinien multifaktoriell. Hauptverantwortlich dafür ist das Virulenzplasmid, welches für ein TTSS, die sechs Yop-Effektor-Proteine, das Adhäsin YadA sowie für LcrV kodiert. Zusätzlich zu den pYV-Plasmid werden auf dem Bakterienchromosom zwei weitere Faktoren kodiert, welche die Besiedlung des Darmes ermöglichen und für die Virulenz in der Maus verantwortlich sind. Das Adhäsin Invasin ermöglicht die Bindung an und Translokation durch die M-Zellen der PP, während es sich bei dem - auf dem high pathogenity island (HPI) kodierte - Yersinia-Eisen-Aufnahme-System handelt. Baktin um ein Die Gesamtheit dieser Virulenzfaktoren erlaubt den Yersinien ein extrazelluläres Überleben und Vermehren in lymphatischen Geweben.

Die biochemischen zellbiologischen Funktionen und dieser Pathogenitätsfaktoren sind gut untersucht und verstanden, jedoch ist das Zusammenspiel während der Infektion in vivo bisher weitgehend unbekannt. Im Mausinfektionsmodel konnte die Rolle der einzelnen Yops untersucht werden und zeigte als wichtigste Funktion die Hemmung der angeborenen Immunantwort des Wirtes. Induktion von Apoptose und Hemmung der Phagozytose in Makrophagen und dendritischen Zellen führt neben der Inhibition der angeborenen Immunantwort auch zu einer Unterdrückung der adaptiven Immunantwort. Um eine Yersinien-Infektion komplett zu beseitigen, ist jedoch zusätzlich eine starke Antwort des adaptiven Immunsystems nötig. Insbesondere CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen scheinen bisher aufgrund der Produktion von IFN-y eine große Rolle in diesem Prozess zu spielen. Durch die YopP vermittelte Apoptose von dendritischen Zellen – wichtige antigenpräsentierende Zellen - wird ein effektives Priming und Aktivierung von T-Zellen unterbunden. Findet keine Aktivierung der T-Zellen statt, so differenzieren diese nicht aus und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere IFN-y, findet nicht statt. IFN-y allerdings erwies sich in in vivo Experimenten mit verschiedenen Mausstämmen als ausschlaggebend für die Resistenz gegenüber Yersinien-Infektionen.

A.3 Zielsetzung dieser Arbeit

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Resistenz von C57BL/6 Mäusen gegen eine Yersinien-Infektion mit der Induktion hoher Mengen an IFN-y während früher Infektionsstadien assoziiert ist. Tiere dieses Mausstamms sind in der Lage, Yersinien-Infektionen innerhalb weniger Tage zu kontrollieren und zu eliminieren. BALB/c-Mäuse hingegen induzieren nur geringe Mengen an IFN-y und vermögen eine Infektion mit gleicher Anzahl von Yersinien nicht zu kontrollieren, so dass letztendlich die Tiere an der Infektion sterben. Durch Applikation von IFN-y kann die Resistenz der BALB/c-Mäuse gesteigert werden. Mit welchem Schweregrad sich also eine Yersinien-Infektion manifestiert, wird während der Frühphase der Infektion bestimmt. Man kann postulieren, dass die Fähigkeit des angeborenen Immunsystems, die Infektion zu begrenzen, bis die adaptive Immunantwort einsetzt, entscheidet, ob die Infektion überlebt wird oder nicht. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die IFN-y Produktion in der frühen Phase der bakteriellen Infektion – noch vor Einsetzen der adaptiven Immunantwort - über Resistenz oder Empfindlichkeit entscheidet. Hauptproduzenten von IFN-y während früher Infektionsphasen sind nicht T-Zellen, sondern NK-Zellen, welche ohne Antigen-spezifische Aktivierung reagieren können. Die Hauptfragestellung dieser Arbeit ist daher: existiert ein Unterschied in den NK-Zell-Populationen und NK-Zell-Funktionen zwischen empfindlichen und resistenten Mausstämmen? Mit verschiedenen molekularbiologischen und immunologischen Techniken soll die Beeinflussung der Zytotoxizität, der IFN-y Produktion, die Regulation von Signaltransduktionskaskaden und differentielle Genexpression durch Yersinien gezeigt werden. Auch die ex vivo Analyse von in vivo infizierten NK-Zellen soll Aufschluss über die Beeinflussung von NK-Zell-Funktionen durch Yersinien geben.

Yersinien besiedeln lymphatische Organe wie PP oder Milz und bilden dort Mikrokolonien. In einer zweiten Fragestellung soll geklärt werden, ob es einen Unterschied in der zellulären Umgebung dieser Abszesse bei den verschiedenen Mausstämmen gibt und ob die unterschiedliche Empfindlichkeit eventuell darin begründet liegt. Um diese Frage zu klären, soll zu verschiedenen Zeitpunkten während der Infektion Gewebe entnommen, Kryomikrotomschnitte angefertigt und mit Antikörpern gegen unterschiedliche Zellpopulationen des Immunsystems gefärbt werden. Diese Schnitte sollen im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Weiterhin soll durch FACS-Analysen ein Einblick gewährt werden, ob und wenn ja wie, sich die Größe der Populationen im Verlauf der Infektion verändert.

B Material und Methoden

B.1 Reagenzien

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von SIGMA (Deisenhofen), Invitrogen (Karlsruhe) oder Merk (Darmstadt) bezogen. Ansonsten werden die Herstellerfirmen der verwendeten Reagenzien, Enzyme und Chemikalien an entsprechender Stelle genannt.

B.2 Bakterien

B.2.1 Yersinienstämme

Stamm	Beschreibung	Herkunft
WA(pYV)	Serotyp O:8, enthält pYV- Plasmid, Wildtyp-Stamm WA- 314	(Heesemann <i>et al.,</i> 1984)
WAC	Plasmidloses (<i>cured</i>) Derivat von WA-314	(Heesemann <i>et al.,</i> 1984)
WAC inv-	WA-C-Mutante, Deletion von inv	(Ruckdeschel <i>et al.,</i> 1996)
WA(pTTS, pP60)	WA-C-Derivat (i) pLCR-Plasmid enthält 25kb Fragment des pYV-Plasmids, kodiert TTSS (ii) Plasmid enthält YopE ₁₃₈ - p60 (<i>Listeria monocytogenes</i>) Fusionsgen	(Russmann <i>et al.,</i> 2001)
WA(pYV)inv-	WA (pYV)-Mutante, Deletion von <i>inv</i>	(Roggenkamp <i>et al.,</i> 1995)
WA(pYV)YadA-	WA (pYV)-Mutante, Deletion von <i>YadA</i>	(Flugel <i>et al.,</i> 1994)

Tabelle B-1: Yersinienstämme

WA(pYV, ΔYopT)	WA(pYV)-Mutante, Deletion von <i>yopT</i>	(Trulzsch <i>et al.,</i> 2004)
WA(pYV, ΔYopE)	WA(pYV)-Mutante, Deletion von <i>yopE</i>	(Trulzsch <i>et al.,</i> 2004)
WA(pYV, ΔYopM)	WA(pYV)-Mutante, Deletion von <i>yopM</i>	(Trulzsch <i>et al.,</i> 2004)
WA(pYV, ΔYopO)	WA(pYV)-Mutante, Deletion von <i>yopO</i>	(Trulzsch <i>et al.,</i> 2004)
WA(pYV, ΔYopP)	WA(pYV)-Mutante, Deletion von <i>yopP</i>	(Trulzsch <i>et al.,</i> 2004)
WA(pYV, ΔYopH)	WA(pYV)-Mutante, Deletion von <i>yopH</i>	(Trulzsch <i>et al.,</i> 2004)
WA(pTTS, pYopT)	WA(pTTSS), zweites Plasmid enthält <i>yopT</i> -Gen	(Trulzsch <i>et al.,</i> 2003)
WA(pTTS, pYopE)	WA(pTTSS), zweites Plasmid enthält <i>yopE</i> -Gen	(Trulzsch <i>et al.,</i> 2003)
WA(pTTS, pYopM)	WA(pTTSS), zweites Plasmid enthält <i>yopM</i> -Gen	(Trulzsch <i>et al.,</i> 2003)
WA(pTTS, pYopO)	WA(pTTSS), zweites Plasmid enthält <i>yopO</i> -Gen	(Trulzsch <i>et al.,</i> 2003)
WA(pTTS, pYopP)	WA(pTTSS), zweites Plasmid enthält <i>yopP</i> -Gen	(Trulzsch <i>et al.,</i> 2003)
WA(pTTS, pYopH)	WA(pTTSS), zweites Plasmid enthält <i>yopH</i> -Gen	(Trulzsch <i>et al.,</i> 2003)

B.2.2 Nährmedien und Zusätze

Tabelle B-2: Medien für die Bakterienkultur

Luria-Bertani (LB) Medium	1 % Bacto-Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl pH 7,5
Brain-Heart-Infusion (BHI) Medium	3,7 % Hirn-Herz-Infusions Extrakt (Schwein)
YT Medium	0,8 % Bacto-Trypton 0,5 % Hefeextrakt 0,25 % NaCl pH 7,0
Einfriermedium (Stammsammlung)	15 % Glycerol in LB Medium
Einfriermedium (Infektion)	40 % Glycerol in PBS
LB-Agar Platten	LB-Medium + 1,5% Agar

Antibiotikum	Stocklösung	Arbeitslösung
Chloramphenicol (Cm)	20 mg/ ml in Ethanol	20 µg/ ml
Spectinomycin (Sp)	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ ml
Ampicillin (Amp)	100 mg/ ml in H ₂ O	100 µg/ ml
Kanamycin (Kan)	50 mg/ ml in H2O	50 µg/ ml
Gentamicin (Gm)	15 µg/ ml in H2O	150 µg/ ml

Tabelle B-3: Antibiotika für die Bakterienkultur

B.2.3 Kultivierung von Yersinien

Die Anzucht der Bakterien erfolgte üN im Schüttelinkubator in sterilem Medium, welchem bei Bedarf die entsprechenden Selektionsmarker zugesetzt wurden. Das Temperaturoptimum der Yersinien liegt bei 27°C. Bei der Durchführung von *in vitro* Infektionen mit *Y. enterocolitica* wurde die üN Kultur 1:10 in LB Medium verdünnt und weitere zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Yersinien können für etwa 4 Wochen auf LB-Agar Platten mit entsprechenden Selektionsmarker im Kühlschrank gelagert werden.

B.2.4 Anlegen einer Stammsammlung

Die Stämme wurden üN in LB Medium angezogen, bei 2000 g abzentrifugiert und das Pellet dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

B.2.5 Anlegen einer Bakterienkultur für *in vivo* Infektionen

Die Stämme wurde üN in LB Medium angezogen, bei 2000 g abzentrifugiert und das Pellet dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml Einfriermedium für Infektionen resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

B.2.6 Bestimmung der Bakterienzahl für in vivo Infektionsversuche

Die Bakterienzahl der eingefrorenen Aliquots wurde durch Ausplattieren mehrerer Verdünnungsreihen der Bakteriensuspension auf LB-Agar Platten ermittelt und als koloniebildende Einheiten (*colony forming units,* CFU) erfasst.

B.2.7 Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen für *in vitro* Infektionsversuche

Die optische Dichte von Bakteriensuspensionen wurde in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gegen das entsprechende Leermedium gemessen. Ein Milliliter einer Bakteriensuspension mit einer OD_{600} von 0,5 enthält ca. 1,6x10^o Bakterien. Für *in vitro* Infektionsversuche wurden die Bakterien mit einer MOI (Multiplizität der Infektion) von 50:1 eingesetzt.

B.2.8 Herstellung transformationskompetenter Yersinien

Die Bakterien wurden üN in LB Medium angezogen, in YT-Medium 1:100 verdünnt und bei 27°C bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension für 10-15 Min. auf 4°C gekühlt, für weitere 10 Min. bei 2900 rcf und 4°C zentrifugiert und zweimal mit 10% Glycerin/ H₂O_{bidest} gewaschen. Die so präparierten Bakterien wurden in 10% Glycerin/ H₂O_{bidest} resuspendiert und als 50 µl Aliqouts schockgefroren. Die kompetenten Bakterien können bis zu einem Jahr bei -80°C gelagert werden.

B.2.9 Elektroporation

Für die Elektroporation wurde ein Aliquot kompetenter Yersinien mit 2 μ l DNA-Lösung gemischt und in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette bei 1,8 kV, 25 μ F und 200 Ω transformiert. Danach wurde die Suspension mit 1 ml LB Medium verdünnt und bei 27°C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach 1 Std. wurde die Suspension auf LB-Agar Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

B.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

B.3.1 Oligonukleotide, Probes, Puffer und Kits

Tabelle B-4: Oligonukleotide, Probes, Puffer und Kits für die Molekularbiologie

INF-y left primer	TCT GGA GGA ACT GGC AAA AG
IFN-γ right primer	TTC AAG ACT TCA AAG AGT CTG AGG
Random Hexamer Primer (Roche, Mannheim)	Pd(N)₀
Oligo-dT-T7 Primer	GGC CAG IGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG-T24-VN
Probe #21	Mause probe library, Roche, Mannheim
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden
MessageAmp™ II-Biotin Enhanced	Ambion
10x MOPS	0,2 M MOPS pH 7 20 mM NaAC 10 mM EDTA pH 8 in DEPC-H ₂ O
10x RNA Auftragspuffer	50 % (v/ v) Glycerol 10 mM EDTA pH 8 0,25 % (m/ v) Bromphenolblau 0,25 % (m/ v) Xylenolcyanol FF in DEPC-H ₂ O
Agarose-Gel für RNA-Elektrophorese	2,5 ml 37 % Formaldehyd 5 ml 10x MOPS 0,5 g Agarose ad 50 ml DEPC-H2O
Die weiteren verwendeten Puffer wurden mit de	en entsprechenden Enzymen mitgeliefert.

B.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Schnelllyse

Die Isolation geringer Plasmid-DNA-Mengen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Schnelllyse in Gegenwart des Detergenz Sodiumdodecylsulfat SDS ("Minipräp").

B.3.3 Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA über Qiagen-Säulen

Zur Isolation und Aufreinigung von Plasmid-DNA wurde diese über Midi-Säulen nach dem Prinzip der Anionentauscher-Chromatographie gemäß den Angaben des Herstellers gewonnen. Die Konzentration und Reinheit der präparierten DNA wurden photometrisch bestimmt und die Endkonzentration auf 1 µg/ µl eingestellt.

B.3.4 Isolation von RNA mittels Trizol[®] für RT-PCR

Für die RNA-Isolierung aus eukaryotischen Suspensionszellen wurden diese für 10 Min. bei 300 g abzentrifugiert und der ÜS vorsichtig abgenommen. Anschließend wurde 1 ml Trizol[®] zugegeben und die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren lysiert. Die Trizolsuspension wurde in ein 1,5 ml RNase freies RG überführt und 5 Min. bei RT inkubiert, damit Nukleoproteinkomplexe komplett dissoziieren konnten. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform – und bei geringen Zellzahlen als Fällungshilfe 1 µg *E. coli* tRNA - und gutem Durchmischen der beiden Phasen wurde weitere 2-3 Min. bei RT inkubiert. Nach 15 Min. Zentrifugation bei 21000 rcf wurde die wässrige Phase in ein frisches RNase freies RG überführt und die RNA mit 500 µl Isopropanol präzipitiert. Das RNA-Pellet wurde mit 70% eiskaltem EtOH gewaschen, unter Vakuum vorsichtig getrocknet und in 10 µl DEPC-H₂O resupendiert. Für längere Lagerung wurde die RNA als EtOH-Pellet bei -80°C eingefroren.

B.3.5 Isolation von RNA mittels RNeasy Mikro Kit für Microarrays

Für die RNA Isolation aus eukaryotischen Suspensionszellen für Microarrays wurden 1x10⁶ Zellen/ Ansatz einmal mit PBS gewaschen und dann gemäß den Herstellerangaben die RNA isoliert. Durch Verwendung des RNeasy Mikro Kits konnte gewährleistet werden, dass sich RNA-Fragmente < 200 bp, 5 S rRNA und 5,8 S rRNA nicht im Ansatz befinden.

B.3.6 Photometrische Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren

Die Reinheit (A₂₆₀/ A₂₈₀) und Konzentration (A₂₆₀) der gereinigten DNA und RNA wurde durch die Messung des Absorptionsspektrums mit Hilfe eines Photometers ermittelt und nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (1 OD₂₆₀=47,5 µg dsDNA/ ml, bzw. 1 OD₂₆₀=40 µg RNA/ ml) berechnet. Der Quotient A₂₆₀/ A₂₈₀ verringert sich mit zunehmender Proteinverunreinigung und sollte über 1,6 liegen.

B.3.7 Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Für die RNA-Gelelektrophorese wurden 1% Agaroseflachbettgele im Format 8,5 cm x 7 cm verwendet. Die RNA-Probe (1µg) wurde mit 5 µl Formamid, 2 µl Formaldehyd, 2 µl 5x MOPS und 1 µl DEPC-H₂O versetzt und für 10 Min bei 70°C erhitzt. Anschließend wurden 1 µl RNA Auftragspuffer und 1 µg Ethidiumbromid dazugegeben und die Probe auf dem Gel aufgetragen.

Nachdem die Proben in 1x MOPS-Laufpuffer bei 100 V aufgetrennt wurden, wurde die Ethidiumbromid-gefärbte RNA unter dem UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht und fotografiert (Abbildung B-1).



B.3.8 Erststrang cDNA-Synthese für RT-PCR mit Random Hexameren

In einem 1,5 ml RNase freiem RG wurden zur cDNA-Synthese 1µl Random Hexamer Primer und 5 µg RNA ad 10 µl mit DEPC-H₂O gemischt und 10 Min. bei 70°C inkubiert. Nach weiteren 10 Min. Inkubation bei RT wurden 4 µl First Strand Buffer, 2 µl DTT, 1 µl RNase OUT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 1 µl Superscript II Reverse Transcriptase (Promega, Karlsruhe) dazugegeben, gemischt, abzentrifugiert und für 1 Std. bei 42°C inkubiert.

B.3.9 Real Time PCR (TaqMan-Analyse)

Quantitative RT-PCR wird eingesetzt, um die Expressionshöhen der RNA in einer Probe zu bestimmen. Analog der konventionellen RT-PCR wird die RNA in cDNA umgeschrieben und diese mit spezifischen Primern amplifiziert. Zusätzlich zu den beiden Primern befindet sich bei der Real Time PCR eine fluoreszenzmarkierte Probe im Ansatz, die an die amplifizierte DNA zwischen den beiden Primern bindet. Die Sonde ist am 5'Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (6-carboxyfluorescein, FAM) markiert und am 3'Ende mit einem Quencherfarbstoff (6-caroxytetra-methylrhodamine, TAMRA). Durch die räumliche Nähe des Reporterfarbstoffes zum Quencherfarbstoff wird die Fluoreszenz-Emission zunächst unterdrückt. Trifft die Taq-Polymerase bei der Amplifikation auf die Fluoreszenzprobe, wird diese durch die Nuklease-Aktivität der Tag-Polymerase abgebaut und der Fluoreszenzfarbstoff, welcher mittels eines Argon-Lasers angeregt wird, wird freigesetzt und kann Licht emittieren. Aufgrund der Spezifität der Sonde kann so die Zunahme eines PCR-Produktes während der gesamten Reaktion gemessen werden. Um Volumina-Schwankungen aufgrund von Pipettierfehlern auszugleichen, enthält der für die TaqMan-PCR verwendete Reaktionspuffer einen passiven Referenzfarbstoff (ROX), der in die Analyse der Fluoreszenzwerte einbezogen wird.

Für die Standard-RT-PCR wurden 150 ng cDNA in einem 25 µl Ansatz (1x Platinum Quantitative PCR Super Mix UDG, 500 nM ROX, 100 nM Fluoreszenzprobe, 240 nM 3'-Oligonukleotide, 240 nM 5'-Oligonukleotide) in eine 96 well-Platte (Quali-PCR-Platten, Kisker, Steinfurt) überführt, mit Folie (PCR-Folie Ultra Clear RT PCR, Kisker, Steinfurt) bedeckt und im TaqMan System mit dem entsprechenden "zwei-Stufen"-PCR-Programm (50°C/ 2 Min.; 95°C/ 10 Min.; 40 Zyklen mit 95°C/ 15 Sek.; 60°C/ 1 Min.) inkubiert. Zur Messung wurde ein ABI 7000 Sequence Detektion System verwendet, ausgerüstet mit der firmeneigenen Software-Version 2.0. Die Auswertung erfolgte mittels eines Excel-Programms über die 2^{-Δct}-Methode mit HPRT als Bezugsgen.

B.3.10 Erst- und Zweitstrang cDNA-Synthese für Microarrays

In einem 0,5 ml RNase freiem RG wurden zur cDNA-Synthese 1 µl Oligo-dT-T7 Primer und 1 µg RNA ad 12 µl mit DEPC-H₂O gemischt und 10 Min. bei 70°C inkubiert. Nach weiteren 10 Min. Inkubation auf Eis wurden 2 µl First Strand Buffer, 1 µl RNaseInhibitor, 4 µl dNTP-Mix und 1 µl Arrayscript dazugegeben, gemischt, abzentrifugiert und für 2 Std. bei 42°C inkubiert.

Für die Zweitstrangsynthese wurden 10 μ l 10x Second Strand buffer, 4 μ l dNTP-Mix, 2 μ l DNA Polymerase, 1 μ l RNase H zum Ansatz pipettiert und mit DEPC-H₂O auf 100 μ l aufgefüllt. Der Ansatz wurde gemischt, abzentrifugiert und bei 16°C 2 Std. inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt. Zur Aufreinigung der cDNA wurde die Probe mit 250 μ l cDNA Binding Puffer versetzt und auf eine cDNA Filter Cartridge gegeben, abzentrifugiert, noch einmal mit 500 μ l Wash Puffer gewaschen und zweimal mit 12 μ l 50–55°C warmen Nuclease-freiem H₂O in ein neues, steriles RNase freies RG eluiert.

B.3.11 In vitro Transkription und Markierung der cDNA für Microarrays

Für die *in vitro* Transkription wurden bei RT 12 μ l Biotin-NTP-Mix zu der cDNA dazugegeben. Nach der Zugabe von 4 μ l 10x T7 Reaktionspuffer und 4 μ l T7 Enzym-Mix wurde der Ansatz für 4 Std. bei 37°C im Trockenschrank inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 60 μ l Nuklease-freiem H₂O gestoppt.

Danach folgte die cRNA Aufreinigung. Die Proben wurden erst mit jeweils 350 µl cRNA Binding Puffer versetzt und anschließend vorsichtig mit 250 µl 100% EtOH gemischt. Der Ansatz wurde auf eine cRNA Filter Cartridge gegeben, abzentrifugiert, noch einmal mit 650 µl Wash Puffer gewaschen und für zwei Min. bei RT mit 100 µl warmen Nuclease-freiem H₂O inkubiert. Danach wurde die Probe in ein neues, steriles RNase freies RG eluiert. Die Qualität der cRNA wurde mittels RNA Gelelektrophorese ermittelt und die Menge über die Messung der optischen Dichte bestimmt.

Um die Microarrays mit der cRNA beladen zu können, muss die RNA fragmentiert werden (durchschnittliche Fragmentgröße 50 -150 Nukleotide). Dazu wurde zu 15 µg RNA 6 µl 5x Fragmentierungspuffer ad 30 µl DEPC-H₂O dazugegeben und 35 Min. bei 95°C in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel inkubiert. Bis zur Auftragung auf den Array wurde die cRNA bei -80°C gelagert.

B.4 Analyse von Affymetrix Microarrays

B.4.1 Puffer und Lösungen

Tabelle B-5: Puffer und Lösungen für die Analyse von Affymetrix Microarrays

12x MES Stocklösung	70,4 g MES Monohydrat 193,3 g MES Na-Salz 800 ml DEPC-H ₂ O, pH 6,5-6,7
2x Hybridisierungpuffer	8,3 ml 12x MES Stocklösung 17,7 ml 5M NaCl 4 ml 0,5 M EDTA 0,1 ml 10 % Triton X-100 ad 50 ml DEPC-H ₂ O
Hybridisierungscocktail	3 μl 5 nM Kontroll-Oligonukleotide B2 3 μl 100x Hybridisierungs-Kontrollen (bioB, BioC, BioD, cre) 3 μl 10 mg/ ml Hering Spermien DNA 3 μl 50 mg/ I acetyliertes BSA 150 μl 2x Hybridisierungspuffer ad 300 μl DEPC-H ₂ O
20x SSPE	175,3 g NaCl 27,6 g NaH2PO4 x H2O 7,4 g EDTA ad 1 I DEPC-H2O, pH 7,4
Waschpuffer A (nicht stringent)	300 ml 20x SSPE 1 ml 10 % Triton X-100 ad 1 I DEPC-H ₂ O
Waschpuffer B (stringent)	83,3 ml 12x MES Stocklösung 5,2 ml 5 M NaCl 1 ml 10 % Triton X-100 ad 1 I DEPC-H ₂ O
2x Färbepuffer	41,7 ml 12x MES Stocklösung 92,5 ml 5 M NaCl 2,5 ml 10 % Triton X-100 ad 250 ml DEPC-H ₂ O
Streptavivdin-Lösung	300 μl 2x Färbepuffer 24 μl 50 mg/ ml acetyliertes BSA 6 μl 1 mg/ ml Streptavidin ad 600 μl DEPC-H ₂ O
Antikörper-Lösung	300 µl 2x Färbepuffer 24 µl 50 mg/ ml acetyliertes BSA 6 µl IgG (Ziege) 3,6 µl (0,5 mg/ ml) biotinylierter anti- Streptavidin Antikörper ad 600 µl DEPC-H ₂ O
SAPE-Lösung	300 µl 2x Färbepuffer 24 µl 50 mg/ ml acetyliertes BSA 6 µl 1 mg/ ml Streptavidin-R-Phycoerythrin- Konjugat (SAPE) ad 600 µl DEPC-H ₂ O

B.4.2 Microarray-Analysen

Eine wichtige Methode in der medizinischen und pharmazeutischen Forschung ist die Microarray-basierte Untersuchung der differentiellen Genexpression verschiedener Zellpopulationen und Organismen. Aktuell kann durch die Verwendung modernster Arrays die Expression von über 50000 Transkripten parallel und semiguantitaiv gemessen werden.

Dabei ist eine der wichtigsten Anwendungen für Microarrays die Erstellung genomweiter Genexpressionsprofile. Die Gesamtheit der transkribierten Sequenzen das Transkriptom – verändert sich durch äußere Einflüsse oder physiologische Prozesse wie DNA-Replikation oder Zellteilung. Es ist im Gegensatz zum Genom hochdynamisch und die Messung von mRNA kann Aufschluss über die Genaktivität geben. Messenger-RNA stellt einen Zwischenschritt der Proteinbiosynthese dar und ein Unterschied in der Transkriptionshöhe korreliert meistens auch mit einem Unterschied der Proteinexpression. Während die nahezu komplette Bestimmung eines zellulären Proteoms augenblicklich technisch nicht realisierbar ist, kann für derartige Hochdurchsatzuntersuchungen die relativ einfach durchzuführende mRNA Messung angewendet werden.

Auch können Rückschlüsse auf die Funktion nicht charakterisierter Transkripte mittels Transkriptomanalyse gezogen werden. Dabei wird angenommen, dass Gene mit ähnlichem Expressionsmuster vergleichbare molekulare Funktionen aufweisen oder in verwandte biologische Prozesse involviert sind. Zur Identifikation coexprimierter Gene werden Cluster-Analysen eingesetzt, welche Gene nach Ähnlichkeit des Expressionsmuster gruppieren. Die Validität dieser experimentellen Herangehensweise wurde für viele Gene im *Saccharomyce cerevisiae* Modell sichergestellt.

B.4.3 GeneChip® Microarrays (Affymetrix)

Auf den GeneChip[®] Microarrays von Affymetrix werden kurze DNA-Fragmente – sogenannte Probes mit einer Länge von 25 Nukleotiden - mittels Photolithographie auf festgelegte Positionen einer Glasoberfläche synthetisiert. Dieses Verfahren ermöglicht eine extrem hohe räumliche Auflösung. Als erster Schritt wird die Glasoberfläche mit einem Linkermolekül, welches eine reaktive OH-Gruppe aufweist, beschichtet. Als Schutz befindet sich über diesem Linkermolekül eine photolabile Schicht, welche durch maskengesteuerte Belichtung an festgelegten Regionen des Arrays abgebaut werden kann. An die freigelegten reaktiven OH-Gruppen dieser ungeschützten Bereiche bindet ein Nukleotid. Anschließend erfolgt eine erneute Beschichtung mit der photolabilen Schutzschicht, so dass anschließend der nächste Belichtungszyklus mit einer weiteren Maske erfolgen kann. Auf diese Weise werden die unterschiedlichen *Probes* durch wiederholte Belichtungs- und Kopplungsschritten synthetisiert. Die Anzahl unterschiedlicher *Probes* pro Array ist dabei von der räumlichen Auflösung der Belichtungs- und Syntheseschritte abhängig. Derzeitige Arrays haben quadratische Synthesefeatures mit 11 µm Seitenlänge, so dass ein Array mit einer Größe von 1,28 cm x 1,28 cm 1,3 Millionen unterschiedliche *Probes* trägt.



B.4.4 GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array

Die Probes mit einer Länge von 25 Nukleotiden, deren Sequenz einer cDNA-Sequenz aus den Datenbanken GenBank, dbEST oder RefSeq komplementär ist, wurden auf einer Fläche mit 11 µm Seitenlänge direkt auf die Glasoberfläche des Arrays synthetisiert. Diese Probes werden als *Perfect Match* (PM) bezeichnet.



In ein angrenzendes Synthesefeld (Feature) wird eine Probe mit fast derselben Sequenz, aber einem vertauschten Basenpaar in der zentralen (mittigen) Position synthetisiert. Diese Probe wird als Mismatch (MM) bezeichnet. Zusammen bilden PM und MM ein Probe Pair (PP). Elf dieser Probe Pairs aus unterschiedlichen Bereichen derselben cDNA-Sequenz bilden ein Probe Set (PS). Die in dieser Arbeit verwendeten Microarrays enthalten auf einer Glasfläche von 1,28 x 1,28 cm mehrere Hunderttausend Probes, welche 45101 Probe zu Sets zusammengefaßt werden. Diese analysieren den Expressionslevel von über 39000 distinkten Transkripten.

B.4.5 Hybridisierung der Proben

Die für die Microarrays aufbereitete cRNA wurde mit dem Hybridisierungscocktail zusammengemischt und in einem GeneChip® (Affymetrix, Santa Clara) pipettiert. Der Chip wurde 16 Std. bei 45°C in einem Hybridisierungsofen (GeneChip® Hybridisation Oven 640, Affymetrix) unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Probe wieder abgenommen und der Chip mit 300 µl Waschpuffer A aufgefüllt. Die Probe kann bei -80°C gelagert und nochmals hybridisiert werden.

B.4.6 Waschen und Färben der Microarrays

Zur Detektion der Fluoreszenzsignale wurde der Chip in die computergesteuerte Waschstation (GeneChip® Fluidics Station 450 Affymetrix) eingesetzt, welche die Stringenz-Waschungen bei 50°C in Waschpuffer B und anschließend die dreischrittige Färbeprozedur (Streptavidin, anschließend biotinylierter a-Streptavidin-AK, schließlich SAPE-Lösung) behandelt. Zwischen den einzelnen Färbungen und zum Schluss wurde mit Waschpuffer A gewaschen. Anschließend wurde der Chip aus der Waschstation entnommen und auf Luftblasen in der Hybridisierungskammer untersucht. Waren keine Luftblasen erkennbar, wurde der Chip mit einem Argon-Laser (GeneChip 300 7G Scanner, Affymetrix, Santa Clara) gescannt und die Roh-Fluoreszenzdaten mit der Affymetrix GCOS Software ermittelt.

B.4.7 Statistische Analyse

B.4.7.1 Normalisierung

Alle Array-Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Um diese Arrays untereinander vergleichbar zu machen, muss zunächst für eventuelle Unterschiede in der Gesamtfluoreszenzintensität korrigiert werden. Dieser Prozess wird als Normalisierung bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde die von Bolstad und Irizarry vorgeschlagene Methode der Quantilennormalisierung verwendet (Bolstad Bioinformatics, 2003). Kurz dargestellt werden alle Signalintensitäten der Arrays ihrer Höhe nach sortiert. Für jeden Rang werden die tatsächlichen Intensitäten durch die mittlere Intensität dieses Ranges ersetzt, und die Intensitäten werden wieder in ihre ursprüngliche Reihenfolge zurücksortiert. Dieses Verfahren stellt sicher, daß die Verteilung der Signalintensitäten auf allen Arrays gleich ist und wird derzeit als *stateof-the-art* angesehen.

B.4.7.2 Qualitätskontrolle der Normalisierung

Als Qualitätskontrolle der Normalisierung dient ein MvA Plot. Hierzu werden auf einer logarithmischen Skala der Mittelwert der Expressionswerte (E) eines Gens aus zwei Arrays auf der X-Achse aufgetragen, auf der Y-Achse deren Ratio:

M=log₂(E_{Array1})-log₂(E_{Array2})

$A=0,5^{*}(log_{2}(E_{Array1})+log_{2}(E_{Array2}))$

Zur besseren Beurteilung wird zusätzlich eine *lowess fit*-Llnie berechnet und aufgetragen. Dies ist ein auf kleinen Abschnitten der Gesamtdaten basierendes und über den ganzen Datenbereich zusammengesetztes lineares Regressionsmodell.

B.4.7.3 Berechnung von Genexpressionswerten

Zur Umsetzung der Fluoreszenzintensitäten in numerische Genexpressionswerte wurde der modellbasierte Ansatz von Wu und Irizarry gewählt (Wu & Irizarry, 2004; Wu & Irizarry, 2005). Dies basiert auf dem additiven Modell von Irizarry et al (Nucleic Acids Research 2003), welches die Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Probenaffinität modelliert. Im Gegensatz zu diesem, rein auf der PM Intensität beruhenden Abschätzung der Transkript-Abundanz, sieht die Modifikation von Wu eine Korrektur für unspezifische Signale basierend auf empirischen, stochastischen Modellen für die Hybridisierungscharakteristik einzelner Material und Methoden

Oligonukleotide vor. Hierzu werden u.a. Sequenzinformationen einbezogen, um die Hybridisierungscharakteristik der Oligonucleotide *in silico* zu modellieren. Nach dieser Hintergrundskorrektur werden die Genexpressionswerte durch ein besonders robustes lineares Regressionsmodell (*median polish*) berechnet.

B.4.7.4 False discovery rate

Zur Identifikation differentiell exprimierter Gene wurde eine *false discovery rate* (FDR) nach der Methode von (Tusher *et al.*, 2001) anstelle eines p-Wertes als Maß für statistische Signifikanz berechnet. Bei der Testung ergibt sich ein signifikantes Problem des multiplen Testens, da man bei Berechnung eines genbasierten p-Wertes auf einem Signifikanzniveau von 0,01 durchschnittlich 1% falsch positive Gene erwarten kann. Deshalb wurde eine Korrektur der Signifikanzen entsprechend der Anzahl der parallel getesteten Hypothesen nach (Benjamini & Hochberg, 1995) vorgenommen. Hierbei wurde eine FDR berechnet, diese entspricht der Anzahl falsch positiver Gene unter allen als signifikant erkannten Genen. Die Anzahl falsch positiver Gene wird dabei durch ein Permutationsverfahren abgeschätzt.

B.4.7.5 <u>Analyse von Experimenten mit >1 experimentellen Faktor</u>

Zur Analyse komplexer Genexpressionsexperimente, die denen der Einfluß von > 1 experimentellem Faktor auf das Genexpressionsprofil von NK-Zellen bestimmt werden sollte, wurde eine N-way ANOVA-Analyse eingesetzt. Die resultierenden p-Werte wurden wieder nach Benjamini-Hochberg für multiples Testen korrigiert. Die Gene, welche in den im jeweiligen Experiment relevanten ANOVA-Interaktionen Signifikanz erreichen, wurden einer hierarchischen Clusteranalyse unterzogen.

B.4.7.6 <u>Hierarchische Clusteranalyse</u>

Zur Identifikation von Genen mit ähnlichem Expressionsmuster wurden differentiell exprimierte Gene einer hierarchischen Clusteranalyse unterzogen, wie von Eisen et al. beschrieben. Es wurde z-score transformierte Genexpressionswerte verwendet, mit der Pearson'schen Korrelation als Ähnlichkeitsmaß und unter Verwendung von *Complete Linkage* zum Dendrogramm-Aufbau.

B.4.7.7 <u>Überrepräsentation funktioneller Gengruppen</u>

Um zu bestimmen, ob innerhalb einer Gruppe co-exprimierter Gene eine bestimmte funktionelle Kategorie überzufällig häufig vorkommt, wurde – unter Annahme einer hypergeometrischen Verteilung – die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass in einer zufällig gezogenen Gruppe gleicher Größe die fragliche Kategorie mit der gleichen Anzahl an Genen vertreten ist, wie das in der zu untersuchenden Gruppe der Fall ist. P < 0.01 wurde als statistisch signifikant angesehen. Die funktionellen Kategorien stammen aus GeneOntology, ein entsprechender Algorithmus ist z.B. im Programm dchip implementiert.

B.5 Allgemeine Zellkulturtechniken

B.5.1 Zelllinien

Tabelle B-6: Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung Herkunft/ Referenz	
Yac-1	Murine Lymphoma-Zelllinie	ATCC TIB-160
J774	Makrophagen-Zellinie aus BALB/c Mäusen	ATCC TIB-67
Jurkat	Humane T-Zell-Leukämie- Zelllinie	ATCC TIB-152
M1/70	Ratten anti-Maus-Mac1a- Hybridom	ATCC TIB-128

B.5.2 Medien, Zusätze und Kits

Tabelle B-7: Medien, Zusätze und Kits für die Zellkultur

DMEM	10 % FCS 2 mM L-Glutamin 10 U/ ml Penicillin 5 μg/ ml Streptomycin 50 μM β-Mercaptoethanol
RPMI	10 % FCS 2 mM L-Glutamin 10 U/ ml Penicillin 5 μg/ ml Streptomycin 50 μM β-Mercaptoethanol
Einfriermedium	10 % DMSO in FCS
NK cell isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
DX5 Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

B.5.3 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in dem entsprechenden Medium im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Sie wurden alle 2-3 Tage passagiert. Adhärente Zellen wurden dazu mit einem Zellschaber abgeschabt, Suspensionszellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Bei allen Experimenten wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase eingesetzt, bei Infektionsversuchen das Medium ohne Zusatz von Antibiotika verwendet.

B.5.4 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Zellzahl und die Vitalität der Zellen wurde mikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau bestimmt. Lebende Zellen mit intakter Membran nehmen keinen Farbstoff auf. Zellen mit permeabilisierter Zellmembran werden durch Trypanblau angefärbt.

B.5.5 Aufbewahrung eukaryontischer Zellen

Die Zellen einer Zellkulturschale (10 cm) wurden 5 Min. bei 400 rcf und 4°C pelletiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und die Suspension in ein Einfrierröhrchen überführt. Die Zellen wurden üN bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen langsam mit in 10 ml des entsprechenden Mediums überführt. Nach zweimaligem Waschen zum Entfernen des DMSO wurden die Zellen wie beschrieben kultiviert. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurden die aufgetauten Zellen vor dem Einsatz in Experimenten mindestens zweimal passagiert.

B.5.6 Zytospinzentrifugation

Um Suspensions-Zellen auf einen Objektträger aufzubringen, wurden 1x10⁵ Zellen in 500 µl PBS in einer Zytospinzentrifuge bei 800 U/ Min. für 10 Min. auf Superfrost Plus Objektträger sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen auf dem Objektträger für 20 Min. mit 3% Paraformaldehyd fixiert, die Zellkerne mit 1 µg/ ml 4´,6-Diamidin-2´phenylindoldihydrochlorid (Dapi) angefärbt und die Proben mikroskopisch ausgewertet.

B.5.7 Anreicherung muriner NK-Zellen mittels MACS (Miltenyi Biotec)

Zur Anreicherung muriner NK-Zellen wurde das magnetische Zelltrennungssystem MACS (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) verwendet. Bei diesem System werden sehr kleine Magnetpartikel (ca. 50 nm) eingesetzt. Diese Magnetpartikel können ähnlich wie Fluorochrome mittels monoklonaler Antikörper spezifisch an bestimmte Zellen gebunden werden. Die Bindung kann direkt über Antikörper-Magnetpartikel-Konjugate erfolgen oder indirekt über anti-Antikörper-Magnetpartikel-Konjugate. Die Trennung spezifisch markierter Zellen von unmarkierten Zellen erfolgt in einem Hochgradienten-Magnetfeld, das durch Insertion einer aus ferromagnetischen Stahlpartikeln bestehenden Säulenmatrix in das Magnetfeld eines Hochleistungspermanentmagneten erzeugt wird. Wird die Zellsuspension über die Säule gegeben, bleiben die magnetisch markierten Zellen an der Matrix hängen, während die unmarkierten Zellen die Säule durchlaufen und als negative Fraktion aufgefangen werden. Die markierten Zellen lassen sich durch Ausspülen der Säule außerhalb des Magnetfeldes gewinnen. Zur Kontrolle der Separation werden Originalfraktion, negative und positive Fraktion anschließend durchflußzytometrisch analysiert.



Material und Methoden

Zur Anreicherung von murinen NK-Zellen wurden die Versuchstiere mit CO₂ getötet und anschließend die Milz unter sterilen Bedingungen heraus präpariert. Für die Isolation von NK-Zellen wurde die Milz in sterilem MACS-Puffer auf Eis aufgenommen und anschließend die Zellen nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des entsprechenden Kits isoliert.

B.5.8 Kultivierung muriner NK-Zellen

Die isolierten NK-Zellen wurden zum einen *ex vivo* in die Versuche eingesetzt, zum anderen für sieben Tage mit 1000 U/ ml IL2 in Zellkulturmedium vorstimuliert. Dafür wurden pro well einer 96-well-Platte etwa 1x10⁵ NK-Zellen in 200 µl DMEM + IL2 ausgesät und ohne Mediumwechsel im Brutschrank inkubiert. Nach sieben Tagen wurden die NK-Zellen gepoolt, gewaschen, in frischem Zellkultur-Medium aufgenommen und in die Experimente eingesetzt.

B.5.9 Infektion muriner NK-Zellen

Die NK-Zellen wurden 1 Std. vor Infektion in frischem Medium ohne AB ausgesät. Die Zellzahl richtete sich nach dem entsprechenden Versuch und wird an entsprechender Stelle genannt. Die 5 ml ÜN Kultur der unterschiedlichen Yersinienstämme wurde 1:10 in frischem LB-Medium verdünnt und 2 Std. bei 37°C inkubiert, um die Expression der Virulenzfaktoren zu induzieren. Die Bakterien wurden mit einer MOI von 1:50 zu den NK-Zellen zugegeben und für 5 Min. bei 300 rcf abzentrifugiert, um einen Kontakt zwischen NK-Zellen und Yersinien zu gewährleisten. Nach 1 Std. Infektion wurden die extrazellulären Yersinien mit Gentamicin abgetötet und die geplanten Versuche durchgeführt.

B.6 Proteinbiochemische Arbeitstechniken

B.6.1 Puffer, Lösungen und Kits

Tabelle B-8: Puffer, Lösungen und Kits für die Proteinbiochemie

RIPA-Lysepuffer	50 mM Tris-Cl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,1 % SDS 1 % Nonidet P40 0.5 % Na-Deoxycholat
TBS	10 mM Tris-Cl 150 mM NaCl pH 7,5
TBST	TBS + 0.05 % Tween
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-Cl 190 mM Glycin 0,1 % SDS pH 7,5
5x SDS Probepuffer	312,5 mM Tris-Cl, pH 6,8 5 % SDS 25 % B-Mercaptoethanol 2,5 mM EDTA 25 % Glycerin 0,0125 % Bromphenolblau
5x Probenpuffer mit DTT	5x Probenpuffer + 0,25 M DTT
Anodenpuffer 1	300 mM Tris 10 % Methanol
Anodenpuffer 2	25 mM Tris 10 % Methanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris 40 mM 6-Aminohexansäure 10 % Methanol
Blocklösung	TBST + 4 % BSA
ECL Western Blotting Analysis System	GE Healthcare, München

B.6.2 Herstellung von Zelllysat aus eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen und das Pellet anschließend in kaltem RIPA-Lysepuffer mit Complete Mini Proteininhibitor-Cocktail lysiert und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Das so hergestellte Lysat kann bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

B.6.3 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Das Prinzip der SDS-Page basiert auf der Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht. Beim Erhitzen der Probe unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen werden die Proteine linearisiert und mit SDS komplexiert, welches eine Auftrennung im elektrischen Feld ermöglicht. Die so entstandene negative Ladung des Protein-SDS-Komplexes ist proportional zum Molekulargewicht des Proteins.

Zur Analyse der zu untersuchenden Proteine wurden die Proben mit 5x Probenpuffer versetzt und 5 Min. bei 99°C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ein SDS-Polyacrylamidgel in 1x SDS-Laufpuffer. Die Prozentigkeit des Gels richtete sich nach der zu erwartenden Größe des zu untersuchenden Proteins und ist an entsprechender Stelle angegeben.

B.6.4 Proteintransfer auf PVDF-Membran: Western Blot Analyse

Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine auf PVDF-Membranen übertragen. Dazu wurden Whatman-Filterpapier und die Membran in den entsprechenden Puffern befeuchtet und ein luftblasenfreies Sandwich (s. Abbildung B-6) gebaut. Die Proteine wurden in einer *Semi-dry-Blot*-Apparatur (BioRad, München) bei 15 V für 1 Std. auf die Membran übertragen.



B.6.5 Detektion spezifischer Proteine mittels Immunoblotting

Um die unspezifische Bindung von Proteinen zu vermeiden, wurde die PVDF-Membran für 1 Std. mit Blocklösung blockiert und dadurch die Hintergrundfärbungen reduziert. Anschließend wurde der Blot 3x in Waschpuffer TBST gewaschen, um überschüssige Blocklösung zu entfernen. Die Proteindetektion wurde mit einem indirekten System durchgeführt. Dabei reagierte der Primärantikörper spezifisch mit dem Zielprotein. Dafür wurde der Blot üN mit der AK-Verdünnung der primären AKs bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag 3x mit Waschpuffer TBST gewaschen. An den Primärantikörper wurde ein peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper gebunden, indem der Blot mit der AK-Lösung des sekundären AKs für 2 Std. bei RT geschüttelt wurde. Reste der Antikörperlösung wurden durch dreimaliges Waschen für jeweils 10 Min. mit TBST entfernt. Nach Zugabe des Substrates für die Peroxidase (Western Blotting ECL Analysis Sytems, GE Healthcare, nach Angaben des Herstellers) konnte die an die Membran gebundene Menge eines spezifischen Proteins mittels Chemilumineszenz (ECL) detektiert und quantifiziert werden. Dabei wurde die chemische Reaktion eines zyklischen Diazylhydrazides (Luminol) mit Peroxidase und Wasserstoffperoxid ausgenutzt. Die sofortige Oxidation des Luminols durch die an das Protein gekoppelte Peroxidase bewirkte eine Lichtemission, die durch Exponieren eines Autoradiografiefilmes (Hyperfilm ECL-Filmen, Fuji, Kisker) erfasst werden konnte. Die jeweiligen Antikörperverdünnungen wurden entsprechend den Herstellerangaben in TBST hergestellt.

Antikörper		Verdünnung	Beschreibung
Primäre Antikörper			
α-β-Aktin	Sigma, Deisenhofen	1:5000	Murin, monoklonal, AC-40
a-pY693- STAT-4	Zymed, Karlsruhe	1:250	Kaninchen, polyklonal
a-pT180pY182p38	Promega, Karlsruhe	1:2000	Kaninchen, polyklonal
a- pT183pY185JNK	Promega, Karlsruhe	1:5000	Kaninchen, polyklonal
a-pT183pY185 ERK	Promega, Karlsruhe	1:5000	Kaninchen, polyklonal
a-pY1054pY1055 Tyk2	Cell Signaling, USA	1:1000	Kaninchen, polyklonal
a-YopP	Max von Pettenkofer- Institut	1:2000	Kaninchen, polyklonal

Tabelle B-9:	Antikörper	für die	Western	Blot	Analy	/se
					_	

а-ҮорМ	Max von Pettenkofer- Institut	1:2000	Kaninchen, polyklonal
Sekundäre Antikörper			
a-Kaninchen-HRP	Amersham Pharmacia Biotech, USA	1:3000	Esel, polyklonal
a-Maus-HRP	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:3000	Ziege, polyklonal

B.7 Tierexperimentelle Arbeiten

B.7.1 Mausstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme wurden in der hauseigenen Tierversuchanlage unter spezifisch Pathogen-freien Bedingungen (SPF) gezüchtet.

Tabelle B-10: Mausstämme

Mausstamm	МНС-Тур
BALB/c	H-2 ^d
C57BL6	H-2 ^b

B.7.2 Infektion der Versuchstiere und Organentnahme

Die Infektion der Versuchstiere mit *Y. enterocolitica* erfolgte im Alter von 4-6 Wochen. Dabei wurden die Mäuse mit einer - an die LD₅₀ des jeweiligen Stammes adaptieren - Dosis intravenös infiziert. Unter einer LD₅₀ versteht man die Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben, diese beträgt bei intravenöser Infektion mit *Y. enterocolitica* WA(pYV) bei C57BL/6-Mäusen 2x10⁴ CFU und bei BALB/c-Mäusen 5x10² CFU. Bei Infektionen mit *Y. enterocolitica* WA(pYV, ΔYopP) wurde für C57BL/6-Mäuse eine Dosis von 2x10³ CFU und bei BALB/c-Mäusen eine Dosis von 5x10² CFU verwendet. Zur Organentnahme wurden die Versuchstiere mit CO₂ getötet und anschließend die Organe unter sterilen Bedingungen heraus präpariert. Für die Isolation von NK-Zellen wurden die Milzen in sterilem MACS-Puffer auf Eis aufgenommen. Bei Infektionen wurden zum einen die Milzen an Tag 4 der Infektion in sterilem MACS-Puffer mit Gentamicin aufgenommen und zum anderen die Organe gemäß dem dargestellten Zeitverlauf präpariert, wie unter B.7.3 beschrieben fixiert und bis zur Kryosektion gelagert.



B.7.3 Fixierung der Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden in Kryocups aufgenommen und in Einbettmedium (OCT-Einbettmedium, Jung) platziert. Die Proben in den Kryocups wurden über flüssigem Stickstoff schonend herunter gekühlt und bei -70°C gelagert.

B.7.4 Anfertigen von Gewebeschnitten

Die Anfertigung der Kryoschnitte erfolgte an einem Ultramikrotom (Leica) bei -20°C. Kryoschnitte von 10 µm Dicke wurden auf Superfrost Plus-Objektträger aufgebracht und lichtgeschützt getrocknet. Die Lagerung und Aufbewahrung der Schnitte erfolgte bei –20°C in Objektträgerboxen (NeoLab, Heidelberg).

B.7.5 Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten

Bei der Immunfluoreszenzfärbung werden spezifische Oberflächenproteine der unterschiedlichen Zellpopulationen angefärbt, um deren Lokalisation sichtbar zu machen. Das Prinzip der Immunfluoreszenzfärbungen beruht auf der spezifischen Bindung eines primären Antikörpers an das zu untersuchende Antigen. Die Detektion dieser Bindung erfolgt mittels eines sekundären Antikörpers, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Dabei ist der sekundäre Antikörper gegen die Immunglobulinklasse der Tierspezies des primären Antikörpers gerichtet.

Das verwendete Färbeprotokoll ist dem Schema zu entnehmen. Als Puffer zum Waschen und Verdünnen wurde TBST verwendet. Die Färbungen erfolgten in einer Färbeschiene (Sequenza® Slide Rack, Thermo Fisher Scientific, Schwerte). Durch die Zugabe von Dapi wurde zusätzlich als Gegenfärbung die DNA der Zellkerne angefärbt.

Die Fluoreszenz konnte unter dem Mikroskop mit entsprechenden Fluoreszenzfiltern angesehen werden. Für die Auswertung der Präparate stand ein BX61 Mikroskop (Olympus, Hamburg) mit entsprechenden Filtern (UIS2 Fluorescence Mirror Units, Olympus, Hamburg) und einer schwarz-weiß Kamera (F-View II, Olympus, Hamburg) zur Verfügung.

Fixierung mit eiskaltem Aceton für 10 Min. auf Eis			
bei RT trocknen lassen 2x für 10 Min. rehydrieren mit TBST			
2x mit 150 µl 5% humanen Serum bei 37°C blockieren			
Färben mit 150 µl Primärantikörper-Verdünnung für 1 Std. bei RT			
3x Waschen mit TBST + 1% FCS 3x Waschen TBST			
Färben mit 150 µl Sekundärantikörper-Verdünnung für 1 Std. bei RT			
3x Waschen mit TBST + 1% FCS 3x Waschen mit TBST			
Counterstaining mit Dapi für 5 Min. bei RT			
3x Waschen mit TBST Eindeckeln			
Schema B-1			
Protokoll für Immunituoreszenz-Farbung von Kryoschnitten auf Objektträgern. Die Eivierung fand in einer			

Protokoll für Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten auf Objektträgern. Die Fixierung fand in einer Küvette statt, während die restlichen Färbeschritte in einer Färbeschiene durchgeführt wurden.

Tabelle B-11: Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

Antikörper		Verdünnung	Beschreibung/Klon
Primäre Antikörper			
a-CD4	BD, Heidelberg	1:50	Ratte, monoklonal, L3T4
a-CD8a	BD, Heidelberg	1:50	Ratte, monoklonal, Ly-2
a-B220	BD, Heidelberg	1:50	Ratte, monoklonal, CD45R
a-Ly6G/ Ly6C	BD, Heidelberg	1:50	Ratte, monoklonal, RB6-8C5/ Gr-1
a-Ly6G/ Ly6C (Biotin)	Caltag, Karlsruhe	1:100	Ratte, monoklonal, RB6-8C5
a-CD11c	BD, Heidelberg	1:50	Armenischer Hamster, polyklonal, gp150, 95
a-CD3e	BD, Heidelberg	1:50	Armenischer Hamster, polyklonal

a-F4/80 (Texas Red)	Caltag, Karlsruhe	1:200	Ratte, monoklonal, BM8
Sekundäre Antikörper			
a-Ratte-Cy3	Dianova, Hamburg	1:200	Cy3-konjugiert
a-Ratte-Cy2	Dianova, Hamburg	1:200	Cy2-konjugiert
a-Kaninchen-Cy2	Dianova, Hamburg	1:200	Cy2-konjuguert
a-Kaninchen-Cy5	Dianova, Hamburg	1:200	Cy5-konjugiert
a-Kaninchen-Cy3	Dianova, Hamburg	1:200	Cy3-konjugiert
a-Armenischer Hamster-Cy2	Dianova, Hamburg	1:200	Cy2-konjugiert
a-Armenischer Hamster-Cy3	Dianova, Hamburg	1:200	Cy3-konjugiert
a-Biotin-Cy5	Dianova, Hamburg	1:100	Cy5-konjugiert
a-Biotin-Cy7	Caltag, Karlsruhe	1:100	Cy7-konjugiert

B.8 Allgemeine immunologische Techniken

B.8.1 Puffer, Lösungen und Kits

Tabelle B-12: Puffer, Lösungen und Kits für die Immunologie

PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
FACS-Puffer	PBS + 2% FCS
IL12	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
IL18	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
PMA	Sigma, Deisenhofen
lonomycin	Sigma, Deisenhofen
Cytofix/ Cytoperm plus Golgi Plug	BD, Heidelberg
AnnexinV FITC Apoptosis Detection Kit I	BD, Heidelberg
IFN-y ELISA (AN)	BD, Heidelberg

B.8.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (auch als FACS für fluorescence-activated cell sorting bezeichnet) eignet sich zur Detektion und Analyse von Signalen, die von einzelnen Zellen oder anderen Partikeln erhalten werden, wenn sie in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl treten. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung sowohl an einem Solid-State Coherent Sapphire Laser (488 nm, 20 mW) als auch einem He-Ne JDS Uniphase Laser (633 nm, 20 mW) vorbeigeleitet. Dabei wird für jede Zelle gemessen, wie viel Licht in Richtung des Laserstrahles gestreut wird (Forward Scatter (FSC), korreliert mit der Zellgröße) und wie viel Licht 90° quer zum Laserstrahl gestreut wird (Side Scatter (SSC), korreliert mit der Zellgranularität) Außerdem können nach vorheriger Färbung Fluoreszenzmessungen auf Einzelzellebene vorgenommen werden. Verschiedene Farbstoffe, die zur Färbung der Zellen verwendet werden, emittieren Licht mit unterschiedlichen Emissionsspektra. die in verschiedenen Kanälen detektiert werden können (515-545 nm, 564-606 nm, >670 nm, 750-810 nm (Coherent Sapphire-Laser); 650-670 nm, 750-810 nm (He-Ne-Laser)). Dies wird durch die Verwendung von Bandpass-Filtern erreicht, die nur für polarisiertes Licht der genannten Wellenlängen durchlässig sind. Die eigentliche Erfassung der Lichtquanten erfolgt mit Hilfe mehrerer Photomultiplier. Für die Auswertung wurden die Daten in Histogrammen oder Punktwolkendiagrammen (Dot Plots) dargestellt. In einem Histogramm werden die Häufigkeitsverteilungen der Fluoreszenzen veranschaulicht. Die x-Achse repräsentiert die Lichtintensität, die y-Achse die Zellzahl. In einem Dot-Plot werden die Lichtintensitäten beliebiger Parameterpaare in einem x/y-Diagramm dargestellt. Jede Zelle wird durch einen Punkt repräsentiert.

Antikörper		Verdünnung	Beschreibung
Primäre Antikörper			
CD107a-FITC	BD, Heidelberg	1:100	Ratte, monoklonal, Lamp-1
DX5-FITC/ -PE	eBioscience, Frankfurt	1:200	Ratte, monoklonal, CD49b a2 integrin
TCR β-chain-PE	BD, Heidelberg	1:100	Armenischer Hamster, monoclonal, β-chain
CD16/ 32	eBioscience, Frankfurt	1:200	Ratte, monoklonal, FcyRIII, FcyRII
CD11c-PE	BD, Heidelberg	1:100	Armenischer Hamster, polyklonal, gp150, 95

Tabelle B-13: Antikörper für die Durchflusszytometrie

IFN-y-PE	BD, Heidelberg	1:200	Ratte, monoklonal
Mac-3	BD, Heidelberg	1:100	Ratte, monoklonal, M3/ 84
CD3-Cy7	Caltag, Karlsruhe	1:100	Armenischer Hamster, 25 kD ∞ chain
CD45-FITC	Miltenyi, Bergisch Gladbach	1:100	Ratte, monoklonal, Ly-5
Ly6G-PE	Caltag, Karlsruhe	1:100	Ratte, monoklonal, RB6-8C5/ Gr-1
В220-Су5	Caltag, Karlsruhe	1:100	Ratte, monoklonal, CD45R
CD244.1	BD, Heidelberg	1:200	Ratte, monoklonal, 2B4 Balb Alloantigen
CD244.2	BD, Heidelberg	1:200	Maus, monoklonal, 2B4 B6 Alloantigen
CD16/ 32	eBioscience, Frankfurt	1:200	Ratte, monoclonal, FcyRIII, FcyRII
Sekundäre Antikörper			
a-Ratte-APC	Dianova, Hamburg	1:200	APC-konjugiert
a-Maus-APC	Dianova, Hamburg	1:200	APC-konjugiert

B.8.3 Quantifizierung der intrazellulären IFN-γ Produktion stimulierter NK-Zellen nach Infektion mit Y. enterocolitica im Durchflusszytometer

Die Milzen wurden wie beschrieben den Versuchstieren entnommen und die NK-Zellen wurden wie unter B.5.7 beschrieben aufgereinigt. Die NK-Zellen wurden sowohl *ex vivo* und nach 7-tägiger Aktivierung mit IL2 als auch aus *in vivo* infizierten Mäusen in die Versuche eingesetzt. In jedes Well einer 96-well-Rundbodenplatte wurden 1x10⁵ NK-Zellen pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation mit verschiedenen *Y. enterocolitica*-Stämmen wurde die Infektion mit Gentamicin gestoppt und die Zellen mit 1000 U/ ml IL12, 20 ng/ ml IL18 sowie mit IL12 + IL18 stimuliert. Als Negativkontrolle wurde den NK-Zellen 100 µl DMEM zugegeben. Als Positivkontrolle wurde PMA/ Ionomycin (50 ng/ ml/ 500 ng/ ml) verwendet. Nach einer Stunde Stimulation wurde den Zellen Golgi Plug zugegeben und der Ansatz weitere 3 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen. Die Blockierung der Fc-Rezeptoren erfolgte durch Zugabe von 50 µl einer 1:200 CD16/ 32-AK-Verdünnung in FACS-Puffer für 15 Min. bei 4°C im Dunkeln. Nach
einem Waschschritt mit FACS-Puffer erfolgte die Oberflächenfärbung mit 50 µl einer 1:200 AK-Verdünnung in FACS-Puffer. *Ex vivo* isolierte NK-Zellen wurden mit DX5, aktivierte NK-Zellen mit 2B4 für 20 Min. bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Nach einem weiteren Waschschritt wurden 100 µl pro well Cytofix/ Cytoperm zugegeben und die Zellen für 20 Min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach weiterem Waschen mit Perm/ Wash-Puffer erfolgte die intrazelluläre IFN-γ Färbung mit a-Maus-IFN-γ-PE. Pro well wurde mit 50 µl einer 1:200 AK-Verdünnung in Perm/ Wash-Puffer für 20 Min. bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Nach einem letzten Waschschritt mit Perm/ Wash-Puffer wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Das anschließende Auslesen erfolgte am FACS-Canto. Zuerst wurde die Lymphozyten-Population bestimmt und anschließend mit Hilfe der Oberflächenmarker auf DX5 bzw. 2B4 positive Zellen gegatet. Mindestens 5000 Zellen wurden aufgenommen und auf IFN-γ Produktion gemessen.

B.8.4 Apoptosemessung im Durchflusszytometer

Während der Apoptose wird Phosphatidylserin (PS), welches sich in lebenden Zellen an der Innenseite der Zellmembran befindet, auf die Außenseite der Membran transloziert. AnnexinV bindet an PS. Durch Markierung von Zellen mit FITC-AnnexinV kann man somit Zellen, die evtl. in Apoptose gehen, durchflusszytometrisch nachweisen, aber auch nekrotische Zellen werden angefärbt. Es wird deshalb zusätzlich mit Propidiumiodid gefärbt, ein Farbstoff, der nur in nekrotische Zellen eindringt.

Die Milzen wurden wie beschrieben den Versuchstieren entnommen und die NK-Zellen wurden wie unter B.5.7 beschrieben aufgereinigt. Die NK-Zellen wurden nach 7-tägiger Aktivierung mit IL2 in die Versuche eingesetzt. In jedes Well einer 96-well-Rundbodenplatte wurden 1x10⁵ NK-Zellen pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation mit verschiedenen *Y. enterocolitica*-Stämmen wurde die Infektion mit Gentamicin gestoppt und nach einer weiteren Inkubationsstunde wurden die Zellen mit AnnexinV gefärbt. Für die Annexin-Färbung wurde das kommerziell erhältliche AnnexinV FITC Apoptosis Detection Kit I verwendet. Die Zellen wurden abzentrifugiert, 1x10° Zellen/ ml in FACS-Puffer resuspendiert, nach Angaben des Herstellers gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

B.8.5 *In vitro* Stimulation der NK-Zellen: Quantifizierung der IFN-γ Sekretion (ELISA) nach Infektion mit *Y. enterocolitica*

Die Milzen wurden wie beschrieben den Versuchstieren entnommen und die NK-Zellen wie unter B.5.7 aufgereinigt. Die NK-Zellen wurden sowohl *ex vivo* als auch nach 7-tägiger Aktivierung mit IL2 in die Versuche eingesetzt. Für die Stimulation mit Interleukinen wurden zusätzlich NK-Zellen aus *in vivo* infizierten Mäusen verwendet.

B.8.5.1 Stimulation mit Interleukinen

In jedes well einer 96-well-Rundbodenplatte wurden 1x10⁴ NK-Zellen pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation mit verschiedenen *Y. enterocolitica*-Stämmen wurde die Infektion mit Gentamicin gestoppt und die Zellen mit IL12, IL18 und IL12 + IL18 stimuliert. Als Negativkontrolle wurde den NK-Zellen 100 µl DMEM zugegeben. Als Positivkontrolle wurde PMA/ Ionomycin verwendet. Nach 3 Std. Stimulation wurden die Zellen bei 400 rcf, 4°C abzentrifugiert und der ÜS vorsichtig in frische RG pipettiert. Die Mengenbestimmung von sezernierten IFN-γ im ÜS wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Zytokin-ELISAs (BD OptEIA, BD, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden dabei unverdünnt, bzw. bei Stimulation mit IL12 + IL18 in einer Verdünnung von 1:10 und 1:50 vermessen.

B.8.5.2 Stimulation mit NK-Zell-spezifischen Antikörpern

ELISA-Platten wurden mit den Antikörperverdünnungen in Coating-Puffer ÜN gecoatet und vor Versuchsbeginn 5x mit sterilem PBS gewaschen. In jedes Well der gecoateten ELISA-Platte wurden 1x10⁴ NK-Zellen pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation mit verschiedenen *Y. enterocolitica*-Stämmen wurde die Infektion mit Gentamicin gestoppt und der Ansatz weitere 3 Std. inkubiert. Die Zellen wurden bei 400 rcf, 4°C abzentrifugiert und der ÜS vorsichtig in frische RG pipettiert. Die Mengenbestimmung von sezernierten IFN-γ im ÜS wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Zytokin-ELISAs nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden dabei unverdünnt bzw. 1:10 verdünnt eingesetzt, um im linearen Meßbereich des ELISAS zu messen.

Tabelle B-14: Agonistische Antikörper für die Stimulation muriner NK-Zellen

Antikörper		Verdünnung	Beschreibung	
Aktivierende Antikörper				
Ly49D	BD, Heidelberg	1:50	Ratte, monoklonal, 4E5	

NKG2D	eBioscience, Frankfurt	1:50	Armenischer Hamster, monoklonal, A10	
Inhibierende Antikörper				
Ly49C/ I/ F/ H	eBioscience, Frankfurt	1:50	Syrischer Hamster, monoklonal, 14B11	
Ly49I	eBioscience, Frankfurt	1:50	Maus, monoklonal, YLI-90	

B.8.6 In vitro Stimulation der NK-Zellen mit aktivierenden und inhibierenden Antikörpern: Quantifizierung der IFN-γ Sekretion (ELISA)

Die Milzen wurden wie beschrieben den Versuchstieren entnommen und die NK-Zellen wie unter B.5.7 beschrieben aufgereinigt. Die NK-Zellen wurden nach 7tägiger Aktivierung mit IL2 in die Versuche eingesetzt.

ELISA-Platten wurden mit den Antikörperverdünnungen in Coating-Puffer ÜN gecoatet und vor Versuchsbeginn 5x mit sterilem PBS gewaschen. In jedes Well der gecoateten ELISA-Platte wurden 1x10⁴ NK-Zellen pipettiert. Nach drei Stunden Inkubation wurden die Zellen bei 400 rcf, 4°C abzentrifugiert und der ÜS vorsichtig in frische RG pipettiert. Die Mengenbestimmung von sezernierten IFN-γ im ÜS wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Zytokin-ELISAs nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden dabei unverdünnt bzw. 1:10 verdünnt vermessen.

B.8.7 JAM-Assay zur Ermittlung der spezifischen Zytotoxizität muriner NK-Zellen

Die Milzen wurden den Versuchstieren entnommen und die NK-Zellen wurden wie unter B.5.7 beschrieben aufgereinigt. $1\times10^4 ex vivo$ isolierte NK-Zellen wurden pro well in die Versuche eingesetzt. Die Yac-1 Target-Zellen wurden üN mit 1 µCi/ ml oder 2 µCi/ ml H³-Thymidin markiert, am nächsten Tag dreimal mit PBS gewaschen und mit einer Target : Effektor-Ratio von 2:1, 1:10 und 1:20 in die Experimente eingesetzt. Die Durchführung des Jam-Assays erfolgte wie unter (Matzinger, 1991) beschrieben.

C Ergebnisse

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten repräsentieren immer den Durchschnitt von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, im Fall von Western Blot Analysen oder Immunfluoreszenz Untersuchungen wurden jeweils die Ergebnisse eines Experimentes exemplarisch gezeigt.

C.1 Analyse der zellulären Immunantwort einer *Y. enterocolitica* Infektion

Nach der oralen Aufnahme gelangt *Y. enterocolitica* zunächst in den unteren Dünndarmabschnitt und besiedelt dort die PP. Von dort ist eine spätere Dissemination der Bakterien in Blutbahn, mesenteriale Lymphknoten, Leber und Milz möglich. Nach i.v. Infektion dagegen ist eine schnelle und effektive Besiedelung der Milz möglich. So kann die Wirkung der Yersinien auf die Struktur und zelluläre Zusammensetzung der Milz untersucht, sowie das zelluläre Infiltrat der Yersinien-Abszesse identifiziert werden. BALB/c und C57BL/6 Mäuse unterscheiden sich deutlich in ihrer Resistenz gegenüber Yersinien-Infektionen. Um zu ermitteln, ob diese unterschiedliche Suszeptibilität aufgrund von Unterschieden im Aufbau der peripheren lymphatischen Organen begründet liegt, wurden 4 – 6 Wochen alte Tiere i.v. mit einer an den jeweiligen Mausstamm adaptierten LD₅₀ des Yersinien-Wildtyp-Stammes WA(pYV) infiziert (Abschnitt B.7.2), die Bakterien wurden vor Infektion auf Virulenz geprüft. Die Milzen der infizierten Tiere wurden zu definierten Zeitpunkten nach Infektion entnommen und sowohl durchflusszytometrisch (Abschnitt B.8.2) als auch mittels Immunfluoreszenzfärbungen (Abschnitt B.7.5) analysiert.

C.1.1 Veränderungen der Milzstruktur während einer Yersinien-Infektion

C.1.1.1 Die Größe der Milz nimmt im Laufe der Infektion zu

Um zu ermitteln, ob die bakterielle Infektion der Mäuse zu einer Veränderung der Größe der Milz führt, wurden den Tieren die Milzen entnommen, an der Milz haftendes Fett- und Bindegewebe entfernt und die Organe auf einer Feinwaage gewogen.

Abbildung C-1 zeigt, dass sich im Verlauf der Yersinien-Infektion die Milz bei beiden Mausstämmen vergrößert. Bei den C57BL/6 Mäusen kommt es gegen Ende der akuten Infektion (Tag 5 - Tag 6) zu einer signifikanten Vergrößerung der Milz um das 6,7 bis 9,5-fache im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (Mock). Ab Tag 7 nimmt das Milz-Gewicht wieder ab. Auch bei den BALB/c Mäusen kommt es zu einer Vergrößerung der Milz, jedoch nicht so ausgeprägt wie bei den C57BL/6 Mäusen. So vergrößert sich die Milz an Tag 5 – Tag 6 nur um das 1,4 bis 1,8-fache im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle; an Tag 7 ist bei diesem Mausstamm keine Reduktion des Gewichtes nachweisbar.



C.1.1.2 Immunfluoreszenz-Analyse der Milzarchitektur während der Infektion

Um die zelluläre Immunantwort und Veränderungen in der Milzstruktur im Verlauf einer Yersinien-Infektion darzustellen, wurden Kryoschnitte von Milzen aus WA(pYV)-infizierten BALB/c und C57BL/6 Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten

nach Infektion angefertigt (Abschnitt B.7.4) und verschiedene Immunzellpopulationen mittels Immunfluoreszenzfärbungen sichtbar gemacht.

Die Übersichtsaufnahmen in Abbildung C-2 zeigen die Milzen von infizierten BALB/c und C57BL/6 Mäusen im Querschnitt, zu erkennen ist die Lokalisation von neutrophilen Granulozyten (blau) in der roten Pulpa, und in den Lymphfollikeln der weißen Pulpa sind die T-Zell- (rot) und B-Zell-Bereiche (grün) deutlich voneinander abgegrenzt. Die Yersinien-Abszesse wurden violett dargestellt.

Beide Mausstämme zeigen bereits an Tag 1 deutlich abgegrenzte, ausgeprägte Lymphfollikel und erste, kleinere Yersinien-Abszesse sind sichtbar. Um diese Abszesse herum und in den Randbereichen der weißen Pulpa sammeln sich neutrophile Granulozyten (Abbildung C-2, A + B und Abbildung C-3, A). Ab dem Zeitpunkt Tag 3 ist eine Zunahme der Abszesse sowohl in der Größe als auch in der Anzahl feststellbar, neutrophile Granulozyten sind sowohl um die Abszesse herum als auch in den Abszessen selbst anfärbbar. Auch finden sich vermehrt neutrophile Granulozyten in der roten Pulpa (Abbildung C-2, C + D). Ab Tag 4 (Daten nicht gezeigt) sind die Yersinien nur in den äußeren Bereichen dieser Abszesse detektierbar, die inneren Bereiche bestehen aus zerstörtem Gewebe und wenigen neutrophilen Granulozyten, dies zeigt sich auch an Tag 5 (Abbildung C-2, E + F und Abbildung C-3, F). Ab Tag 7 sind in den Milzen der C57BL/6 Mäuse keine Abszesse mehr sichtbar, die Struktur der Milz ähnelt der einer gesunden Milz, die Lymphfollikel sind noch deutlich ausgeprägt und es ist kein zerstörtes Gewebe zu erkennen (Abbildung C-2, H). Bei den BALB/c Mäusen finden sich an Tag 7 noch vereinzelt kleinere Abszesse, auch das Gewebe ist stellenweise noch zerstört (Abbildung C-2, G und Abbildung C-3, G).

Der auffälligste Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen ist die Lokalisation der Yersinien-Abszesse in der Milz. Während bei den C57BL/6 Mäusen die Abszesse zufällig verteilt scheinen, finden sich in den BALB/c Mäusen die Yersinien-Abszesse immer in unmittelbarer Nähe der Lymphfollikel, dabei hauptsächlich in den Bereichen der B-Zell-Areale. Dieser Effekt zeigt sich besonders deutlich an Tag 1 nach Infektion (Abbildung C-2, A und Abbildung C-3, A).



Angefärbt wurden B-Zellen (grün), T-Zellen (rot), Granulozyten (blau) und Yersinien (violett) in Milzquerschnitten aus infizierten BALB/c und C57BL/6 Mäusen. Gezeigt sind Übersichtsaufnahmen der Milzen von Tag 1, 3, 5 und 7 nach Infektion.

Die markierten Bereiche in den Aufnahmen A, F und G sind in Abbildung C-3 vergrößert dargestellt.



Gezeigt sind Vergrößerungen aus den Ubersichtsaufnahmen der immunfluoreszenzgefärbten Milzquerschnitte aus Abbildung C-2. Die Beschriftungen in den Immunfluoreszenzen entsprechen zur leichteren Identifikation der dazugehörigen Übersichtsaufnahme denen aus Abbildung C-2.

C.1.2 Zelluläre Zusammensetzung der Milz und Verteilung verschiedener Zellpopulationen während der Infektion

Wie unter Abschnitt C.1.1 gezeigt, verändert sich die Milz im Laufe der Infektion sowohl in Größe wie auch in ihrer Architektur. Mit den in diesem Abschnitt durchgeführten Experimenten soll untersucht werden, ob und wie sich die Anteile unterschiedlicher Immunzellpopulationen im Laufe der Infektion verändern. Dafür soll an definierten Zeitpunkten nach Infektion zum einen die Größe der jeweiligen Population mittels FACS-Analyse bestimmt werden, zum anderen soll durch Immunfluoreszenz-Einzelfärbungen die Lokalisation der entsprechenden Zellpopulation im Verhältnis zu den Yersinien-Abszessen in der Milz gezeigt werden.

C.1.2.1 Makrophagen verbleiben in der roten Pulpa

Makrophagen reifen aus zirkulierenden Monozyten heran, welche aus dem Blutkreislauf ins Gewebe eintreten. Bei Makrophagen handelt es sich somit um gewebsständige Zellen. In der Milz befinden sie sich in der roten Pulpa, dort phagozytieren sie gealterte Erythrozyten. Makrophagen erkennen und binden Pathogene mit Hilfe von Oberflächenrezeptoren und phagozytieren diese. Durch den Kontakt mit dem Pathogen werden Makrophagen aktiviert und sezernieren proinflammatorische Zytokine, welche wiederum neutrophile Granulozyten an den Infektionsherd rekrutieren. Makrophagen sind gemeinsam mit den neutrophilen Granulozyten wichtige Effektorzellen bei der Abwehr einer beginnenden Infektion. In einer weiteren Funktion präsentieren Makrophagen die phagozytierten Antigene auf MHC-Klasse II Molekülen und können so die adaptive Immunantwort aktivieren. Ob die unterschiedliche Empfindlichkeit von C57BL/6 und BALB/c Mäusen auch von unterschiedlichen Anteilen an Makrophagen in der Milz abhängt, soll durch die Bestimmung der Anteile von Makrophagen in der Milz im Verlauf einer Yersinien-Infektion mittels FACS-Analyse geklärt werden. Auch die Lokalisation der Makrophagen im Verhältnis zu den Yersinien-Abszessen soll mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen festgestellt werden.

Zu definierten Zeitpunkten nach Infektion wurden den Tieren die Milz entnommen, Milzzellsuspensionen angefertigt und diese mit a-Mac-3 - einem Marker spezifisch für Makrophagen - angefärbt. Die Größe der Makrophagen-Population wurde im FACS bestimmt. Abbildung C-4 zeigt den Anteil von Makrophagen an Milzzellen beider Mausstämme sowohl von nicht-infizierten Mäusen (Mock) als auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion. Bei beiden Mausstämmen verändert sich die Populationsgröße der Makrophagen im Laufe der Infektion nicht signifikant. In den Milzen der C57BL/6 Mäusen ist der Anteil der Makrophagen in der Milz mit 20 - 25% um 1,5 bis 2,5-fach größer als bei BALB/c-Mäusen (10 - 14%).



Abbildung C-4 Anteil von Makrophagen an Milzzellen während der Yersinien-Infektion

Milzzellen aus infizierten BALB/c und C57BL/6 Mäusen wurden mit a-Mac-3 gefärbt und die Größe der Makrophagen-Populationen im FACS bestimmt. Die Populationsgröße verändert sich nicht signifikant bei beiden Mausstämmen. In den Milzen der C57BL/6 Mäusen ist die Population der Makrophagen 1,5 bis 2,3-fach größer als bei BALB/c Mäusen.



Die Milzquerschnitte wurden mit a-F4/80 – einem Antikörper spezifisch für Makrophagen - und einem a-myf-Antikörper spezifisch für Yersinien angefärbt. Die Übersichtsaufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen zeigen die Lokalisation von Makrophagen (rot) und Yersinien-Abszessen (grün) an Tag 1, 3, 5 und 7 nach Infektion.

Die Übersichtsaufnahmen in Abbildung C-5 zeigen immunfluoreszenzgefärbte Milzen von infizierten BALB/c und C57BL/6 Mäusen im Querschnitt, zu erkennen ist die Lokalisation von Makrophagen (rot). Die Yersinien-Abzesse wurden grün dargestellt. Bereits an Tag 1 sind bei beiden Mausstämme erste Yersinien-Abzesse sichtbar, die Zahl und die Größe der Abszesse nimmt im Laufe der Infektion bis Tag 5 erst zu (Abbildung C-5, A - F), ab Tag 7 sind in den Milzen beider Mausstämme keine Abszesse mehr sichtbar (Abbildung C-5, G + H).

Über den gesamten Zeitverlauf der Infektion bleiben die Makrophagen beider Mausstämme unabhängig von der Lokalisation der Yersinien-Abszesse in der roten Pulpa lokalisiert. Nur wenige Makrophagen sind in den Abszessen detektierbar, nur etwa bei der Hälfte der Yersinien-Abszesse sind Makrophagen in den Randbereichen der Abszesse vorhanden. Diese Abszesse liegen in oder an der roten Pulpa. Bei Abszessen, welche sich ausschließlich im Bereich der Lymphollikel befinden, sind keine oder nur sehr wenige Makrophagen nachweisbar (Abbildung C-5, B + C, Pfeile).

C.1.2.2 Neutrophile Granulozyten werden zu den Abszessen in der Milz rekrutiert

Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten erfolgt innerhalb von Stunden nach der Infektion. Neutrophile Granulozyten wandern im Falle einer bakteriellen Infektion aus dem Blut zu dem entsprechenden Infektionsherd und phagozytieren die dort vorhandenen Erreger. Durch die schnelle Rekrutierung gehören sie gemeinsam mit den Makrophagen zu den ersten Zellen der angeborenen Immunantwort, die im Gewebe mit dem Pathogen in Kontakt kommen und stellen somit eine wichtige Komponente in der initialen Bekämpfung einer Infektion dar.

Abbildung C-6 zeigt, dass bei beiden Mausstämmen bereits zu frühen Zeitpunkten der Infektion der Anteil an neutrophilen Granulozyten in der Milz im Vergleich zur nicht-infizierten Maus (Mock) zunimmt. Während bei den C57BL/6 Mäusen zwischen Tag 1 und Tag 3 der Anteil an neutrophilen Granulozyten von 25% (Mock) um etwa das 1,5-fache auf ca. 37% ±14,5% zunimmt, steigt der Anteil an neutrophilen Granulozyten bei den BALB/c Mäusen im gleichen Zeitraum mit einer Zunahme von 17% ±3,4% auf 35% ±2% um etwa das Doppelte. Ab Tag 4 kommt es bei beiden Mausstämmen zu einer weiteren Zunahme an neutrophilen Granulozyten in der Milz. Bei C57BL/6 Mäusen ist an Tag 6 und Tag 7 mit einer 2,7-fachen Zunahme auf 67% ±7,2% neutrophile Granulozyten das Maximum erreicht, bei den BALB/c Mäusen

sind an Tag 6 mit 82% ±4% 4,8-fach mehr neutrophile Granulozyten in der Milz enthalten im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle.



Die Übersichtsaufnahmen in Abbildung C-7 zeigen immunfluoreszenzgefärbte Milzen von infizierten BALB/c und C57BL/6 Mäusen im Querschnitt, zu erkennen ist die Lokalisation von neutrophilen Granulozyten (rot). Die Yersinien-Abzesse wurden grün dargestellt.

Bereits an Tag 1 sammeln sich bei beiden Mausstämme um die Yersinien-Abzesse herum und in den Randbereichen der weißen Pulpa neutrophile Granulozyten (Abbildung C-7, A + B und Abbildung C-8, A). Ab Tag 3 sind neutrophile Granulozyten sowohl um die Abszesse herum als auch in den Abszessen selbst anfärbbar. Auch in den Randbereichen der weißen Pulpa sind vermehrt neutrophile Granulozyten nachweisbar (Abbildung C-7, C + D). An Tag 5 nach Infektion findet sich der Hauptteil der neutrophilen Granulozyten in und um die Yersinien-Abszesse, nur noch wenige Granulozyten sind in den Randbereichen der Lymphfollikel präsent (Abbildung C-7, F und Abbildung C-8, F). Ab Tag 7 sind in den Milzen der C57BL/6 Mäuse keine Abszesse mehr sichtbar, die neutrophilen Granulozyten verteilen sich gleichmäßig über die gesamte rote Pulpa. (Abbildung C-7, H und Abbildung C-8, H). Bei den BALB/c Mäusen finden sich an Tag 7 noch vereinzelt kleinere Abszesse, die neutrophilen Granulozyten sind weiterhin mit den Yersinien-Abszessen co-lokalisiert (Abbildung C-7, G).



Abbildung C-7

Lokalisation der neutrophilen Granulozyten im Verlauf einer *Y. enterocolitica*-Infektion in der Milz von BALB/c und C57BL/6 Mäusen mit Hilfe von Übersichtsaufnahmen immunfluoreszenzgefärbter Milzquerschnitte

Die Milzquerschnitte wurden mit a-Ly6G – einem Antikörper spezifisch für Granulozyten - und einem a-myf-Antikörper spezifisch für Yersinien angefärbt. Die Übersichtsaufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen zeigen die Co-Lokalisation von neutrophilen Granulozyten (rot) und Yersinien-Abszessen (grün) an Tag 1, 3, 5 und 7 nach Infektion.

Die markierten Bereiche in den Aufnahmen A, F und H sind in Abbildung C-8 vergrößert dargestellt.



Abbildung C-8 Vergrößerungen aus Abbildung C-7

Gezeigt sind Vergrößerungen aus den Übersichtsaufnahmen der immunfluoreszenzgefärbten Milzquerschnitte aus Abbildung C-7. Die Beschriftungen in den Immunfluoreszenzen entsprechen zur leichteren Identifikation der dazugehörigen Übersichtsaufnahme denen aus Abbildung C-7.

C.1.2.3 Dendritische Zellen wandern in die Milz ein

Unreife dendritische Zellen wandern aus dem Blut in die peripheren Gewebe ein und nehmen dort Antigene mittels Phagozytose auf. Nach Aufnahme von Antigenen wandern dendritische Zellen in die sekundären lympatischen Organe und präsentieren die Antigene auf MHC-Klasse II Molekülen den T-Zellen. Während dieser Vorgänge differenzieren dendritische Zellen aus. Aufgrund der Fähigkeit, Antigene zu phagozytieren und durch gezielte Präsentation eine spezifische Antwort der T-Zellen zu induzieren, stellen dendritsche Zellen ein wichtiges Bindeglied zwischen adaptiver und angeborener Immunantwort dar.

In Abbildung C-9 sind die Anteile der dendritischen Zellen in den Milzen beider Mausstämme sowohl von nicht-infizierten Mäusen (Mock) als auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion dargestellt. Bei beiden Mausstämmen sind in Milzen nicht-infizierter Mäuse nur sehr wenige dendritische Zellen nachweisbar, die Zahl an dendrischen Zellen nimmt im Laufe der Infektion bei BALB/c Mäusen von 1,3% \pm 0,4% um das 9,5-fache auf 9,3% \pm 1,8%, bei den C57BL/6 Mäusen von 0,4% \pm 0,1% um das 24,5-fache auf 9,8% \pm 2,3% zu.



Die Übersichtsaufnahmen in Abbildung C-10 zeigen immunfluoreszenzgefärbte Milzen von infizierten BALB/c und C57BL/6 Mäusen im Querschnitt, zu erkennen ist die Lokalisation von dendritischen Zellen (rot). Die Yersinien-Abzesse wurden grün dargestellt.

An Tag 1 sammeln sich dendritische Zellen hauptsächlich in den äußeren Randbereichen der weißen Pulpa (Abbildung C-10, A + B). Ab Tag 3 sind dendritische Zellen vermehrt in umittelbarer Nähe um die Abszesse herum und in den Randbereichen der weißen Pulpa anfärbbar. (Abbildung C-10, C - F). Ab Tag 7 sind in den Milzen keine Abszesse mehr sichtbar, die dendritischen Zellen verteilen sich über die gesamte rote Pulpa, wobei sie vermehrt in den Randbereichen zwischen roter und weißer Pulpa sammeln. (Abbildung C-10, G + H).



Die Milzquerschnitte wurden mit a-CD11c – einem Antikörper spezifisch für dendritische Zellen - und einem a-myf-Antikörper spezifisch für Yersinien angefärbt. Die Übersichtsaufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen zeigen die Lokalisation von dendritischen Zellen (rot) und Yersinien-Abszessen (grün) an Tag 1, 3, 5 und 7 nach Infektion.

68

C.1.2.4 Die Größe der T-Zell-Population nimmt nur bei C57BL/6 Mäusen ab

Zu den Zelltypen der adaptiven Immunantwort gehören die T-Zellen. Sie werden durch den Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen wie dendritische Zellen und Makrophagen aktiviert. Nach erfolgter Stimulation proliferieren die antigenspezifischen T-Zellen. Nach dieser klonalen Expansion sind T-Zellen in der Lage, Zytokine wie z.B. IFN-y zu sezernieren oder infizierte Zellen zu erkennen und zu lysieren. Im Mausinfektionsmodell konnte bisher gezeigt werden, dass zur vollständigen Beseitigung einer Yersinien-Infektion eine starke T-Zell-Antwort nötig ist.

In Abbildung C-11 ist der Anteil von T-Zellen in den Lymphozyten beider sowohl von nicht-infizierten Mäusen (Mock) als auch Mausstämme zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion dargestellt. Bei beiden Mausstämmen ist die Zahl an T-Zellen in der nicht-infizierten Maus gleich, sie liegt bei etwa 30% ±3,4% T-Zellen. Während bei den BALB/c Mäusen im Verlauf der Infektion die Zahl an T-Zellen unverändert bleibt, nimmt die T-Zell-Population bei den C57BL/6 Mäusen kontinuierlich ab. An Tag 5 nach Infektion sind bei den C57BL/6 Mäusen nur noch 14,5% ±5,1% T-Zellen nachweisbar, die Zahl der T-Zellen hat sich im Vergleich zur nichtinfizierten Maus halbiert. Ab Tag 7 nimmt die Zahl an T-Zellen wieder zu, mit 21,5% ±1,5% T-Zellen sind bereits 60% der Populationsgröße einer nicht-infizierten Maus erreicht. Das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Zellen bleibt bei beiden Mausstämmen im Verlauf der Infektion konstant bei 2:1 (Daten nicht gezeigt).



Abbildung C-11 Anteil von T-Zellen an Lymphozyten während der Yersinien-Infektion

Milzzellen aus infizierten BALB/c und C57BL/6 Mäusen wurden mit a-CD3 einem spezifischen Marker gegen T-Zellen - gefärbt und der Anteil von T-Zellen an Lymphozyten im FACS bestimmt. Im Laufe der Infektion bleibt der Anteil an T-Zellen bei BALB/c Mäusen nahezu konstant, bei C57BL/6 Mäusen ist Abnahme um bis zu eine 50% nachweisbar. * p < 0,05



Die Milzquerschnitte wurden mit a-CD3 – einem Antikörper spezifisch für T-Zellen - und einem a-myf-Antikörper spezifisch für Yersinien angefärbt. Die Übersichtsaufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen zeigen die Lokalisation von T-Zellen (rot) und Yersinien-Abszessen (grün) an Tag 1, 3, 5 und 7 nach Infektion. Die Übersichtsaufnahmen in Abbildung C-12 zeigen immunfluoreszenzgefärbte Milzen von infizierten BALB/c und C57BL/6 Mäusen im Querschnitt, zu erkennen ist die Lokalisation von T-Zellen (rot). Die Yersinien-Abzesse wurden grün dargestellt.

An Tag 1 sind bei beiden Mausstämmen die T-Zellen in deutlich abgegrenzten Bereichen der Lymphfollikel, der *periateriolar lymphoid sheath* Region (PALS), nachweisbar. Im Querschnitt sind zu diesem frühen Zeitpunkt der Infektion durchschnittlich 5 PALS sichtbar (Abbildung C-12, A + B). Im weiteren Verlauf der Infektion nimmt die Zahl an PALS zu, an Tag 3 sind durchschnittlich 8 - 10 anfärbbar, zusätzlich dazu sind vereinzelte T-Zellen in der roten Pulpa sichtbar. Die Größe der PALS dagegen nimmt ab (Abbildung C-12, C + D). Ab Tag 5 sinkt die Zahl an PALS wieder auf durchschnittlich 5, jedoch nimmt die Größe der PALS an diesem Zeitpunkt nicht zu und es sind weiterhin T-Zellen in der roten Pulpa nachweisbar (Abbildung C-12, E + F). An Tag 7 nach Infektion sind im Querschnitt durchschnittlich 5 PALS sichtbar, die PALS sind größer als zu Zeitpunkten der akuten Infektion und vereinzelte T-Zellen sind in der roten Pulpa anfärbbar (Abbildung C-12, G + H).

C.1.2.5 <u>In den Milzen der C57BL/6 Mäusen kann eine Co-Lokalisation von</u> <u>CD4+ T-Zellen und dendritischen Zellen beobachtet werden</u>

Für ein effektives Priming der T-Zellen ist der direkte Kontakt zu antigenpräsentierenden Zellen, insbesondere dendritischen Zellen, notwendig. Die Präsentation von Antigenen durch dendritische Zellen während einer Infektion findet in den PALS statt und induziert die adaptive Immunantwort, welche mit Proliferation und anschließender Zytokin-Produktion der T-Zellen verbunden ist.

Die Übersichtsaufnahmen in Abbildung C-12 zeigen immunfluoreszenzgefärbte Milzen von infizierten BALB/c und C57BL/6 Mäusen im Querschnitt an Tag 3 nach Infektion. Zu erkennen ist die Lokalisation von T-Zellen (grün) und dendritischen Zellen (rot). Die Yersinien-Abzesse wurden blau dargestellt.

Auffälligster Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen ist die deutlich ausgeprägte Co-Lokalisation von dendritischen Zellen und CD4+ T-Zellen im Bereich der T-Zell-Areale in den Milzen der C57BL/6 Mäuse. Dieser Effekt zeigt sich auch bei allen weiteren Zeitpunkten (Tag 1 – Tag 7, Daten nicht gezeigt). Bei BALB/c Mäusen kann zu keinem Zeitpunkt keine so offensichtliche Co-Lokalisation von CD4+ T-Zellen und dendritischen Zellen beobachtet werden.



C.1.2.6 Die Größe der B-Zell-Population nimmt nur bei BALB/c Mäusen ab

B-Zellen sind neben den T-Zellen der zweite Zelltyp der adaptiven Immunantwort. B-Zellen erkennen im Gegensatz zu den T-Zellen ihr spezifisches Antigen in frei vorliegender Form und binden dieses mit Hilfe des B-Zell-Rezeptors (BZR). B-Zellen können T-Zell-abhängig oder T-Zell-unabhängig aktiviert werden. Im ersten Fall ist neben der Bindung des Antigens eine zusätzliche Stimulation durch T-Zellen in Form von Zytokinen notwendig, im zweiten Fall reicht die Kreuzvernetzung des BZR durch das Antigen allein aus. Erkannt werden auf diese Weise hauptsächlich sich wiederholende Polysaccharidketten, wie sie beispielsweise an der Oberfläche von Bakterien vorkommen. Nach Aktivierung und Proliferation in den Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe sezernieren B-Zellen Antikörper und tragen so zur humoralen Immunantwort bei. In Abbildung C-14 sind die Anteile der B-Zellen in den Milzen beider Mausstämme sowohl von nicht-infizierten Mäusen (Mock) als auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion dargestellt. Bei beiden Mausstämmen ist die Zahl an B-Zellen in der nicht-infizierten Maus gleich, sie liegt bei etwa 25 - 30% B-Zellen. Während bei den BALB/c Mäusen im Verlauf der Infektion die Zahl an B-Zellen im Vergleich zur nicht-infizierten Maus um 30% sinkt (Tag 5, 17% ±6,7% B-Zellen bei BALB/c Mäusen), nimmt die B-Zell-Population bei den C57BL/6 Mäusen ab Tag 3 bis Tag 6 mit 39 – 49% um das 1,3 – 1,5-fache zu.



Die Übersichtsaufnahmen in Abbildung C-15 zeigen immunfluoreszenzgefärbte Milzen von infizierten BALB/c und C57BL/6 Mäusen im Querschnitt, zu erkennen ist die Lokalisation von B-Zellen (rot). Die Yersinien-Abzesse wurden grün dargestellt.

An Tag 1 nach Infektion sammeln sich bei beiden Mausstämmen die B-Zellen in deutlich abgegrenzten Bereichen der weißen Pulpa, den Keimzentren oder Follikeln. Im Querschnitt sind bei beiden Mausstämmen zu diesem frühen Zeitpunkt der Infektion durchschnittlich 12 Follikel sichtbar (Abbildung C-15, A + B). Im weiteren Verlauf der Infektion nimmt bei C57BL/6 Mäusen die Zahl der Keimzentren zu, ab Tag 3 bis Tag 7 sind durchschnittlich 20 Follikel anfärbbar (Abbildung C-15, D, F, H), bei den BALB/c Mäusen bleibt die Zahl an Follikeln unverändert (Abbildung C-15, C, E, G).



Die Milzquerschnitte wurden mit a-B220 – einem Antikörper spezifisch für B-Zellen - und einem a-myf-Antikörper spezifisch für Yersinien angefärbt. Die Übersichtsaufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen zeigen die Lokalisation von B-Zellen (rot) und Yersinien-Abszessen (grün) an Tag 1, 3, 5 und 7 nach Infektion.

74

Der auffälligste Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen ist die Lokalisation der Yersinien-Abszesse in der Milz. Während bei den C57BL/6 Mäusen die Abszesse zufällig verteilt scheinen, finden sich in den BALB/c Mäusen die Yersinien Abszesse immer in unmittelbarer Nähe der weißen Pulpa, dabei hauptsächlich in den Bereichen der B-Zell-Follikel. Dieser Effekt zeigt sich besonders deutlich an Tag 1 und Tag 3 nach Infektion (Abbildung C-15, A + C, Pfeile).

C.1.2.7 NK-Zellen stellen nur eine kleine Zellpopulation in der Milz dar

Durch Applikation von IFN-γ während früher Phasen einer Yersinien-Infektion kann die Resistenz von BALB/c Mäusen gesteigert werden. Dies führt zu der Annahme, dass gerade die Produktion von IFN-γ in der frühen Phase der bakteriellen Infektion über Empfindlichkeit und Resistenz entscheidet. Hauptproduzenten von IFN-γ während früher Infektionsphasen sind NK-Zellen, welche ohne vorhergehende Aktivierung reagieren können.

Die Lokalisation der NK-Zellen in der Milz konnte nicht untersucht werden, da kein immunfluoreszenztauglicher Antikörper kommerziell verfügbar war. Der Anteil der NK-Zellen in den Milzen wurde im FACS bestimmt. Abbildung C-16 zeigt die Größe der NK-Zell-Populationen beider Mausstämme sowohl von nicht-infizierten Mäusen (Mock) als auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion. Bei beiden Mausstämmen verändert sich die Populationsgröße der NK-Zellen im Laufe der Infektion nicht signifikant. In den Milzen der BALB/c Mäusen ist die NK-Zell-Population mit 3,1 – 5,2% etwa 2,5-fach größer als bei C57BL/6 Mäusen (1,3 – 2,5%).



Abbildung C-16 Anteil von NK-Zellen an Lymphozyten während der Yersinien-Infektion

Milzzellen aus infizierten BALB/c und C57BL/6 Mäusen wurden mit a-2B4 - einem spezifischen Marker gegen NK-Zellen gefärbt und die Anteile an NK-Zellen in der Milz im FACS bestimmt. Die Größe der Zellpopulation bleibt bei beiden Mausstämmen nahezu konstant, in den Milzen der BALB/c Mäuse sind 2,5-fach mehr NK-Zellen enthalten.

C.1.3 Zusammenfassung

Im Laufe der Yersinien-Infektion kommt es zu grundlegenden Veränderungen der und Zusammensetzung der der Milzarchitektur unterschiedlichen Immunzellpopulationen bei den beiden untersuchten Mausstämmen. Bereits makroskopisch ist die Zunahme des Milzvolumens deutlich zu erkennen, dabei unterscheiden sich beide Mausstämme in dem Ausmaß der Zunahme. Bei C57BL/6 kommt es gegen Ende der akuten Infektion zu einer signifikanten Vergrößerung der Milz, welche zu späteren Zeitpunkten wieder abschwillt, bei BALB/c dagegen steigt das Milzgewicht nur langsam (Abbildung C-1). Mikroskopisch fällt besonders die unterschiedliche Lokalisation der Yersinien-Abszesse bei den untersuchten Mausstämmen auf: während die Verteilung der Abszesse bei C57BL/6 zufällig scheint, ist bei den BALB/c ein Tropismus der Yersinien zu den Lymphfollikeln sichtbar (Abbildung C-2 + Abbildung C-15).

Auch die FACS-Analysen sowohl von Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems als auch der adaptiven Immunantwort ergeben Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen. Die Zahl an Makrophagen und auch an NK-Zellen verändert sich bei beiden Mausstämmen im Laufe der Infektion nicht, jedoch gibt es Unterschiede in der Größe der Zellpopulation zwischen den beiden Mausstämmen (Abbildung C-4 + Abbildung C-16). Die Zahl an neutrophlien Granulozyten und dendritischen Zellen nimmt bei beiden Mausstämmen vergleichbar zu (Abbildung C-6 + Abbildung C-9). Deutliche Unterschiede ergeben die Analysen der T- und B-Zell-Populationen: bei BALB/c bleibt die Zahl an T-Zellen gleich und bei C57BL/6 nimmt sie ab (Abbildung C-11), bei den B-Zellen nimmt die Population bei C57BL/6 zu, bei BALB/c dagegen ab (Abbildung C-14).

C.2 Isolation, Kultivierung und Charakterisierung von NK-Zellen aus BALB/c und C57BL/6 Mäusen

C.2.1 Anreicherung muriner NK-Zellen mittels MACS-Technologie und Kultivierung über 7 Tage

Die Tiere wurden wie unter B.7.2 beschrieben getötet und die Milzen steril entnommen. Nach Anreicherung der NK-Zellen (Abschnitt B.5.7), wurden diese mit verschiedenen Antikörpern gegen NK- und T-Zellen markiert, um den Reinheitsgrad der Zellen mittels FACS-Analyse (Abschnitt B.8.2) zu bestimmen.

Bereits im FSC-SSC-Blot zeigt sich, wie effektiv durch das MACS-Anreicherungs-Verfahren ungewünschte Zellpopulationen entfernt werden. Nach der Anreicherung sind bereits in der FSC-SSC-Blot-Darstellung (Abbildung C-17) fast nur noch Lymphozyten (rot umrandet) nachweisbar.



Während in den Milzen der BALB/c Mäuse zwischen 4,5 – 7% der Zellen 2B4+/ TZR⁻ sind, finden sich in den Milzen der C57BL/6 Mäuse nur 2,5 – 4,5% 2B4+/ TZR⁻ Zellen. In beiden Mausstämmen sind etwa 1/3 aller Milzzellen T-Zellen. Nach der Anreicherung enthält man bei BALB/c ~85% angereicherte NK-Zellen, bei C57BL/6

~65%. Die restlichen Zellen sind hauptsächlich neutrophile Granulozyten, es sind maximal 0,1 - 0,4% T-Zellen nachweisbar. Nach Stimulation für 7 Tage mit IL2 ist bei beiden Mausstämmen eine Reinheit von > 95% NK-Zellen nachweisbar (Abbildung C-18).



Da in den Milzen der BALB/c-Mäuse die NK-Zell-Population größer ist und demzufolge eine effektivere Anreicherung mit höheren Ausbeuten ermöglicht wurde, wurden für die Etablierung der folgenden Experimente hauptsächlich BALB/c NK-Zellen verwendet (Abschnitt C.3 + C.4).

C.2.2 Charakterisierung der Expression spezifischer NK-Zell-Marker während der Kultivierung über 7 Tage

Um einen geeigneten NK-Zell-Marker nach Isolation und Kultivierung zu ermitteln, wurden die Zellen während eines Zeitverlaufes auf die Expression unterschiedlicher NK-Zell-Marker analysiert. Getestet wurden zum einen der Pan-NK-Zell-Marker DX5, welcher sowohl auf BALB/c wie auch auf C57BL/6 NK-Zellen exprimiert wird und zum anderen der Oberflächenmarker CD244, von dem zwei unterschiedliche Alloantigene auf BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen exprimiert werden.



Die NK-Zellen wurden mit den entsprechenden Antikörpern markiert und im Durchflusszytometer analysiert. Während bei beiden Mausstämmen > 95% der Zellen 2B4 über den gesamten untersuchten Zeitraum exprimieren (Abbildung C-19, B), nimmt die Zahl an NK-Zellen, welche den NK-Zell-Marker DX5 an der Zelloberfläche präsentieren, ab Tag 6 dramatisch ab (20% ±4,7%) (Abbildung C-19, A). Aus diesem Grund wurde bei den nachfolgenden FACS-Analysen in Kultur genommener NK-Zellen 2B4 als NK-Zell-spezifischer Oberflächenmarker gewählt und die weiteren Auswertungen erfolgten ausschließlich auf 2B4+/ TZR- gegatete Zellpopulationen.

C.2.3 Zusammenfassung

NK-Zellen können mit Hilfe der MACS-Technologie fast ohne Verunreinigung in Form von T-Zellen (< 0,4%) aus murinen Milzen isoliert werden. Dabei handelt es sich um Zellsuspensionen mit 70 - 80% Reinheit, abhängig vom Mausstamm. Bei den anderen Zellen handelt es sich hauptsächlich um neutrophile Granulozyten. Nach Kultivierung für 7 Tage mit IL2 steigt die Reinheit der NK-Zell-Fraktion auf > 95% an (Abbildung C-18), die Zellen verändern sich morphologisch (rund zu Beginn der Kultivierung, elongiert nach 7 Tagen; Daten nicht gezeigt) und auch die Expression der Oberflächenmarker verändert sich. Die Expression des NK-Zell-Markers DX5 nimmt im Verlaufe der Kultivierung ab, während der Marker 2B4 unverändert auf den NK-Zellen exprimiert wird (Abbildung C-19).

C.3 Y. enterocolitica interagiert mit NK-Zellen

C.3.1 WA(pYV) bindet an die Zelloberfläche von murinen NK-Zellen

Hauptvoraussetzung für eine erfolgreiche Yersinien-Infektion ist die Bindung der Bakterien an die zu infizierenden Zielzellen. Um festzustellen, ob *Y. enterocolitica* überhaupt mit NK-Zellen interagiert, wurden Zytospin-Präparationen von *ex vivo* isolierten und anschließend infizierten NK-Zellen angefertigt (Abschnitt B.5.6 + B.5.9). Diese wurden anschließend mit einem Antikörper gegen das *Yersinia*-Myf-Protein gefärbt, die NK-Zellen wurden mit Dapi gegengefärbt (Schema B-1).



Abbildung C-20

Immunfluoreszenzaufnahme einer Yersinia-infizierten NK-Zelle

NK-Zellen wurden für eine Stunde mit dem Wildtyp-Stamm WA(pYV) infiziert. Nach Abtötung der Bakterien mit Gentamicin wurden Zytospin-Präparationen der infizierten NK-Zellen angefertigt und im Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Es sind deutlich fest an die NK-Zelle (blau) adhärierende Yersinien (grün) zu erkennen. In Abbildung C-20 sind an die NK-Zelle (blau) adhärierende Yersinien (grün) deutlich zu erkennen, Zytospin-Präparationen IL2 kultiverierter und anschliessend infizierter BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen erbrachten das gleiche Ergebnis (Daten nicht gezeigt). WA(pYV) ist in der Lage an *ex vivo* und IL2 kultivierte NK-Zellen beider Mausstämme zu adhärieren.

C.3.2 Die Bindung der Yersinien erfolgt über Interaktion des *Yersinia*-Invasins an die NK-Zellen

Zu einer weiteren Charakterisierung der Bindung zwischen *Y. enterocolitica* und NK-Zellen und zur Identifikation des verantwortlichen *Yersinia* Adhäsins (chromosonal codiertes Invasin oder plasmidcodiertes YadA) wurden *ex vivo* isolierte NK-Zellen bei zwei unterschiedlichen Temperaturen mit verschiedenen *Yersinia*-Mutanten infiziert. Die Expression des chromosomal codierten Invasins findet bereits bei 27°C statt, die Expression des plasmidcodierten YadA dagegen wird erst bei 37°C induziert. Nach Anfertigung von Zytospinpräparationen und anschließenden Färbungen (Abschnitt C.3.1) wurden diese im Fluoreszenzmikroskop aufgenommen und später statistisch ausgewertet.

In Abbildung C-21 A sind die Fluoreszenzaufnahmen der Zytospinpräparationen gezeigt und in Abbildung C-21 B ist die statistische Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen dargestellt. Nach Infektion mit dem plasmidfreien Stamm WAC und WA(pYV) adhärieren an 90 – 100% aller NK-Zellen bei beiden Temperaturen Bakterien (Abbildung C-21, A a – d, B). Deletion des *inv*-Gens in den beiden Yersinia-Stämmen WAC und WA(pYV) dagegen führt dazu, dass an 77 – 90% aller NK-Zellen bei beiden Temperaturen keine Yersinien binden (Abbildung C-21, A e – f, B). Deletion des *yadA*-Gens in WA(pYV) dagegen zeigt keinen Effekt auf die Bindungsfähigkeit der Yersinien, an ungefähr 90% aller NK-Zellen binden Yersinien (Abbildung C-21, A i + j, B). Zytospin-Präparationen IL2 kultivierter und anschliessend infizierter NK-Zellen mausstämmen zeigten sich keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Diese Daten zeigen, dass die Bindung der Yersinien an NK-Zellen maßgeblich über das *Yersinia* Adhäsin Invasin erfolgt.



Beide Darstellungen weisen darauf hin, dass durch Deletion von Invasin bei beiden Temperaturen unabhängig von der Expression von YadA nahezu keine Bindung der Yersinien an NK-Zellen erfolgt.

C.3.3 Zusammenfassung

Y. enterocolitica WA(pYV) ist in der Lage, an NK-Zellen zu adhärieren (Abbildung C-20). Dabei handelt es sich um eine Invasin-vermittelte Bindung an die Zelloberfläche der NK-Zellen. Das zweite bekannte Yersinia Adhäsin YadA spielt bei der Bindung der Bakterien an die NK-Zellen keine Rolle (Abbildung C-21).

C.4 *Y. enterocolitica* hemmt elementare Funktionen von NK-Zellen

Um festzustellen, ob *Y. enterocolitica* überhaupt NK-Zell-Funktionen beeinflusst und ob gegebenenfalls die *Yersinia* Effektor-Proteine dafür verantwortlich sind, wurden NK-Zellen mit zwei verschiedenen *Yersinia*-Stämmen infiziert. Dabei handelte es sich um den virulenten Stamm WA(pYV), Serotyp O:8 und als Kontrolle diente WA(pTTS, pP60), welcher anstelle von Yops eine inaktive Form der p60 Murein-Hydrolase von *Listeria monocytogenes* sekretiert. Beide Stämme wurden vor der Infektion auf Funktionalität geprüft.

NK-Zellen sind in der Lage, veränderte Zellen zu erkennen und diese innerhalb eines kurzen Zeitraumes abzutöten. Ein starkes aktivierendes Signal für NK-Zellen ist die Abwesenheit von MHC-Molekülen auf der Oberfläche der Zielzellen (siehe Abschnitt A.2.3.3). Die Yac-1 Zelllinie ist eine murine Lymphoma-Zelllinie, welche keine MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimiert und daher als Targetzelle für NK-Zellen eingesetzt werden kann. Eine weitere wichtige Funktion von NK-Zellen ist die nach Stimulation unmittelbar stattfindende Produktion proinflammatorischer Zytokine, insbesondere die Produktion von IFN-γ in der Frühphase bakterieller Infektionen. Inwieweit beide Funktionen durch Infektion der NK-Zellen mit WA(pYV) und WA(pTTS, pP60) beeinflusst werden, sollen die Experimente dieses Abschnittes klären.

C.4.1 Apoptoseverhalten von NK-Zellen nach Infektion mit Y. enterocolitica

Als erstes musste die Frage geklärt werden, ob durch die Infektion mit *Y. enterocolitica* Apoptose in NK-Zellen induziert wird. Dafür wurden IL2 kultivierte NK-Zellen mit den oben beschriebenen Yersinien-Stämmen infiziert. Die Färbung apoptotischer Zellen wurde wie unter Abschnitt B.8.4 beschrieben durchgeführt.



Abbildung C-22 Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils apoptotischer NK-Zellen nach Infektion mit Y. enterocolitica NK-Zellen wurden für eine Stunde mit den unterschiedlichen Yersinien-Stämmen mit einer MOI 50:1 infiziert und der Anteil apoptotischer Zellen nach einer weiteren Stunde bestimmt. Apoptotische Zellen finden sich innerhalb des Markers M1, die Prozentzahlen geben den

Bereits bei den nicht-infizierten NK-Zellen liegt der Anteil apoptotischer NK-Zellen bei 14,7%. Nach Infektion mit der Wildtyp-Yersinie WA(pYV) erhält man eine Apoptoserate von 24,4% ±0,4%, nach Infektion mit der avirulenten Kontrolle WA(pTTS, pP60) liegt die Apoptoserate bei 19,3% ±2,5% (Abbildung C-22). Dieser Unterschied zwischen den beiden Yersinien-Stämmen ist allerdings nicht statistisch signifikant.

Anteil der apoptotischen Zellen wieder.

C.4.2 Etablierung eines Nachweisverfahrens der zellvermittelten Zytotoxizität von NK-Zellen: der JAM-Assay

Um die zellvermittelte Zytotoxizität der *ex vivo* isolierten NK-Zellen zu testen, wurde der JAM-Assay (Abschnitt B.8.7) verwendet (Matzinger, 1991). Sowohl die optimale Target : Effektor-Ratio als auch die minimale Dosis H³-Thymidin wurde in diesem Experiment ermittelt. Dafür wurden die Target-Zelllinie YAC-1 mit 1 μ Ci/ ml und 2 μ Ci/ ml gelabelt und mit einer Ratio von 2:1, 1:10 und 1:20 mit den *ex vivo* isolierten NK-Zellen gemischt.

Bei einer Target : Effektor-Ratio von 2:1 liegt die spezifische Zytotoxizität bei etwa 20%, ein Veränderung der Ratio zugunsten der NK-Zellen erhöht die spezifische Zytotoxizität auf ~80% bei einer Ratio von 1:10 bzw. ~90% bei einer Ratio von 1:20. Die beiden eingesetzten Mengen an H³-Thymidin erweisen sich als gleichwertig (Abbildung C-23). Für die nachfolgende Analyse der Wirkung von Yersinien auf die zellvermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen (Abschnitt C.4.3) wurden als Versuchsbedingungen eine Ratio von 1:10 mit einer H³-Thymidin-Dosis von 1 µCi/ ml gewählt.



C.4.3 Abhängigkeit der Hemmung der Zytotoxizität von der multiplicity of infection (MOI)

Um zu klären, ob Yersinien die zellvermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen beeinflussen, wurden WA(pYV) infizierte NK-Zellen in die Experimente eingesetzt. Desweiteren wurden, um eine eventuelle Abhängigkeit der Hemmung der Zytotoxizität von der Bakterienzahl zu ermitteln, die NK-Zellen mit zwei unterschiedlichen Mengen an Yersinien infiziert.



Nach Infektion mit WA(pYV) und einer MOI von 50:1 sinkt die spezifische Zytotoxizität statitsch signifikant um 81% bei BALB/c NK-Zellen bzw. um 88% bei C57BL/6 NK-Zellen im Vergleich zur spezifischen Zytotoxizität der nicht-infizierten NK-Zellen (Mock) aus beiden Mausstämmen. Nach Infektion mit einer 10-fach geringeren Bakterienmenge, welche einer MOI von 5:1 entspricht, sinkt die spezifische Zytotxizität nur um 12% bei BALB/c NK-Zellen bzw. um 8% bei C57BL/6 NK-Zellen

(Abbildung C-24). Diese Daten zeigen, dass die zellvermittelte, spezifische Zytotoxizität von NK-Zellen beider Mausstämme nach Infektion mit WA(pYV) bei einer MOI von 50:1 signifikant inhibiert wird.

C.4.4 Quantifizierung der IFN-γ Produktion von NK-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation mit IL12 + IL18

Um festzustellen, zu welchem Zeitpunkt nach Stimulation mit IL12 + IL18 ausreichend nachweisbare Mengen an IFN-γ von NK-Zellen produziert und sezerniert werden, wurden Zellkultur-Überstände zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation geerntet und im ELISA analysiert (Abschnitt B.8.5.1). Dabei wurden BALB/c NK-Zellen eingesetzt, da diese geringere Mengen an IFN-γ produzieren als C57BL/6 NK-Zellen und so ein optimaler Zeitpunkt für NK-Zellen aus beiden Mausstämmen ermittelt werden kann.



Quantifizierung der INF-y Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stimulation mit IL12 + IL18 im ELISA

BALB/c NK-Zellen wurden mit IL12 + IL18 stimuliert, nach 1-, 2-, 3- und 4-stündiger Stimulation Überstände geerntet und im ELISA eingesetzt. Bereits nach dreistündiger Stimulation wurden detektierbare Mengen an IFN-γ in den Zellkultur-Überständen sowohl *ex vivo* isolierter (A) als auch für 7 Tage mit IL2 kultivierter NK-Zellen (B) nachgewiesen.

Bereits nach 3 Stunden Inkubation mit IL12 + IL18 sezernieren BALB/c NK-Zellen detektierbare Mengen an IFN-y. Dabei unterscheiden sich *ex vivo* isolierte NK-Zellen von IL2 kultivierten NK-Zellen in der Menge an sezernierten IFN-y um Faktor 10. *Ex vivo* isolierte BALB/c NK-Zellen produzieren ~100 pg/ ml IFN-y nach dreistündiger Stimulation mit IL12 + IL18, während in Kultur genommene NK-Zellen ~1000 pg/ ml IFN-y produzieren (Abbildung C-25). Für die nachfolgenden Experimente wurden - falls nicht anders angegeben – die NK-Zellen für 3 Stunden stimuliert.

C.4.5 Quantifizierung der IFN-γ produzierenden NK-Zellen und Abhängigkeit der Anzahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen von der *multiplicity of infection* (MOI)

Um zu klären, ob Yersinien die NK-Zell-abhängige Produktion von IFN-y nach Stimulation mit IL12 + IL18 beeinflussen, wurden infizierte BALB/c NK-Zellen in die Experimente eingesetzt. Desweiteren wurden, um eine eventuelle Abhängigkeit der Anzahl an IFN-y produzierenden NK-Zellen von der Bakterienzahl zu ermitteln, die NK-Zellen mit zwei unterschiedlichen Mengen an Yersinien infiziert, stimuliert und im FACS analysiert.



Nach dreistündiger Stimulation mit IL12 + IL18 produzieren etwa 45% der *ex vivo* isolierten NK-Zellen IFN-γ, bei den IL2 kultivierten NK-Zellen sind es etwa 80% aller NK-Zellen. Nach Infektion mit WA(pYV) und einer MOI von 50:1 sinkt die die Zahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen um 48% bei den *ex vivo* isolierten NK-Zellen bzw. um 30% bei den IL2 kultivierten NK-Zellen. Nach Infektion mit einer 10-fach geringeren Bakterienmenge, welche einer MOI von 5:1 entspricht, sinkt die Anzahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen um 16% bei den *ex vivo* isolierten NK-Zellen bzw. bleibt unverändert bei den IL2 kultivierten NK-Zellen im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (Abbildung C-26). Diese Daten zeigen, dass nach einer Yersinien-Infektion mit einer MOI von 50:1 die Zahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen abnimmt, dieser Effekt findet sich bei *ex vivo* isolierten wie auch bei IL2 kultivierten NK-Zellen. Für die nachfolgenden Experimente wurden die NK-Zellen mit einer MOI von 50:1 infiziert, um einen Effekt der Yersinien auf die NK-Zell-Funktionen eindeutig nachweisen zu können.

C.4.6 *Y. enterocolitica* WA(pYV) aber nicht *Y. enterocolitica* WA(pTTS, pP60) inhibiert die IFN-γ Produktion von NK-Zellen

Um den Effekt der Yersinien auf NK-Zellen genauer zu charakterisieren, wurden *ex vivo* isolierte und IL2 kultivierte NK-Zellen beider Mausstämme zum einen mit dem WA(pYV), zum anderen mit der avirulenten Kontrolle WA(pTTS, pP60) infiziert, mit IL12 + IL18 stimuliert und sowohl die Anzahl an IFN-y produzierenden NK-Zellen im FACS bestimmt als auch die sezernierten Mengen an IFN-y im ELISA quantifiziert.

Stimulation mit IL12 + IL18 für 3 Stunden resultiert bei beiden Mausstämmen in einer deutlich nachweisbaren IFN- γ Produktion. Dabei produzieren *ex vivo* isolierte C57BL/6 NK-Zellen mit 125,7 pg/ ml etwa doppelt soviel IFN- γ wie *ex vivo* isolierte BALB/c NK-Zellen (61 pg/ ml IFN- γ). Bei den IL2 kultivierten NK-Zellen ist der Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen geringer (C57BL/6: 1749 pg/ ml IFN- γ ; BALB/c: 1388 pg/ ml IFN- γ), jedoch mit ca. 25% Diskrepanz deutlich nachweisbar. Nach Infektion mit WA(pYV) wird die IFN- γ Produktion beider Mausstämme signifikant inhibiert, sowohl bei den *ex vivo* isolierten NK-Zellen (C57BL/6: 25 pg/ ml IFN- γ ; BALB/c: 31,5 pg/ ml IFN- γ) als auch bei den IL2 kultivierten NK-Zellen (C57BL/6: 407,5 pg/ ml IFN- γ ; BALB/c: 191,5 pg/ ml IFN- γ). Das Ausmaß der Hemmung liegt dabei im Vergleich zur jeweiligen nicht-infizierten Kontrolle (Mock) bei BALB/c NK-Zellen bei 49% ±4,5% (*ex vivo* isoliert) und 86% ±5,6% (IL2 kultiviert). bei C57BL/6 NK-Zellen bei 81% ±3,9% (*ex vivo* isoliert) und 77% ±6,3% (IL2 kultiviert). Infektion mit der pYV-Plasmid-freien Yersinie WA(pTTS, pP60) dagegen hat keinen signifikanten Einfluss auf die IFN- γ Produktion der NK-Zellen (Abbildung C-27 A + B).

Auch in der Anzahl der IFN-γ produzierenden Zellen unterscheiden sich *ex vivo* isolierte BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen: bei C57BL/6 NK-Zellen produzieren etwa 20% mehr Zellen IFN-γ nach dreistündiger Stimulation mit IL12 + IL18. Dieser Unterschied zwischen den Mausstämmen ist nach siebentägiger Kultivierung mit IL2 nicht mehr nachweisbar, bei beiden Mausstämmen produzieren unter diesen Bedingungen 92% aller NK-Zellen IFN-γ. Auch die Anzahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen wird durch Infektion mit WA(pYV) beeinflusst: die Zahl an *ex vivo* isolierten IFN-γ produzierenden NK-Zellen nimmt statistisch signifikant um 53% ±0,6% (BALB/c) bzw. 64% ±5,3% (C57BL/6) ab, bei IL2 kultivierten NK-Zellen werden 67% ±15,8%
(BALB/c) bzw. 70% ±7,8% (C57BL/6) der NK-Zellen an der IFN-γ Produktion durch die Yersinien-Infektion gehemmt. Der Stamm WA(pTTS, pP60) indes hat keinen Einfluss auf die Anzahl an IFN-γ produzierenden Zellen (Abbildung C-27 C + D). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die Inhibition der NK-Zellen demnach an die Translokation der Yop-Effektorproteine gekoppelt ist, die Gegenwart von Yersinien und die Ausbildung des TTSS ohne Translokation der Yops ist nicht ausreichend für eine Hemmung der NK-Zellen.



Abbildung C-27



Die IFN- γ Produktion nach IL12 + IL18 Stimulation wird durch Infektion mit WA(pYV) sowohl bei *ex vivo* isolierten (A) als auch bei IL2 kultivierten (B) NK-Zellen signifikant inhibiert. Auch die Zahl an IFN- γ produzierenden Zellen sinkt um einen statistisch signifikanten Wert bei *ex vivo* isolierten (C) und kultivierten (D) NK-Zellen durch die Infektion mit WA(pYV). Infektion mit der pYV-Plasmid-freien Yersinie WA(pTTS, pP60) dagegen hat keinen Effekt auf die Menge an nachweisbaren IFN- γ und auf die Anzahl an IFN- γ produzierenden NK-Zellen.

* p < 0,05

C.4.7 Zusammenfassung

NK-Zellen sind Effektor-Zellen, welche ohne vorhergehende Aktivierung in der Lage sind, Zielzellen zu erkennen und innerhalb eines kurzen Zeitraumes zu lysieren

(Abbildung C-23). Auch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, z.B. IFN-γ, lässt sich innerhalb weniger Stunden induzieren (Abbildung C-25). NK-Zellen werden aber nach Infektion mit WA(pYV) in ihren Effektor-Funktionen gehemmt. Voraussetzung für eine effektive Hemmung ist eine ausreichende MOI (Abbildung C-24 + Abbildung C-26) und die Translokation von Yops (Abbildung C-27). Infektion mit der Yop-freien Yersinie WA(pTTS, pP60) oder Infektion mit einer nur geringen Zahl an Yersinien pro NK-Zelle hemmt die NK-Zellen nur wenig.

C.5 Identifikation des für die NK-Zell-Hemmung verantwortlichen Yops

NK-Zellen werden durch die Translokation der Yersinia-Effektor-Proteine ins Zytosol gehemmt (Abschnitt C.4.6). Um das hauptverantwortliche Yop zu identifizieren, wurden NK-Zellen mit verschiedenen *Y. enterocolitica* Mutanten infiziert (Beschreibung der Yersinien-Stämme siehe Abschnitt B.2.1). Als Kontrollen wurden die unter Abschnitt C.4 beschriebenen *Yersinia*-Stämme WA(pYV) und WA(pTTS, pP60) verwendet. Bei den *Yersinia* Deletionsmutanten wurde ein einzelnes Yop-Gen ausgeschaltet, während die Monosekretionsmutanten nur ein einzelnes Yop sekretieren. Alle Stämme wurden vor Infektion auf Sekretion von Virulenzproteinen geprüft.

C.5.1 YopP ist hauptverantwortlich für die Hemmung der NK-Zellen nach Stimulation mit IL12 + IL18

C.5.1.1 Einfluß verschiedener Yops auf die Anzahl IFN-y produzierender NK-Zellen

Der Einfluss der sechs verschiedenen Yops auf die Anzahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen wurde mittels intrazellulärer Zytokin-Färbung (Abschnitt B.8.3) und anschließender FACS-Analyse bestimmt. Dafür wurden *ex vivo* isolierte und IL2 kultivierte BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen mit den unterschiedlichen Yersinien Deletions- und Monosekretionsmutanten infiziert, anschließend mit IL12 + IL18 stimuliert und die Zahl an IFN-γ produzierenden Zellen im FACS gemessen.



verschiedenen Yersinia-Stämmen Bestimmt wurde der Einfluss der unterschiedlichen Yops auf die Anzahl an IFN-γ produzierenden BALB/c und

Bestimmt wurde der Einfluss der unterschiedlichen Yops auf die Anzahl an IFN- γ produzierenden BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen. Infektion mit der YopP-Deletionsmutante führt zu keiner Abnahme der Zahl an IFN- γ produzierenden NK-Zellen, während die Translokation von YopP allein zu einer Verminderung der Anzahl an IFN- γ produzierenden NK-Zellen führt. Dieser YopP vermittelte Effekt findet sowohl bei *ex vivo* isolierten (A) als auch bei IL2 kultivierten (B) NK-Zellen beider Mausstämme statt. * p < 0,05

Bei den *ex vivo* isolierten BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen nimmt die Zahl an IFN-γ produzierenden Zellen nach Infektion mit YopT, YopE, YopM, YopO und YopH Deletionsmutanten um 33 – 73% ab. Infektion mit WA(pYV, ΔYopP) dagegen beeinflusst die Anzahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen nicht. Umgekehrt verhält es sich nach Infektion mit den Monosekretionsmutanten: die alleinige Translokation von YopT, YopE, YopM, YopO und YopH hat keinen Einfluss auf die Zahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen, Translokation von YopP allein hingegen führt zu einer Abnahme (BALB/c: 36%; C57BL/6: 61% ±10%) an IFN-γ produzierenden NK-Zellen (Abbildung C-28, A).

Bei den IL2 kultivierten BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen nimmt die Zahl an IFN-γ produzierenden Zellen nach Infektion mit den YopM und YopO Deletionsmutanten um 54 – 90% ab. Nach Infektion mit den YopT, YopE und YopH Deletionsmutanten reduziert sich die Zahl um 12 - 35%. Infektion mit WA(pYV, ΔYopP) dagegen beeinflusst die Anzahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen nicht. Auch bei den IL2 kultivierten NK-Zellen hat die alleinige Translokation von YopT, YopE, YopM, YopO und YopH keinen Einfluss auf die Zahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen, Translokation von YopP indes führt zu einer signifikanten Abnahme (BALB/c: 37% ±7%; C57BL/6: 79% ±8,7%) an IFN-γ produzierenden NK-Zellen (Abbildung C-28, B).

Diese Daten zeigen, dass YopP also bei beiden Mausstämmen und bei sowohl *ex vivo* als auch IL2 kultivierten NK-Zellen hauptverantwortlich für die verringerte Anzahl an IFN-y produzierenden NK-Zellen nach Stimulation mit IL12 + IL18 zu sein scheint.

C.5.1.2 Einfluss verschiedener Yops auf die Menge an sezernierten IFN-y

Der Einfluss der sechs verschiedenen Yops auf die Menge an sezernierten IFN-y im Zellkultur-Überstand wurde mittels ELISA (Abschnitt B.8.5.1) bestimmt. Nach Infektion der NK-Zellen und anschließender Stimulation mit IL12 + IL18 wurde die Menge an sezerniertem IFN-y im Zellkultur-Überstand mittels eines kommerziell erhältlichen Zytokin-ELISA gemessen und in Abbildung C-29 graphisch dargestellt.

Sowohl in *ex vivo* wie auch in IL2 kultivierten NK-Zellen beider Mausstämme führt die Infektion mit YopT, YopE, YopM, YopO und YopH Deletionsmutanten zu einer Suppression der IFN-γ Produktion (38 - 94%) ähnlich wie nach Infektion mit WA(pYV). Infektion mit WA(pYV, ΔYopP) hingegen supprimiert nicht die IL12 + IL18 induzierte IFN-γ Expression. Ein komplementäres Bild zeigt sich nach Infektion mit verschiedenen Monosekretionsmutanten.



Quantifizierung der IFN-y Produktion mittels ELISA nach Infektion mit verschiedenen *Yersinia*-Stämmen zur Identifikation des für die Hemmung der IFN-y Produktion verantwortlichen Yops

BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen wurden mit verschieden Yersinien-Mutanten infiziert, anschließend mit IL12 + IL18 stimuliert und die Menge an sezernierten IFN- γ im ELISA quantifiziert. Infektion mit der YopP-Deletionsmutante führt zu keiner Hemmung der IFN- γ Produktion, während die Translokation von YopP allein zu einer Hemmung der IFN- γ Produktion führt. Dieser YopP vermittelte Effekt findet sowohl bei *ex vivo* isolierten NK-Zellen (A) statt, als auch bei IL2 kultivierten NK-Zellen (B) beider Mausstämme. * p < 0,05

Durch Translokation von YopT, YopE, YopM, YopO und YopH wird die Menge an sezernierten IFN-y im Vergleich zu den nicht-infizierten NK-Zellen nicht supprimiert. Die Translokation von YopP jedoch führt zu einer statistisch signifikanten Abnahme (35 - 79%) an sezernierten IFN-y.

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass YopP bei beiden Mausstämmen und beiden Bedingungen hauptverantwortlich für die verminderte Menge an sezernierten IFN-y nach Stimulation mit IL12 + IL18 zu sein scheint.

C.5.2 Die YopP vermittelte Hemmung der IFN-γ Induktion ist nicht spezifisch für IL12 + IL18

In den vorhergehenden Abschnitten konnte gezeigt werden, dass durch YopP die IL12 + IL18 induzierte IFN-γ Produktion von NK-Zellen gehemmt wird. Durch die gemeinsame Stimulation mit IL12 + IL18 werden die Signaltransduktionskaskaden der MAPK-Kinasen und Signaltransduktion über den Jak-STAT-Pathway aktiviert. Ob der YopP-vermittelte Hemmeffekt auch bei anderen Stimulatoren und infolgedessen auch anderen Signaltransduktionskaskaden eintritt, soll mit den nachfolgenden Experimenten geklärt werden.

C.5.2.1 YopP hemmt die IFN-y Induktion nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin

Durch die kombinierte Gabe von PMA/ Ionomycin können NK-Zellen unabhängig von stimulierenden Oberflächenrezeptoren aktiviert werden. Ionomycin wirkt als Ca²⁺-Ionophor und sorgt zum einen für einen Kalzium-Einstrom in die Zellen, zum anderen schleust es PMA, einen Aktivator der Proteinkinase C (PKC), ins Zellinnere. Durch die Stimulation mit PMA/ Ionomycin werden bei Lymphozyten PKCund Kalzium-Signalwege aktiviert. Mit Hilfe dieser Rezeptor-unabhängigen Stimulation können Lymphozyten angeregt werden, Zytokine, insbesonders IFN-y, zu produzieren.

Ex vivo isolierte und IL2 kultivierte NK-Zellen wurden mit verschiedenen Yersinien-Stämmen infiziert und anschließend mit PMA/ Ionomycin stimuliert. Die Anzahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen wurde im FACS bestimmt (Abbildung C-30).

In Abbildung C-30 ist die Wirkung der der unterschiedlichen Yersinien-Stämme auf die Zahl der IFN-γ produzierenden NK-Zellen nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin gezeigt. Bei den *ex vivo* isolierten NK-Zellen beider Mausstämme ist mit 60% ±8% die Zahl an IFN-γ produzierenden Zellen nach der Stimulation gleich. Nach

Infektion mit WA(pYV) nimmt die Zahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen um 63 - 83% statistisch signifikant ab, während Infektion mit der Yop-freien Kontrolle WA(pTTS, pP60) die Zahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen nur gering beeinflusst. Durch die Deletion des Effektor-Proteins YopP kann dieser Hemmeffekt deutlich abgeschwächt werden, umgekehrt führt die alleinige Tranlokation von YopP zu einer statistisch signifanten Abnahme an IFN-γ produzierenden NK-Zellen von 57 - 70% ähnlich wie nach Infektion mit WA(pYV) (Abbildung C-30, A).



Ex vivo isolierte (A) und IL2 stimulierte (B) NK-Zellen aus BALB/c und C57BL/6 Mäusen wurden mit unterschiedlichen Yersinien-Stämmen infiziert und anschließend mit PMA/ Ionomycin stimuliert. Die Anzahl an IFN-y produzierenden Zellen wurde mittels intrazellulärer Zytokin-Färbung und FACS-Analyse bestimmt. Infektion mit der YopP-Deletionsmutante führt zu keiner Abnahme der Zahl an IFN-y produzierenden NK-Zellen, während die Translokation von YopP allein zu einer Verminderung der Anzahl an IFN-y produzierenden NK-Zellen führt. * p < 0,05

Bei den IL2 kultivierten BALB/c NK-Zellen ist mit 75% \pm 10,7% die Zahl an IFN- γ produzierenden Zellen nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin fast doppelt so hoch wie bei C57BL/6 NK-Zellen (40% \pm 7,6%). Auch bei den IL2 kultivierten NK-Zellen kann durch die Infektion mit WA(pYV) die Zahl an IFN- γ produzierenden NK-Zellen um 22,5 - 33% reduziert werden. YopP-Deletions-Mutanten haben keinen Einfluss auf die Anzahl an

IFN-γ produzierenden NK-Zellen, im Gegensatz dazu führt die Translokation von YopP zu einer Abnahme an IFN-γ produzierenden NK-Zellen um 45 - 50% (Abbildung C-30, B). Für die anderen Yops konnte kein signifikanter Einfluss auf die Zahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Menge an sezernierten IFN-y nach PMA/ Ionomycin-Stimulation wurde im ELISA bestimmt. In Abbildung C-31 ist die Wirkung der unterschiedlichen Yersinien-Mutanten auf die Menge von sezernierten IFN-y im Zellkultur-Überstand von sowohl *ex vivo* isolierten als auch IL2 kultivierten NK-Zellen beider Mausstämme dargestellt. *Ex vivo* isolierte und IL2 kultivierte C57BL/6 und BALB/c NK-Zellen sezernieren nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin IFN-y, wobei die Menge an sezernierten IFN-y bei *ex vivo* isolierten C57BL/6 NK-Zellen mit durchschnittlich 22 pg/ ml etwa doppelt so hoch ist wie bei BALB/c NK-Zellen (Abbildung C-31, A). Umgekehrt verhält es sich bei IL-2 kultivierten NK-Zellen: NK-Zellen beider Mausstämme sezernieren mehr IFN-y als *ex vivo* isolierte NK-Zellen, dabei sezernieren BALB/c NK-Zellen mit 100 pg/ ml IFN-y doppelt soviel IFN-y wie C57BL/6 NK-Zellen (Abbildung C-31, B).

Nach Infektion mit WA(pYV) nimmt die Menge an sezernierten IFN-γ bei *ex vivo* isolierten und IL2 kultivierten NK-Zellen beider Mausstämmen um 27 - 56% statistisch signifikant ab, während Infektion mit der Yop-freien Kontrolle WA(pTTS, pP60) die Menge an sezernierten IFNγ nicht beeinflusst. Infektion mit YopT, YopE, YopM, YopO und YopH Deletionsmutanten führt bei *ex vivo* isolierten C57BL/6 und BALB/c NK-Zellen zu einer Suppression der IFN-γ Produktion ähnlich wie nach Infektion mit WA(pYV). Infektion mit WA(pYV, ΔYopP) hingegen supprimiert nicht die PMA/ Ionomycin induzierte IFN-γ Expression. Umgekehrt verhält es sich nach Infektion mit den Monosekretionsmutanten: die alleinige Translokation von YopT, YopE, YopM, YopO und YopH hat keinen Einfluss auf die Menge an sezernierten IFN-γ. Translokation von YopP allein hingegen führt zu einer Suppression der IFN-γ Expression um 30 - 51%.

Diese Daten belegen, dass YopP bei beiden Mausstämmen und sowohl bei *ex vivo* isolierten als auch bei IL2 kultivierten NK-Zellen hauptverantwortlich für die verminderte Menge an sezernierten IFN-y nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin zu sein scheint.



Abbildung C-31

Quantifizierung der IFN-y Produktion nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin mit verschiedenen Yersinien-Stämmen

BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen wurden mit unterschiedlichen Yersinien-Mutanten infiziert und anschließend mit PMA/ Ionomycin stimuliert. Die Menge an sezernierten IFN- γ wurde im ELISA quantifiziert. Infektion mit der YopP-Deletionsmutante führt zu keiner Hemmung der IFN- γ Produktion, während die Translokation von YopP allein zu einer Hemmung der IFN- γ Produktion führt. Dieser YopP vermittelte Effekt findet sowohl bei *ex vivo* isolierten NK-Zellen (A) statt, als auch bei IL2 kultivierten NK-Zellen (B) beider Mausstämme. * p < 0,05

Ergebnisse

C.5.2.2 <u>YopP hemmt die IFN-y Produktion nach Ligation aktivierender NK-Zell-</u> <u>Rezeptoren</u>

Es sind zahlreiche aktivierende Rezeptoren und die entsprechenden Liganden muriner NK-Zellen bekannt, deren Stimulation zur IFN-y Produktion führt. Um die hemmende Wirkung von YopP zu untersuchen, wurden exemplarisch die Rezeptoren NKG2D und Ly49D gewählt, da sowohl die Rezeptoren als auch die von ihnen vermittelten Signaltransduktionskaskaden gut beschrieben sind. Durch das Beschichten von 96-well Platten mit entsprechenden agonistischen Antikörpern wird eine rezeptorspezifische Stimulation der NK-Zellen leicht ermöglicht (Abschnitt B.8.5.2 und Abschnitt B.8.6). Beide Rezeptoren bilden Heterodimere mit Adaptorproteinen, welche ITAMS enthalten. So kann neben der IL12 + IL18 vermittelten, ITAMunabhängigen Aktivierung der NK-Zellen auch die ITAM-abhänigige Aktivierung und eine mögliche Beeinflussung durch *Y. enterocolitica* untersucht werden.

IL2 kultivierte NK-Zellen wurden in die mit aktivierenden Antikörpern beschichteten 96-well Platten eingesetzt und mit den verschiedenen Yersinien-Stämmen infiziert. Die Menge an sezerniertem IFN-γ wurde anschließend im ELISA bestimmt.



IL2 stimulierre BALB/c und C5/BL/6 NK-zeilen wurden mit verschiedenen Yersinien-Stammen infiziert und gleichzeitig mit aktivierenden Antikörpern gegen Ly49D (A) oder NKG2D (B) stimuliert. Infektion mit der vollvirulenten Wildtyp-Yersinie WA(pYV) hemmt die IFN-γ Produktion, durch die Deletion von YopP kann dieser Hemmeffekt abgeschwächt werden. * p < 0,05

Nach Stimulation des Ly49D-Rezeptors produzieren NK-Zellen beider Mausstämmen IFN- γ , wobei C57BL/6 NK-Zellen die 10-fache Menge sezernieren im Vergleich zu BALB/c NK-Zellen (Abbildung C-32, A). Infektion mit WA(pYV) führt bei beiden Mausstämmen zu einer statistisch signifikanten Abnahme an sezerniertem IFN- γ , das Ausmaß der Hemmung ist dabei bei den beiden Mausstämmen unterschiedlich. Bei C57BL/6 NK-Zellen nimmt im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle die Menge an sezernierten IFN- γ nach Infektion mit WA(pYV) um 32% ±6,3% ab, bei BALB/c NK-Zellen dagegen um 75% ±2,2%. Durch Deletion von YopP kann dieser Hemmeffekt bei BALB/c NK-Zellen um 50% ±2,6% und bei C57BL/6 NK-Zellen um 25,2% ±2,6% aufgehoben werden.

Nach Stimulation des NKG2D-Rezeptors produzieren NK-Zellen beider Mausstämmen IFN-y, wobei C57BL/6 NK-Zellen durchschnittlich die 2,6-fache Menge an IFN-y im Vergleich zu BALB/c NK-Zellen sezernieren (Abbildung C-32, B). Infektion mit der WA(pYV) führt bei beiden Mausstämmen zu einer statistisch signifikanten Abnahme an sezerniertem IFN-y um 69% ±11% im Vergleich zur nicht-infizieren Kontrolle. Durch Deletion von YopP kann auch dieser Hemmeffekt bei BALB/c NK-Zellen um 34,4% ±8% und bei C57BL/6 NK-Zellen um 48,3% ±2,5% aufgehoben werden.

Diese Daten zeigen, dass auch nach Ligation aktivierender Rezeptoren die IFN-y Produktion in NK-Zellen induziert wird und YopP mitverantwortlich bei der Suppression der IFN-y Expression ist.

C.5.2.3 YopP hemmt die IFN-y Expression nach Stimulation mit IL12

Auch durch die alleinige Gabe von IL12 kann die Produktion von IFN-γ induziert werden. Diese Stimulation ist nicht so effektiv wie die Stimulation mit IL12 + IL18, da durch die alleinige Stimulation mit IL12 nur die Jak-STAT-Kaskade und p38 aktiviert werden. Jedoch können so erste Hinweise darauf gesammelt werden, ob die Yersinien-vermittelte Hemmung - insbesondere der YopP-vermittelte Effekt auch die Jak-STAT-Signaltransduktionskaskade betrifft.

Ex vivo isolierte und IL2 kultivierte NK-Zellen wurden mit verschiedenen Yersinien-Stämmen infiziert und anschließend mit IL12 stimuliert. Die Anzahl an IFN-y produzierenden NK-Zellen wurde im FACS bestimmt (Abbildung C-33).



In Abbildung C-33 A ist die Anzahl an *ex vivo* isolierten IFN-γ produzierenden NK-Zellen nach Stimulation mit IL12 dargestellt, wobei mit 7,7% ±2% fast doppelt soviele BALB/c NK-Zellen IFN-γ produzieren wie bei C57BL/6 NK-Zellen (4,3% ±2,5%). Nach Infektion mit WA(pYV) nimmt die Zahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen um 14 - 37% ab, während Infektion mit der Yop-freien Kontrolle WA(pTTS, pP60) die Zahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen NK-Zellen nicht beeinflusst. Durch die Deletion des Effektor-Proteins YopP kann dieser Hemmeffekt komplett aufgehoben werden, umgekehrt führt die Tranlokation von YopP alleine zu einer Abnahme an IFN-γ produzierenden NK-Zellen, ähnlich wie nach Infektion mit WA(pYV).

Bei den IL2 kultivierten NK-Zellen produzieren mit 20% 6-mal mehr BALB/c NK-Zellen IFN-y wie bei C57BL/6 NK-Zellen (3,2%). Durch Infektion mit WA(pYV) wird die Zahl an IFN-y produzierenden NK-Zellen bei beiden Mausstämmen um 28 - 66% reduziert, Infektion mit WA(pTTS, pP60) beeinflusst die Zahl an IFN-y produzierenden NK-Zellen nur gering. YopP-Deletionsmutanten haben keinen Einfluss auf die Anzahl an IFN-y produzierenden NK-Zellen, umgekehrt führt die Translokation von YopP zu einer Abnahme an IFN-y produzierenden NK-Zellen, vergleichbar mit der Hemmung nach Infektion mit WA(pYV) (Abbildung C-33, B).



BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen wurden mit unterschiedlichen Yersinien-Mutanten infiziert und anschließend mit IL12 stimuliert. Die Menge an sezernierten IFN- γ wurde im ELISA quantifiziert. Infektion mit der YopP-Deletionsmutante führt zu keiner Hemmung der IFN- γ Produktion, während die Translokation von YopP allein zu einer Hemmung der IFN- γ Produktion führt. Dieser YopP vermittelte Effekt findet sowohl bei *ex vivo* isolierten NK-Zellen (A) statt, als auch bei IL2 kultivierten NK-Zellen (B) beider Mausstämme. * p < 0,05

Ergebnisse

Diese Daten zeigen, dass auch nach alleiniger Stimulation mit IL12 YopP hauptverantwortlich für die verringerte Anzahl an IFN-y produzierenden NK-Zellen zu sein scheint.

Die Menge an sezernierten IFN-y nach IL12 Stimulation wurde im ELISA bestimmt und in Abbildung C-34 graphisch dargestellt. *Ex vivo* isolierte C57BL/6 und BALB/c NK-Zellen sezernieren nach Stimulation mit IL12 nur geringe Mengen an IFN-y, wobei die Menge an sezernierten IFN-y bei C57BL/6 NK-Zellen mit durchschnittlich 3,6 pg/ml um das 2,2-fache größer ist als bei BALB/c NK-Zellen (Abbildung C-34, A). Bei IL-2 kultivierten NK-Zellen beider Mausstämme steigt die Menge an sezernierten IFN-y auf 19 - 25 pg/ml (Abbildung C-34, B).

Nach Infektion mit WA(pYV) nimmt die Menge an sezernierten IFN-γ sowohl bei *ex vivo* isolierten (BALB/c: 31,3% ±16%; C57BL/6: 39,6% ±1,6%) als auch IL2 kultivierten (BALB/c: 20,2% ±2,7%; C57BL/6: 27,5% ±6,4%) NK-Zellen ab, während Infektion mit WA(pTTS, pP60) die Menge an sezernierten IFN-γ nicht beeinflusst. Infektion mit YopT, YopE, YopM, YopO und YopH Deletionsmutanten führt bei C57BL/6 und BALB/c NK-Zellen zu einer Suppression der IFN-γ Produktion ähnlich wie nach Infektion mit WA(pYV). Infektion mit WA(pYV, ΔYopP) hingegen supprimiert nicht die IL12 induzierte IFN-γ Expression. Ein komplementäres Bild zeigt sich nach Infektion mit den Monosekretionsmutanten: die alleinige Translokation von YopT, YopE, YopM, YopO und YopH hat keinen hemmenden Einfluss auf die Menge an sezernierten IFN-γ. Translokation von YopP allein hingegen führt zu einer Suppression der IFN-γ Expression ähnlich wie nach Infektion mit WA(pYV).

YopP scheint also auch nach Stimulation mit IL12 alleine bei beiden Mausstämmen und beiden Bedingungen mitverantwortlich für die verminderte Menge an sezernierten IFN-y zu sein.

C.5.3 Der YopP Hemmeffekt findet bereits auf mRNA Ebene statt

Um festzustellen, ob der Effekt von YopP auf Transkriptionsebene nachweisbar ist, wurden Real time RT PCR Analysen durchgeführt (Abschnitt B.3.9). IL2 kultivierte NK-Zellen wurden mit verschiedenen Yersinien-Stämmen infiziert und mit IL12 + IL18 und IL12 allein stimuliert. Nach drei Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert (Abschnitt B.3.4). Nach Umschreiben in cDNA (Abschnitt B.3.8) wurde diese in die TaqMan-Analyse eingesetzt und nach der $2^{A_{ct}}$ Methode ausgewertet.

Abbildung C-35 A zeigt die IFN-γ mRNA-Expression relativ zur konstanten Expression des Kontrollgens HPRT nach Stimulation mit IL12 + IL18. Infektion mit WA(pYV) verhindert die IFN-γ Geninduktion um 67% in BALB/c NK-Zellen und um 63% in C57BL/6 NK-Zellen. Deletion von YopM verstärkt diese Suppression um weitere 10-20%, während Deletion von YopH zu vergleichbaren Genexpressionswerten ähnlich wie nach Infektion mit WA(pYV) führt. Durch Deletion von YopP dagegen kann die Hemmung der Geninduktion aufgehoben werden. Abbildung C-35 B zeigt die IFN-γ mRNA-Expression relativ zur konstanten Expression des Kontrollgens HPRT nach Stimulation mit IL12.

Auch bei diesem Stimulus ist die IFN-γ Geninduktion nach Infektion mit WA(pYV) verringert (41% in BALB/c NK-Zellen; 90% in C57BL/6 NK-Zellen). Deletion von YopM verstärkt diese Suppression, während Deletion von YopH zu vergleichbaren Genexpressionswerten ähnlich WA(pYV) führen. Durch Deletion von YopP dagegen kann wiederum die Hemmung der Geninduktion aufgehoben werden.



anschließend mit IL12 + IL18 (A) und IL12 allein (B) stimuliert. Nach 3 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert in cDNA umgeschrieben und die Expressionshöhe der IFN-y mRNA relativ zur Expressionshöhe von HPRT in der TagMan-Analyse bestimmt. Infektion mit der voll-virulenten Wildtyp-Yersinie WA(pYV) hemmt die IFN-y mRNA-Expression, durch die Deletion von YopP kann dieser Hemmeffekt aufgehoben werden. * p < 0.05

Somit kann davon ausgegangen werden, dass der YopP-vermittelte Effekt auf die NK-Zellen beider Mausstämme bereits die Transkription von IFN-y beeinflusst. Dies läßt die Hypothese zu, dass YopP mit Komponenten der IL12 + IL18 Signaltransduktionskaskaden interagiert.

C.5.4 YopP hemmt IL12 und IL18 vermittelte Signaltransdutionskaskaden durch Hemmung der Phosphorylierung wichtiger Signalproteine

Die TaqMan-Analysen (Abschnitt C.5.3) zeigen, dass durch die Infektion mit *Y. enterocolitica* die Signaltransduktion von IL12 und IL18 gehemmt wird. Für YopP wurde früher bereits beschrieben, dass die MAPK-Signaltransduktion durch Hemmung der Phosphorylierung gehemmt wird. Die vorhergehenden Experimente, bei denen die NK-Zellen nur mit IL12 alleine stimuliert wurden, lassen die Hypothese zu, dass YopP eine weitere Signaltransduktionskaskade, den Jak-STAT-Pathway, beeinflusst (Abschnitt C.5.2.3 und Abschnitt C.5.3). Um diese Hypothese zu prüfen, wurden Western Blot Analysen mit phospho-spezifischen Antikörpern gegen wichtige Signaltransduktionsproteine aus beiden Signalkaskaden durchgeführt.

C.5.4.1 <u>Nach 30 Minuten Stimulation ist ein Effekt der Yersinien auf die</u> <u>Phosphorylierung wichtiger Signaltransduktionskaskaden nachweisbar</u>

IL2 kultivierte BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen wurden für eine Stunde infiziert und anschließend für 30 Min. mit IL12 + IL18 und IL12 stimuliert. Nach Ernte der Gesamtzell-Lysate wurden diese in der Western Blot Analyse auf den Phosphorylierungsstatus von p38 und JNK1+2 (MAPK-Signalling) bzw. Tyk2 und STAT4 (Jak-STAT-Signalling) untersucht (Abschnitt B.6). Als Kontrolle dienten Lysate von nichtinfizierten, unstimulierten Zellen und von nicht-infizierten, aber stimulierten Zellen (Mock). Zur Kontrolle der aufgetragenen Gesamtprotein-Menge wurden die Blots gestrippt und mit einem Antikörper gegen Aktin oder dem entsprechenden Gesamtprotein markiert.

Abbildung C-36 A zeigt die Western Blot Analysen mit phospho-spezifischen Antikörpern gegen Signaltransduktionsproteine des MAPK-Pathway. Nach Stimulation mit IL12 + IL18 wird sowohl p38 als auch JNK1+2 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung wird durch Infektion mit WA(pYV) fast völlig gehemmt. Nach Stimulation mit IL12 alleine wird p38 phopshoryliert, nicht jedoch JNK1+2, auch hier ist nach Infektion mit WA(pYV) keine Phosphorylierung nachweisbar. Nach Infektion mit WA(pYV, ΔYopP) findet keine Hemmung der Phosphorylierung von p38 und JNK1+2 statt.



Abbildung C-36

Y. enterocolitica inhibiert die Phosphorylierung wichtiger Signaltransduktionsproteine der MAPK-Kinase und Jak-STAT-Pathways

IL2 vorstimulierte NK-Zellen wurden mit WA(pYV) infiziert und für 30 Minuten mit IL12 + IL18 und IL12 stimuliert. Das Zelllysat wurde im Western Blot mit phospho-spezifischen Antikörpern gegen p38, JNK1 +2 (MAPK-Pathway, A), Tyk2 und STAT4 (Jak-STAT-Signalling, B) analysiert. Als Kontrolle dienen unstimulierte nicht-infizierte (unstimuliert) und stimulierte nicht-infizierte Zellen (Mock). *Y. enterocolitica* verhindert die Phosphorylierung wichtiger Signaltransduktionsproteine des MAPK-Pathways (A) und des Jak-STAT-Pathways (B).

Abbildung C-36 B zeigt die Western Blot Analysen mit phospho-spezifischen Antikörpern gegen Signaltransduktionsproteine des Jak-STAT-Pathways. Tyk2 und STAT4 werden nach Stimulation mit IL12 + IL18 und IL12 alleine phosphoryliert. Infektion mit WA(pYV) inhibert die Phosphorylierung beider Proteine, nach Infektion mit WA(pYV, ΔYopP) indes ist wieder keine Hemmung der Phosphorylierung nachweisbar. Diese Daten zeigen, dass YopP also nicht nur Signaltransduktion via MAPK-Signalling inhibiert, sondern auch die Jak-STAT-Signaltransduktionskaskade durch Suppression der Phosphorylierung von Tyk2 und STAT4 hemmt.

C.5.4.2 <u>Die Yersinien-vermittelte Hemmung der Phosphorylierung von STAT4 ist nach</u> <u>3 Stunden Stimulation aufgehoben</u>

IL2 kultivierte BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen wurden für eine Stunde infiziert und anschließend für 3 Std. mit IL12 + IL18 und IL12 stimuliert. Nach Ernte der Gesamtzell-Lysate wurden diese in der Western Blot Analyse auf den Phosphorylierungsstatus von STAT4 untersucht (Abschnitt B.6). Als Kontrolle dienten Lysate von nicht-infizierten, unstimulierten Zellen (unstimuliert) und von nicht-infizierten, stimulierten Zellen (Mock). Zur Kontrolle der aufgetragenen Gesamtprotein-Menge wurden die Blots gestrippt und mit einem Antikörper gegen Aktin markiert.



Abbildung C-37 Die Y. enterocolitica-vermittelte Hemmung der NK-Zellen ist ein transienter Effekt

A IL2 vorstimulierte NK-Zellen wurden mit WA(pYV) infiziert, für 3 Stunden mit IL12 + IL18 und IL12 stimuliert, danach das Zellysat geerntet und im Western Blot mit einem phospho-spezifischen Antikörper gegen STAT4 analysiert. Als Kontrolle dienen unstimulierte, nicht-infizierte (unstimuliert) und stimulierte nicht-infizierte Zellen (Mock). 3 Stunden nach Infektion ist kein Unterschied in der Phosphorylierung zwischen infizierten und nicht-infizierten NK-Zellen zu erkennen

B IL2 vorstimulierte NK-Zellen wurden mit WA(pYV) infiziert und anschließend über Nacht mit IL12 + IL18 und IL12 allein stimuliert. Die Menge an sezernierten IFN-γ wurde im ELISA quantifiziert. 20 Stunden nach Infektion ist kein Unterschied in der IFN-γ Produktion zwischen infizierten und nicht-infizierten NK-Zellen zu erkennen.

In Abbildung C-37 A ist der Phosphorylierungsstatus von STAT4 nach 3-stündiger Stimulation mit IL12 + IL18 und IL12 gezeigt. Sowohl bei den stimulierten, nicht-infizierten als auch bei den WA(pYV)-infizierten Zellen ist STAT4 phosphoryliert. Die Yersinien-vermittelte Suppression der Phosphorylierung von STAT4 ist ein transienter Effekt. Analog dazu verhält es sich mit der IFN-γ Produktion. Nach Stimulation mit IL12 + IL18 und IL12 alleine über Nacht ist kein Unterschied in der Menge an sezernierten IFN-γ zwischen nicht-infizierten, stimulierten NK-Zellen (Mock) und WA(pYV)-infizierten, stimulierten NK-Zellen sichtbar (Abbildung C-37, B). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Yersinien-vermittelte Hemmung der IFN-γ Produktion daher ebenfalls nur vorübergehend stattfindet.

C.5.5 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass Y. enterocolitica die IL12 + IL18 induzierte IFN-γ Expression von NK-Zellen hemmt. Dies ist abhängig von der Translokation von Yops. Durch Infektion mit unterschiedlichen Yop-Deletions- und Yop-Monosekretionsmutanten konnte YopP als hauptverantwortlich für die Yersinienvermittelte Hemmung von NK-Zellen identifiziert werden (Abbildung C-28 + Abbildung C-29). Auch nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin, agonistischen Antikörpern (a-NKG2D und a-Ly49D) und IL12 alleine ist der YopP-vermittelte Hemmeffekt nachweisbar (Abbildung C-30, Abbildung C-31, Abbildung C-32 + Abbildung C-33). Mittels RT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass YopP die IFN-γ Transkription hemmt. Es konnte gezeigt werden, dass auch Jak-STAT-Signalling von YopP inhibiert wird (Abbildung C-35). Durch Infektion mit *Y. enterocolitica* wird Phosphorylierung von Tyk2 und STAT4 nach Stimulation mit IL12 + IL18 und IL12 alleine verhindert (Abbildung C-36).

C.6 Transkriptom-Analysen von BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen

Um die Transkriptionsantwort von NK-Zellen in genomischen Maßstab zu untersuchen, wurden NK-Zellen mittels Microarrays untersucht. Hierzu wurden aufgrund der größeren Reinheit IL2 stimulierte NK-Zellen in die Experimente eingesetzt. Zunächst wurde das Transkriptionsprofil von nicht-infizierten NK-Zellen zu dem nach Infektion mit WA(pYV) und WA(pTTS, pP60) verglichen. Im Anschluss wurde der Einfluss der Yops auf das durch Stimulation mit IL12 + IL18 oder a-NKG2D hervorgerufene Transkriptionsprofil untersucht. Die beiden Yersinien-Stämme wurden vor der Infektion auf ihre Funktionalität geprüft.

C.6.1 Kontrolle der Versuchsbedingungen

NK-Zellen beider Mausstämme wurden zum einen mit einer MOI von 50:1 mit den Yersinien-Stämmen WA(pTTS, pP60) und WA(pYV) infiziert. Zum anderen wurden NK-Zellen mit WA(pYV) infiziert und anschließend mit IL12 + IL18 oder NKG2D stimuliert. Die Menge an sezernierten IFN-γ im Zellkultur-Überstand wurde zur Kontrolle der Stimulation und des Hemmeffektes des Yersinien auf die IFN-γ Produktion im ELISA bestimmt.



Abbildung C-38 zeigt, dass die Infektion mit beiden Yersinien-Stämmen ohne anschließende Stimulation keinen Einfluss auf die IFN-y Produktion hat. Stimulation mit IL12 + IL18 bzw. NKG2D resultiert in IFN-y Produktion, Infektion mit WA(pYV) hemmt die Produktion von IFN-y nach Stimulation effektiv. Die gewählten Bedingungen - Stimulation der NK-Zellen und Infektion – können somit als korrekt durchgeführt vorausgesetzt werden.

C.6.2 Qualitätskontrolle der Microarray-Daten

Vor der statistschen Auswertung und der Erstellung der Transkriptionsprofile wurde eine Qualitätskontrolle der Daten vorgenommen. Als Maß für die Qualität dienten dabei (i) der Anteil der als exprimiert erkannten Gene pro Array, dieser sollte bei jedem Array über 40% liegen und (ii) das Verhältnis der Signalintensitäten von Proben spezifisch für das 5´ und 3´Ende der Transkripte von β-Aktin und GADPH, welche als Kontrollproben auf dem Array enthalten sind. Optimalerweise liegt die Ratio aus 3´/ 5´ Signal bei eins, Werte bis vier liegen im Toleranzbereich. Werte darüber lassen auf eine stärkere RNA-Degradation schließen. Bei den in dieser Arbeit gezeigten Arrays lagen die Werte im Bereich von eins bis zwei, so dass von nicht degradierter RNA ausgegangen werden kann (Daten nicht gezeigt).

Um mehrere Arrays miteinander vergleichen zu können, müssen diese zuvor aufeinander normalisiert werden, um systematische oder zufällige Unterschiede der Gesamtfluoreszenz zu korrigieren. Als Qualitätskontrolle der Normalisierung dient ein MvA-Plot, M steht für die Ratio der Fluoreszenzintensitäten zweier Arrays (y-Achse), A steht für deren Mittelwert (x-Achse). In Abbildung C-39 ist exemplarisch jeweils ein MvA-Plot eines BALB/c und eines C57BL/6-Arrays nach Normalisierung nach der Methode der Quantilennormalisierung von Bolstad und Irizarry (Abschnitt B.4.7.1) gezeigt (BOLSTAD BIOINFORMATICS 2003). Dieses Verfahren stellt sicher, daß die Verteilung der Signalintensitäten auf allen Arrays gleich ist und wird derzeit als *stateof-the-art* angesehen.

Diese Normalisierungsmethode resultiert in einer symmetrisch eng um die x-Achse liegenden Punktwolke, deren *lowess fit* Linie nahezu linear und auf der x-Achse liegend verläuft.

Für die Untersuchung der Genexpressionsprofile der NK-Zellen wurden die Microarray-Experimente in Triplikaten durchgeführt. Es wurden BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen unstimuliert, mit IL12 + IL18 oder NKG2D stimuliert eingesetzt. Um zu untersuchen, ob *Y. enterocolitica* das Genexpressionsprofil von NK-Zellen dieser Mausstämme beeinflusst, wurden unstimulierte NK-Zellen mit den *Y. enterocolitica* Stämmen WA(pTTS, pP60) und WA(pYV) infiziert, desweiteren IL12 + IL18 bzw. NKG2D stimulierte NK-Zellen mit dem *Y. enterocolitica* Stämmen WA(pTV) infiziert.



Da insgesamt drei biologische Replikate durchgeführt wurden, enthält das Experiment insgesamt 42 Arrays. Folgende vier experimentelle Variablen wurden untersucht: (i) die Bakterienstämme, (ii) der genetische Hintergrund, (iii) die Replikate und (iv) die unterschiedlichen Stimuli. Zur weiteren Qualitätskontrolle wurde eine hierarchische Clusteranalyse mit diesen 42 Arrays durchgeführt. Unter dem Postulat, dass die experimentellen Bedingungen einen größeren Einfluss auf das gemessene Genexpressionsmuster haben sollten als die Replikatmessungen, würde man erwarten, dass innerhalb der experimentellen Bedingungen die Replikatmessungen

zusammen clustern. Abbildung C-40 zeigt das auf Basis der 42 Arrays erstellte Clusterdiagramm.

Die 42 Arrays lasssen sich in vier große Gruppen unterteilen: Arrays, die auf (1) nicht-infizierte, stimulierte NK-Zellen beruhen und (2) solche, die das Genexpressionsmuster nicht-stimulierter, nicht-infizierter NK-Zellen, nicht-stimulierter, infizierter NK-Zellen und stimulierter, infizierter NK-Zellen zeigen.

Innerhalb Gruppe 1 (stimulierte, nicht-infizierte NK-Zellen) lassen sich wieder zwei Gruppen bilden: solche, die das Genexpressionsmuster (a) NKG2D stimulierter bzw. (b) IL12 + IL18 stimulierter NK-Zellen zeigen. Innerhalb der beiden Gruppen bilden die Arrays von (i) BALB/c und (ii) C57BL/6 NK-Zellen wiederum eigene Subgruppen. In diesem Fall lässt sich also eine eindeutige Hierarchie des Einflusses experimenteller Parameter auf das zelluläre Genexpressionsprofil bilden: der entsprechende Stimulus übt den größten Einfluss auf das zelluläre Genexpressionsmuster aus, gefolgt vom genetischen Hintergrund.



Gruppe 2 beruht auf den übrigen Arrays und lässt sich nur grob unterteilen. Auch hier ist ein Einfluss des gewählten Stimulus erkennbar: (c) eine Gruppe umfasst nicht-stimulierte, infizierte NK-Zellen und IL12 + IL18 stimulierte, infizierte Zellen, (d) die andere Gruppe bilden Arrays von nicht-infizierten, nicht-stimulierten NK-Zellen (Mock) und NKG2D stimulierte, WA(pYV)-infizierte NK-Zellen. Innerhalb der beiden Gruppen bilden die Arrays von (i) BALB/c und (ii) C57BL/6 Mäusen wiederum eigene Subgruppen. Zwei Arrays in dieser Obergruppe clustern nicht, in diesen Fällen muß von experimentellen Ausreißern ausgegangen werden.

Insgesamt zeigt diese Analyse, dass sich eine Hierarchie des Einflusses experimenteller Parameter auf das zelluläre Genexpressionsprofil bilden läßt: Stimulation und bakterielle Infektion üben einen größeren Einfluss auf das zelluläre Genexpressionsmuster aus als der genetische Hintergrund.

C.6.3 Vergleichende Mikroarray-Analysen von NK-Zellen nach Stimulation mit IL12 + IL18 oder agonistischem Antikörper a-NKG2D

Wie unter Abschnitt C.6.2 gezeigt, üben die unterschiedlichen Stimulatoren einen großen Einfluss auf das Genexpressionsprofil der NK-Zellen aus. Um die Unterschiede zwischen den beiden Stimuli und den beiden Mausstämmen zu untersuchen, wurden Transkriptionsanalysen durchgeführt. Abbildung C-41 zeigt die hierarchische Clusteranalyse der mRNA-Expressionswerte von 271 statistisch signifikant differentiell exprimierten Genen nach IL12 + IL18 oder NKG2D Stimulation. Die Expressionswerte wurden nach der 2-way Anova Analyse ausgewertet. Bei dieser Methode werden zwei Parameter gewählt, welche Unterschiede aufweisen müssen. Diese Methode hat den Vorteil, dass Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen deutlich werden. Des Weiteren wurden hierarchische Clusteranalysen der mRNA-Expressionswerte mit Hilfe der SAM-Analyse durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Diese Analyse berücksichtigt nur einen Parameter, so dass wesentlich mehr Gene als diffentiell exprimiert berücksichtigt werden. Im vorliegenden Fall umfasst das SAM-basierte hierarchische Clusterdiagramm 2311 differentiell exprimierte Gene. Ein Vergleich dieser Genexpressionprofile von BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen zeigt, dass die Mehrzahl der differentiell exprimierten Gene ein ähnliches Genexpressionsmuster in NK-Zellen beider Mausstämme hat. Aufgrund der Vielzahl an differentiell exprimierten Genen und der Tatsache, dass die 2-way-Anova-Analyse Unterschiede in den Genexpressionprofilen zwischen den beiden Mausstämmen besser aufzeigt, werden hier nur die auf der 2-way Anova Analyse basierenden Daten gezeigt.



Gruppe A enthält 32 Gene, welche bei BALB/c NK-Zellen - nicht jedoch C57BL/6 NK-Zellen - nach Stimulation mit IL12 + IL18 und/ oder NKG2D induziert werden und läßt sich in drei weitere Untergruppen unterteilen (Gruppe A1: 3 Gene, Genexpression supprimiert nach NKG2D Stimulation; Gruppe A2: 12 Gene, Geninduktion nach Stimulation mit IL12 + IL18 und NKG2D; Gruppe A3: 17 Gene, Induktion nach Stimulation mit NKG2D). In Gruppe A sind Gene aus dem Bereich der Immunantwort (p = 0,001837) und des Immunsystems (p = 0,00141) statistisch signifikant vertreten. In den Untergruppen sind speziell in Gruppe A3 Gene aus dem Bereich des Immunsystems (p = 0,00057) und der Lymphozyten-Aktivierung (p = 0.007807) überzufällig häufig enthalten. Gruppe B enthält 15 Gene, welche nach Stimulation mit NKG2D in BALB/c NK-Zellen, jedoch nicht in C57BL/6 NK-Zellen, induziert werden. Gruppe C enthält 21 Gene, welche nach Stimulation mit IL12 + IL18 induziert werden, dabei sind Gene aus dem Bereich der zellulären Homöostase statistisch signifikant angereichert (p < 0,01). Diese Gruppe läßt sich in drei Untergruppen einteilen: (i) Gruppe C1 mit 2 Genen, welche bei BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen induziert werden; (ii) Gruppe C2 mit 12 Genen, welche nur bei C57BL/6 NK-Zellen induziert werden, in dieser Gruppe sind hauptsächlich die Gene aus dem Bereich der Homöostase enthalten und (iii) Gruppe C3 mit 6 Genen, welche bei BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen induziert werden. Gruppe D enthält 49 Gene, welche

nach Stimulation mit IL12 + IL18 und/ oder NKG2D induziert werden und läßt sich in drei weitere Untergruppen unterteilen (Gruppe D1: 16 Gene, Genexpression induziert nach IL12 + IL18 und NKG2D Stimulation bei BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen; Gruppe D2: 6 Gene, Geninduktion nach Stimulation mit IL12 + IL18 und NKG2D bei C57BL/6 NK-Zellen; Gruppe D3: 27 Gene, Induktion nach Stimulation mit NKG2D bei C57BL/6 NK-Zellen). In Gruppe D sind Gene aus dem Bereich der multizellulären Antwort auf Stress (p = 0,001707) statistisch signifikant vertreten. In Gruppe E sind 93 Gene enthalten, welche ohne vorhergehende Stimulation in C57BL/6 NK-Zellen als exprimiert erkannt werden, die Genexpression wird nach Stimulation mit IL12 + IL18 und NKG2D supprimiert. Gruppe E enthält überzufällig viele Gene aus dem Bereich des Energiestoffwechsels (p < 0,01) und des Phosphatmetabolismus (p < 0,007) und kann in sechs Untergruppen unterteilt werden (Gruppe E1: 71 Gene; Gruppe E2: 5 Gene; Gruppe E3: 4 Gene; Gruppe E4: 4 Gene; Gruppe E5: 4 Gene; Gruppe E6: 5 Gene). Gruppe F enthält 61 Gene, welche ohne vorhergehende Stimulation in BALB/c NK-Zellen als exprimiert erkannt werden, die Geninduktion wird nach Stimulation mit IL12 + IL18 und NKG2D supprimiert. Gruppe F enthält signifikant viele Gene aus dem Bereich der Protein-Kinase Aktivität (p = 0,00993) und Protein-Tyrosin-Kinase Aktivität (p = 0,006475). Diese Gruppe läßt sich in drei weitere Untergruppen unterteilen: (i) Gruppe F1 mit 52 Genen, welche nur ohne vorhergehende Stimulation in BALB/c NK-Zellen induziert werden; (ii) Gruppe F2 mit 5 Genen, welche ohne Stimulation und nach Stimulation mit NKG2D in BALB/c NK-Zellen induziert werden und (iii) Gruppe F3 mit 4 Genen, welche bei NK-Zellen beider Mausstämme ohne vorhergehende Stimulation induziert werden.

C.6.4 Microarray-Analysen von IL12 + IL18 stimulierten NK-Zellen nach Infektion mit *Y. enterocolitica*

Um die Transkriptionsantwort von IL12 + IL18 stimulierten BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen auf eine *Y. enterocolitica* Infektion zu untersuchen, wurden die NK-Zellen mit WA(pYV) infiziert und anschließend mit IL12 + IL18 stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte, nicht-infizierte (Mock) und stimulierte, nicht-infizierte NK-Zellen.



Clusterdiagramm in Abbildung C-42 stellt Das eine hierarchische Clusteranalyse von 171 differentiell exprimierten Genen dar und lässt sich in sechs große Gruppen unterteilen, welche sich in weitere Untergruppen gliedern lassen. Gruppe A enthält 41 Gene, welche bei BALB/c NK-Zellen nach Stimulation mit IL12 + IL18 induziert und nach Infektion mit WA(pYV) supprimiert werden. In dieser Gruppe sind insbesondere Gene aus den Bereichen Antigen-Prozessierung und Präsentation (p < 0,007), der Immunantwort und des Immunsystems (p < 0,002) und der Lymphozyten-Aktivierung (p = 0,005618) überrepräsentiert. Gruppe A läßt sich in vier Untergruppen unterteilen: (i) Gruppe A1 mit fünf Genen, welche bei BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen nach Stimulation mit IL12 + IL18 induziert werden, (ii) Gruppe A2 mit 28 Genen, welche bei BALB/c NK-Zellen nach Stimulation mit IL12 + IL18 induziert werden, (iii) Gruppe A3 mit sechs Genen, welche bei BALB/c ohne Stimulation und nach Stimulation mit IL12 + IL18 induziert werden, und (iv) Gruppe A4 mit 2 Genen, welche bei BALB/c nach Stimulation mit IL12 + IL18 und Infektion mit WA(pYV) induziert werden. In den beiden letztgenannten Gruppen sind Gene aus den Bereichen der Immunantwort (p = 0.006937) und des Immunsystems (p = 0.001828) statistisch signifikant überrepräsentiert. In Gruppe B umfasst 21 Gene, hier sind Gene

aus dem Bereich der Ionenbindung angereichert (p < 0,004), sie werden in C57BL/6 NK-Zellen nach Stimulation mit IL12 + IL18 induziert, nach Infektion mit WA(pYV) supprimiert. Die 35 Gene in Gruppe C werden nach Infektion mit WA(pYV) induziert und können in vier Untergruppen (Gruppe C1: 23 Gene, welche nach Infektion mit WA(pYV) in BALB/c NK-Zellen induziert werden; Gruppe C2: sieben Gene, welche ohne Stimulation und nach Infektion mit WA(pYV) in BALB/c NK-Zellen induziert werden; Gruppe C3: 3 Gene, welche nach Infektion mit WA(pYV) in BALB/c NK-Zellen und ohne Stimulation in C57BL/6 NK-Zellen induziert werden; Gruppe C4: 2 Gene, welche nach Infektion mit WA(pYV) in BALB/c NK-Zellen und in C57BL/6 NK-Zellen sowohl ohne Stimulation als auch nach Infektion mit WA(pYV) induziert werden) aufgeteilt werden. Hier findet sich keine Anreicherung an Genen aus bestimmten Bereichen. Gruppe D enthält 27 Gene, welche bei BALB/c NK-Zellen ohne vorhergehende Stimulation exprimiert und durch IL12 + IL18 und/ oder WA(pYV) supprimiert werden, auch hier finden sich keine signifikanten Anreicherungen von Genen aus bestimmten Gene-Ontology Gruppen. In Gruppe E sind 42 Gene enthalten, welche bei C57BL/6 NK-Zellen ohne Stimulation exprimiert und durch IL12 + IL18 und/ oder WA(pYV) supprimiert werden, diese Gruppe kann in drei Untergruppen unterteilt werden (Gruppe E1: vier Gene, welche bei NK-Zellen beider Mausstämme ohne Stimulation induziert werden; Gruppe E2: 13 Gene, welche bei C57BL/6 NK-Zellen sowohl ohne Stimulation als auch nach Infektion mit WA(pYV) induziert werden; Gruppe E3: 25 Gene, welche bei C57BL/6 NK-Zellen ohne Stimulation exprimiert werden) und enthält keine signifikanten Anreicherungen von Genen aus bestimmten Gene-Ontology Gruppen. Die acht Gene in Gruppe F werden nach Infektion mit WA(pYV) in C57BL/6 NK-Zellen induziert und enthalten überzufällig viele Gene aus den Bereichen der Aktivierung der Transkription (p < 0.005). Diese Gruppe kann in zwei Untergruppen mit jeweils vier Genen unterteilt werden.

Im gesamten hierarchischen Clusterdiagramm wird die Expression von 118 Genen durch Yersinien verändert, dies entspricht 69% aller als differentiell exprimiert erkannten Gene.

C.6.5 Microarray-Analysen von NKG2D stimulierten NK-Zellen nach Infektion mit *Y. enterocolitica*

Um die Transkriptionsantwort von NKG2D stimulierten NK-Zellen aus BALB/c und C57BL/6 Mäusen auf eine *Y. enterocolitica* Infektion zu untersuchen, wurden die NK-Zellen mit WA(pYV) infiziert und mit NKG2D stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte, nicht-infizierte (Mock) und stimulierte, nicht-infizierte NK-Zellen.

Das Clusterdiagramm in Abbildung C-43 stellt eine hierarchische Clusteranalyse von 129 differentiell exprimierten Genen dar und lässt sich in sechs große Gruppen unterteilen, welche sich in weitere Untergruppen gliedern lassen. Gruppe A enthält 27 Gene, welche in BALB/c NK-Zellen ohne Stimulation und/ oder nach Infektion mit WA(pYV) exprimiert werden. Diese Gruppe kann in zwei Untergruppen unterteilt werden: (i) in Gruppe A1 sind in den 27 Genen, welche ohne Stimulation exprimiert und durch WA(pYV) supprimiert werden, signifikant viele Gene aus dem Bereich des Transmembran-Rezeptor Protein-Tyrosin Kinase Aktivität und Signaltransduktion (p < 0,006) vertreten und (ii) in Gruppe A2 mit 7 Genen, welche ohne Stimulation und nach Infektion mit WA(pYV) induziert werden, sind Gene aus dem Bereich der Immunantwort (p = 0,006937) und der Reaktion auf Stimulation (p = 0,009323) statistisch signifikant angereichert. Die 17 Gene aus Gruppe B werden nach NKG2D Stimulation in BALB/c NK-Zellen induziert und sind überzufällig häufig aus dem Bereich der Transferase Aktivität (p < 0,008). Gruppe C enthält 12 Gene, welche in BALB/c NK-Zellen nach Infektion mit WA(pYV) (Gruppe C1 mit acht Genen) und nach Stimulation mit NKG2D und auch nach Infektion (Gruppe C2 mit vier Genen) exprimiert werden. In dieser Gruppe befinden sich Gene aus den Bereichen des Aminosäure-Metabolismus (p < 0.01) und der Aminosäure-Biosynthese (p < 0.001). Gruppe D enthält 25 Gene, welche ohne Stimulation und/ oder nach Infektion mit WA(pYV) exprimiert werden und kann in drei Untergruppen unterteilt werden: (i) Gruppe D1 mit 11 Genen, welche ohne Stimulation und nach Infektion mit WA(pYV) in C57BL/6 NK-Zellen exprimiert werden, (ii) Gruppe D2 mit 11 Genen, welche ohne Stimulation in C57BL/6 NK-Zellen induziert werden und (iii) Gruppe D3 mit drei Genen, welche in beiden Mausstämmen ohne Stimulation und nach Infektion mit WA(pYV) exprimiert werden. Gruppe E umfasst 13 Gene, hier sind Gene aus dem Bereich der Transkriptions-Aktivität (p < 0,007) statistisch signifikant angereichert. Die Gene aus Gruppe E werden ohne Stimulation und nach Infektion mit WA(pYV) in C57BL/6 NK-Zellen induziert (Gruppe E1 mit 7 Genen) bzw. nur nach Infektion mit WA(pYV) (Gruppe E2 mit 6 Genen) exprimiert. Gruppe F enthält 35 Gene, welche in C57BL/6 NK-Zellen nach Stimulation mit NKG2D induziert werden und hier sind Gene aus dem Bereich des Golgi Vesikel Transportes überzufällig häufig angereichert (p = 0,007526).



Im gesamten hierarchischen Clusterdiagramm wird die Expression von 90 Genen durch Yersinien verändert, dies entspricht 70% aller als differentiell exprimiert erkannten Gene.

C.6.6 Zusammenfassung

Die unterschiedliche Aktivierbarkeit von BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen bezieht sich nicht nur auf die Menge an nachweisbaren IFN-y nach Stimulation. Die Analyse der differentiell exprimierten Gene zeigt Unterschiede in den induzierten Genen nach IL12 + IL18 bzw. NKG2D Stimulation in den beiden Mausstämmen (Abbildung C-41). Mit Hilfe von Microarray-Analysen konnte weiterhin werden, dass der Yersinien-vermittelte Effekt auf NK-Zellen nicht spezifisch für IFN-y ist. Die Induktion von 69 - 70% der als differentiell exprimiert erkannten Gene nach IL12 + IL18 bzw. NKG2D Stimulation wird nach Infektion mit *Y. enterocolitica* verändert (Abbildung C-42 + Abbildung C-43).

C.7 Der YopP-vermittelte Hemmeffekt findet auch *in vivo* statt

C.7.1 *Ex vivo* Analysen *in vivo* infizierter BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen

Um zu ermitteln, ob die Yersinien-vermittelte Hemmung und insbesondere der YopP-Effekt auf NK-Zellen auch *in vivo* stattfindet, wurden BALB/c und C57BL/6 Mäuse mit einer an die LD₅₀ des jeweiligen Stamm adaptierten Dosis i.v. infiziert. Vier Tage nach Infektion wurden den Tieren die Milz entnommen und die NK-Zellen isoliert. Nach Restimulation mit IL12 + IL18 wurden die NK-Zellen in die Experimente eingesetzt.

FACS-Analysen der restimulierten NK-Zellen ergeben, dass bei beiden Mausstämmen durch *in vivo* Infektion mit WA(pYV) die Zahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle um 90% reduziert wird. Nach *in vivo* Infektion mit der YopP-Deletionsmutante dagegen nimmt die Zahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen lediglich um durchschnittlich 29% bei BALB/c bzw. 31% bei C57BL/6 ab.

In Abbildung C-44 A sind die entsprechenden Histogramme der FACS-Messungen gezeigt. In der Quadranten-Darstellung in Abbildung C-44 B wird deutlich, dass an NK-Zellen adhärierende Yersinien die Produktion von IFN-γ effektiv hemmen. Ausschließlich NK-Zellen ohne adhärierende Yersinien lassen sich mit IL12 + IL18 restimulieren (Quadrant oben links), bei NK-Zellen mit adhärierenden Yersinien ist keine IL12 + IL18 induzierte IFN-γ Produktion nachweisbar (Quadrant unten rechts.). Es sind keine IFN-γ⁺/ Y. enterocolitica⁺ NK-Zellen (Quadrant oben rechts) nachweisbar.

Auch die Menge an sezernierten IFN-γ wurde im ELISA quantifiziert. Abbildung C-44 C zeigt, dass durch die *in vivo* Infektion mit WA(pYV) die Menge an sezerniertem IFN-γ um 55% bei BALB/c NK-Zellen und um 71% bei C57BL/6 NK-Zellen im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle reduziert wird. Abbildung C-44 D zeigt die IFN-γ mRNA-Expression relativ zur konstanten Expression des Kontrollgens HPRT nach Stimulation mit IL12 + IL18. Infektion mit WA(pYV) *in vivo* verhindert die IFN-γ Geninduktion um 91% in BALB/c NK-Zellen und um 85% in C57BL/6 NK-Zellen. Auch die Induktion von IFN-γ mRNA nach Restimulation mit IL12 + IL18 wird durch die *in vivo* Infektion der Mäuse effektiv supprimiert.



BALB/c und C57BL/6 Mäuse wurden i.v. infiziert, an Tag 4 nach Infektion die Milz entnommen und die NK-Zellen isoliert.

A Nach Stimulation mit IL12 + IL18 wurde die Anzahl der IFN-γ produzierenden NK-Zellen im FACS analysiert. *In vivo* Infektion mit WA(pYV) reduziert die Zahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen, Infektion mit der YopP-Deletionsmutante führt zu keiner Abnahme.

B Die Dot-Blot Darstellung zeigt, dass anhängende Yersinien die IFN-γ Produktion der entsprechenden NK-Zellen komplett inhibieren, es sind keine doppelt positiven Zellen vorhanden.

C Die Zytokin-Produktion nach IL12 + IL18 Restimulation wude im ELISA quantifiziert, durch die Infektion der Mäuse mit WA(pYV) *in vivo* wird die Produktion von IFN-y inhibiert.

D TaqMan-Analysen ergeben nach Stimulation mit IL12 + IL18 eine Hemmung der IFN-γ mRNA-Expression in NK-Zellen aus WA(pYV) infizierten Mäusen im Vergleich zur HPRT-Expression.

C.7.2 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt konnte der YopP-vermittelte Hemmeffekt *in vivo* nachgewiesen werden: die IFN-γ Produktion von NK-Zellen aus *in vivo* infizierten BALB/c und C57BL/6 Mäusen ist stark supprimiert, auch die Zahl an IFN-γ produzierenden NK-Zellen ist bei beiden Mausstämmen vermindert. NK-Zellen mit adhärierenden Yersinien werden komplett in der IFN-γ Produktion inhibiert. (Abbildung C-44, A - D).

D Diskussion

D.1 Vergleichende Analysen der zellulären Immunantwort der Milz von BALB/c und C57BL/6 Mäusen auf Infektion mit *Y. enterocolitica*

Bereits in den 1980-er Jahren wurde beobachtet, dass unterschiedliche Mausstämme unterschiedlich empfindlich gegenüber Yersinien-Infektionen sind (Hancock *et al.*, 1986). Yersinien besiedeln nach oraler oder i.v. Infektion lymphatische Organe wie PP oder Milz und bilden dort Mikrokolonien (Trulzsch *et al.*, 2007). Eine Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedliche Empfindlichkeit wären unterschiedliche Mikro-Milieus im Bereich der Mikrokolonien. So ist es vorstellbar, dass bei den verschiedenen Mausstämmen Unterschiede in den zellulären Infiltraten der Abszesse bestehen. Sowohl der zelluläre Aufbau der Milz als auch die Verteilung immunologisch wichtiger Zellpopulationen während einer Yersinien-Infektion sollten daher in dieser Arbeit charakterisiert werden.

Hierzu wurden die makroskopischen, mikroskopischen und zellulären Veränderungen der Milz während einer Yersinien-Infektion untersucht. In der histologischen Untersuchung scheinen in C57BL/6 Mäusen die Mikrokolonien zufällig verteilt zu sein, in BALB/c dagegen zeigt sich ein Tropismus zu den Lymphfollikeln, insbesondere zu den B-Zell-Arealen. Infektionsversuche mit pTTSS defizienten *Yersinia pseudotuberculosis* Mutanten zeigten, dass diese Yersinien in den B- und T-Zell-Zonen der lymphatischen Gewebe überleben können. Fehlen T- und B-Zellen, wie beispielsweise in Rag1^{-/-} Mäusen, ist im Gegensatz zur Wildtyp-Yersinie keine erfolgreiche Infektion mit diesem Yersinien-Stamm möglich (Balada-Llasat & Mecsas, 2006). Der Tropismus der pTTSS defizienten Yersinien-Stämme lässt somit vermuten, dass T- und B-Zell-Areale eine Überlebensnische für Yersinien darstellen, in welcher eine Elimination der Yersinien durch phagozytierende Zellen vermindert werden kann. Unseren Ergebnissen zufolge werden bei BALB/c Mäusen die Mikroabszesse im Bereich der B-Zell-Areale im Verlauf der Infektion durch einwandernde Granulozyten infiltriert, so dass insgesamt der Anteil an B-Zellen in der Milz sinkt. Bei C57BL/6 Mäusen dagegen läuft die zelluläre Infiltration anders ab: die B-Zell-Follikel nehmen im Laufe der Infektion in Größe und Anzahl zu und es kommt zu einem leichten Anstieg des Anteils von B-Zellen in der Milz. Die unterschiedliche Resistenz von BALB/c und C57BL/6 Mäusen könnte aufgrund dieser Beobachtungen dadurch erklärt werden, dass bei BALB/c Mäusen durch den Einstrom von Granulozyten und die dadurch verbundene Degranulation im Bereich der Lymphfollikel zu einer Schädigung derselben kommt, so dass die adaptive Immunantwort bei diesem Mausstamm nur eingeschränkt einsetzen kann. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit wäre, dass sich bei BALB/c Mäusen die Yersinien in den B-Zell-Arealen vor der adaptiven Immunantwort "verstecken", es zu einem geringeren Einstrom an phagozytierenden Zellen kommt und die Immunantwort infolgedessen schwächer einsetzt als bei C57BL/6 Mäusen.

Letztere Hypothese kann durch die Analyse des Milzgewichtes gestützt werden: nach Infektion nimmt das Milzgewicht bei C57BL/6 Mäusen ab Tag 5 signifikant zu, während BALB/c Mäuse nur eine gering ausgeprägte Splenomegalie entwickeln. Diese unterschiedliche Ausprägungsstärke der Splenomegalie zwischen BALB/c und C57BL/6 Mäusen wurde bereits von Autenrieth beschrieben (Autenrieth *et al.*, 1994). Splenomegalie nach einer Yersinien-Infektion korreliert mit der Rekrutierung von M1/70⁺ phagozytischen Zellen und NK-Zellen (Autenrieth *et al.*, 1993). Da sich beide Mausstämme in der Ausprägung der Splenomegalie unterscheiden, wurden die als verantwortlich erkannten Zelltypen detaillierter untersucht, um eventuelle Unterschiede aufzeigen zu können.

Die Analyse der prozentualen Verteilung von Granulozyten während der Infektion zeigt jedoch keine Unterschiede zwischen den Mausstämmen. Bei beiden Mausstämmen kommt es zu einem massiven Influx an neutrophilen Granulozyten. In immunhistochemischen Analysen wird deutlich, dass Granulozyten bereits nach 24 Stunden zu den Infektionsherden rekrutiert werden und das zelluläre Infiltrat der Mikrokolonien darstellen. Granulozyten sind wichtig in der frühen Immunabwehr, weil sie während der ersten Stunden der Infektion in lymphatische Gewebe einwandern und dort anwesende Yersinien inaktivieren (Conlan, 1997; Oellerich *et al.*, 2007).

Der Anteil an Makrophagen bleibt bei beiden Mausstämmen über die Dauer der Infektion konstant, wobei sich der Anteil zwischen den Mausstämmen unterscheidet: in den Milzen von C57BL/6 Mäusen ist der Anteil an Makrophagen etwa doppelt so hoch wie in den Milzen von BALB/c Mäusen. In den immunhistochemischen Analysen der Makrophagenpopulation konnte kein Unterschied in der Lokalisation der Makrophagen während einer Yersinien-Infektion bei beiden Mausstämmen gezeigt werden. Dies steht im Gegensatz zu publizierten

Diskussion

Beobachtungen, bei denen nach oraler Yersinien-Infektion zu frühen Zeitpunkten bei C57BL/6 Mäusen eine größere Zahl an Makrophagen in den PP nachweisbar ist als bei BALB/c Mäusen. Daher wurde postuliert, dass die Zahl an Makrophagen und der Zeitpunkt der Infiltration verantwortlich sind für die unterschiedliche Resistenz zwischen den beiden Mausstämmen (Schippers *et al.*, 2008). Die Unterschiede zu unseren Daten lassen sich durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau erklären: der Yersinienserotyp (O:9) unterscheidet sich von dem von uns verwendeten (O:8), zur Infektion wurde die orale Infektionsroute gewählt und es wurden die PP (im Gegensatz zur Milz) histologisch untersucht.

In einer weiteren Studie wurde der Aktivierungsstatus von BALB/c und C57BL/6 Makrophagen nach Infektion analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Differenzierung der Makrophagen nach Aktivierung und das Ausmaß der Aktivierung mit Resistenz oder Empfindlichkeit korreliert (Tumitan *et al.*, 2007). Makrophagen aus C57BL/6 Mäusen differenzieren nach Aktivierung zum M1-Phänotyp, welcher durch Sekretion von IL12 eine Th1 T-Zell-Immunantwort induziert, während Makrophagen aus BALB/c Mäusen einen M2-Phänotyp entwickeln und durch erhöhte Produktion von IL4 und TGF-β eine Th2 Immunantwort auslösen (Mills *et al.*, 2000).

Eine starke T-Zell-Antwort indes ermöglicht die Kontrolle und Elimination bakterieller Infektionen. Dabei spielen insbesondere CD4+ T-Zellen eine ambivalente Rolle: in C57BL/6 Mäusen wird durch CD4+ Th1 T-Zellen Resistenz vermittelt, während sich in BALB/c durch die CD4+ Th2 T-Zell-Antwort die Infektion gravierender verläuft (Autenrieth *et al.*, 1995; Heinzel *et al.*, 1989; Kempf *et al.*, 1998). Um die Unterschiede zwischen BALB/c und C57BL/6 in Bezug auf die T-Zellen genauer zu charakterisieren, wurden neben der Gesamt-T-Zell Population auch die CD4+ und CD8+ Subpopulationen betrachtet. Im Laufe der Infektion nimmt bei C57BL/6 Mäusen der Anteil an T-Zellen ab, dabei bleibt das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ T-Zellen konstant. In BALB/c Mäusen bleibt der Anteil an T-Zellen und auch das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Zellen im Lauf der Infektion konstant. Der Anteil an T-Zellen ist also nicht entscheidend für die Kontrolle der Infektion, sondern die Differenzierung der T-Zellen durch Zytokine und das Ausmaß der Aktivierung mittels akzessorischer Zellen. Der Kontakt zu antigenpräsentieren Zellen ist notwendig für ein effektives Priming der CD4+ T-Zellen und eine starke adaptive Immunantwort.

Wichtigste antigenpräsentierende Zellen sind die dendritischen Zellen. Diese wandern während einer Infektion zu den Infektionsherden und phagozytieren dort Antigene und apoptotische Zellen (Albert *et al.*, 1998; Bellone *et al.*, 1997). Die aufgenommenen Antigene werden sowohl über den MHC-Klasse I, als auch den

Diskussion

MHC-Klasse II Pathway prozessiert und in der Milz in den PALS den T-Zellen präsentiert (Busch et al., 1998; Skoberne et al., 2002; Svensson et al., 1997; Yrlid & Wick, 2000). Hier werden Unterschiede zwischen den Mausstämmen nach einer Yersinien-Infektion deutlich: in der histologischen Untersuchung zeigt sich, dass sich in den PALS der C57BL/6 Mäuse bereits zu frühen Zeitpunkten der Infektion mit T-Zellen colokalisierende dendritische Zellen finden, bei BALB/c kann keine Co-Lokalisation nachgewiesen werden. Zur Elimination von Yersinien-Infektionen wurde bisher eine starke T-Zell-Antwort als erforderlich erachtet (Autenrieth et al., 1992; Autenrieth et al., 1993). Diese wird durch ein effektives Priming der T-Zellen mittels antigenpräsentierenden Zellen induziert, welches wiederum einen Kontakt zwischen den beiden Zelltypen voraussetzt. Demnach lässt sich die Hypothese aufstellen, dass aufgrund der Co-Lokalisation von CD4+ T-Zellen und dendritischen Zellen bei C57BL/6 Mäusen eine stärkere adaptive Immunantwort hervorgerufen wird als bei BALB/c Mäusen. Demzufolge können C57BL/6 Mäuse besser in der Lage sein, die Infektion mit Beginn der adaptiven Immunantwort zu kontrollieren als BALB/c Mäuse.

Die Resistenz von C57BL/6 Mäusen gegen eine Yersinien-Infektion ist jedoch insbesondere mit der Induktion hoher Mengen an IFN-y während früher Infektionsstadien assoziiert (Autenrieth et al., 1994). Wichtige Produzenten von IFN-y während der Frühphase sind besonders NK-Zellen, welche im Gegensatz zu den T-Zellen ohne antigenspezifische Stimulation und Proliferation sofort zur Zytokin-Produktion aktiviert werden können. NK-Zellen sind in der Milz in der roten Pulpa lokalisiert und stehen dort in engem Kontakt zu dendritischen Zellen (Yokoyama et al., 2004). Nach Infektion mit Y. pestis kommt es zu einer Depletion von NK-Zellen in Milz, Leber und Blut (Kerschen et al., 2004). Diese Beobachtungen konnten in vorliegender Arbeit nicht bestätigt werden, nach Infektion mit Y. enterocolitica bleibt der Anteil an NK-Zellen in der Milz während der Infektion in BALB/c und C57BL/6 Mäusen konstant. Erstaunlicherweise sind die prozentualen Werte an NK-Zellen in den Milzen aus BALB/c Mäusen etwa doppelt so hoch wie die der resistenten C57BL/6 Mäuse. Die unterschiedliche Resistenz der beiden Mausstämme, welche mit unterschiedlichen Mengen an frühem IFN-y korreliert, liegt also nicht in der Anzahl an NK-Zellen begründet, sondern könnte durch die unterschiedliche Fähigkeit der NK-Zellen, IFN-y zu produzieren, erklärt werden. Bei NK-Zellen wurde bereits eine Inhibition der IFN-y Produktion durch Zytokine gezeigt: TGF-β inhibiert die IL12 induzierte Aktivierung in NK-Zellen (Bright & Sriram, 1998). Ob und wie NK-Zellen als wichtige Produzenten von IFNy sich zwischen den beiden Mausstämmen unterscheiden und unmittelbar durch eine Infektion mit Yersinien beeinflusst werden können, soll in den nächsten Abschnitten erklärt werden.

D.2 Charakterisierung der unterschiedlichen Aktivierbarkeit von BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen

D.2.1 BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen produzieren nach Stimulation mit IL12 und IL18 unterschiedliche Mengen an IFN-γ

NK-Zellen sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Hauptfunktion von NK-Zellen ist das Erkennen und Eliminieren von pathologisch veränderten Zellen, wie beispielsweise Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen. Dies geschieht durch direkten Kontakt der NK-Zelle mit der Zielzelle. Dadurch wird die NK-Zelle über das Zusammenspiel von unterschiedlichen Rezeptoren aktiviert. Zusätzlich zu der Stimulation aktivierende NK-Zell-Rezeptoren werden NK-Zellen auch durch Zytokine aktiviert (Miettinen *et al.*, 1998). Insbesondere die Interleukine IL12 und IL18, welche von Makrophagen und dendritischen Zellen nach Kontakt mit Pathogenen sezerniert werden, sind von Bedeutung bei der Zytokin-vermittelten NK-Zell-Aktivierung und induzieren die Produktion von IFN-γ (Akira *et al.*, 2006; Lauwerys *et al.*, 1999; Trinchieri, 1995). Die Induktion von IL12 erfolgt besonders bei bakteriellen und parasitären Infektionen, während IL18 bei bakteriellen und viralen Infektionen sezerniert wird (Okamura *et al.*, 1995; Takeda *et al.*, 1998; Trinchieri, 1995). Zusammen wirken beide Interleukine synergistisch als starke Stimulatoren für die IFN-γ Produktion in NK-Zellen (Lauwerys *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1997).

In der Literatur wurden C57BL/6 Mäuse im Vergleich zu BALB/c Mäusen als starke IFN-y Produzenten beschrieben (Bohn *et al.*, 1998). Während einer Yersinien-Infektion sind insbesondere große Mengen an IFN-y in C57BL/6 Mäusen verantwortlich für die Resistenz, BALB/c Mäuse dagegen können die Infektion nicht kontrollieren (Autenrieth *et al.*, 1994). Diese frühe Induktion von IFN-y wird als IL12-abhängig beschrieben und den NK-Zellen zugeschrieben, da durch Depletion von NK-Zellen die Mäuse empfindlicher gegenüber der Infektion werden (Bohn & Autenrieth, 1996). Da sich beide Mausstämme nicht nur in den Anteilen an NK-Zellen in der Milz unterscheiden, sondern auch in der Gesamtmenge an nachweisbaren IFN-y, sollte in diesem Abschnitt dieser Arbeit die unterschiedliche Fähigkeit der NK-Zellen, IFN-y nach Stimulation mit IL12 und IL18 zu produzieren, untersucht werden.
Nach Stimulation mit IL18 allein konnte in beiden Mausstämmen keine IFN-y Produktion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Stimulation mit IL12 allein bewirkte, dass die Menge an produziertem IFN-y bei BALB/c NK-Zellen wesentlich geringer ist als bei C57BL/6 NK-Zellen. C57BL/6 NK-Zellen sezernieren etwa doppelt soviel IFN-y wie BALB/c NK-Zellen nach IL12 + IL18 Stimulation, während sich die Anzahl an IFN-y produzierenden NK-Zellen kaum unterscheidet. Die Menge an produziertem IFN-y nach IL12 + IL18 Stimulation beträgt das 38–fache (*ex vivo* isolierte NK-Zellen) bis 74–fache (IL2 kultivierte NK-Zellen) im Vergleich zur IFN-y Produktion nach IL12 Stimulation.

Letzteres ist im Hinblick auf die induzierten Signaltransduktionskaskaden nicht weiter verwunderlich: durch die kombinierte Gabe von IL12 + IL18 werden Jak-STAT und NFkB Signaltransduktionskaskaden aktiviert, welche letztendlich die Interaktion zwischen phosphoryliertem STAT4 und phosphoryliertem c-Jun/ AP-1 ermöglichen. Diese Interaktion ist Voraussetzung für eine starke Bindung an den IFN-γ Promotor und demzufolge für eine erhöhte IFN-γ Produktion (Nakahira *et al.*, 2002). So lässt sich auch die geringe IFN-γ Produktion nach alleiniger Gabe von IL12 bzw. das Fehlen einer IFN-γ Produktion nach Stimulation mit IL18 allein erklären: (i) nach Stimulation mit IL12 allein wird nur STAT4 phosphoryliert und bindet an nicht-phosphorylierte c-Jun/ AP-1 Komplexe, die Bindungsaffinität dieses Komplexes an den IFN-γ-Promotor ist jedoch schwach und ermöglicht nur eine geringe Transkriptionsaktivität von *ifn*γ und (ii) IL18 allein wirkt zwar als starker Induktor auf die Phosphorylierung von c-Jun/ AP-1, ist aber nicht in der Lage STAT4 zu phosphorylieren, die Komplexbildung findet somit nicht statt und die Transkription von IFN-γ mRNA unterbleibt (Nakahira *et al.*, 2002).

Eine weitere Folge des synergistischen Effektes von IL12 und IL18 ist die reziprok induzierte Expression des entsprechenden Zytokin-Rezeptors (Lawless *et al.*, 2000). In murinen T-Zellen wurde gezeigt, dass IL12 die Transkription von IL18R mRNA induziert, so eine erhöhte Expression des IL18R auf der Zelloberfläche bewirkt und umgekehrt (Nakahira *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 1998). Es wurde weiterhin gezeigt, dass die Expression des IL18R nur bei CD4⁺ Th1 T-Zellen stattfindet und durch IL12 + IL18 eine Polarisierung in Richtung Th1 Immunantwort induziert wird (Xu *et al.*, 1998). IL18, in Kombination mit IL12, beeinflusst die "Helfer"-Aktivität von NK-Zellen, dadurch unterstützen NK-Zellen *in vivo* IL18-vermittelt die Th1 Antwort von CD4⁺ T-Zellen (Marcenaro *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu sezernieren NK-Zellen nach Stimulation mit IL4 Typ 2 Zytokine wie IL5 und IL13 und nehmen demgemäß an der Polarisierung der Immunantwort in Richtung Th2 teil (Deniz *et al.*, 2008; Kimura & Nakayama, 2005;

Loza & Perussia, 2001). Eventuell liegen die Unterschiede in der Resistenz zwischen den beiden Mausstämmen darin begründet, dass sich BALB/c NK-Zellen - ähnlich wie Makrophagen, dendritische Zellen und T-Zellen in BALB/c Mäusen - in Richtung Th2 Immunantwort differenzieren (Aktas *et al.*, 2005; Kimura & Nakayama, 2005; Loza & Perussia, 2001; Mills *et al.*, 2000). So könnte auf der Oberfläche von BALB/c NK-Zellen - wie bei Th2 T-Zellen - eine geringere Expression des IL18R nach IL12 + IL18 Stimulation erfolgen, wodurch die geringere IFN-γ Produktion erklärt werden kann. Diese könnte letztendlich die Th2 Immunantwort in BALB/c Mäusen stabilisieren.



NK1 und NK2 NK-Zellen wird die Polarisierung der Immunantwort unterstützt.

Für die Unterschiede in der IFN-γ Produktion zwischen diesen beiden Mausstämmen wurde bisher insbesondere IL12 als verantwortlich beschrieben. Da

nach einer Yersinien-Infektion bei beiden Mausstämmen gleiche Mengen an IL12 mRNA nachgewiesen werden konnten (Bohn & Autenrieth, 1996), wurden verschiedene Hypothesen zur Erklärung aufgestellt: (i) unterschiedliche biologische Aktivität des sezernierten IL12 (Bette *et al.*, 1994; Gillessen *et al.*, 1995; Ling *et al.*, 1995; Mattner *et al.*, 1993), (ii) ungleiche Expression des β2 Untereinheit des IL12R bei BALB/c T-Zellen (Bohn & Autenrieth, 1996; Rogge *et al.*, 1997; Rogge *et al.*, 1999; Szabo *et al.*, 1997) und/ oder (iii) Beeinflussung der Wirkungsweise von IL12 durch das Zusammenspiel mit verschiedenen Zytokinen wie beispielsweise IL10, IL4 oder TGF-β (Bohn & Autenrieth, 1996).

In dieser Arbeit wurden ex vivo und IL2 stimulierte NK-Zellen in vitro mit rekombinanten IL12 stimuliert, so dass Effekte von biologisch inaktivem IL12 ausgeschlossen werden können. In die Experimente wurden hochreine NK-Zell-Fraktionen eingesetzt, jedoch wurden die Überstände nicht auf antagonistische Zytokine durch verunreinigende Zellpopulationen untersucht. Die unterschiedliche Produktion von IFN-y nach IL12 Stimulation könnte auch in einer verminderten Expression der β2 Untereinheit des IL12R auf BALB/c NK-Zellen begründet sein. Von IL2 aktivierten NK-Zellen ist bereits bekannt, dass sie in zwei Subpopulationen ausdifferenzieren: IL12^{β2^{high}} und IL12^{β2^{low}}, welche sich auch in der Expression weiterer NK-Zell-Rezeptoren, wie Ly49G2 unterscheiden. Beide Subpopulationen sind in der Lage, nach IL12 Stimulation IFN-y zu produzieren, wobei deutlich mehr IL12B2high NK-Zellen IFN-y produzieren als IL12 β ²^{Iow} NK-Zellen. Unterschiede zwischen den verwendeten Mausstämmen in Bezug auf die Größe der IL12RB2 Subpopulationen wurden jedoch nicht untersucht (Chakir et al., 2000). Unsere Daten lassen die Hypothese zu, dass es zwischen BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen durchaus Unterschiede in den Anteilen der IL12β2^{high} und IL12β2^{low} Subpopulationen geben könnte, welche sich auch in der Fähigkeit hohe Mengen an IFN-y zu produzieren, unterscheiden. Auch eine regulatorische Funktion der NK-Zellen für die Polarisierung der Immunantwort scheint möglich und soll im nächsten Abschnitt untersucht werden.

D.2.2 Vergleichende Analysen der Transkriptionsantwort von BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen nach Stimulation mit IL12 + IL18 und NKG2D

Die Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen nach IL12 + IL18 Stimulation beschränken sich jedoch nicht nur auf die unterschiedliche IFN-Y

Produktion: Microarray-Analysen zeigen Unterschiede in der Höhe der Genexpressionswerte und den induzierten Genen. Um die Unterschiede zwischen den Mausstämmen aufzeigen zu können, wurden die Genexpressionswerte mittels 2-way Anova Analyse untersucht. Der Vergleich der Genexpressionsprofile von BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen nach IL12 + IL18 Stimulation zeigt, dass in der Gruppe der IL12 + IL18 induzierten Gene bei BALB/c, nicht jedoch C57BL/6, Gene aus dem Bereich der Immunantwort, des Immunsystems und der Lymphozyten-Aktivierung überzufällig häufig vertreten sind.

Bei einem der als differentiell exprimiert erkannten Gene in BALB/c NK-Zellen handelt es sich um itac. I-Tac wurde anfänglich als Agonist für den CXC Chemokin-Rezeptor 3 (CXCR3) erkannt und aktiviert CXCR3+ positive Zellen wie B-Zellen, NK-Zellen und Th1 T-Zellen (Cole et al., 1998; Loetscher et al., 1998; Qin et al., 1998). In einer weiteren Studie jedoch wurde I-TAC als Antagonist für die Chemokin-Rezeptoren 3 und 5 (CCR3 und CCR5) beschrieben. Der CCR3, welcher auf Th2 T-Zellen exprimiert wird, vermittelt nach Aktivierung Defensin-ähnliche, antimikrobielle Immunantworten, welche jedoch nach Bindung von I-TAC inhibiert werden (Loetscher et al., 2001). Des Weiteren hemmt I-TAC bei CCR5+ Zellen (periphere dendritische Zellen, Th1 T-Zellen und Monozyten) die Bindung von MIP-1a (macrophage inflammatory protein-1a) und anderer proinflammatorischer Chemokine, welche via CCR5 agieren, und wirkt als negativer Modulator für die Migration und Aktivierung von Leukozyten. Im Einzelnen hemmt die Bindung von I-TAC an CCR5 Chemotaxis, verhindert Änderungen des intrazellulären Ca²⁺ und inhibiert die Aktin-Polymerisation (Petkovic et al., 2004). Dieses Gen liefert ein erstes Indiz dafür, dass bei BALB/c NK-Zellen Gene induziert werden, welche unter bestimmten Voraussetzungen die Immunantwort negativ regulieren können.

C57BL/6 NK-Zellen dagegen induzieren nach IL12 + IL18 Stimulation *cd38*. CD38 gehört zur Familie der multifunktionalen Ektoenzyme, welche über Signalling und Zelladhäsionseigenschaften verfügen und extra- und intrazelluläre enzymatische Aktivität besitzen (Deaglio *et al.*, 2000). NK-Zellen werden durch CD38 aktiviert, indem CD38 zur Übermittelung von Signaltransduktionskaskaden an CD16, einem aktivierenden Rezeptor, bindet (Deaglio *et al.*, 2002). Nach Ligation von CD38 werden Transkriptionsfaktoren wie NFkB aktiviert, welche durch erhöhte Zytokin-Produktion zu einer inflammatorischen Immunantwort beitragen (Bofill & Borthwick, 2000). Die Relevanz von CD38 während einer bakteriellen Infektion wurde mit Hilfe von CD38-/- Mäusen nachgewiesen: diese zeigen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber einer *Mycobacterium avium* Infektion. Resistenz gegen *M. avium* ist mit hohen Mengen an IFN-γ während der Frühphase der Infektion assoziiert. Zu späteren Zeitpunkten ist zur Kontrolle der Infektion eine Th1 Immunantwort erforderlich. Bei Abwesenheit von CD38 sind die Tiere nicht in der Lage, die Infektion zu kontrollieren, da zum einen die Produktion von IFN-γ inhibiert wird und zum anderen durch erhöhte Produktion von IL4 eine Th2 Immunantwort induziert wird (Viegas *et al.*, 2007). Expression und Aktivierung von CD38 unterstützt also die Polarisierung der Immunantwort in Richtung Th1 und die Produktion von IFN-γ, dies ist wiederum auch für die Resistenz gegenüber einer Yersinien-Infektion notwendig. C57BL/6 NK-Zellen scheinen nach Stimulation mit IL12 + IL18 Gene zu induzieren, welche Resistenz gegen bakterielle Infektionen durch IFN-γ Produktion und Th1-gerichtete Immunantwort vermitteln, während in BALB/c NK-Zellen Gene induziert werden, welche über anti-inflammatorische Eigenschaften verfügen.

Weitere Hinweise für diese Hypothese zeigt der Vergleich der Genexpressionsprofile von BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen nach Aktivierung des NKG2D-Rezeptors. Nach Ligation wird in BALB/c NK-Zellen die Expression von axl induziert. Die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Axl gehört zur Tyro3/ Axl/ Mer (TAM) Familie (Lai & Lemke, 1991) und wird auf NK-Zellen und NK-Vorläuferzellen exprimiert. Auf NK-Vorläuferzellen reguliert Axl nach Aktivierung die Expression der meisten beschriebenen inhibitorischen und aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren. Des Weiteren sind die TAM-Rezeptoren auf noch unbekannte Weise in der Modulation der NK-Zell-Funktionen beteiligt (Caraux et al., 2006). In einer kürzlich erschienenen Studie wurden die TAM-Rezeptoren jedoch als Suppressoren des TLR-Signallings - durch Induktion von SOCS1 und SOCS3 (suppressor of cytokine signalling) - in dendritischen Zellen beschrieben (O'Neill, 2007; Rothlin et al., 2007). Aktivierung der TAM-Rezeptoren führt also bei NK-Zellen zu einer Regulation der Expression von NK-Zell-Rezeptoren und einer Modulation der NK-Zell-Rezeptor-vermittelten Funktionen von NK-Zellen. Möglich wäre aber auch eine negative Regulation der Zytokin-Produktion von NK-Zellen durch TAMbedingte Induktion von SOCS1 und SOCS3. Die Funktion der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Axl scheint also ambivalent zu sein und könnte zu einer Suppression der Zytokin-Produktion von BALB/c NK-Zellen beitragen.

Ein weiteres Gen, welches nur in BALB/c NK-Zellen nach Ligation des NKG2D-Rezeptors induziert wird, ist das Gen für das CD160 Protein, welches MHC I Moleküle erkennt und bindet. CD160 wird hauptsächlich auf zytolytischen Zellen wie CD8+ T-Zellen, NKT-Zellen und NK-Zellen exprimiert (Bensussan *et al.*, 1994; Maiza *et al.*, 1993). Nach Aktivierung exprimieren auch CD4+ T-Zellen CD160 auf ihrer Oberfläche, Ligation des CD160 mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern bewirkt jedoch eine

Inhibition der Proliferation und Zytokin-Produktion. CD160 bindet nicht nur an MHC I Moleküle, sondern auch an eine Vielzahl weiterer Liganden. (Cai *et al.*, 2008). Die Induktion von *cd160* und daraus resultierend eine mögliche Inhibition von BALB/c NK-Zellen durch Bindung bisher unbekannter Liganden an CD160 könnte somit zu einer Hemmung der IFN-γ Produktion führen.

Im Gegensatz zu BALB/c NK-Zellen werden auch nach Aktivierung von NKG2D in C57BL/6 NK-Zellen Gene induziert, welche Lymphozyten-Proliferation und Zytokin-Produktion ermöglichen. Ein Beispiel hierfür wäre GITR (Glucokorticoidinduzierter TNF-Rezeptor). GITR wurde auf T-Zellen, NK-Zellen und einigen Zellen der angeborenen Immunantwort nachgewiesen und wird durch den dazugehörigen Liganden GITRL, welcher hauptsächlich auf Makrophagen und dendritischen Zellen vorkommt, aktiviert (Kim et al., 2003; Yu et al., 2003). Die Interaktion von GITR/ GITRL aktiviert nicht nur die Rezeptor-tragenden Zellen, sondern auch die GITRLexprimierenden Zellen. So werden beispielsweise Makrophagen nach GITRL-Aktivierung zur Produktion proinflammatorischer Zytokine veranlasst (Shin et al., 2002). Die proinflammatorische Rolle von GITR wurde bisher in Bezug auf T-Zellen untersucht und beinhaltet eine umfangreiche Aktivierung von T-Effektor-Zellen durch Inhibition von T-Suppressor-Zellen (Krausz et al., 2007). Die Aktivierung von T-Zellen durch GITR resultiert in Proliferation und Zytokin-Produktion mittels NFkB- und MAPK-Signaltransduktionskaskaden (Esparza & Arch, 2005). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für NK-Zellen beschrieben (Hanabuchi et al., 2006). Bisher wurde der Einfluss von GITR nur im Zusammenhang mit viralen Erregern untersucht: nach Aktivierung des GITR durch Gabe von anti-GITR konnte in vivo eine reduzierte Virus-Last im Freund-Virus-Infektionsmodell nachgewiesen werden (Dittmer et al., 2004). GITR scheint also auch im Zusammenhang mit Pathogenen für eine proinflammatorische Immunantwort mitverantwortlich zu sein und so könnte Expression und Aktivierung von GITR auf C57BL/6 NK-Zellen diese zur Zytokin-Produktion anregen.

Der Vergleich der induzierten Gene von BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen nach Stimulation mit IL12 + IL18 und NKG2D zeigt also gravierende Unterschiede zwischen den exprimierten Genen und deren Funktionen auf. Während in BALB/c NK-Zellen Gene induziert werden, welche antiinflammatorische Eigenschaften aufweisen, werden in C57BL/6 NK-Zellen Gene für eine proinflammatorische Immunantwort induziert. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass bei BALB/c - im Gegensatz zu C57BL/6 - die Funktionen der NK-Zellen und eine Immunantwort durch die induzierten Gene negativ reguliert werden könnten. Dagegen werden in C57BL/6 NK-Zellen nach Stimulation Gene induziert, welche eine starke proinflammatorische Immunantwort gegenüber Infektionen ermöglichen. Die Ausprägung der Immunantwort und Resistenz gegen Pathogene scheinen also in Fall von NK-Zellen genetisch determiniert zu sein.

Insgesamt gesehen deuten die Daten dieser Arbeit darauf hin, dass speziell NK-Zellen einen großen Einfluss auf die Regulation einer Immunantwort haben und so mitverantwortlich sind für Resistenz oder Empfindlichkeit gegenüber einer Yersinien-Infektion. Ob überhaupt und wie NK-Zellen - als wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunantwort und Modulator der Polarisierung - durch Yersinien beeinflusst werden, soll im nächsten Abschnitt gezeigt werden.

D.3 Charakterisierung des Einflusses von *Y. enterocolitica* auf essentielle Funktionen von NK-Zellen

D.3.1 *Y. enterocolitica* bindet an NK-Zellen und inhibiert durch die Translokation von Yops Zytotoxizität und IFN-γ Produktion

NK-Zellen sind nicht nur wichtige Produzenten von IFN-y, sondern sind aufgrund der Fähigkeit, infizierte Zellen zu erkennen und zu lysieren, auch unmittelbar bei der Kontrolle unterschiedlicher Infektionen beteiligt. Diese Funktion konnte bisher bei zahlreichen Virus-Infektionen aber auch bei intrazellulären bakteriellen Erregern gezeigt werden (Vankayalapati et al., 2005). Dessen ungeachtet scheint die Hauptfunktion von NK-Zellen während bakterieller Infektionen in der Produktion proinflammatorischer Zytokine zu liegen. Dabei verläuft die Aktivierung der NK-Zellen einerseits indirekt über lösliche Signale von akzessorischen Zellen oder bakteriellen Substanzen, andererseits aber auch direkt durch Kontakt mit den Pathogenen selbst. So induziert das Enterotoxin B aus Staphylococcus bei humanen NK-Zellen die Produktion von IFN-y (D'Orazio et al., 1995) und nach Kontakt mit Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin (BCG) via NKp44 produzieren NK-Zellen nicht nur IFN-y, sondern auch Perforin und Granzym A (Batoni et al., 2005; Esin et al., 2008). Insgesamt wurde für eine Vielzahl nicht-viraler Erreger eine Aktivierung der NK-Zellen während der Infektion gezeigt: u.a. für Listeria monozytogenes (Dunn & North, 1991), Staphylococcus aureus (Haller et al., 2002) oder Leishmania infantum (Schleicher et al., 2007).

Die Kontrolle einer Yersinien-Infektion ist mit Produktion hoher Mengen von IFN-y während der Frühphase der Infektion assoziiert. In resistenten C57BL/6 Mäusen kann eine größere Menge an IFN-y in der Frühphase der Infektion nachgewiesen werden als in empfindlichen BALB/c Mäusen (Bohn *et al.*, 1994). Der genaue Grund für die unterschiedliche IFN-y Produktion ist bisher weitgehend ungeklärt. Es gibt starke Indizien dafür, dass unterschiedliche Zusammensetzungen im Zytokinprofil der Mausstämme die Immunantwort steuern, aber die Mechanismen sind unverstanden (Bohn & Autenrieth, 1996). Da Yersinien die NFkB- und MAPK-vermittelte Aktivierungen von Makrophagen und dendritische Zellen - beides Zelltypen der angeborenen Immunantwort – hemmen, stellt sich weiterhin die Frage, ob nicht auch NK-Zellen - als wichtigste IFN-y Produzenten während der Frühphase der Infektion - ein Ziel für Yersinien darstellen. Daher wurde in diesem Abschnitt untersucht, ob Yersinien überhaupt mit NK-Zellen interagieren und ob eine Interaktion die Funktionen der NK-Zellen beeinflusst.

Voraussetzung für eine Interaktion von Yersinien mit NK-Zellen ist eine Bindung der Bakterien an die Zellen. Die notwendige Bindung konnte in unseren Untersuchungen zweifelsfrei gezeigt werden: Yersinien binden Invasin-vermittelt an NK-Zellen beider Mausstämme, während die Bindung über YadA nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Mausstämme kann also nicht mit unterschiedlicher Bindungsaffinität der Yersinien an die NK-Zellen erklärt werden. Dabei unterscheiden sich BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen durchaus in der Expression gemeinsamer Oberflächenmarker. Während nahezu alle ex vivo isolierten BALB/c NK-Zellen den Pan-NK-Zell Marker DX5 – ein a2-Integrin - auf ihrer Oberfläche exprimieren, kann DX5 bei C57BL/6 NK-Zellen nur bei der Hälfte der Zellen nachgewiesen werden. Im Laufe der IL2 Stimulation nimmt die Zahl an DX5 positiven NK-Zellen ab (Arase et al., 2001). Das veränderte Oberflächenprofil der NK-Zellen hat jedoch keinen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit der Yersinien an die NK-Zellen, da Yersinien auch an IL2 stimulierte NK-Zellen sehr effizient mittels Invasin binden können. Als Bindungspartner von Invasin wurden ß1-Integrine identifiziert (Isberg & Barnes, 2001; Isberg & Leong, 1990; Schulte et al., 2000) und die Invasinβ1-Integrin Bindung wurde bereits für T-Zellen beschrieben (Arencibia *et al.*, 2002). Auch auf der Oberfläche von NK-Zellen werden β1-Integrine exprimiert (Gismondi et al., 1995), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Bindung von Invasin an β1-Intergrine der NK-Zelle erfolgt. Unsere Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass sich die Expression von β1-Integrinen auf der Oberfläche von NK-Zellen während der IL2 Stimulation nicht signifikant verändert. Des Weiteren kann auch davon ausgegangen werden, dass keine Unterschiede in der ß1-Intergrin Expression

zwischen den beiden Mausstämmen bestehen. Da Yersinien effizient an *ex vivo* und IL2 stimulierte NK-Zellen binden, kann weiterhin gefolgert werden, dass Yersinien auch mit NK-Zellen interagieren können.

Yersinien inhibieren sehr nachhaltig antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen. Eine Hemmung von NK-Zellen wäre eine weitere Möglichkeit der Yersinien die frühe Immunantwort zu supprimieren. Eine Suppression der adaptiven Immunantwort durch Yersinien ist bereits bekannt, wobei nicht klar ist, ob die Hemmung von B- und T-Zellen unmittelbar erfolgt oder ob die T-Zell-Antworten durch die Inhibition der antigenpräsentierenden Zellen vermindert wird (Trulzsch *et al.*, 2005). Insgesamt zeigen immer mehr Daten, dass die Yersinienvermittelte Hemmung der Immunantwort alle Bereiche des Immunsystems betrifft. Unsere Untersuchungen zeigen erstmalig, dass Yersinien *in vivo* wie auch *in vitro* NK-Zellen in Zytotoxizität und Zytokin-Produktion hemmen, ohne Apoptose zu induzieren. Als Voraussetzung für eine erfolgreiche Suppression der NK-Zellen durch Yersinien wurde außerdem die Translokation von Yops nachgewiesen. Welches der Effektorproteine verantwortlich für die Hemmung der NK-Zellen ist, soll im nächsten Abschnitt geklärt werden.

D.3.2 NK-Zell-Funktionen werden durch YopP-vermittelte Hemmung unterschiedlichster Signaltransduktionskaskaden supprimiert

Yersinien überleben und proliferieren extrazellulär. Um dies zu gewährleisten, manipulieren Yersinien die Immunantwort des Wirtes, indem sie (i) die Phagozytose der Bakterien verhindern, (ii) Zytokin-Produktion hemmen und (iii) Apoptose in *Yersinia*infizierten Zellen induzieren. Dafür translozieren Yersinien sechs Effektor-Proteine mittels TTSS in das Zytosol der Wirtszelle. YopP, YopE und vermutlich YopM verändern Signaltransduktionskaskaden und schwächen so die proinflammatorische Immunantwort ab. Durch YopT, YopE, YopO und YopH werden Umlagerungen des Zytoskeletts induziert und infolgedessen wird die Phagozytose der Yersinien durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten und Makrophagen gehemmt (Viboud & Bliska, 2005).

Unsere Untersuchungen identifizieren YopP als Hauptverursacher der Hemmung von NK-Zellen. YopP wurde bisher als für die Hemmung von antigenpräsentierenden Zellen verantwortlich beschrieben. Es inhibiert die Aktivierung von Makrophagen und induziert deren Apoptose (Ruckdeschel *et al.*, 1997b). Die



Inhibition der Zytokin-Produktion von Makrophagen erfolgt über Hemmung von NFkB und MAPK-Kinase Signalling (Haase et al., 2005; Ruckdeschel et al., 1997a; Ruckdeschel *et al.*, 1998). Auch in dendritischen Zellen verhindern ähnliche Mechanismen die Antigen-Aufnahme und Präsentation und induzieren Apoptose (Erfurth et 2004). Neben den gut untersuchten al., Interaktionen von YopP mit NFkB- und MAPK-Signaltransduktion, wurde auch die YopPvermittelte Inhibition der IL1 Signaltransduktionskaskade gezeigt (Thiefes et al., 2006). YopP interagiert mit einer großen Anzahl an Wirtsproteinen: (i) anfänglich wurde für YopP eine Cysteinprotease-Aktivität erkannt, wobei YopP die posttranslationalen Addition von Ubiquitinähnlichen Proteinen an viele regulatorische

Proteine hemmt (Orth *et al.*, 2000); (ii) später wurde gezeigt, dass YopP IkBa deubiquitiniert, so die proteasomale Degradation verhindert und infolge dessen NFkB-Signalling hemmt (Zhou *et al.*, 2005) und (iii) neueste Daten weisen für YopP eine Acetyltransferase-Aktivität nach, wodurch wichtige Serin- und Threoninreste der MAPKK6 derart modifiziert werden, dass keine Phosphorylierung mehr möglich ist (Mukherjee *et al.*, 2006; Mukherjee *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe unterschiedlicher Yersinien-Mutanten gezeigt werden, dass YopP die IL12 + IL18 vermittelte IFN-Y Produktion in NK-Zellen beider Mausstämme inhibiert. Da durch IL18 NFkB- und MAPK-Kinase-Signalling induziert wird, steht diese Beobachtung im Einklang mit der bisher publizierten Wirkungsweise von YopP. Zusätzlich dazu inhibiert YopP jedoch auch die IFN-Y Produktion von NK-Zellen nach Stimulation von IL12 allein. Die Signaltransduktion von IL12 verläuft über die Tyk2-STAT4-Kaskade (Cho *et al.*, 1996), welche in dieser Arbeit erstmals als Ziel von YopP erkannt wurde. Allerdings konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass IL12 auch p38 über MKK6 aktiviert, der genaue Mechanismus ist allerdings bis heute ungeklärt (Visconti *et al.*, 2000; Zhang & Kaplan, 2000).

Eine Hemmung der IL12 vermittelten IFN-y Produktion könnte also auch durch Inhibition der p38 Phosphorylierung durch YopP erklärt werden. Unsere Western Blot Analysen von Tyk2 und STAT4 zeigen allerdings eine Hemmung der Phosphorylierung dieser beiden Proteine bei Anwesenheit von YopP, was für eine direkte Interaktion mit YopP spricht. Es kann jedoch nicht unterschieden werden, ob YopP mit beiden Proteinen – Tyk2 und STAT4 – interagiert, oder der Effekt auf STAT4 ein *downstream* Effekt der Hemmung von Tyk2 ist. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Hemmung der Phosphorylierung des IL12R durch YopP. Ob diese Hemmung durch Acetylierung bedingt ist, kann derzeit nicht beurteilt werden.

Die fünf weiteren Yops scheinen keinen hemmenden Einfluss auf IFN-y Produktion nach Stimulation mit IL12 + IL18 oder IL12 allein zu haben. Auffällig ist, dass der YopP-vermittelte Hemmeffekt nach Deletion von YopM verstärkt zu sein scheint. YopM defiziente Yersinien hemmen die IFN-y Produktion effektiver als WA(pYV). Die Funktion von YopM ist indes bisher weitgehend ungeklärt. YopM bindet an die Kinasen RSK1 und PRK2, welche Bestandteile von Signalkaskaden zur Regulation von Zellwachstum, Apoptose und Translationsvorgängen sind (McDonald et al., 2003). Weiterhin kann YopM über einen Vesikel-assoziierten Transportweg in den Zellkern gelangen, die genaue Funktion und Wirkungsweise von YopM ist hier unbekannt (Skrzypek et al., 2003). Nach i.v. Infektion mit Y. pestis wurde gezeigt, dass sich die Produktion an proinflammatorischen Zytokinen in vivo, insbesondere IL12, IL18 und IFN-y, verringert. Ob diese Effekte auf die Interaktion von YopM mit Makrophagen, NK-Zellen oder beiden Zelltypen zurückzuführen sind, wurde in dieser Studie nicht untersucht (Kerschen et al., 2004). Unsere Daten sprechen gegen eine YopMvermittelte Hemmung von NK-Zellen nach Infektion mit Y. enterocolitica, sondern dafür, dass YopM auf unbekannte Weise den hemmenden Effekt von YopP in NK-Zellen attenuieren kann. So wäre es vorstellbar, dass YopM auch bei NK-Zellen in den Zellkern wandert und dort entweder direkt oder indirekt durch Wechselwirkung mit Wirtsproteinen Transkriptionsvorgänge positiv beeinflusst.

Nach Stimulation unterschiedlicher Oberflächenrezeptoren, deren Signaltransduktion über verschiedene Kaskaden verlaufen, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass YopP verschiedene Signaltransduktionskaskaden in unterschiedlichem Ausmaß hemmt. Nach Ligation des aktivierenden Rezeptors Ly49D wird nur eine geringe Hemmung der IFN-γ Produktion durch eine Yersinien-Infektion beobachtet. Ly49D bildet mit Dap12, welches ein ITAM enthält, ein Heterodimer und die Signalübermittlung erfolgt über Syk und Zap-70 (Lanier *et al.*, 1998; Vivier *et al.*, 2004). Möglicherweise wird diese Signaltransduktion nur gering von YopP beeinflusst.

Andererseits findet nach Ligation des NKG2D-Rezeptors eine starke Hemmung der IFN-y Produktion nach Yersinien-Infektion statt. Murines NKG2D bildet nicht nur mit Dap12 Heterodimere, sondern auch mit der verkürzten Form Dap10,

welche nicht über ein ITAM verfügt und mittels PβK und Grb2 die Signale weiterleitet (Upshaw & Leibson, 2006; Vivier *et al.*, 2004). Diese zweite Dimerbildung könnte erklären, warum die Dap12 vermittelte Resistenz nicht bei NKG2D nachweisbar ist. Deletion von YopP führt hier nicht zu einer Rekonstitution der IFN-γ Produktion, wie bei anderen Stimulatoren beobachtet. Dies lässt die Hypothese zu, dass andere Yops mit NKG2D Signalling interagieren. Denkbar wäre eine Interaktion von YopH: für YopH wurde bereits eine Hemmung der TZR-Signaltransduktionskaskade durch Dephosphorylierung von Lck und LAT beschrieben (Alonso *et al.*, 2004; Gerke *et al.*, 2005). Zum derzeitigen Zeitpunkt sind jedoch die Zytokin-induzierten Signalwege in NK-Zellen und die Unterschiede zu den entsprechenden Signaltransduktionskaskaden in T-Zellen nicht bis ins Detail bekannt, so dass für die Yersinien-bedingten Veränderungen dieser Kaskaden nur gemutmaßt werden kann.

Neben der Rezeptor-vermittelten Aktivierung können Lymphozyten auch durch die kombinierte Gabe von PMA/ Ionomycin unabhängig von aktivierenden Oberflächenrezeptoren zur IFN-γ Produktion angeregt werden. Dabei wirkt Ionomycin als Ca²⁺-Ionophor und sorgt zum einen für einen Kalzium-Einstrom in die Zellen, zum anderen schleust es PMA, einen Aktivator der PKC, ins Zellinnere. Durch die Stimulation mit PMA/ Ionomycin werden bei Lymphozyten PKC- und Kalzium-Signalwege aktiviert, welche wiederum weitere Signaltransduktionskaskaden wie beispielsweise JNK- oder NFκB-Signalling aktivieren können (Isakov & Altman, 2002; Mitsutake *et al.*, 2001). Die IFN-γ Produktion nach PMA/ Ionomycin Stimulation bei NK-Zellen wird durch YopP drastisch supprimiert. Eine Hemmung der PMA/ Ionomycin-vermittelten IFN-γ Produktion könnte also durch YopP-vermittelte Inhibition der NFκB-Signaltransduktionskaskade erklärt werden, dies wäre schlüssig zu der bisher publizierten Wirkungsweise von YopP.

Die Hemmung von NK-Zellen durch Yersinien beschränkt sich indes nicht nur auf die IFN-y Produktion, sondern auch die Fähigkeit, Zielzellen zu lysieren, wird inhibiert. Das Erkennen von Zielzellen, in unserem Fall die MHC-defiziente Yac-1 Zelllinie, induziert Signaltransduktionskaskaden, welche letztendlich zur Sekretion von Granzym und Perforin führen. Zur Induktion von natürlicher Zytotoxizität werden in NK-Zellen über eine Vielzahl an aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren ähnliche Signaltransduktionskaskaden verwendet, die auch für die Produktion von Zytokinen aktiviert werden. Zum derzeitigen Zeitpunkt sind die Signaltransduktionskaskaden, welche natürliche Zytotoxizität vermitteln, noch nicht bis ins Detail charakterisiert, jedoch ist von Syk, Vav, LAT, ERK und p38 bekannt, dass sie eine Rolle in der Ausbildung von natürlicher Zytotoxizität spielen (Chini *et al.*, 2000; Vivier *et al.*, 2004). Auch durch *cross-linking* von β1-Integrinen kann Zytoxizität vermittelt werden, dabei werden Ras/ MAPK-Signaltransduktionskaskaden aktiviert (Mainiero *et al.*, 1998). Die *Yersinia*-Effektor-Proteine YopP und YopH interagieren mit Signalling via MAPK, ERK und Ras und inhibieren diese Signaltransduktionskaskaden effektiv (Liang *et al.*, 2003; Orth *et al.*, 1999; Ruckdeschel *et al.*, 1997a). So wird in neutrophilen Granulozyten der β1-Pathway, welcher durch die Invasin-Bindung aktiviert wird, effektiv durch YopH inhibiert (Persson *et al.*, 1999). Eine Hemmung der Zytotoxizität von NK-Zellen durch Yersinien kann also durch Hemmung der entsprechenden Signaltransduktionskaskaden durch YopP und YopH erklärt werden und steht im Einklang mit der bisher beschriebenen Wirkungsweise dieser Yops.

D.4 Transkriptionsantwort von NK-Zellen nach Infektion mit Y. enterocolitica

In den vorhergehenden Abschnitten konnte gezeigt werden, dass eine Infektion von BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen mit *Y. enterocolitica* die zelluläre Signaltransduktion für IFN-γ Produktion und Induktion natürlicher Zytotoxizität mittels YopP modifiziert. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen nach einer Yersinien-Infektion in Bezug auf Resistenz oder Empfindlichkeit aufgezeigt werden: sowohl BALB/c als auch C57BL/6 NK-Zellen werden durch Yersinien in IFN-γ Produktion und Zytotoxizität gehemmt. Aus diesem Grund soll die transkriptionelle Antwort von BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen auf eine Yersinien-Infektion in diesem Abschnitt untersucht und verglichen werden. Aufgrund der vielfältigen immunsuppressiven Strategien von *Y. enterocolitica* kann postuliert werden, dass eine Infektion von NK-Zellen mit Yersinien nicht nur die Induktion von IFN-γ und die natürliche Zytotoxizität beeinflusst, sondern Änderungen eines signifikanten Anteils der transkribierten Gene hervorruft.

Um die Transkriptionsantwort auf eine Yersinien-Infektion zu charakterisieren, wurden *ex vivo* isolierte BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen *in vitro* für 7 Tage mit IL2 stimuliert, um so NK-Zell-Populationen mit sehr hoher Reinheit zu generieren. Die hohe Reinheit bewirkt, dass die Transkriptionsantwort auf Yersinien nicht durch Faktoren anderer Zellen überdeckt wird. Aufgrund der gewählten Bedingungen lassen sich fünf Einflussgrößen auf das Expressionsprofil der NK-Zellen definieren: (i) An- oder Abwesenheit der Bakterien, (ii) der zur Infektion gewählte Bakterienstamm (iii) der

genetische Hintergrund der beiden untersuchten Mausstämme, (iv) die experimentellen Replikate (1-3) und (v) An- bzw. Abwesenheit der unterschiedlichen Stimuli. Durch die hierarchische Clusteranalyse über den gesamten Datensatz konnte nachgewiesen werden, dass der Einfluss der verschiedenen Stimuli und Anwesenheit von Bakterien einen größeren Einfluss auf das Transkriptom der NK-Zellen haben als der genetische Hintergrund. Innerhalb der experimentellen Bedingungen gruppieren sich überwiegend die Proben der drei Replikate, die Reproduzierbarkeit des Experimentes ist also sehr hoch.

D.4.1 Yersinien verändern die Genexpression NKG2D stimulierter NK-Zellen

Neben der Aktivierung durch Zytokine werden NK-Zellen auch durch das Zusammenspiel der unterschiedlichen NK-Zell-Rezeptoren aktiviert. So erkennen NK-Zellen BCG via NKp44 und werden durch diesen Kontakt zur Produktion von IFN-γ, Perforin und Granzym A angeregt (Batoni *et al.*, 2005; Esin *et al.*, 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch nach Ligation des NKG2D-Rezeptors NK-Zellen IFN-γ produzieren und des Weiteren durch Yersinien die IFN-γ Produktion inhibiert werden kann. Der Vergleich der Genexpressionsprofile von BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen nach NKG2D Stimulation zeigt Unterschiede in den induzierten Genen zwischen den Mausstämmen, wobei es sich dabei durchaus auch um Gene aus dem Bereich der Immunantwort handelt (siehe Abschnitt D.2.2). Somit kann auch für *Yersinia*-infizierte NK-Zellen nach NKG2D Stimulation postuliert werden, dass (i) Veränderungen des Genexpressionsprofils durch Yersinien nicht nur die Induktion von *ifn*γ betrifft, sondern einen signifikanten Anteil der transkribierten Gene und (ii) Yersinien die Genexpressionsprofile von BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen nach NKG2D Stimulation in unterschiedlicher Weise verändern.

Um den Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Transkriptionsantwort von NK-Zellen nach einer Yersinien-Infektion zu untersuchen, wurden die generierten Genexpressionswerte mit Hilfe der 2-way Anova Analyse ausgewertet und Expressionsprofile erstellt, welche Unterschiede zwischen BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen nach Ligation des NKD2D-Rezeptors und nach Infektion mit *Y. enterocolitica* aufzeigen. So konnten Gruppen von Genen identifiziert werden, deren differentielle Expression vorrangig vom genetischen Hintergrund abhängt. Das erstellte Genexpressionsprofil umfasst 129 Gene, welche bei einer FDR von 10% als differentielle exprimiert erkannt werden. Änderungen der Genexpression nach NKG2D Stimulation durch Yersinien erfolgen auf zwei Arten: zum einen werden NKG2D induzierte Gene durch Yersinien supprimiert und zum anderen werden NKG2D supprimierte Gene durch Yersinien induziert. Insgesamt wird die Expression von 70% der als differentiell erkannten Gene durch Yersinien beeinflusst, das Genexpressionsprofil der NK-Zellen wird also deutlich verändert.

Interessanterweise wird die Genexpression NKG2D stimulierter C57BL/6 NK-Zellen stärker beeinflusst als die von BALB/c NK-Zellen. So werden bei C57BL/6 NK-Zellen 35 Gene, welche nach Ligation des NKG2D-Rezeptors induziert werden, nach Infektion mit WA(pYV) supprimiert, während die entsprechende Gruppe an Genen bei BALB/c NK-Zellen nur 17 Gene umfasst. Die Ligation von NKG2D resultiert bei C57BL/6 NK-Zellen in einer Induktion proinflammatorischer Gene (siehe Abschnitt D.2.2). Bei einem Beispiel handelt es sich dabei um coronin1, welches bei Mycobakterien ein intrazelluläres Überleben in Makrophagen sichert, indem es die Fusion von Phagosom und Lysosom verhindert (Ferrari et al., 1999; Jayachandran et al., 2007; Nguyen & Pieters, 2005). In weiteren Untersuchungen wurde Coronin-1 bei T-Zellen als eine wichtige Komponente für die Mobilisation intrazellulären Ca²⁺ identifiziert (Mueller et al., 2008). Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺ ist essentiell für das Überleben und die Aktivierung von T-Zellen (Gallo et al., 2006) und auch bei NK-Zellen werden durch erhöhte Ca²⁺ Konzentration Signalwege aktiviert, welche wiederum proinflammatorische Signaltransduktionskaskaden wie beispielsweise JNKoder NFkB-Signalling aktivieren können. Eine mögliche Aktivierung von C57BL/6 NK-Zellen kann in diesem Fall durch Yersinien-bedingte Suppression von Coronin-1 verhindert werden.

Bei BALB/c NK-Zellen dagegen werden durch NKG2D Gene induziert, welche NK-Zellen in ihren Funktionen hemmen könnten. Überraschenderweise wird die NKG2D-bedingte Induktion von *axl*, welches sowohl die Expression von NK-Zell-Rezeptoren und die NK-Zell-Rezeptor-vermittelten Funktionen reguliert wie auch die Zytokin-Produktion durch TAM-bedingte Induktion von SOCS1 und SOCS3 hemmt (siehe Abschnitt D.2.2), durch Yersinien supprimiert. Eine mögliche Hemmung der BALB/c NK-Zellen durch NKG2D Ligation kann folglich durch Yersinien aufgehoben werden.

Die Induktion bzw. Suppression der angeführten Gene ist erstaunlich, da dieser Arbeit die Hypothese zugrunde liegt, dass die unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Mausstämme mindestens teilweise auf Unterschiede in den NK-Zell-Funktionen zurückzuführen ist. Inwiefern Ligation des NKG2D-Rezeptors *in vivo*

während einer bakteriellen Infektion stattfindet und ob die NKG2D-bedingte Aktivierung von NK-Zellen in diesem Kontext relevant ist, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht, sondern nur als weitere Option der bakteriellen Hemmung von NK-Zellen in Betracht gezogen. Zum derzeitigen Zeitpunkt sind die Funktionen der NK-Zell-Rezeptoren während einer bakteriellen Infektion weitgehend unbekannt. Im *in vivo* Infektionsmodell wurde die Regulation der Immunantwort insbesondere in Hinsicht auf die Zytokine IL12 und IL18 untersucht. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle und Elimination einer Yersinien-Infektion (Bohn *et al.*, 1998; Bohn & Autenrieth, 1996). Deshalb soll im nächsten Abschnitt die Wirkung von Yersinien auf die Transkriptionsantwort von IL12 + IL18 stimulierten BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen vergleichend untersucht werden.

D.4.2 Yersinien beeinflussen das Genexpressionsprofil IL12 + IL18 stimulierter NK-Zellen

Der Einfluss von IL12 und IL18 auf NK-Zellen wurde als mitentscheidend für die Ausprägung der Immunantwort beschrieben und kann als ausschlaggebend für die Ausprägung von Resistenz oder Empfindlichkeit gegen eine Yersinien-Infektion gewertet werden (Bohn *et al.*, 1998; Bohn & Autenrieth, 1996). Unsere Daten zeigen, dass zum einen BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen unterschiedliche Mengen an IFN-γ nach Stimulation mit IL12 + IL18 produzieren, diese IFN-γ Produktion gleichermaßen von YopP gehemmt wird und zum anderen sich die Genexpressionsprofile von BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen nach IL12 + IL18 Stimulation unterscheiden. Daher lässt sich die diesem Abschnitt zugrunde liegende Hypothese aufstellen, welche besagt, dass (i) Veränderungen des Genexpressionsprofils durch Yersinien nicht nur die Induktion von *ifn*γ nach IL12 + IL18 Stimulation betreffen, sondern einen signifikanten Anteil der transkribierten Gene und (ii) Yersinien die Genexpressionsprofile von BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen nach IL12 + IL18 Stimulation in unterschiedlicher Weise verändern.

Die generierten Daten wurden wie unter Abschnitt D.4.1 beschrieben ausgewertet. Insgesamt handelt es sich hierbei um 171 Gene, welche bei einer FDR von 10% als differentiell exprimiert erkannt werden. Die Genexpressionsanalysen zeigen weiterhin, dass Yersinien auf zwei Wegen Änderungen der Genexpression nach IL12 + IL18 Stimulation verursachen: (i) zum einen durch Suppression der IL12 + IL18 bedingten Induktion der mRNA Transkription und (ii) zum anderen durch Hemmung von IL12 + IL18 vermittelter Suppression der mRNA Transkription. Insgesamt

wird die Expression von 69% der IL12 + IL18 induzierten Gene durch Yersinien beeinflusst, das Genexpressionsprofil der NK-Zellen wird dramatisch verändert.

Dabei zeigen sich Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen: bei BALB/c NK-Zellen werden 41 Gene, welche durch IL12 + IL18 induziert werden und hauptsächlich Gene aus dem Bereich der Immunantwort, Antigen-Prozessierung und Präsentation umfassen, nach Infektion mit WA(pYV) nicht mehr induziert, während die entsprechende Gruppe an Genen bei C57BL/6 NK-Zellen nur 21 Gene beinhaltet. So kann davon ausgegangen werden, dass Yersinien in BALB/c NK-Zellen effektiver proinflammatorische Immunantworten durch Suppression induzierter Gene unterdrücken. Beispiele für supprimierte Gene aus dem Bereich der Immunantwort nach Yersinien-Infektion wären die bereits unter Abschnitt D.2.2 detailliert beschriebenen Gene *itac* (BALB/c), welches die Immunantwort sowohl in proinflammatorische wie auch antiinflammatorische Richtung regulieren kann (Petkovic *et al.*, 2004) oder *cd38* (C57BL/6), welches als mitentscheidend für die Resistenz gegenüber einer *M. avium*-Infektion beschrieben wurde (Viegas *et al.*, 2007).

Yersinien modulieren das Transkriptionsprofil auf eine zweite Weise zu ihren Gunsten: neben der zuvor erläuterten Suppression proinflammatorischer Gene werden durch Yersinien antiinflammatorische Gene induziert, um die Immunantwort zu inhibieren. Auch hier zeigt der Vergleich der entsprechenden Gruppen Unterschiede zwischen den Mausstämmen: bei BALB/c NK-Zellen werden 36 Gene nach Infektion mit WA(pYV) induziert, während die entsprechende Gruppe an Genen bei C57BL/6 NK-Zellen nur 22 Gene beinhaltet. So kann davon ausgegangen werden, dass Yersinien in BALB/c NK-Zellen effektiver antiinflammatorische Immunantworten durch Induktion der entsprechenden Gene hervorrufen.

Ein Beispiel für die Induktion antiinflammatorischer Gene in beiden Mausstämmen wäre *cd160* (bereits unter Abschnitt D.2.2 beschrieben), welches Proliferation und Zytokin-Produktion hemmen kann (Cai *et al.*, 2008). Bei einem weiteren Gen, welches in BALB/c NK-Zellen nach Infektion mit *Y. enterocolitica* induziert wird, handelt es sich um *ccr6*. Insbesondere der Chemokin-Rezeptor 6 (CCR6) scheint bei der Resistenz gegenüber einer Yersinien-Infektion eine entscheidende Rolle zu spielen: CCR6 defiziente Mäuse sind resistent gegenüber einer Yersinien-Infektion. Die PP von CCR6^{-/-} Mäusen sind verkleinert und im Follikelassoziierten Epithel (FAE) der PP fehlen die M-Zellen, welche insbesondere für Yersinien eine Eintrittspforte in die PP darstellen. Die Abwesenheit von CCR6 verhindert somit eine Kolonisation der PP nach oraler Infektion mit Yersinien und folglich eine

Dissemination der Bakterien in weitere lymphatische Gewebe (Westphal *et al.*, 2008). Weiterhin wurde beschrieben, dass CCR6 defiziente dendritische Zellen höhere Mengen an IL12 sezernieren (Lugering *et al.*, 2005) und so eine proinflammatorische Immunantwort unterstützen. Ob die Induktion von CCR6 auf NK-Zellen eine Yersinien-Infektion begünstigen kann, oder ob *ccr6* in allen Yersinien-infizierten Zellen induziert wird – also auch in den Zellen des FAE – und so letztendlich eine Infektion fördern kann, kann hier nicht geklärt werden.

In C57BL/6 NK-Zellen wird jedoch durch eine Yersinien-Infektion die Expression mancher IL12 + IL8 induzierter Gene verstärkt. Diese könnten die Resistenz gegenüber einer Infektion steigern. Als Beispiel wäre hier *coronin1* genannt, welches durch Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration proinflammatorische Signalwege aktiviert (siehe Abschnitt D.4.1). Die verstärkte Induktion dieses Gens durch Yersinien könnte also kontraproduktiv für eine erfolgreiche Infektion sein, indem es zu einer möglichen Aktivierung der NK-Zellen und folglich zur Resistenz von C57BL/6 gegenüber einer Yersinien-Infektion beitragen könnte.

Der Vergleich der Genexpressionsprofile von *Yersinia*-infizierten BALB/c und C57BL/6 NK-Zellen nach IL12 + IL18 Stimulation zeigt, dass (i) Yersinien die Expression einer größeren Anzahl an Genen in BALB/c NK-Zellen beeinflussen, um eine antiinflammatorische Immunantwort hervorzurufen und (ii) in C57BL/6 NK-Zellen durch Yersinien auch Gene induziert werden, welche zur Kontrolle der Infektion und somit zur Resistenz beitragen können. Als Haupteffektor für die Hemmung des proinflammatorischen Genexpressionsprogramms in Makrophagen konnte in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe YopP identifiziert werden. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die hier beobachtete Suppression der durch IL12 + IL18 induzierten proinflammatorischen Genexpression ebenfalls hauptsächlich auf YopP zurückzuführen sein könnte, dies würde im Einklang stehen mit den weiteren Daten dieser Arbeit.

D.5 Die Hemmung der NK-Zellen findet auch in vivo statt

Bisher wurde ausschließlich gezeigt, dass NK-Zellen während einer bakteriellen Infektion aktiviert werden. Die Aktivierung kann sowohl über lösliche Signale von akzessorischen Zellen oder bakteriellen Substanzen als auch durch direkten Kontakt mit dem Pathogen induziert werden. *Staphylococcus* sezerniert das

Enterotoxin B, welches bei humanen NK-Zellen die Produktion von IFN-y induziert (D'Orazio *et al.*, 1995) und nach Kontakt mit BCG via NKp44 produzieren NK-Zellen nicht nur IFN-y, sondern auch Perforin und Granzym A (Batoni *et al.*, 2005; Esin *et al.*, 2008). Insgesamt wurde für eine Vielzahl nicht-viraler Erreger eine Aktivierung der NK-Zellen während der Infektion gezeigt: u.a. für *Listeria monozytogenes* (Dunn & North, 1991), *Staphylococcus aureus* (Haller *et al.*, 2002) oder *Leishmania infantum* (Schleicher *et al.*, 2007). In dieser Arbeit dagegen konnte erstmalig gezeigt werden, dass NK-Zellen auch *in vivo* durch einen bakteriellen Erreger effektiv in der IFN-y Produktion gehemmt werden. Auch *in vivo* konnte das *Yersinia*-Effektor-Protein YopP als hauptverantwortlich für die Hemmung der NK-Zellen identifiziert werden. Die Beobachtungen, dass NK-Zellen während einer Infektion nicht nur durch unterschiedliche Signale aktiviert werden können, sondern - wie in dieser Arbeit gezeigt - durch Yersinien in ihren proinflammtorischen Funktionen inhibiert werden, lassen den Schluss zu, dass Yersinien die entscheidenden Zellpopulationen der frühen Immunantwort hemmen können, um eine Etablierung der Infektion zu ermöglichen.

E Zusammenfassung

Yersinien sind gram-negative Bakterien, welche nach Infektion lymphatische Organe wie PP oder Milz besiedeln und dort Mikrokolonien bilden. In der Analyse der systemischen Immunantwort einer Yersinien-Infektion wurde das Gewebe im Bereich der Mikrokolonien mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen von Milzquerschnitten analysiert. Die mikroskopische Auswertung zeigte eine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zu den Yersinien-Abszessen bei BALB/c und C57BL/6 Mäusen. Der Einstrom an Granulozyten im Verlauf der Infektion wurde durchflusszytometrisch bestätigt. Der Vergleich von BALB/c und C57BL/6 Milzquerschnitten zeigte Unterschiede in der Lokalisation der Yersinien-Mikrokolonien. Während in C57BL/6 Mäusen die Abszesse statistisch verteilt sind, zeigt sich bei BALB/c Mäusen ein Tropismus der Yersinien zu den Lymphfollikeln, insbesondere der B-Zell-Bereiche. Auch die Lokalisation von CD4+ T-Zellen unterscheidet sich: bei C57BL/6 konnte im Gegensatz zu BALB/c eine Co-Lokalisation von CD4+ T-Zellen und dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Zur Elimination von Yersinien-Infektionen wurde bisher eine starke T-Zell-Antwort als erforderlich beschrieben. Diese wird durch ein effektives Priming der T-Zellen mittels akzessorischer Zellen induziert, welches wiederum einen Kontakt zwischen den beiden Zelltypen voraussetzt. Demnach lässt sich die Hypothese aufstellen, dass aufgrund der Co-Lokalisation von CD4+ T-Zellen und dendritischen Zellen bei C57BL/6 Mäusen eine stärkere adaptive Immunantwort hervorgerufen wird als bei BALB/c Mäusen und die Tiere aufgrund dessen in der Lage sind, die Infektion mit Beginn der adaptiven Immunantwort besser zu kontrollieren.

Die Resistenz von C57BL/6 Mäusen gegen eine Yersinien-Infektion ist aber auch mit der Induktion hoher Mengen an IFN-y während früher Infektionsstadien - vor dem Einsetzen der adaptiven Immunantwort - assoziiert. Hauptproduzenten von IFN-y während früher Infektionsphasen sind nicht T-Zellen, sondern NK-Zellen, welche ohne antigenspezifische Aktivierung reagieren können. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass NK-Zellen beider Mausstämme sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nach Infektion mit Yersinien in Zytotoxizität und Zytokin-Produktion gehemmt werden. Als Hauptverursacher dieser Hemmung konnte das Yersinien-Effektor-Protein YopP identifiziert werden. Von YopP ist bisher bekannt, dass es die NFKB- und MAPK-Signaltransduktionskaskaden in Makrophagen und dendritischen Zellen hemmt. In NK-Zellen inhibiert YopP die IL12 + IL18 vermittelte IFN-y Produktion. Da durch IL18 NFkB- und MAPK-Kinase Signalling induziert wird, ist diese Beobachtung schlüssig zu der bisher publizierten Wirkungsweise von YopP. Zusätzlich dazu hemmt YopP jedoch auch die IFN-y Produktion von NK-Zellen nach Stimulation mit IL12 alleine. Die Signaltransduktion von IL12 verläuft über die Tyk2-STAT4-Kaskade, welche bisher nicht als Ziel von YopP beschrieben wurde. Durch phoshospezifische Western Blots von Tyk2 und STAT4 konnte eine Hemmung der Phosphorylierung dieser beiden Proteine bei Anwesenheit von YopP nachgewiesen werden. Die Inhibition der IFN-y Produktion durch YopP ist jedoch nicht spezifisch für IL12 + IL18, sondern findet auch nach Stimulation von NK-Zellen via Ly49D, NKG2D und PMA/ Ionomycin statt (in unterschiedlichen Ausmaß). Mit Hilfe von Microarray-Analysen infizierter NK-Zellen konnte gezeigt werden, dass nicht nur die IFN-y Produktion durch Yersinien gehemmt wird, sondern dass die Expression sämtlicher Gene, welche für proinflammatorische Proteine codieren, nach IL12 + IL18 Stimulation supprimiert wird. Insgesamt zeigen diese Daten, dass YopP mehrere aktivierende Signaltransduktionskaskaden in NK-Zellen inhibiert, speziell wurde in dieser Arbeit die Hemmung der Jak-STAT-Kaskade nachgewiesen. Somit trägt YopP - durch Suppression der frühen IFN-y Produktion - zur Etablierung der Yersinien-Infektion bei. Die Hemmung von NK-Zellen durch ein bakterielles Pathogen wurde in dieser Form bisher nicht beschrieben und konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden.

F Literaturverzeichnis

- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K. & Akira, S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9, 143-150.
- 2. Adkins, I., Koberle, M., Grobner, S., Bohn, E., Autenrieth, I. B. & Borgmann, S. (2007). Yersinia outer proteins E, H, P, and T differentially target the cytoskeleton and inhibit phagocytic capacity of dendritic cells. *Int J Med Microbiol* 297, 235-244.
- 3. Aepfelbacher, M. (2004). Modulation of Rho GTPases by type III secretion system translocated effectors of Yersinia. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 152, 65-77.
- 4. Aepfelbacher, M., Zumbihl, R. & Heesemann, J. (2005). Modulation of Rho GTPases and the actin cytoskeleton by YopT of Yersinia. *Curr Top Microbiol Immunol* 291, 167-175.
- 5. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Aktas, E., Akdis, M., Bilgic, S., Disch, R., Falk, C. S., Blaser, K., Akdis, C. & Deniz, G. (2005).Different natural killer (NK) receptor expression and immunoglobulin E (IgE) regulation by NK1 and NK2 cells. *Clin Exp Immunol* 140, 301-309.
- 7. Albert, M. L., Sauter, B. & Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392**, 86-89.
- Alonso, A., Bottini, N., Bruckner, S., Rahmouni, S., Williams, S., Schoenberger, S. P. & Mustelin, T. (2004).Lck dephosphorylation at Tyr-394 and inhibition of T cell antigen receptor signaling by Yersinia phosphatase YopH. J Biol Chem 279, 4922-4928.
- Andor, A., Trulzsch, K., Essler, M., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Heesemann, J. & Aepfelbacher, M. (2001). YopE of Yersinia, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol* 3, 301-310.
- Angot, A., Vergunst, A., Genin, S. & Peeters, N. (2007). Exploitation of eukaryotic ubiquitin signaling pathways by effectors translocated by bacterial type III and type IV secretion systems. *PLoS Pathog* 3, e3.
- 11. Arase, H., Mocarski, E. S., Campbell, A. E., Hill, A. B. & Lanier, L. L. (2002).Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 296, 1323-1326.
- 12. Arase, H., Saito, T., Phillips, J. H. & Lanier, L. L. (2001). Cutting edge: the mouse NK cellassociated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha 2 integrin, very late antigen-2). *J Immunol* 167, 1141-1144.
- Arencibia, I., Frankel, G. & Sundqvist, K. G. (2002). Induction of cell death in T lymphocytes by invasin via beta1-integrin. Eur J Immunol 32, 1129-1138.

- Autenrieth, I. B., Beer, M., Bohn, E., Kaufmann, S. H. & Heesemann, J. (1994). Immune responses to Yersinia enterocolitica in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon. Infect Immun 62, 2590-2599.
- 15. Autenrieth, I. B., Bohn, E., Beer, M., Preger, S., Heinze, G. & Heesemann, J. (1995). Role of T-helper-cell subtypes and cytokines in immunity to Yersinia enterocolitica in susceptible and resistant strains of mice. *Contrib Microbiol Immunol* 13, 203-206.
- Autenrieth, I. B. & Schmidt, M. A. (2000). Bacterial interplay at intestinal mucosal surfaces: implications for vaccine development. *Trends Microbiol* 8, 457-464.
- 17. Autenrieth, I. B., Tingle, A., Reske-Kunz, A. & Heesemann, J. (1992). Tymphocytes mediate protection against Yersinia enterocolitica in mice: characterization of murine T-cell clones specific for Y. enterocolitica. *Infect Immun* 60, 1140-1149.
- Autenrieth, I. B., Vogel, U., Preger, S., Heymer, B. & Heesemann, J. (1993). Experimental Yersinia enterocolitica infection in euthymic and T-cell-deficient athymic nude C57BL/6 mice: comparison of time course, histomorphology, and immune response. *Infect Immun* 61, 2585-2595.
- Bacon, C. M., McVicar, D. W., Ortaldo, J. R., Rees, R. C., O'Shea, J. J. & Johnston, J. A. (1995a). Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. J Exp Med 181, 399-404.
- Bacon, C. M., Petricoin, E. F., III, Ortaldo, J. R., Rees, R. C., Larner, A. C., Johnston, J. A. & O'Shea, J. J. (1995b). Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7307-7311.
- Balada-Llasat, J. M. & Mecsas, J. (2006). Yersinia has a tropism for B and T cell zones of lymph nodes that is independent of the type III secretion system. *PLoS Pathog* 2, e86.
- Batoni, G., Esin, S., Favilli, F., Pardini, M., Bottai, D., Maisetta, G., Florio, W. & Campa, M. (2005). Human CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets respond differentially to direct stimulation with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin. Scand J Immunol 62, 498-506.
- Bellone, M., Iezzi, G., Rovere, P., Galati, G., Ronchetti, A., Protti, M. P., Davoust, J., Rugarli, C. & Manfredi, A. A. (1997). Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. *J Immunol* 159, 5391-5399.
- 24. **Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995).**Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statisticial Society* **57**, 289-300.
- 25. Bensussan, A., Gluckman, E., el, M. S., Schiavon, V., Mansur, I. G., Dausset, J., Boumsell, L. & Carosella, E. (1994).BY55 monoclonal antibody delineates within human cord blood and bone marrow lymphocytes distinct cell subsets mediating cytotoxic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9136-9140.
- Bette, M., Jin, S. C., Germann, T., Schafer, M. K., Weihe, E., Rude, E. & Fleischer, B. (1994).Differential expression of mRNA encoding interleukin-12 p35 and p40 subunits in situ. Eur J Immunol 24, 2435-2440.
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. & Salazar-Mather, T. P. (1999).Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17, 189-220.

Literaturverzeichnis

- 28. Black, D. S. & Bliska, J. B. (2000). The RhoGAP activity of the Yersinia pseudotuberculosis cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol* **37**, 515-527.
- Black, R. E., Jackson, R. J., Tsai, T., Medvesky, M., Shayegani, M., Feeley, J. C., MacLeod, K. I. & Wakelee, A. M. (1978). Epidemic Yersinia enterocolitica infection due to contaminated chocolate milk. N Engl J Med 298, 76-79.
- 30. Bleves, S. & Cornelis, G. R. (2000). How to survive in the host: the Yersinia lesson. *Microbes Infect* 2, 1451-1460.
- 31. **Bofill, M. & Borthwick, N. J. (2000).**CD38 in health and disease. *Chem Immunol* **75**, 218-234.
- Bohn, E. & Autenrieth, I. B. (1996).IL-12 is essential for resistance against Yersinia enterocolitica by triggering IFN-gamma production in NK cells and CD4+ T cells. J Immunol 156, 1458-1468.
- Bohn, E., Heesemann, J., Ehlers, S. & Autenrieth, I. B. (1994). Early gamma interferon mRNA expression is associated with resistance of mice against Yersinia enterocolitica. *Infect Immun* 62, 3027-3032.
- Bohn, E., Sing, A., Zumbihl, R., Bielfeldt, C., Okamura, H., Kurimoto, M., Heesemann, J. & Autenrieth, I. B. (1998).IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice. J Immunol 160, 299-307.
- 35. **Boland, A. & Cornelis, G. R. (1998).** Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during Yersinia infection. *Infect Immun* 66, 1878-1884.
- 36. Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier, L. L. & McMichael, A. J. (1998).HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. Nature 391, 795-799.
- 37. Bretscher, P. & Cohn, M. (1970). A theory of self-nonself discrimination. Science 169, 1042-1049.
- Bright, J. J. & Sriram, S. (1998).TGF-beta inhibits IL-12-induced activation of Jak-STAT pathway in T lymphocytes. J Immunol 161, 1772-1777.
- 39. Brown, M. G., Dokun, A. O., Heusel, J. W., Smith, H. R., Beckman, D. L., Blattenberger, E. A., Dubbelde, C. E., Stone, L. R., Scalzo, A. A. & Yokoyama, W. M. (2001). Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 292, 934-937.
- 40. Brown, M. G., Scalzo, A. A., Matsumoto, K. & Yokoyama, W. M. (1997). The natural killer gene complex: a genetic basis for understanding natural killer cell function and innate immunity. *Immunol Rev* 155, 53-65.
- 41. Brubaker, R. R. (2003).Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to Yersiniae: roles of Yops and LcrV (V antigen). *Infect Immun* 71, 3673-3681.
- 42. Busch, D. H., Pilip, I. M., Vijh, S. & Pamer, E. G. (1998). Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* 8, 353-362.
- Cai, G., Anumanthan, A., Brown, J. A., Greenfield, E. A., Zhu, B. & Freeman, G. J. (2008).CD160 inhibits activation of human CD4+ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol* 9, 176-185.

- Caraux, A., Lu, Q., Fernandez, N., Riou, S., Di Santo, J. P., Raulet, D. H., Lemke, G. & Roth, C. (2006). Natural killer cell differentiation driven by Tyro3 receptor tyrosine kinases. *Nat Immunol* 7, 747-754.
- 45. Carter, R. S., Pennington, K. N., Ungurait, B. J., Arrate, P. & Ballard, D. W. (2003).Signalinduced ubiquitination of I kappaB Kinase-beta. J Biol Chem 278, 48903-48906.
- Cerwenka, A., Baron, J. L. & Lanier, L. L. (2001). Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11521-11526.
- 47. Chakir, H., Camilucci, A. A., Filion, L. G. & Webb, J. R. (2000). Differentiation of murine NK cells into distinct subsets based on variable expression of the IL-12R beta 2 subunit. *J Immunol* 165, 4985-4993.
- Chini, C. C., Boos, M. D., Dick, C. J., Schoon, R. A. & Leibson, P. J. (2000). Regulation of p38 mitogen-activated protein kinase during NK cell activation. Eur J Immunol 30, 2791-2798.
- Cho, S. S., Bacon, C. M., Sudarshan, C., Rees, R. C., Finbloom, D., Pine, R. & O'Shea, J. J. (1996). Activation of STAT4 by IL-12 and IFN-alpha: evidence for the involvement of ligand-induced tyrosine and serine phosphorylation. J Immunol 157, 4781-4789.
- 50. Cole, K. E., Strick, C. A., Paradis, T. J., Ogborne, K. T., Loetscher, M., Gladue, R. P., Lin, W., Boyd, J. G., Moser, B., Wood, D. E., Sahagan, B. G. & Neote, K. (1998).Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. J Exp Med 187, 2009-2021.
- 51. Colucci, F., Caligiuri, M. A. & Di Santo, J. P. (2003). What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 3, 413-425.
- 52. **Conlan, J. W. (1997).**Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, and Yersinia enterocolitica. *Infect Immun* **65**, 630-635.
- 53. Cornelis, G. R. (2000). Molecular and cell biology aspects of plague. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 8778-8783.
- 54. Cornelis, G. R. (2002). Yersinia type III secretion: send in the effectors. J Cell Biol 158, 401-408.
- 55. Cornelis, G. R., Boland, A., Boyd, A. P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M. P. & Stainier, I. (1998). The virulence plasmid of Yersinia, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1315-1352.
- 56. Cornelis, G. R. & Van, G. F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. Annu Rev Microbiol 54, 735-774.
- 57. D'Orazio, J. A., Burke, G. W. & Stein-Streilein, J. (1995).Staphylococcal enterotoxin B activates purified NK cells to secrete IFN-gamma but requires T lymphocytes to augment NK cytotoxicity. *J Immunol* 154, 1014-1023.
- Deaglio, S., Mallone, R., Baj, G., Arnulfo, A., Surico, N., Dianzani, U., Mehta, K. & Malavasi, F. (2000).CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes. *Chem Immunol* 75, 99-120.

Literaturverzeichnis

- Deaglio, S., Zubiaur, M., Gregorini, A., Bottarel, F., Ausiello, C. M., Dianzani, U., Sancho, J. & Malavasi, F. (2002). Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells. *Blood* 99, 2490-2498.
- Deniz, G., Erten, G., Kucuksezer, U. C., Kocacik, D., Karagiannidis, C., Aktas, E., Akdis, C. A. & Akdis, M. (2008). Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. J Immunol 180, 850-857.
- 61. Diefenbach, A., Jensen, E. R., Jamieson, A. M. & Raulet, D. H. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* **413**, 165-171.
- Dittmer, U., He, H., Messer, R. J., Schimmer, S., Olbrich, A. R., Ohlen, C., Greenberg, P. D., Stromnes, I. M., Iwashiro, M., Sakaguchi, S., Evans, L. H., Peterson, K. E., Yang, G. & Hasenkrug, K. J. (2004). Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity* 20, 293-303.
- 63. Dukuzumuremyi, J. M., Rosqvist, R., Hallberg, B., Akerstrom, B., Wolf-Watz, H. & Schesser, K. (2000). The Yersinia protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J Biol Chem* **275**, 35281-35290.
- Dunn, P. L. & North, R. J. (1991). Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect Immun* 59, 2892-2900.
- 65. Erfurth, S. E., Grobner, S., Kramer, U., Gunst, D. S., Soldanova, I., Schaller, M., Autenrieth, I. B. & Borgmann, S. (2004). Yersinia enterocolitica induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect Immun* 72, 7045-7054.
- 66. Esin, S., Batoni, G., Counoupas, C., Stringaro, A., Brancatisano, F. L., Colone, M., Maisetta, G., Florio, W., Arancia, G. & Campa, M. (2008). Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. *Infect Immun* 76, 1719-1727.
- 67. **Esparza, E. M. & Arch, R. H. (2005).** Glucocorticoid-induced TNF receptor functions as a costimulatory receptor that promotes survival in early phases of T cell activation. *J Immunol* **174**, 7869-7874.
- 68. Fallman, M., Persson, C. & Wolf-Watz, H. (1997). Yersinia proteins that target host cell signaling pathways. *J Clin Invest* 99, 1153-1157.
- 69. Ferrari, G., Langen, H., Naito, M. & Pieters, J. (1999). A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97, 435-447.
- 70. Flugel, A., Schulze-Koops, H., Heesemann, J., Kuhn, K., Sorokin, L., Burkhardt, H., von der, M. K. & Emmrich, F. (1994). Interaction of enteropathogenic Yersinia enterocolitica with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. J Biol Chem 269, 29732-29738.
- 71. Fueller, F., Bergo, M. O., Young, S. G., Aktories, K. & Schmidt, G. (2006). Endoproteolytic processing of RhoA by Rce1 is required for the cleavage of RhoA by Yersinia enterocolitica outer protein T. Infect Immun 74, 1712-1717.
- 72. Galan, J. E. & Wolf-Watz, H. (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444, 567-573.
- 73. Gallo, E. M., Cante-Barrett, K. & Crabtree, G. R. (2006). Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus. *Nat Immunol* 7, 25-32.

- 74. Gerke, C., Falkow, S. & Chien, Y. H. (2005). The adaptor molecules LAT and SLP-76 are specifically targeted by Yersinia to inhibit T cell activation. *J Exp Med* 201, 361-371.
- Gillessen, S., Carvajal, D., Ling, P., Podlaski, F. J., Stremlo, D. L., Familletti, P. C., Gubler, U., Presky, D. H., Stern, A. S. & Gately, M. K. (1995). Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. Eur J Immunol 25, 200-206.
- 76. Gismondi, A., Milella, M., Palmieri, G., Piccoli, M., Frati, L. & Santoni, A. (1995). Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by interaction of NK cells with fibronectin via alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1. *J Immunol* 154, 3128-3137.
- 77. Guan, K. L. & Dixon, J. E. (1990). Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in Yersinia. *Science* 249, 553-556.
- 78. Haase, R., Richter, K., Pfaffinger, G., Courtois, G. & Ruckdeschel, K. (2005). Yersinia outer protein P suppresses TGF-beta-activated kinase-1 activity to impair innate immune signaling in Yersinia enterocolitica-infected cells. *J Immunol* 175, 8209-8217.
- 79. Haller, D., Serrant, P., Granato, D., Schiffrin, E. J. & Blum, S. (2002). Activation of human NK cells by staphylococci and lactobacilli requires cell contact-dependent costimulation by autologous monocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 649-657.
- Hanabuchi, S., Watanabe, N., Wang, Y. H., Wang, Y. H., Ito, T., Shaw, J., Cao, W., Qin, F. X. & Liu, Y. J. (2006). Human plasmacytoid predendritic cells activate NK cells through glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand (GITRL). *Blood* 107, 3617-3623.
- 81. Hancock, G. E., Schaedler, R. W. & MacDonald, T. T. (1986). Yersinia enterocolitica infection in resistant and susceptible strains of mice. *Infect Immun* 53, 26-31.
- Heesemann, J. (1994). Die Gattung Yersinia, Yersiniosen. Edited by H. Brandis, H. J. Eggers, W. Köhler & G. Pulverer. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag.
- 83. Heesemann, J., Algermissen, B. & Laufs, R. (1984). Genetically manipulated virulence of Yersinia enterocolitica. *Infect Immun* 46, 105-110.
- 84. Heinzel, F. P., Sadick, M. D., Holaday, B. J., Coffman, R. L. & Locksley, R. M. (1989). Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. J Exp Med 169, 59-72.
- 85. Ho, E. L., Heusel, J. W., Brown, M. G., Matsumoto, K., Scalzo, A. A. & Yokoyama, W. M. (1998). Murine Nkg2d and Cd94 are clustered within the natural killer complex and are expressed independently in natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S* A 95, 6320-6325.
- Hoffmann, R., van, E. K., Trulzsch, K. & Heesemann, J. (2004). Transcriptional responses of murine macrophages to infection with Yersinia enterocolitica. *Cell Microbiol* 6, 377-390.
- 87. **Hooper, L. V. & Gordon, J. I. (2001).**Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* **292**, 1115-1118.
- 88. **Ihle, J. N. (1995)**. The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling. *Adv Immunol* **60**, 1-35.

- Ihle, J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K. & Silvennoinen, O. (1995).Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 13, 369-398.
- 90. Isakov, N. & Altman, A. (2002).Protein kinase C(theta) in T cell activation. Annu Rev Immunol 20, 761-794.
- 91. Isberg, R. R. & Barnes, P. (2001). Subversion of integrins by enteropathogenic Yersinia. J Cell Sci 114, 21-28.
- 92. Isberg, R. R. & Leong, J. M. (1990). Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 60, 861-871.
- Ivanov, M. I., Stuckey, J. A., Schubert, H. L., Saper, M. A. & Bliska, J. B. (2005). Two substrate-targeting sites in the Yersinia protein tyrosine phosphatase cooperate to promote bacterial virulence. *Mol Microbiol* 55, 1346-1356.
- 94. Jacobson, N. G., Szabo, S. J., Weber-Nordt, R. M., Zhong, Z., Schreiber, R. D., Darnell, J. E., Jr. & Murphy, K. M. (1995). Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. J Exp Med 181, 1755-1762.
- 95. Jayachandran, R., Sundaramurthy, V., Combaluzier, B., Mueller, P., Korf, H., Huygen, K., Miyazaki, T., Albrecht, I., Massner, J. & Pieters, J. (2007). Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell* 130, 37-50.
- 96. Johnston, J. A., Bacon, C. M., Riedy, M. C. & O'Shea, J. J. (1996). Signaling by IL-2 and related cytokines: JAKs, STATs, and relationship to immunodeficiency. J Leukoc Biol 60, 441-452.
- 97. Juris, S. J., Shao, F. & Dixon, J. E. (2002). Yersinia effectors target mammalian signalling pathways. *Cell Microbiol* 4, 201-211.
- 98. Karlhofer, F. M., Ribaudo, R. K. & Yokoyama, W. M. (1992).MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* **358**, 66-70.
- 99. Karre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G. & Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675-678.
- 100. Kempf, V. A., Bohn, E., Noll, A., Bielfeldt, C. & Autenrieth, I. B. (1998). In vivo tracking and protective properties of Yersinia-specific intestinal T cells. *Clin Exp Immunol* 113, 429-437.
- 101. Kerschen, E. J., Cohen, D. A., Kaplan, A. M. & Straley, S. C. (2004). The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. *Infect Immun* 72, 4589-4602.
- 102. Kim, J. D., Choi, B. K., Bae, J. S., Lee, U. H., Han, I. S., Lee, H. W., Youn, B. S., Vinay, D. S. & Kwon, B. S. (2003). Cloning and characterization of GITR ligand. Genes Immun 4, 564-569.
- 103. Kimura, M. Y. & Nakayama, T. (2005).Differentiation of NK1 and NK2 cells. Crit Rev Immunol 25, 361-374.
- 104. Kos, F. J. (1998). Regulation of adaptive immunity by natural killer cells. *Immunol Res* 17, 303-312.

- Krall, R., Zhang, Y. & Barbieri, J. T. (2004). Intracellular membrane localization of pseudomonas ExoS and Yersinia YopE in mammalian cells. J Biol Chem 279, 2747-2753.
- 106. Krausz, L. T., Bianchini, R., Ronchetti, S., Fettucciari, K., Nocentini, G. & Riccardi, C. (2007).GITR-GITRL system, a novel player in shock and inflammation. *ScientificWorldJournal* 7, 533-566.
- 107. Lai, C. & Lemke, G. (1991). An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron* 6, 691-704.
- 108. Lanier, L. L. (2005).NK cell recognition. Annu Rev Immunol 23, 225-274.
- 109. Lanier, L. L., Corliss, B. & Phillips, J. H. (1997). Arousal and inhibition of human NK cells. Immunol Rev 155, 145-154.
- 110. Lanier, L. L., Corliss, B. C., Wu, J., Leong, C. & Phillips, J. H. (1998). Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 391, 703-707.
- Lauwerys, B. R., Renauld, J. C. & Houssiau, F. A. (1999). Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18. *Cytokine* 11, 822-830.
- 112. Lawless, V. A., Zhang, S., Ozes, O. N., Bruns, H. A., Oldham, I., Hoey, T., Grusby, M. J. & Kaplan, M. H. (2000).Stat4 regulates multiple components of IFN-gammainducing signaling pathways. *J Immunol* 165, 6803-6808.
- 113. Liang, F., Huang, Z., Lee, S. Y., Liang, J., Ivanov, M. I., Alonso, A., Bliska, J. B., Lawrence, D. S., Mustelin, T. & Zhang, Z. Y. (2003). Aurintricarboxylic acid blocks in vitro and in vivo activity of YopH, an essential virulent factor of Yersinia pestis, the agent of plague. J Biol Chem 278, 41734-41741.
- 114. Ling, P., Gately, M. K., Gubler, U., Stern, A. S., Lin, P., Hollfelder, K., Su, C., Pan, Y. C. & Hakimi, J. (1995). Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J Immunol* 154, 116-127.
- 115. Loetscher, M., Loetscher, P., Brass, N., Meese, E. & Moser, B. (1998). Lymphocytespecific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol* 28, 3696-3705.
- 116. Loetscher, P., Pellegrino, A., Gong, J. H., Mattioli, I., Loetscher, M., Bardi, G., Baggiolini, M. & Clark-Lewis, I. (2001). The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. J Biol Chem 276, 2986-2991.
- 117. Logsdon, L. K. & Mecsas, J. (2003). Requirement of the Yersinia pseudotuberculosis effectors YopH and YopE in colonization and persistence in intestinal and lymph tissues. *Infect Immun* 71, 4595-4607.
- 118. Long, E. O. (1999). Regulation of immune responses through inhibitory receptors. Annu Rev Immunol 17, 875-904.
- 119. Loza, M. J. & Perussia, B. (2001). Final steps of natural killer cell maturation: a model for type 1-type 2 differentiation? *Nat Immunol* 2, 917-924.
- 120. Lugering, A., Floer, M., Westphal, S., Maaser, C., Spahn, T. W., Schmidt, M. A., Domschke, W., Williams, I. R. & Kucharzik, T. (2005). Absence of CCR6 inhibits CD4+ regulatory T-cell development and M-cell formation inside Peyer's patches. Am J Pathol 166, 1647-1654.
- 121. MacDonald, T. T. (2003). The mucosal immune system. Parasite Immunol 25, 235-246.

- 122. Mainiero, F., Gismondi, A., Soriani, A., Cippitelli, M., Palmieri, G., Jacobelli, J., Piccoli, M., Frati, L. & Santoni, A. (1998). Integrin-mediated ras-extracellular regulated kinase (ERK) signaling regulates interferon gamma production in human natural killer cells. J Exp Med 188, 1267-1275.
- 123. Maiza, H., Leca, G., Mansur, I. G., Schiavon, V., Boumsell, L. & Bensussan, A. (1993). A novel 80-kD cell surface structure identifies human circulating lymphocytes with natural killer activity. J Exp Med 178, 1121-1126.
- 124. Marcenaro, E., Dondero, A. & Moretta, A. (2006). Multi-directional cross-regulation of NK cell function during innate immune responses. *Transpl Immunol* 17, 16-19.
- 125. Matsumoto, S., Tsuji-Takayama, K., Aizawa, Y., Koide, K., Takeuchi, M., Ohta, T. & Kurimoto, M. (1997).Interleukin-18 activates NF-kappaB in murine T helper type 1 cells. Biochem Biophys Res Commun 234, 454-457.
- Mattner, F., Fischer, S., Guckes, S., Jin, S., Kaulen, H., Schmitt, E., Rude, E. & Germann,
 T. (1993). The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. *Eur J Immunol* 23, 2202-2208.
- 127. **Matzinger, P. (1991).**The JAM test. A simple assay for DNA fragmentation and cell death. *J Immunol Methods* **145**, 185-192.
- 128. Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045.
- 129. McDonald, C., Vacratsis, P. O., Bliska, J. B. & Dixon, J. E. (2003). The yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J Biol Chem* 278, 18514-18523.
- Miettinen, M., Matikainen, S., Vuopio-Varkila, J., Pirhonen, J., Varkila, K., Kurimoto, M. & Julkunen, I. (1998).Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 66, 6058-6062.
- 131. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. (2000).M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164, 6166-6173.
- 132. Mills, S. D., Boland, A., Sory, M. P., van der, S. P., Kerbourch, C., Finlay, B. B. & Cornelis, G. R. (1997). Yersinia enterocolitica induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12638-12643.
- 133. Mitsutake, N., Namba, H., Shklyaev, S. S., Tsukazaki, T., Ohtsuru, A., Ohba, M., Kuroki, T., Ayabe, H. & Yamashita, S. (2001).PKC delta mediates ionizing radiationinduced activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase through MKK7 in human thyroid cells. Oncogene 20, 989-996.
- 134. Monack, D. M., Mecsas, J., Ghori, N. & Falkow, S. (1997). Yersinia signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10385-10390.
- 135. Morinobu, A., Gadina, M., Strober, W., Visconti, R., Fornace, A., Montagna, C., Feldman, G. M., Nishikomori, R. & O'Shea, J. J. (2002).STAT4 serine phosphorylation is critical for IL-12-induced IFN-gamma production but not for cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12281-12286.
- Mueller, C. A., Broz, P., Muller, S. A., Ringler, P., Erne-Brand, F., Sorg, I., Kuhn, M., Engel, A. & Cornelis, G. R. (2005). The V-antigen of Yersinia forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science* 310, 674-676.

- 137. Mueller, P., Massner, J., Jayachandran, R., Combaluzier, B., Albrecht, I., Gatfield, J., Blum, C., Ceredig, R., Rodewald, H. R., Rolink, A. G. & Pieters, J. (2008). Regulation of T cell survival through coronin-1-mediated generation of inositol-1,4,5-trisphosphate and calcium mobilization after T cell receptor triggering. Nat Immunol 9, 424-431.
- Mukherjee, S., Hao, Y. H. & Orth, K. (2007). A newly discovered post-translational modification--the acetylation of serine and threonine residues. *Trends Biochem Sci* 32, 210-216.
- 139. Mukherjee, S., Keitany, G., Li, Y., Wang, Y., Ball, H. L., Goldsmith, E. J. & Orth, K. (2006). Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* 312, 1211-1214.
- 140. Muller, C. A., Autenrieth, I. B. & Peschel, A. (2005). Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell Mol Life Sci* 62, 1297-1307.
- 141. Nakahira, M., Ahn, H. J., Park, W. R., Gao, P., Tomura, M., Park, C. S., Hamaoka, T., Ohta, T., Kurimoto, M. & Fujiwara, H. (2002).Synergy of IL-12 and IL-18 for IFNgamma gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1. J Immunol 168, 1146-1153.
- 142. Nakahira, M., Tomura, M., Iwasaki, M., Ahn, H. J., Bian, Y., Hamaoka, T., Ohta, T., Kurimoto, M. & Fujiwara, H. (2001). An absolute requirement for STAT4 and a role for IFN-gamma as an amplifying factor in IL-12 induction of the functional IL-18 receptor complex. *J Immunol* 167, 1306-1312.
- 143. Nguyen, L. & Pieters, J. (2005). The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends Cell Biol* 15, 269-276.
- 144. O'Neill, L. A. (2007). TAMpering with toll-like receptor signaling. *Cell* 131, 1039-1041.
- 145. Oellerich, M. F., Jacobi, C. A., Freund, S., Niedung, K., Bach, A., Heesemann, J. & Trulzsch, K. (2007). Yersinia enterocolitica infection of mice reveals clonal invasion and abscess formation. *Infect Immun* 75, 3802-3811.
- 146. Okamura, H., Tsutsi, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K. & . (1995). Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378, 88-91.
- 147. Orth, K. (2002). Function of the Yersinia effector YopJ. Curr Opin Microbiol 5, 38-43.
- 148. Orth, K., Palmer, L. E., Bao, Z. Q., Stewart, S., Rudolph, A. E., Bliska, J. B. & Dixon, J. E. (1999). Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector. *Science* 285, 1920-1923.
- 149. Orth, K., Xu, Z., Mudgett, M. B., Bao, Z. Q., Palmer, L. E., Bliska, J. B., Mangel, W. F., Staskawicz, B. & Dixon, J. E. (2000). Disruption of signaling by Yersinia effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* 290, 1594-1597.
- 150. Palmer, L. E., Hobbie, S., Galan, J. E. & Bliska, J. B. (1998). YopJ of Yersinia pseudotuberculosis is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol Microbiol* 27, 953-965.
- Persson, C., Nordfelth, R., Andersson, K., Forsberg, A., Wolf-Watz, H. & Fallman, M. (1999).Localization of the Yersinia PTPase to focal complexes is an important virulence mechanism. *Mol Microbiol* 33, 828-838.

- 152. **Perussia, B. (1998).**Fc receptors on natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **230**, 63-88.
- 153. **Petkovic, V., Moghini, C., Paoletti, S., Uguccioni, M. & Gerber, B. (2004).**I-TAC/CXCL11 is a natural antagonist for CCR5. *J Leukoc Biol* **76**, 701-708.
- 154. **Pujol, C. & Bliska, J. B. (2005).**Turning Yersinia pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. *Clin Immunol* **114**, 216-226.
- 155. Qin, S., Rottman, J. B., Myers, P., Kassam, N., Weinblatt, M., Loetscher, M., Koch, A. E., Moser, B. & Mackay, C. R. (1998). The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. J Clin Invest 101, 746-754.
- 156. Raulet, D. H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. Nat Rev Immunol 3, 781-790.
- 157. Raulet, D. H. & Vance, R. E. (2006).Self-tolerance of natural killer cells. Nat Rev Immunol 6, 520-531.
- 158. **Reisner, B. S. & Straley, S. C. (1992).**Yersinia pestis YopM: thrombin binding and overexpression. *Infect Immun* **60**, 5242-5252.
- 159. Robinson, D., Shibuya, K., Mui, A., Zonin, F., Murphy, E., Sana, T., Hartley, S. B., Menon, S., Kastelein, R., Bazan, F. & O'Garra, A. (1997). IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity* 7, 571-581.
- Rogge, L., Barberis-Maino, L., Biffi, M., Passini, N., Presky, D. H., Gubler, U. & Sinigaglia, F. (1997). Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. J Exp Med 185, 825-831.
- 161. Rogge, L., Papi, A., Presky, D. H., Biffi, M., Minetti, L. J., Miotto, D., Agostini, C., Semenzato, G., Fabbri, L. M. & Sinigaglia, F. (1999). Antibodies to the IL-12 receptor beta 2 chain mark human Th1 but not Th2 cells in vitro and in vivo. J Immunol 162, 3926-3932.
- 162. Roggenkamp, A., Neuberger, H. R., Flugel, A., Schmoll, T. & Heesemann, J. (1995).Substitution of two histidine residues in YadA protein of Yersinia enterocolitica abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol* 16, 1207-1219.
- 163. Rothlin, C. V., Ghosh, S., Zuniga, E. I., Oldstone, M. B. & Lemke, G. (2007).TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* 131, 1124-1136.
- 164. **Ruckdeschel, K. (2002).**Immunomodulation of macrophages by pathogenic Yersinia species. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **50**, 131-137.
- 165. Ruckdeschel, K., Harb, S., Roggenkamp, A., Hornef, M., Zumbihl, R., Kohler, S., Heesemann, J. & Rouot, B. (1998). Yersinia enterocolitica impairs activation of transcription factor NF-kappaB: 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.
- 166. Ruckdeschel, K., Machold, J., Roggenkamp, A., Schubert, S., Pierre, J., Zumbihl, R., Liautard, J. P., Heesemann, J. & Rouot, B. (1997a). Yersinia enterocolitica promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase. Correlation with its inhibitory effect on tumor necrosis factor-alpha production. J Biol Chem 272, 15920-15927.

- 167. Ruckdeschel, K., Pfaffinger, G., Trulzsch, K., Zenner, G., Richter, K., Heesemann, J. & Aepfelbacher, M. (2006). The proteasome pathway destabilizes Yersinia outer protein E and represses its antihost cell activities. J Immunol 176, 6093-6102.
- 168. Ruckdeschel, K., Roggenkamp, A., Lafont, V., Mangeat, P., Heesemann, J. & Rouot, B. (1997b).Interaction of Yersinia enterocolitica with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. *Infect Immun* 65, 4813-4821.
- Ruckdeschel, K., Roggenkamp, A., Schubert, S. & Heesemann, J. (1996). Differential contribution of Yersinia enterocolitica virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun* 64, 724-733.
- 170. Russmann, H., Igwe, E. I., Sauer, J., Hardt, W. D., Bubert, A. & Geginat, G. (2001).Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant Salmonella expressing hybrid Yersinia type III proteins. *J Immunol* 167, 357-365.
- 171. Sansonetti, P. J. & Di Santo, J. P. (2007). Debugging how bacteria manipulate the immune response. *Immunity* 26, 149-161.
- 172. Sauvonnet, N., Lambermont, I., van der, B. P. & Cornelis, G. R. (2002a). YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol Microbiol* **45**, 805-815.
- 173. Sauvonnet, N., Pradet-Balade, B., Garcia-Sanz, J. A. & Cornelis, G. R. (2002b).Regulation of mRNA expression in macrophages after Yersinia enterocolitica infection. Role of different Yop effectors. J Biol Chem 277, 25133-25142.
- 174. Schindler, C. & Darnell, J. E., Jr. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64, 621-651.
- Schippers, A., Mateika, S., Prochnow, B., Gruber, A. D., Muller, W. & Frischmann, U. (2008).Susceptibility of four inbred mouse strains to a low-pathogenic isolate of Yersinia enterocolitica. *Mamm Genome*.
- 176. Schleicher, U., Liese, J., Knippertz, I., Kurzmann, C., Hesse, A., Heit, A., Fischer, J. A., Weiss, S., Kalinke, U., Kunz, S. & Bogdan, C. (2007).NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. J Exp Med 204, 893-906.
- 177. Schotte, P., Denecker, G., Van Den, B. A., Vandenabeele, P., Cornelis, G. R. & Beyaert, R. (2004). Targeting Rac1 by the Yersinia effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta. J Biol Chem 279, 25134-25142.
- 178. Schulte, R., Kerneis, S., Klinke, S., Bartels, H., Preger, S., Kraehenbuhl, J. P., Pringault, E. & Autenrieth, I. B. (2000). Translocation of Yersinia entrocolitica across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by Yersinia invasin binding to betal integrins apically expressed on M-like cells. *Cell Microbiol* 2, 173-185.
- 179. Shao, F., Vacratsis, P. O., Bao, Z., Bowers, K. E., Fierke, C. A. & Dixon, J. E. (2003).Biochemical characterization of the Yersinia YopT protease: cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 904-909.
- 180. Shayegani, M., DeForge, I., McGlynn, D. M. & Root, T. (1981). Characteristics of Yersinia enterocolitica and related species isolated from human, animal, and environmental sources. J Clin Microbiol 14, 304-312.

- 181. Sherman, M. A. & Kalman, D. (2004).Initiation and resolution of mucosal inflammation. Immunol Res 29, 241-252.
- 182. Shin, H. H., Kwon, B. S. & Choi, H. S. (2002). Recombinant glucocorticoid induced tumour necrosis factor receptor (rGITR) induced COX-2 activity in murine macrophage Raw 264.7 cells. *Cytokine* 19, 187-192.
- Skoberne, M., Schenk, S., Hof, H. & Geginat, G. (2002). Cross-presentation of Listeria monocytogenes-derived CD4 T cell epitopes. J Immunol 169, 1410-1418.
- 184. Skrzypek, E., Myers-Morales, T., Whiteheart, S. W. & Straley, S. C. (2003). Application of a Saccharomyces cerevisiae model to study requirements for trafficking of Yersinia pestis YopM in eucaryotic cells. *Infect Immun* 71, 937-947.
- 185. **Smalle, J. & Vierstra, R. D. (2004).**The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. Annu Rev Plant Biol **55**, 555-590.
- 186. Spits, H., Blom, B., Jaleco, A. C., Weijer, K., Verschuren, M. C., van Dongen, J. J., Heemskerk, M. H. & Res, P. C. (1998). Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. *Immunol Rev* 165, 75-86.
- Svensson, M., Stockinger, B. & Wick, M. J. (1997). Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol* 158, 4229-4236.
- 188. Szabo, S. J., Dighe, A. S., Gubler, U. & Murphy, K. M. (1997). Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. J Exp Med 185, 817-824.
- 189. Takeda, K., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Adachi, O., Yoshida, N., Kishimoto, T., Okamura, H., Nakanishi, K. & Akira, S. (1998). Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* 8, 383-390.
- 190. Thiefes, A., Wolf, A., Doerrie, A., Grassl, G. A., Matsumoto, K., Autenrieth, I., Bohn, E., Sakurai, H., Niedenthal, R., Resch, K. & Kracht, M. (2006). The Yersinia enterocolitica effector YopP inhibits host cell signalling by inactivating the protein kinase TAK1 in the IL-1 signalling pathway. *EMBO Rep* 7, 838-844.
- 191. Trinchieri, G. (1989). Biology of natural killer cells. Adv Immunol 47, 187-376.
- 192. **Trinchieri, G. (1995).**Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* **13**, 251-276.
- 193. Troisfontaines, P. & Cornelis, G. R. (2005). Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)* 20, 326-339.
- 194. Trulzsch, K., Geginat, G., Sporleder, T., Ruckdeschel, K., Hoffmann, R., Heesemann, J. & Russmann, H. (2005). Yersinia outer protein P inhibits CD8 T cell priming in the mouse infection model. *J Immunol* 174, 4244-4251.
- 195. Trulzsch, K., Oellerich, M. F. & Heesemann, J. (2007). Invasion and dissemination of Yersinia enterocolitica in the mouse infection model. Adv Exp Med Biol 603, 279-285.
- 196. Trulzsch, K., Roggenkamp, A., Aepfelbacher, M., Wilharm, G., Ruckdeschel, K. & Heesemann, J. (2003). Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of Yersinia enterocolitica. Int J Med Microbiol 293, 167-177.

- 197. Trulzsch, K., Sporleder, T., Igwe, E. I., Russmann, H. & Heesemann, J. (2004).Contribution of the major secreted yops of Yersinia enterocolitica O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect Immun* 72, 5227-5234.
- 198. Tumitan, A. R., Monnazzi, L. G., Ghiraldi, F. R., Cilli, E. M. & hado de Medeiros, B. M. (2007).Pattern of macrophage activation in yersinia-resistant and yersiniasusceptible strains of mice. *Microbiol Immunol* 51, 1021-1028.
- 199. **Tusher, V. G., Tibshirani, R. & Chu, G. (2001).**Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5116-5121.
- 200. Upshaw, J. L. & Leibson, P. J. (2006).NKG2D-mediated activation of cytotoxic lymphocytes: unique signaling pathways and distinct functional outcomes. *Semin Immunol* 18, 167-175.
- 201. Vance, R. E., Kraft, J. R., Altman, J. D., Jensen, P. E. & Raulet, D. H. (1998). Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J Exp Med* 188, 1841-1848.
- 202. Vankayalapati, R., Garg, A., Porgador, A., Griffith, D. E., Klucar, P., Safi, H., Girard, W. M., Cosman, D., Spies, T. & Barnes, P. F. (2005). Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol* 175, 4611-4617.
- 203. Veiga, E. & Cossart, P. (2005). Ubiquitination of intracellular bacteria: a new bacteriasensing system? *Trends Cell Biol* 15, 2-5.
- 204. Vely, F. & Vivier, E. (1997). Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts. *J Immunol* 159, 2075-2077.
- 205. Viboud, G. I. & Bliska, J. B. (2005). Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 59, 69-89.
- 206. Viboud, G. I., So, S. S., Ryndak, M. B. & Bliska, J. B. (2003). Proinflammatory signalling stimulated by the type III translocation factor YopB is counteracted by multiple effectors in epithelial cells infected with Yersinia pseudotuberculosis. *Mol Microbiol* **47**, 1305-1315.
- 207. Viegas, M. S., do, C. A., Silva, T., Seco, F., Serra, V., Lacerda, M. & Martins, T. C. (2007).CD38 plays a role in effective containment of mycobacteria within granulomata and polarization of Th1 immune responses against Mycobacterium avium. *Microbes Infect* 9, 847-854.
- 208. Visconti, R., Gadina, M., Chiariello, M., Chen, E. H., Stancato, L. F., Gutkind, J. S. & O'Shea, J. J. (2000).Importance of the MKK6/p38 pathway for interleukin-12induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity. *Blood* 96, 1844-1852.
- 209. Vivier, E., Nunes, J. A. & Vely, F. (2004). Natural killer cell signaling pathways. *Science* 306, 1517-1519.
- 210. Westphal, S., Lugering, A., von, W. J., von, E. C., Maaser, C., Spahn, T., Heusipp, G., Schmidt, M. A., Herbst, H., Williams, I. R., Domschke, W. & Kucharzik, T. (2008). Resistance of chemokine receptor 6-deficient mice to Yersinia enterocolitica infection: evidence of defective M-cell formation in vivo. Am J Pathol 172, 671-680.
- 211. Wu, Z. & Irizarry, R. A. (2004). Preprocessing of oligonucleotide array data. Nat Biotechnol 22, 656-658.

- 212. Wu, Z. & Irizarry, R. A. (2005). Stochastic models inspired by hybridization theory for short oligonucleotide arrays. *J Comput Biol* 12, 882-893.
- 213. Xu, D., Chan, W. L., Leung, B. P., Hunter, D., Schulz, K., Carter, R. W., McInnes, I. B., Robinson, J. H. & Liew, F. Y. (1998). Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. J Exp Med 188, 1485-1492.
- 214. Yao, T., Mecsas, J., Healy, J. I., Falkow, S. & Chien, Y. (1999). Suppression of T and B lymphocyte activation by a Yersinia pseudotuberculosis virulence factor, yopH. J Exp Med 190, 1343-1350.
- 215. Yersin, A. (1994). (Bubonic plague in Hong Kong. 1894). *Rev Med Suisse Romande* 114, 393-395.
- 216. Yokoyama, W. M. (1995). Natural killer cell receptors. Curr Opin Immunol 7, 110-120.
- 217. Yokoyama, W. M., Kim, S. & French, A. R. (2004). The dynamic life of natural killer cells. Annu Rev Immunol 22, 405-429.
- 218. Yoon, S., Liu, Z., Eyobo, Y. & Orth, K. (2003). Yersinia effector YopJ inhibits yeast MAPK signaling pathways by an evolutionarily conserved mechanism. *J Biol Chem* 278, 2131-2135.
- 219. Yrlid, U. & Wick, M. J. (2000).Salmonella-induced apoptosis of infected macrophages results in presentation of a bacteria-encoded antigen after uptake by bystander dendritic cells. *J Exp Med* **191**, 613-624.
- 220. Yu, K. Y., Kim, H. S., Song, S. Y., Min, S. S., Jeong, J. J. & Youn, B. S. (2003). Identification of a ligand for glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor constitutively expressed in dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 433-438.
- 221. **Zhang, S. & Kaplan, M. H. (2000)**. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for IL-12-induced IFN-gamma expression. *J Immunol* **165**, 1374-1380.
- 222. Zhang, T., Kawakami, K., Qureshi, M. H., Okamura, H., Kurimoto, M. & Saito, A. (1997).Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against Cryptococcus neoformans through production of gamma interferon by natural killer cells. *Infect Immun* 65, 3594-3599.
- 223. **Zhang, Y. & Bliska, J. B. (2005).**Role of macrophage apoptosis in the pathogenesis of Yersinia. *Curr Top Microbiol Immunol* **289**, 151-173.
- 224. **Zhang, Y., Ting, A. T., Marcu, K. B. & Bliska, J. B. (2005).**Inhibition of MAPK and NFkappa B pathways is necessary for rapid apoptosis in macrophages infected with Yersinia. *J Immunol* **174**, 7939-7949.
- 225. **Zhang, Z. Y. (2003).**Chemical and mechanistic approaches to the study of protein tyrosine phosphatases. *Acc Chem Res* **36**, 385-392.
- 226. Zhou, H., Monack, D. M., Kayagaki, N., Wertz, I., Yin, J., Wolf, B. & Dixit, V. M. (2005). Yersinia virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NFkappa B activation. J Exp Med 202, 1327-1332.
- 227. Zumbihl, R., Aepfelbacher, M., Andor, A., Jacobi, C. A., Ruckdeschel, K., Rouot, B. & Heesemann, J. (1999). The cytotoxin YopT of Yersinia enterocolitica induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J Biol Chem* **274**, 29289-29293.
G Anhang

G.1 Tabellarische Darstellung der differentiell exprimierten Gene aller Microarryanalysen

In den nachfolgenden Tabellen sind die differentiell exprimierten Gene aller Genexpressionsprofile, die im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden, zusammengefasst.

G.1.1 Differentiell exprimierte Gene IL12 + IL18 bzw. NKG2D stimulierter NK-Zellen

Gruppe	Affymetrix-ID	Name
A1	1420549_at	guanylate nucleotide binding protein 1
A1	1418829_a_at	enolase 2, gamma neuronal
A1	1435069_at	cDNA sequence BC064078
A2	1420044_at	
A2	1434929_at	cDNA sequence BC035044
A2	1433839_at	asparaginyl-tRNA synthetase 2 (mitochondrial)(putative)
A2	1455741_a_at	endothelin converting enzyme 1
A2	1434177_at	endothelin converting enzyme 1
A2	1437635_at	discoidin, CUB and LCCL domain containing 2
A2	1435995_at	mitochondrial ribosomal protein L22
A2	1439483_at	expressed sequence AI506816
A2	1452677_at	
A2	1445226_at	cDNA sequence BC023969
A2	1424923_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G
A2	1434296_at	cDNA sequence BC049349
A3	1418271_at	basic helix-loop-helix domain containing, class B5
A3	1456632_at	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)
A3	1447460_at	Ribosomal protein L5

Tabelle G-1: Differentiell exprimierte Gene zu Abbildung C-41

A3	1443835_x_at	RIKEN cDNA 1110014K08 gene /// hypothetical protein LOC664786 /// hypothetical protein LOC664849 /// hypothetical protein LOC669054 /// hypothetical protein LOC672175
A3	1420276_x_at	
A3	1417408_at	coagulation factor III
A3	1436759_x_at	calponin 3, acidic
A3	1436409_at	cytochrome c oxidase, subunit VIIIa
A3	1440131_at	Poliovirus receptor-related 1
A3	1434153_at	src homology 2 domain-containing transforming protein B
A3	1436836_x_at	calponin 3, acidic
A3	1419160_at	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 3
A3	1456380_x_at	calponin 3, acidic
A3	1455570_x_at	calponin 3, acidic
A3	1448059_at	mirror-image polydactyly gene 1 homolog (human)
A3	1422645_at	hemochromatosis
A3	1419697_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
В	1431469_a_at	CXXC finger 5
В	1420067_at	CD160 antigen
В	1448909_a_at	mitochondrial ribosomal protein L39
В	1435748_at	guanine deaminase
В	1423586_at	AXL receptor tyrosine kinase
В	1459847_x_at	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2
В	1432393_a_at	RIKEN cDNA 5730409G07 gene
В	1418610_at	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 6
В	1433716_x_at	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2
В	1425002_at	cDNA sequence BC010462
В	1439947_at	cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1
В	1416613_at	cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1
В	1439794_at	Transcribed locus
В	1433108_at	T-cell receptor beta, joining region /// T-cell receptor beta, variable 8.2 /// T-cell receptor beta, variable 13 /// similar to T-cell receptor beta-1 chain C region
В	1460431_at	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2
C1	1456135_s_at	paxillin
C1	1442181_at	Glucocorticoid receptor DNA binding factor 1
C2	1448233_at	prion protein
C2	1433741_at	CD38 antigen
C2	1448771_a_at	ferritin heavy chain 1
C2	1427021_s_at	ferritin heavy chain 1 /// dipeptidase 2
C2	1436026_at	zinc finger protein 703
C2	1428864_at	RIKEN cDNA 5530400B01 gene
C2	1458362_at	RIKEN cDNA D730005E14 gene
C2	1434867_at	solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 11

C2	1417701_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14c
C2	1456673_at	expressed sequence AL022943
C2	1424733_at	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14
C2	1434580_at	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4
C2	1452870_at	
C3	1457707_at	gene model 489, (NCBI)
C3	1418436_at	syntaxin 7
C3	1457691_at	Epstein-Barr virus induced gene 2
C3	1437356_at	Epstein-Barr virus induced gene 2
C3	1454962_at	spire homolog 1 (Drosophila)
C3	1417216_at	proviral integration site 2
D1	1424989_at	transmembrane protein 142A
D1	1453797_at	phosphatase, orphan 2
D1	1420038_at	VATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit E1
DI	1427158_at	mitochondrial ribosomal protein S30
DI	1416793_at	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 2
DI	1434307_at	transmembrane protein 64
D1	1436348_at	Transcribed locus
DI	1435872_at	Transcribed locus
DI	1420012_at	X-box binding protein 1
DI	1452012_a_at	exosome component 1
DI	1423760_at	CD44 antigen
DI	1442999_at	RIKEN cDNA B930036G03 gene
DI	1424942_a_at	myelocytomatosis oncogene
DI	1424697_at	DTW domain containing 1
DI	1451346_at	methylthioadenosine phosphorylase
DI	1421914_s_at	mitochondrial ribosomal protein L19
D2	1422303_a_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18
D2	1455863_at	spermatogenesis associated 5-like 1
D2	1440340_at	UDP-Gal:betaGal beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 6
D2	1435252_at	UDP-Gal:betaGal beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 6
D2	1438306_at	ring finger protein 180
D2	1452367_at	coronin, actin binding protein 2A
D3	1428112_at	arginine-rich, mutated in early stage tumors
D3	1427464_s_at	heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein)
D3	1450943_at	RIKEN cDNA 2010012C16 gene
D3	1452405_x_at	T-cell receptor alpha chain /// RIKEN cDNA A430107P09 gene
D3	1434887_at	frequenin homolog (Drosophila)
D3	1422890_at	protocadherin 18
D3	 1424734 at	RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1
D3	1421689 at	keratin associated protein 8-2
D3	1422514 at	AE binding protein 1
D3	1437111 at	zinc finger CCCH-type containing 12C
D3	1437111_at	zinc tinger CCCH-type containing 12C

D3	1447831_s_at	myotubularin related protein 7
D3	1423420_at	adrenergic receptor, beta 1
D3	1425469_a_at	RIKEN cDNA 9030208C03 gene
D3	1427038_at	preproenkephalin 1
D3	1418925_at	cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1
D3	1458456_x_at	RIKEN cDNA 6430571L13 gene
D3	1422611_s_at	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3
D3	1455697_at	PREDICTED: Mus musculus hypothetical protein LOC629064 (LOC629064), mRNA
D3	1434163_at	expressed sequence AU024076
D3	1426852_x_at	nephroblastoma overexpressed gene
D3	1441206_at	synaptopodin 2
D3	1424594_at	lectin, galactose binding, soluble 7
D3	1448411_at	Wolfram syndrome 1 homolog (human)
D3	1459187_at	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4
D3	1425471_x_at	
D3	1425470_at	
D3	1417029_a_at	tripartite motif protein 2
El	1460617_s_at	RAB6B, member RAS oncogene family
El	1442693_at	similar to tripartite motif protein TRIM5
El	1437432_a_at	tripartite motif protein 12
El	1431821_a_at	EPS8-like 1
E1	1453109_at	arylsulfatase K
El	1441803_at	RIKEN cDNA A130090K04 gene
E1	1434171_at	RIKEN cDNA C330011K17 gene
E1	1419658_at	RIKEN cDNA C920025E04 gene
El	1444102_at	Endothelin converting enzyme 1
El	1425417_x_at	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 8 /// killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 21 /// similar to killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 21 /// killer cell lectin-like receptor subfamily A member 29 /// simil
E1	1426171_x_at	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 7
E1	1426127_x_at	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 18
El	1447363_s_at	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S. cerevisiae)
El	1424143_a_at	chromatin licensing and DNA replication factor 1
El	1455503_at	zinc finger protein 85, related sequence 1 /// RIKEN cDNA 6820416H06 gene
E1	1431053_at	M-phase phosphoprotein 9
El	1422708_at	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide
El	1455220_at	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 2
El	1416952_at	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit D
El	1416951_a_at	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit D
El	1454938_at	sorting nexin 13

E1	1435879_at	thymoma viral proto-oncogene 3
E1	1435746_at	serine/arginine-rich protein specific kinase 2
E1	1441301_at	Janus kinase and microtubule interacting protein 1
E1	1446244_at	RIKEN cDNA 2810482G21 gene
El	1435693_at	mal, T-cell differentiation protein-like
E1	1444176_at	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit D2
E1	1436865_at	solute carrier family 26, member 11
El	1424816_at	cat eye syndrome chromosome region, candidate 5 homolog (human)
E1	1424175_at	thyrotroph embryonic factor
E1	1419952_at	Syntaxin 5A
E1	1420082_at	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 750, expressed
E1	1419977_s_at	RNA binding motif protein 35b
E1	1434337_at	Transcribed locus
E1	1455164_at	Cdc42 GTPase-activating protein
El	1444750_at	Restin (Reed-Steinberg cell-expressed intermediate filament- associated protein)
E1	1457163_at	RIKEN cDNA D730035F11 gene
E1	1450790_at	thyroglobulin
El	1441404_at	Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, beta1 subunit
E1	1440455_at	expressed sequence AI848599
E1	1451506_at	myocyte enhancer factor 2C
E1	1435330_at	expressed sequence AI447904 /// cDNA sequence BC094916 /// similar to Gamma-interferon-inducible protein Ifi-16 (Interferon- inducible myeloid differentiation transcriptional activator) (IFI 16)
E1	1424857_a_at	tripartite motif protein 34 /// similar to Tripartite motif protein 34
E1	1436061_at	
E1	1418837_at	quinolinate phosphoribosyltransferase
E1	1445882_at	CD300 antigen like family member B
E1	1448931_at	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1
E1	1453145_at	RIKEN cDNA 4933439C20 gene
E1	1421525_a_at	baculoviral IAP repeat-containing 1e
E1	1417469_at	nitrilase 1
E1	1436441_at	Prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)
E1	1417327_at	caveolin 2
El	1444218_at	DNA segment, Chr 19, ERATO Doi 737, expressed
El	1431372_at	serine/arginine-rich protein specific kinase 2
E1	1430003_at	RIKEN cDNA 6330412A17 gene
El	1426215_at	dopa decarboxylase
El	1441228_at	apolipoprotein L domain containing 1
El	1451507_at	myocyte enhancer factor 2C
E1	1437128_a_at	RIKEN cDNA A630033E08 gene
E1	1450470_at	

E1	1427509_at	BAI1-associated protein 3
E1	1453261_at	RIKEN cDNA 2610035D17 gene
E1	1452844_at	POU domain, class 6, transcription factor 1
E1	1437441_at	expressed sequence AA388235
E1	1435312_at	
E1	1430218_at	RIKEN cDNA 4933424M12 gene
E1	1456848_at	
E1	1453074_at	dual specificity phosphatase 23
E1	1437636_at	Similar to Interferon-activatable protein 203 (Ifi-203) (Interferon- inducible protein p203)
E1	1434914_at	RAB6B, member RAS oncogene family
E1	1452063_at	RIKEN cDNA 2410081M15 gene
E2	1460603_at	sterile alpha motif domain containing 9-like
E2	1456395_at	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha
E2	1426640_s_at	tribbles homolog 2 (Drosophila)
E2	1445659_at	Protective protein for beta-galactosidase
E2	1434974_at	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1
E3	1419370_a_at	microfibrillar-associated protein 1
E3	1424516_at	RIKEN cDNA B230354K17 gene
E3	1424515_at	RIKEN cDNA B230354K17 gene
E3	1452918_at	DNA segment, Chr 19, ERATO Doi 737, expressed
E4	1449354_at	U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor (U2AF) 1, related sequence 1
E4	1418884_x_at	tubulin, alpha 1
E4	1439066_at	angiopoietin 1
E4	1420641_a_at	sulfide quinone reductase-like (yeast)
E5	1454231_a_at	retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1
E5	1417146_at	RIKEN cDNA 2410018C20 gene
E5	1422307_at	
E5	1418885_a_at	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta
E6	1417218_at	RIKEN cDNA 2810048G17 gene
E6	1428660_s_at	torsin family 3, member A
E6	1428461_at	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), epsilon isoform
E6	1452051_at	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)
E6	1450853_at	transducin-like enhancer of split 4, homolog of Drosophila E(spl)
F1	1418524_at	pericentriolar material 1
F1	1460594_a_at	GDP-mannose pyrophosphorylase A
F1	1435840_x_at	similar to 2-cell-stage, variable group, member 3
F1	1432032_a_at	artemin
F1	1456456_x_at	Melanoma antigen
F1	1442192_at	thymidylate synthase
F1	1432464_a_at	RIKEN cDNA 2310057J16 gene

Fl	1456181_at	RIKEN cDNA 9530020G05 gene
Fl	1436359_at	16 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9630013F18 product:unclassifiable, full insert sequence
Fl	1445369_at	RIKEN cDNA B230359F08 gene
Fl	1459091_at	
Fl	1449076_x_at	acireductone dioxygenase 1
Fl	1430771_a_at	mutS homolog 5 (E. coli)
Fl	1458585_at	Transcribed locus
Fl	1456635_at	RIKEN cNDA C130026l21 gene /// similar to SP140 nuclear body protein (predicted) /// similar to SP140 nuclear body protein (predicted) /// similar to SP140 nuclear body protein (predicted)
Fl	1457761_at	expressed sequence C79607
Fl	1429796_at	kalirin, RhoGEF kinase
Fl	1426917_s_at	secernin 3
Fl	1435058_x_at	syntaxin binding protein 3A
Fl	1455240_x_at	hypothetical protein LOC666185 /// hypothetical protein LOC666222 /// hypothetical protein LOC673030
Fl	1449365_at	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 8
Fl	1435504_at	Transcribed locus
Fl	1436970_a_at	platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide
Fl	1444546_at	cDNA sequence BC027057
Fl	1422510_at	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like
Fl	1442407_at	
Fl	1460300_a_at	leukocyte tyrosine kinase
Fl	1438021_at	cDNA sequence BC013481
Fl	1438202_at	RIKEN cDNA C920005C14 gene
Fl	1428987_at	dynein light chain roadblock-type 2
Fl	1436397_at	cDNA sequence BC027057
Fl	1425601_a_at	rhotekin
Fl	1456186_at	RIKEN cDNA 8030443D09 gene
Fl	1456277_at	RIKEN cDNA 7530414M10 gene
Fl	1436647_at	tau tubulin kinase 1
Fl	1430447_a_at	leukocyte-associated Ig-like receptor 1
Fl	1452978_at	transmembrane protein 138
Fl	1419793_at	DNA segment, Chr 5, ERATO Doi 615, expressed
Fl	1448729_a_at	septin 4
Fl	1454225_s_at	DNA segment, Chr 3, ERATO Doi 751, expressed
Fl	1441891_x_at	ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty acids (yeast)
Fl	1430590_at	DNA segment, Chr 3, ERATO Doi 751, expressed
F1	1459130_at	HECT domain and ankyrin repeat containing, E3 ubiquitin protein ligase 1
Fl	1421251_at	zinc finger protein 40

Fl	1456464_x_at	
Fl	1455422_x_at	septin 4
Fl	1439971_at	RIKEN cDNA 6330439K17 gene
Fl	1446503_at	
F1	1449907_at	beta-carotene 15,15'-monooxygenase
Fl	1422952_at	Ng23 protein
Fl	1444350_at	similar to schlafen 10
Fl	1437092_at	restin-like 2
F2	1424410_at	tetratricopeptide repeat domain 8
F2	1447181_s_at	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 7
F2	1426074_at	LOC434536
F2	1418165_at	intelectin a
F2	1417392_a_at	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 7
F3	1449265_at	caspase 1
F3	1433626_at	phospholipid scramblase 4
F3	1425084_at	GTPase, IMAP family member 7
F3	1418593_at	TAF6 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor

G.1.2 Differentiell exprimierte Gene von IL12 + IL18 stimulierten NK-Zellen nach Infektion mit *Y. enterocolitica*

Gruppe	Affymetrix-ID	Name
A1	1427158_at	mitochondrial ribosomal protein \$30
A1	1454963_at	RIKEN cDNA E430028B21 gene
A1	1437356_at	Epstein-Barr virus induced gene 2
A1	1436313_at	SCY1-like 2 (S. cerevisiae)
A1	1420977_at	mannosidase, alpha, class 1A, member 2
A2	1448059_at	mirror-image polydactyly gene 1 homolog (human)
A2	1436409_at	cytochrome c oxidase, subunit VIIIa
A2	1453138_at	RNA pseudouridylate synthase domain containing 2
A2	1422645_at	hemochromatosis
A2	1417408_at	coagulation factor III
A2	1456380_x_at	calponin 3, acidic
A2	1437635_at	discoidin, CUB and LCCL domain containing 2
A2	1455570_x_at	calponin 3, acidic

Tabelle G-2: Differentiell exprimierte Gene zu Abbildung C-42

A2	1436402_at	deoxyhypusine hydroxylase/monooxygenase
A2	1456632_at	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)
A2	1436836_x_at	calponin 3, acidic
A2	1426724_at	calponin 3, acidic
A2	1442372_at	Transcribed locus
A2	1419697_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
A2	1437212_at	RIKEN cDNA B230312118 gene
A2	1436759_x_at	calponin 3, acidic
A2	1419160_at	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 3
A2	1442431_at	Transcribed locus
A2	1416899_at	undifferentiated embryonic cell transcription factor 1
A2	1457072_at	RIKEN cDNA 2410127E16 gene /// B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)
A2	1435998_at	gene model 288, (NCBI)
A2	1447460_at	Ribosomal protein L5
A2	1428834_at	dual specificity phosphatase 4
A2	1452677_at	
A2	1434177_at	endothelin converting enzyme 1
A2	1455741_a_at	endothelin converting enzyme 1
A2	1439483_at	expressed sequence AI506816
A2	1433839_at	asparaginyl-tRNA synthetase 2 (mitochondrial)(putative)
A3	1435069_at	cDNA sequence BC064078
A3	1452431_s_at	histocompatibility 2, class II antigen A, alpha /// histocompatibility 2, class II antigen E alpha
A3	1418827_at	three prime histone mRNA exonuclease 1
A3	1420549_at	guanylate nucleotide binding protein 1
A3	1418829_a_at	enolase 2, gamma neuronal
A3	1419290_at	methyltransferase like 6
A4	1424923_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G
A4	1415851_a_at	inosine 5'-phosphate dehydrogenase 2
В	1455292_x_at	Regulator of sex limited protein-Slp 1
В	1444188_at	
В	1440478_at	DNA segment, Chr 10, ERATO Doi 438, expressed
В	1427356_at	RIKEN cDNA 2310031A18 gene
В	1441993_at	adaptor-related protein complex 3, sigma 2 subunit
В	1438306_at	ring finger protein 180
В	1456807_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3E
В	1437914_at	E2F transcription factor 6
В	1434867_at	solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like, member 11
В	1428864_at	RIKEN cDNA 5530400B01 gene
В	1420351_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4
В	1436026_at	zinc finger protein 703
В	1440340_at	UDP-Gal:betaGal beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 6
В	1458362_at	RIKEN cDNA D730005E14 gene
В	1435252_at	UDP-Gal:betaGal beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 6

В	1437111_at	zinc finger CCCH-type containing 12C
В	1417701_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14c
В	1456673_at	expressed sequence AL022943
В	1448771_a_at	ferritin heavy chain 1
В	1435872_at	Transcribed locus
C1	1453603_at	RIKEN cDNA 2700022O18 gene
C1	1448877_at	distal-less homeobox 2
C1	1458577_at	
C1	1458795_at	Transcribed locus
C1	1444467_at	expressed sequence C77534
C1	1420597_a_at	calcium binding protein 2
C1	1454165_at	RIKEN cDNA 1700025K04 gene
C1	1459931_a_at	Similar to zinc finger protein 709
C1	1446546_at	trimethyllysine hydroxylase, epsilon
Cl	1457341_at	Transcribed locus, moderately similar to XP_579758.1 PREDICTED: hypothetical protein XP_579758 (Rattus norvegicus)
C1	1443451_at	
C1	1442934_at	expressed sequence C81608
C1	1450357_a_at	chemokine (C-C motif) receptor 6
C1	1448756_at	\$100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)
C1	1423226_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
C1	1433266_at	RIKEN cDNA 2810416A17 gene
C1	1440602_at	Glutamate receptor, ionotropic, kainate 2 (beta 2)
C1	1456344_at	Tenascin C
C1	1445392_at	Transmembrane 7 superfamily member 3
C1	1446935_at	RIKEN cDNA 9130011E15 gene
C1	1432975_at	RIKEN cDNA 2310038E17 gene
C1	1438868_at	DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 668, expressed
C1	1420044_at	
C2	1457761_at	expressed sequence C79607
C2	1430771_a_at	mutS homolog 5 (E. coli)
C2	1418165_at	intelectin a
C2	1426074_at	LOC434536
C2	1437092_at	restin-like 2
C2	1460300_a_at	leukocyte tyrosine kinase
C2	1456635_at	RIKEN cNDA C130026l21 gene /// similar to SP140 nuclear body protein (predicted) /// similar to SP140 nuclear body protein (predicted) /// similar to SP140 nuclear body protein (predicted)
C3	1444569_at	hypothetical protein LOC666752 /// hypothetical protein LOC669447 /// hypothetical protein LOC677552
C3	1427829_at	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 4
C3	1424693_at	RIKEN cDNA 4933407N01 gene
C4	1420067_at	CD160 antigen
C4	1416056_a_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 11
D	1455804_x_at	3-oxoacid CoA transferase 1

D	1425084_at	GTPase, IMAP family member 7
D	1432464_a_at	RIKEN cDNA 2310057J16 gene
D	1458585_at	Transcribed locus
D	1418171_at	transcription elongation factor A (SII)-like 8
D	1456277_at	RIKEN cDNA 7530414M10 gene
D	1441792_at	RIKEN cDNA A630033E08 gene
D	1436647_at	tau tubulin kinase 1
D	1436970_a_at	platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide
D	1435504_at	Transcribed locus
D	1436397_at	cDNA sequence BC027057
D	1438202_at	RIKEN cDNA C920005C14 gene
D	1428987_at	dynein light chain roadblock-type 2
D	1444546_at	cDNA sequence BC027057
D	1422510_at	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like
D	1442407_at	
D	1454225_s_at	DNA segment, Chr 3, ERATO Doi 751, expressed
D	1452978_at	transmembrane protein 138
D	1447181_s_at	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 7
D	1454855_at	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 2
D	1449365_at	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 8
D	1426917_s_at	secernin 3
D	1456261_at	SH3-domain kinase binding protein 1
D	1437310_at	Bardet-Biedl syndrome 1 homolog (human)
D	1452336_at	cDNA sequence BC027382
D	1436359_at	16 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9630013F18 product:unclassifiable, full insert sequence
D	1419883_s_at	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit B2
E1	1434565_at	cell growth regulator with ring finger domain 1
E1	1432295_a_at	RIKEN cDNA 2310035K24 gene
E1	1439066_at	angiopoietin 1
E1	1437003_at	
E2	1422307_at	
E2	1459827_x_at	Hermansky-Pudlak syndrome 1 homolog (human)
E2	1426171_x_at	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 7
E2	1435665_at	expressed sequence AI451617
E2	1444750_at	Restin (Reed-Steinberg cell-expressed intermediate filament- associated protein)
E2	1437432_a_at	tripartite motif protein 12
E2	1418837_at	quinolinate phosphoribosyltransferase
E2	1437128_a_at	RIKEN cDNA A630033E08 gene
E2	1421525_a_at	baculoviral IAP repeat-containing 1e
E2	1442693_at	similar to tripartite motif protein TRIM5

E2	1436061_at	
E2	1424816_at	cat eye syndrome chromosome region, candidate 5 homolog (human)
E2	1430516_at	RIKEN cDNA 4930428B01 gene
E3	1460603_at	sterile alpha motif domain containing 9-like
E3	1436441_at	Prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)
E3	1430218_at	RIKEN cDNA 4933424M12 gene
E3	1453261_at	RIKEN cDNA 2610035D17 gene
E3	1452844_at	POU domain, class 6, transcription factor 1
E3	1435312_at	
E3	1436580_at	
E3	1438054_x_at	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), gamma isoform
E3	1446244_at	RIKEN cDNA 2810482G21 gene
E3	1446820_at	zinc finger protein 182
E3	1444176_at	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit D2
E3	1436865_at	solute carrier family 26, member 11
E3	1435746_at	serine/arginine-rich protein specific kinase 2
E3	1455781_at	cDNA sequence BC027231
E3	1455220_at	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 2
E3	1460617_s_at	RAB6B, member RAS oncogene family
E3	1427509_at	BAI1-associated protein 3
E3	1453109_at	arylsulfatase K
E3	1435330_at	expressed sequence AI447904 /// cDNA sequence BC094916 /// similar to Gamma-interferon-inducible protein Ifi-16 (Interferon- inducible myeloid differentiation transcriptional activator) (IFI 16)
E3	1445882_at	CD300 antigen like family member B
E3	1439512_at	RIKEN cDNA 5830444B04 gene
E3	1434914_at	RAB6B, member RAS oncogene family
E3	1424857_a_at	tripartite motif protein 34 /// similar to Tripartite motif protein 34
E3	1452918_at	DNA segment, Chr 19, ERATO Doi 737, expressed
E3	1419995_at	DNA segment, Chr 10, ERATO Doi 641, expressed
F1	1438335_at	RIKEN cDNA 6030413G23 gene
Fl	1457470_at	DNA segment, Chr 3, ERATO Doi 452, expressed
Fl	1440092_at	Exostoses (multiple) 1
Fl	1435038_s_at	AP2 associated kinase 1
F2	1454231_a_at	retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1
F2	1451506_at	myocyte enhancer factor 2C
F2	1425227_a_at	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit A1
F2	1452367_at	coronin, actin binding protein 2A

G.1.3 Differentiell exprimierte Gene von NKG2D stimulierten NK-Zellen nach Infektion mit *Y. enterocolitica*

Gruppe	Affymetrix-ID	Name
A1	1437356_at	Epstein-Barr virus induced gene 2
Al	1444312_at	solute carrier family 22 (organic anion/cation transporter), member 15
A1	1456464_x_at	
A1	1435504_at	Transcribed locus
A1	1422952_at	Ng23 protein
A1	1444350_at	similar to schlafen 10
A1	1456277_at	RIKEN cDNA 7530414M10 gene
Al	1422510_at	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like
A1	1436397_at	cDNA sequence BC027057
A1	1438202_at	RIKEN cDNA C920005C14 gene
A1	1436970_a_at	platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide
A1	1419876_at	RIKEN cDNA 2810449G22 gene
A1	1444546_at	cDNA sequence BC027057
A1	1423411_at	cDNA sequence BC013481
A1	1455367_at	dead end homolog 1 (zebrafish)
A1	1460300_a_at	leukocyte tyrosine kinase
A1	1418829_a_at	enolase 2, gamma neuronal
A1	1425201_a_at	hydroxypyruvate isomerase homolog (E. coli)
A1	1432464_a_at	RIKEN cDNA 2310057J16 gene
A1	1432032_a_at	artemin
A2	1437092_at	restin-like 2
A2	1458585_at	Transcribed locus
A2	1430771_a_at	mutS homolog 5 (E. coli)
A2	1449076_x_at	acireductone dioxygenase 1
A2	1449538_a_at	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2 /// similar to glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2
A2	1420549_at	guanylate nucleotide binding protein 1
A2	1426906_at	interferon activated gene 203
В	1458897_at	uronyl-2-sulfotransferase
В	1425002_at	cDNA sequence BC010462
В	1420697_at	solute carrier family 15, member 3
В	1452677_at	
В	1433716_x_at	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2
В	1439947_at	cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1

Tabelle G-3: Differentiell exprimierte Gene zu Abbildung C-43

В	1439794_at	Transcribed locus
В	1418610_at	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 6
В	1418271_at	basic helix-loop-helix domain containing, class B5
В	1429936_at	RIKEN cDNA 2700059L22 gene
В	1459847_x_at	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2
В	1432393_a_at	RIKEN cDNA 5730409G07 gene
В	1443587_at	cDNA sequence AK129128
В	1423586_at	AXL receptor tyrosine kinase
В	1439483_at	expressed sequence AI506816
В	1427679_at	large tumor suppressor
В	1447813_x_at	src-like adaptor
C1	1442422_at	Transmembrane protein 55A
C1	1438759_x_at	
C1	1458426_at	Kinesin family member 1B
C1	1453603_at	RIKEN cDNA 2700022O18 gene
C1	1439587_at	LEM domain containing 3
C1	1453269_at	unc-5 homolog B (C. elegans)
C1	1440497_at	CDNA clone IMAGE:5690974
C1	1420044_at	
C2	1448548_at	tubby like protein 4
C2	1421858_at	a disintegrin and metallopeptidase domain 17
C3	1428660_s_at	torsin family 3, member A
C3	1428212_x_at	ribosomal protein L31 /// similar to ribosomal protein L31 /// similar to ribosomal protein L31 /// similar to ribosomal protein L31 /// similar to ribosomal protein L31 /// similar to ribosomal protein L31 /// similar to ribosomal protein L31 /// similar
DI	1422307_at	
D1	1452918_at	DNA segment, Chr 19, ERATO Doi 737, expressed
D1	1420082_at	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 750, expressed
DI	1455164_at	Cdc42 GTPase-activating protein
DI	1427509_at	BAI1-associated protein 3
DI	1437128_a_at	RIKEN cDNA A630033E08 gene
DI	1419658_at	RIKEN cDNA C920025E04 gene
DI	1434337_at	Transcribed locus
DI	1426640_s_at	tribbles homolog 2 (Drosophila)
D1	1426215_at	dopa decarboxylase
DI	1435746_at	serine/arginine-rich protein specific kinase 2
D2	1454938_at	sorting nexin 13
D2	1435491_at	RIKEN cDNA 9830167H18 gene
D2	1435567_at	phosphorylase kinase alpha 1
D2	1444176_at	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit D2
D2	1420682_at	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 1 (muscle)
D2	1430218_at	RIKEN cDNA 4933424M12 gene
D2	1457163_at	RIKEN cDNA D730035F11 gene

D2	1437636_at	Similar to Interferon-activatable protein 203 (Ifi-203) (Interferon- inducible protein p203)
D2	1441293_at	Adult male accessory axillary lymph node cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:G630004G16 product:unclassifiable, full insert sequence
D2	1453261_at	RIKEN cDNA 2610035D17 gene
D2	1450470_at	
D3	1449354_at	U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor (U2AF) 1, related sequence 1
D3	1440825_s_at	coiled-coil domain containing 28A
D3	1416251_at	minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe) (S. cerevisiae)
E1	1436807_x_at	tripartite motif-containing 62
El	1453465_x_at	RIKEN cDNA 4930402H24 gene
El	1456395_at	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha
El	1457949_at	Transcribed locus
El	1451507_at	myocyte enhancer factor 2C
E1	1423086_at	Niemann Pick type C1
El	1421027_a_at	myocyte enhancer factor 2C
E2	1460719_a_at	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1
E2	1460156_at	Acyloxyacyl hydrolase
E2	1453425_at	coiled-coil domain containing 83
E2	1449823_at	dachshund 2 (Drosophila)
E2	1443890_at	Transcribed locus
E2	1455297_at	spindlin family, member 2
F	1451012_a_at	cold shock domain protein A
F	1457691_at	Epstein-Barr virus induced gene 2
F	1427110_at	ribonucleoprotein, PTB-binding 1
F	1452367_at	coronin, actin binding protein 2A
F	1460628_at	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3
F	1437049_at	Transcribed locus
F	1436026_at	zinc finger protein 703
F	1454962_at	spire homolog 1 (Drosophila)
F	1435860_at	solute carrier family 5 (sodium-dependent vitamin transporter), member 6
F	1419204_at	delta-like 1 (Drosophila)
F	1426852_x_at	nephroblastoma overexpressed gene
F	1424546_at	cDNA sequence BC003965
F	1458350_at	
F	1452879_at	synaptopodin 2
F	1441206_at	synaptopodin 2
F	1444037_at	lectin, mannose-binding, 1
F	1425470_at	
F	1440340_at	UDP-Gal:betaGal beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 6
F	1435252_at	UDP-Gal:betaGal beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 6

F	1425471_x_at	
F	1455697_at	PREDICTED: Mus musculus hypothetical protein LOC629064 (LOC629064), mRNA
F	1434163_at	expressed sequence AU024076
F	1438239_at	midline 1
F	1424594_at	lectin, galactose binding, soluble 7
F	1442024_at	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3E
F	1455380_at	cDNA sequence BC060677
F	1431071_at	metaxin 3
F	1422611_s_at	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3
F	1437111_at	zinc finger CCCH-type containing 12C
F	1427038_at	preproenkephalin 1
F	1458456_x_at	RIKEN cDNA 6430571L13 gene
F	1448411_at	Wolfram syndrome 1 homolog (human)
F	1425469_a_at	RIKEN cDNA 9030208C03 gene
F	1451346_at	methylthioadenosine phosphorylase
F	1434887_at	frequenin homolog (Drosophila)

G.2 Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht.

Publikationen in internationalen Fachzeitschriften

Katrin van Erp, Kristina Dach, <u>Isabel Koch</u>, Jürgen Heesemann and Reinhard Hoffmann. Role of strain differences on host resistance and the transcriptional response of macrophages to infection with Yersinia enterocolitica. Physiol Genomics 2006 1 25 75-84

Kristina Dach, Josip Zovko, Michael Hogardt, <u>Isabel Koch</u>, Katrin van Erp, Jürgen Heesemann and Reinhard Hoffmann. Bacterial toxins induce sustained mRNA expression of the silencing transcription factor KLF2 via inactivation of RhoA and Rhophilin-1. (Publikation eingereicht)

<u>Isabel Koch</u>, Kristina Dach, Jürgen Heesemann and Reinhard Hoffmann. A bacterial pathogen targets and inactivates NK cells. (Publikation eingereicht)

<u>Isabel Koch</u>, Jürgen Heesemann and Reinhard Hoffmann. The splenic cellular immune response to Yersinia infection in resistant and susceptible strains of mice. (Publikation in Vorbereitung)

Posterpräsentationen auf nationalen sowie internationalen Kongressen

Josip Zovko, Kristina Dach, Katrin van Erp, Michael Hogardt, <u>Isabel Koch</u>, Jürgen Heesemann and Reinhard Hoffmann. Y. enterocolitica YopT, P. aeruginosa ExoS ans S. aureus EDIN-B induce mRNA expression oft he silencing transcription factor klf2 in host macrophages and epithelial cells. 36th Annual Meeting of the DGfl German Society of Immunology and 36th Annual Meeting of the SSI Scandinavian Society for Immunology, Kiel 2005

Katrin van Erp, Kristina Dach, <u>Isabel Koch</u>, Jürgen Heesemann and Reinhard Hoffmann. Role of strain differences and the transcriptional response of macrophages to infection with Y. enterocolitica. International Symposium on Functional Genomics of Infectious Diseases and Inflammation, Giessen 2006

Anhang

<u>Isabel Koch</u> and Reinhard Hoffmann. Yersinia virulence proteins inhibt NK cell cytotoxicity and cytokine production. 1st joint meeting of European National Societies of Immunology and 16th European Congress of Immunology, Paris 2006

<u>Isabel Koch</u> and Reinhard Hoffmann. Yersinia virulence protein YopP inhibits NK cell cytokine production by blocking host cell IL-12 signaling. 37th Annual Meeting of the DGfl German Society of Immunology, Heidelberg 2007

<u>Isabel Koch</u> and Reinhard Hoffmann. Y. enterocolitica suppresses basic NK cell functions. Interact 2007 – 1st PhD Symposium of the Life Science Community Munich, München 2007

Vorträge auf nationalen sowie internationalen Kongressen

Josip Zovko, Kristina Dach, Katrin van Erp, Michael Hogardt, <u>Isabel Koch</u>, Jürgen Heesemann, Reinhard Hoffmann^{*}. Y. enterocolitica YopT, P. aeruginosa ExoS, and S. aureus EDIN-B induce mRNA expression of the silencing transcription factor klf2 in host macrophages and epithelial cells. 36th Annual Meeting of the DGfl German Society of Immunology and 36th Annual Meeting of the SSI Scandinavian Society for Immunology, Kiel 2005

<u>Isabel Koch*</u> and Reinhard Hoffmann. Yersinia virulence protein YopP inhibits NK cell cytokine production by blocking host cell IL-12 signaling. 37th Annual Meeting of the DGfl German Society of Immunology, Heidelberg 2007

G.3 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei:

Prof. Siegfried Scherer für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens und dass er sich ohne zu zögern bereit erklärt hat, diese Arbeit in der Fakultät des WZW der TU München zu vertreten.

Meinem Betreuer PD Dr. Reinhard Hoffmann für das große Interesse am Gelingen dieser Arbeit, die Möglichkeit, bereits früh an Kongressen teilzunehmen und diese Arbeit präsentieren zu können. Seine unerschütterliche Ruhe, schier endlose Geduld und dass er immer ein offenes Ohr für die großen und kleinen Sorgen des Laboralltages hatte. Vielen Dank für die anregenden Diskussionen, auch lange nach Abschluss der praktischen Arbeit, trotz Wechsel der Arbeitstelle.

Prof. Dr. Holger Rüssmann für die bereitwillige Übernahme des Sondergutachtens.

Prof. Jürgen Heesemann für die Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung eines modernen und gut ausgerüsteten Arbeitsplatzes am Max von Pettenkofer-Institut der LMU München.

PD Dr. Konrad Trülzsch für die unzähligen Yersinien-Mutanten, ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Angela Servatius von der Microarray-Facility für die schnelle und zuverlässige Durchführung der vielen Microarrays gegen Ende dieser Arbeit.

Meiner Kollegin und Platz-Nachbarin Kristina Dach, die mit mir alle Höhen und Tiefen einer Doktor-Arbeit durchlebt hat. Annika Schmid, Svea Dittmann und Katy Niedung für ihre Freundschaft, immerwährende Hilfsbereitschaft und lustige Mittagessen. Den Virologen vom ersten und zweiten Stock, insbesondere Rudi Haase, Dietlind Rose, Anja Ehrhardt und Armin Baiker für diverse Diskussionen während Kaffeepausen, Grillabende und Freitag-Feierabend-Runden. Danke, ohne Euch wäre es bedeutend langweiliger gewesen.

Dem Tierstallteam Christian Giller, Beatrix Lunk und Silke Birkmann möchte ich mich für die Aufzucht, Pflege und Haltung der Versuchstiere bedanken.

Meiner Familie, für ihre Zuversicht und ihren unerschütterlichen Glauben in mich.

Darüber hinaus ein Dankeschön an alle nicht namentlich erwähnten Kolleginnen und Kollegen am Institut für das gute Arbeitsklima.

G.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Isabel Koch
Geburtstag	
Geburtsort	
Ausbildung	
	Grundschule
	Gymnasium
	Studium der Chemie
	Studium der Biologie
	, Regensburg
	Promotion am Max von Pettenkofer-Institut, Ludwig-Maximilians- Universität München