

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

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

**Modulation der  
CYR61 und CTGF Expression  
in Epithelzellen durch *Yersinia enterocolitica*  
und andere Bakterien**

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

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

**vorgelegt von  
Nina Wiedmaier  
aus Stuttgart**

**2008**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Stevanovic

Gehe nicht wohin der Weg führen mag,  
sondern dorthin, wo kein Weg ist  
und hinterlasse eine Spur.

Jean Paul

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Funktion und Bedeutung von Epithelzellen .....	1
1.2	Gegenseitige Modulation von Epithelzellen und Mikroorganismen .....	2
1.3	Die Gattung <i>Yersinia</i> und ihre medizinische Bedeutung.....	2
1.3.1	<i>Yersinia pestis</i> , Verursacher des „Schwarzen Todes“ .....	3
1.3.2	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> .....	4
1.3.3	<i>Yersinia enterocolitica</i> .....	4
1.4	Pathogenitätsfaktoren von <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	6
1.4.1	Chromosomal kodierte Pathogenitätsfaktoren .....	7
1.4.2	Plasmid kodierte Pathogenitätsfaktoren.....	8
1.4.3	Das Typ III-Sekretionssystem .....	10
1.5	Pathogenese von <i>Yersinia enterocolitica</i> Infektionen .....	13
1.6	Rho-GTPasen – multiple zelluläre Regulatoren .....	16
1.7	CYR61 und CTGF, die CCN-Familie .....	17
1.7.1	Die CCN-Familie .....	17
1.7.2	Funktion und Regulation der CYR61/CTGF- Proteinexpression. ....	19
1.8	LPA, S1P und ihre Rezeptoren.....	22
1.9	Zielsetzung .....	23
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1	Material .....	25
2.1.1	Geräte .....	25
2.1.2	Verbrauchsmittel .....	26

---

2.1.3	Chemikalien .....	28
2.1.3.1	Allgemein.....	28
2.1.3.2	Antibiotika.....	30
2.1.3.3	Kommerzielle Kits.....	30
2.1.4	Proteine.....	30
2.1.4.1	Antikörper für Immunoblotting.....	30
2.1.4.2	Antikörper für Durchflusszytometrie (FACS).....	31
2.1.4.3	Größenstandards.....	31
2.1.4.4	Enzyme.....	32
2.1.5	Oligonukleotide .....	32
2.1.5.1	Oligonukleotide für Reverse Transkription .....	32
2.1.5.2	Oligonukleotide für quantitative Echtzeit-PCR .....	32
2.1.6	Zelllinien.....	33
2.1.7	Bakterienstämme.....	33
2.1.7.1	<i>Yersinia enterocolitica</i> Stämme.....	33
2.1.7.2	<i>Listeria monocytogenes</i> Stämme .....	34
2.1.7.3	Sonstige Bakterienstämme.....	34
2.1.8	Mausstämme .....	34
2.1.9	Kulturmedien .....	35
2.1.9.1	Zellkulturmedien .....	35
2.1.9.2	Bakterienkulturmedien.....	35
2.1.10	Puffer und Lösungen.....	36
2.1.10.1	Allgemein.....	36
2.1.10.2	Puffer und Lösungen für die Proteingelelektrophorese	36
2.1.10.3	Puffer und Lösungen für Immunoblotting (Westernblot)	37
2.1.10.4	Puffer und Lösungen für Durchflusszytometrie (FACS)	38
2.2	Methoden.....	39
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	39
2.2.1.1	Umgang mit RNA.....	39

---

2.2.1.2	Isolierung von RNA.....	39
2.2.1.3	Reverse Transkription (RT-PCR) .....	40
2.2.1.4	Quantitative Echtzeit-PCR mit TaqMan .....	41
2.2.1.5	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode zur relativen Quantifikation von mRNA-Mengen .....	45
2.2.2	Proteinchemische und allgemein biochemische Methoden .....	45
2.2.2.1	Präparation von Proteinextrakten .....	45
2.2.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford .....	45
2.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen... ..	46
2.2.2.4	Immunoblot (Westernblot) .....	48
2.2.3	Mikrobiologische Methoden .....	50
2.2.3.1	Konservierung von Bakterienstämmen .....	50
2.2.3.2	Kultivierung von <i>Y. enterocolitica</i> Stämmen .....	50
2.2.3.3	Vorbereiten von Bakterien und Bakterienüberständen zur Infektion von Zellen .....	51
2.2.3.4	Extraktion lipophiler Stoffe aus Bakterienüberständen... ..	51
2.2.4	Zellkulturmethoden.....	52
2.2.4.1	Kultivierung von HeLa-Zellen .....	52
2.2.4.2	Auftauen von Gewebekulturzellen .....	53
2.2.4.3	Einfrieren von Gewebekulturzellen.....	53
2.2.4.4	Bestimmung der Lebend-Zellzahl mit Trypan-Blau.....	54
2.2.4.5	Infektion von HeLa-Zellen mit Bakterien.....	54
2.2.5	Tierexperimentelle Methoden.....	55
2.2.5.1	Präparation von Darmepithelzellen der Maus .....	55
2.2.6	Durchflusszytometrie Methoden (FACS) .....	56
2.2.6.1	FACS-Analyse von Darmepithelzellen der Maus.....	56
2.2.7	Statistik.....	57

---

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>58</b>
3.1	Die Induktion von CYR61/CTGF in Epithelzellen durch <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	58
3.1.1	Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression.....	58
3.1.2	Induktion der CYR61/CTGF Proteinexpression .....	60
3.1.3	Induktion von CYR61/CTGF in Darmepithelzellen der Maus.....	61
3.1.3.1	Durchflusszytometrische Analyse von primären Maus-Darmepithelzellen.....	62
3.1.3.2	Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression .....	67
3.2	<i>Yersinia Outer Protein T</i> (YopT) inhibiert die CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen.....	68
3.3	Die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression wird durch sezernierte, lipophile Signalstoffe vermittelt .....	69
3.3.1	Sezernierte Signalstoffe vermitteln CYR61/CTGF mRNA-Expression.....	70
3.3.2	Lipophile Signalstoffe vermitteln CYR61/CTGF mRNA-Expression.....	72
3.4	LPA-Rezeptoren und Rho-GTPasen sind am Signalweg der CYR61/CTGF mRNA-Expression beteiligt .....	74
3.5	Die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression ist eine generelle Reaktion von Epithelzellen nach Interaktion mit Bakterien.....	77
3.5.1	Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression durch verschiedene Bakterienspezies .....	78
3.5.2	CYR61/CTGF mRNA-Expression ist generell über sezernierte Mediatoren und LPA-Rezeptoren vermittelt .....	80
3.6	Die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression durch <i>Listeria monocytogenes</i> .....	82
3.6.1	Sezernierte Signalstoffe vermitteln über LPA-Rezeptoren CYR61/CTGF mRNA-Expression.....	82
3.6.2	Listeriolysin induziert CYR61/CTGF mRNA-Expression .....	84

---

---

3.7	Schlussfolgerungen .....	86
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>88</b>
4.1	<i>Yersinia enterocolitica</i> und die Modulation der CYR61/CTGF Expression in Epithelzellen.....	88
4.1.1	LPA und LPA-Rezeptoren .....	89
4.1.2	YopT und Rho-GTPasen.....	91
4.2	Verschiedene Bakterienspezies modulieren die CYR61/CTGF Expression in Epithelzellen, die Bedeutung von Rho-GTPasen.....	93
4.2.1	Induktion von CYR61/CTGF in Epithelzellen durch Pseudomonaden .....	94
4.2.2	Induktion von CYR61/CTGF in Epithelzellen durch <i>Staphylokokkus aureus</i> .....	96
4.2.3	Induktion von CYR61/CTGF in Epithelzellen durch Listerien .....	97
4.3	Die Beeinflussung von Wirtszellfunktionen durch Bakterien .....	99
4.4	Die physiologische Bedeutung der Induktion von CYR61/CTGF durch Bakterien.....	102
4.4.1	Induktion der CYR61/CTGF Expression als „Stressreaktion“ .....	102
4.4.2	Tumorproliferation und Bedeutung der Induktion der CYR61/CTGF Expression durch Bakterien .....	105
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	108
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>117</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>137</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>138</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>139</b>

---

# 1 Einleitung

## 1.1. Funktion und Bedeutung von Epithelzellen

Innere und äußere Oberflächen des Körpers sind durch eine Barriere aus besonderen Zellen, den Epithelzellen, begrenzt, welche vielfältige und lebenswichtige Funktionen erfüllen.

Epithelzellen trennen das interne Milieu eines Organismus von der äußeren Umwelt ab, und üben somit eine lebenswichtige Schutzfunktion aus. Mikroorganismen der Umwelt, wie etwa Darmbakterien des distalen Gastrointestinaltraktes, können die epitheliale Barriere nicht überwinden, und deshalb nicht in das Wirtsinnere eindringen. Neben dieser mechanischen Barriere nehmen Epithelzellen noch andere spezifische Funktionen innerhalb der verschiedenen Organsysteme eines Organismus wahr: Sie sind wesentlich beteiligt an Resorptions- und Sekretionsvorgängen. Im Gastrointestinaltrakt etwa sind sie verantwortlich für die Flüssigkeitsaufnahme und -sekretion, sowie für den Ionentransport. Des Weiteren können Epithelzellen auch Sinnesfunktionen erfüllen, wie beispielsweise das Riechepithel der Nasenschleimhaut oder die Tast- und Schmerzrezeptoren der Haut. Epithelzellen besitzen außerdem eine wesentliche Funktion innerhalb des angeborenen Immunsystems. Aufgrund ihrer Barrierefunktion sind sie diejenigen Zellen, welche als erste mit eventuellen Pathogenen in Kontakt treten. Diese Interaktion kann Epithelzellen dazu stimulieren, Botenstoffe, wie Zytokine, freizusetzen, die auf das Immunsystem eine aktivierende Wirkung haben. Somit fungieren Epithelzellen als primäre Sensoren für mikrobielle Pathogene, als sogenannte „Wachhunde des Immunsystems“ (Eckmann *et al.*, 1995).

## 1.2. Gegenseitige Modulation von Epithelzellen und Mikroorganismen

Pathogene Mikroorganismen haben spezifische Mechanismen entwickelt, Wirtszellen so zu manipulieren und zu beeinflussen, dass trotz der eigentlichen Schutz- und Abwehrfunktion der Epithelzellen eine Invasion und Infektion möglich wird. Durch vielfältige Pathogenitätsfaktoren können Mikroorganismen die Barriere der Epithelzellen überwinden, die vom Wirt generierte Immunantwort unterlaufen oder zu ihren Gunsten verändern, und sich auf diese Weise im Wirt vermehren und etablieren.

Das darmpathogene Bakterium *Yersinia (Y.) enterocolitica* etwa besitzt chromosomal kodierte Virulenzfaktoren, wie das *Yersinia* Invasin, wodurch in Epithelzellen als Reaktion auf eine Infektion mehr als hundert Gene induziert werden, um die Invasion und Ausbreitung der Mikroorganismen zu verhindern. Gleichzeitig wiederum kann *Y. enterocolitica* diese Genexpression durch in die Wirtszellen translozierte Signalproteine, wie die *Yersinia Outer Proteins* (Yops), reprimieren. Die Inhibition der Genexpression durch Yops erfolgt mittels einer direkten Interaktion mit Komponenten verschiedener Signaltransduktionswege. Interessanterweise induzieren Yops aber auch die Expression einiger weniger Gene in Epithelzellen, um sich im Wirt zu etablieren, wie beispielsweise *Glucocorticoid induced leucine zipper* (GILZ) und RhoB (Bohn *et al.*, 2004).

Das Verhältnis zwischen Abwehrfunktionen des Wirtes und Invasions- bzw. Manipulationsfunktionen der pathogenen Mikroorganismen und deren Pathogenitätsfaktoren entscheidet, welche Folgen die Interaktion von Wirt und Mikroorganismus für den Infektionsablauf hat.

## 1.3. Die Gattung *Yersinia* und ihre medizinische Bedeutung

Die Gattung *Yersinia* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* (Schleifstein und Coleman, 1939). Yersinien sind fakultativ anaerobe, Gram-negative Stäbchenbakterien. Sie sind ubiquitär verbreitet, pleomorph, psychrophil, nicht sporenbildend und wachsen optimal bei 27-30 °C (Cornelis *et al.*, 1998). Von den

elf beschriebenen Spezies dieser Gattung ist bisher nur bei dreien eine krankheitserregende Wirkung beim Menschen nachgewiesen (Brenner, 1979). Trotz teilweise unterschiedlicher Ansteckungswege und Krankheitsbilder zeigen alle drei humanpathogenen Stämme einen deutlichen Tropismus für lymphoides Gewebe und verfügen über Mechanismen, sich der Immunantwort des Wirtes zu entziehen (Grosdent *et al.*, 2002).

### **1.3.1. *Yersinia pestis*, Verursacher des „Schwarzen Todes“**

*Yersinia pestis* entwickelte sich vor einigen tausend Jahren aus einem mutierten *Y. pseudotuberculosis* Klon (Achtman *et al.*, 1999). Die Trennung dieser beiden Arten wiederum von *Y. enterocolitica* erfolgte dagegen schon vor mehreren Millionen Jahren (Achtman *et al.*, 1999). *Y. pestis* bildet als einzige *Yersinia* Art bei 37 °C eine Polysaccharidkapsel.

Die Pest ist eine Zoonose, deren primäres Reservoir wildlebende Nager und Flöhe sind. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt durch Flohbisse oder direkten Kontakt zu infizierten Nagetieren, hierbei hauptsächlich Ratten. Die Inkubationszeit liegt zwischen wenigen Stunden und sieben Tagen. In dieser Zeit gelangt der Erreger über das lymphatische System in lokale Lymphknoten und vermehrt sich dort, wodurch es zu einer starken Lymphknotenschwellung, sogenannten Bubonen, kommt („Beulenpest“). Diese Geschwüre zerfallen durch eitrige Einschmelzung. Von den Lymphknoten aus kann sich der Erreger lymphogen oder hämatogen im Körper ausbreiten, was zu einer oft tödlich verlaufenden Sepsis („Pestsepsis“) führt. Besonders fulminante Verläufe werden bei Streuung des Erregers in die Lunge („Lungenpest“) beobachtet. In diesem Fall kann zusätzlich eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch über das Sputum erfolgen.

Zu den Symptomen der Pesterkrankung gehören hohes Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen, schweres Krankheitsgefühl, starke Lymphknotenschwellungen und, je nach Form, pulmonale oder gastrointestinale Symptome (Crook *et al.*, 1992), sowie Haut- oder Organblutungen.

Zur Behandlung ist der sofortige Beginn einer Antibiose mit Tetracyklinen, Chinolonen oder Co-Trimoxazol erforderlich. Ohne Behandlung verläuft die Erkrankung in etwa der Hälfte der Fälle letal (Putzker *et al.*, 2001).

Die Pest ist seit der Antike bekannt, und war vor allem im Mittelalter und der frühen Neuzeit für verheerende Epidemien verantwortlich. Vor allem die Pandemie zwischen dem 14. und 17. Jahrhundert hatte fatale Folgen für Europa („der schwarze Tod“) und kostete 30-40 % der damaligen Bevölkerung das Leben (Smego *et al.*, 1999). Alexandre Yersin isolierte und identifizierte den Pesterreger in Menschen und Ratten 1894 in Hongkong. Pesterkrankungen sind heute vor allem endemisch in einigen Regionen Indiens und Afrikas zu finden; in den Industriestaaten (außer den USA) spielen Infektionen mit *Y.pestis* heutzutage, dank höherer Hygienestandards kaum eine Rolle mehr (Perry und Fetherston, 1997). Zunehmend in den Blickpunkt rückt der Erreger allerdings gegenwärtig durch seine Eignung als Biowaffe (Lippi und Conti, 2002).

### **1.3.2. *Yersinia pseudotuberculosis***

*Y. pseudotuberculosis* ist nahe mit *Y. pestis* verwandt und ursprünglich ein Nagetierpathogen, gehört aber, wie *Y. enterocolitica*, zu den enteropathogenen Yersinien (Smego *et al.*, 1999). Nach oraler Aufnahme kann es bei Menschen zu Diarrhoen, Kachexie und in seltenen Fällen sogar zum Tod durch Sepsis kommen. Der Infektionsweg ähnelt dem von *Y. enterocolitica* (Marra und Isberg, 1997).

### **1.3.3. *Yersinia enterocolitica***

*Y. enterocolitica* ist die am häufigsten isolierte humanpathogene *Yersinia*-Spezies. Sie besiedelt als Enteropathogen den Darm von Säugetieren, ist aber auch im Boden und in Oberflächenwasser zu finden. Die Aufnahme erfolgt fäkal-oral, über kontaminierte Nahrungsmittel wie Schlacht- und Milchprodukte, oder durch mit kontaminiertem Wasser zubereitete Lebensmittel; so wurden

Endemien etwa über Schulmilch oder Tofu ausgelöst (Aleksic und Bockemühl, 1990; Cover und Aber, 1989; FDA/CFSAN Bad Bug Book). In seltenen Fällen kann der Erreger auch über Bluttransfusionen übertragen werden (Stenhouse und Milner, 1982).

Es erkranken vor allem Kinder und immundefiziente Personen. Schwere Verläufe werden vor allem bei der Serogruppe 0:8 beobachtet, wohingegen die Serogruppen 0:3 und 0:9 ein abgeschwächtes Bild zeigen (Bradford und Gutman, 1974; Lee *et al.*, 1990; Bottone, 1997).

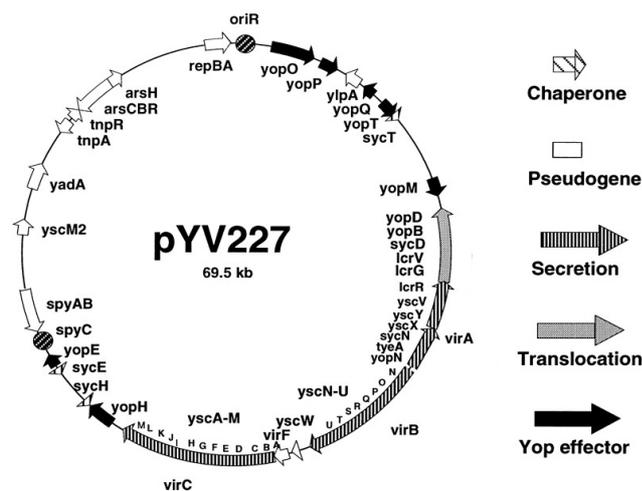
Die Manifestation einer Yersiniose ist sehr vielgestaltig und äußert sich nach einer Inkubationszeit von 24 bis 48 Stunden etwa als akute Gastroenteritis bzw. Enterokolitis und mesenteriale Lymphadenitis, verbreitet sind aber auch asymptomatische Infektionen begleitet von leichter Bakteriämie. Die Infektion ist in der Regel selbstlimitierend. Selten verläuft sie allerdings septisch, mit Abszessen in Leber, Milz und anderen Organen wie Lunge, Knochen und Herz (Beeching *et al.*, 1985; Ismail *et al.*, 1987; Sebes *et al.*, 1976; Appelbaum *et al.*, 1983). Dies tritt gehäuft bei immunsupprimierten Patienten, unter Behandlung mit dem Chelatbildner Desferrioxamin oder bei Patienten mit überhöhter Eisenspeicherung, wie etwa Hämochromatose, auf (Bottone, 1997; Bouza *et al.*, 1980; Rabson *et al.*, 1975). Chronische Infektionen werden ebenfalls selten beobachtet (Heesemann *et al.*, 1988).

Als seltene, immunpathologische Folgeerkrankungen können eine reaktive Arthritis, ein Erythema nodosum, eine Uveitis oder eine Autoimmunthyreoiditis auftreten, insbesondere bei Patienten, die das *major histocompatibility complex* (MHC)-Gen HLA-B27 tragen (Ahvonen *et al.*, 1969; Ahvonen und Dickhoff, 1974; Wenzel *et al.*, 1996; Dequeker *et al.*, 1980; Toivanen *et al.*, 1985).

Nach elektronenmikroskopischen und zellbiologischen Untersuchungen wurde *Y. enterocolitica* primär als extrazelluläres Pathogen beschrieben (Autenrieth und Firsching, 1996; Hanski *et al.*, 1989; Devenish und Schiemann, 1981), es ist aber auch teilweise intrazellulär nachweisbar (Koornhof *et al.*, 1999). Ähnliche Befunde gelten auch für *Y. pseudotuberculosis* (Shepel *et al.*, 2001; Simonet *et al.*, 1990).

### 1.4. Pathogenitätsfaktoren von *Yersinia enterocolitica*

Um die Invasion in den Wirtsorganismus und die anschließende Ausbreitung zu ermöglichen, verfügen Yersinien über eine Vielzahl von Virulenzfaktoren. Diese sind teilweise chromosomal (Revell und Miller, 2001), teilweise auf dem Virulenzplasmid *plasmid Yersinia Virulence* (pYV, 70 kb, siehe Abb. 1) kodiert, welches bei den humanpathogenen *Yersinia*-Arten stark konserviert ist (Cornelis *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1998; Perry *et al.*, 1998; Snellings *et al.*, 2001) und in avirulenten Stämmen nicht vorkommt (Gemski, 1980; Portnoy *et al.*, 1981). Die Genexpression des pYV-Plasmids ist unter anderem abhängig von der Temperatur und der Kalziumkonzentration. So kommt es bei 37°C bzw. bei niedrigerer Kalziumkonzentration zu einer verstärkten pYV-Expression (Straley, 1991; Straley *et al.*, 1993).



**Abb. 1: Karte des Virulenzplasmids pYV227 von *Yersinia enterocolitica* (Serotyp 0:9)**  
Die Karte ist modifiziert nach Cornelis *et al.*, 1998.

Besondere Aufmerksamkeit gilt einer Gruppe von auf dem pYV-Plasmid kodierten Proteinen, den Yops (*Yersinia Outer Proteins*), welche verschiedenste Aufgaben erfüllen. Zum einen bilden sie Strukturproteine für den Aufbau eines Typ III-Sekretionssystems, zum anderen fungieren sie als sogenannte Effektor-Yops, welche durch dieses Sekretionssystem in die Wirtszelle transloziert wer-

den, um dort auf unterschiedlichste Weise auf die Wirtszelle und deren Signalweiterleitung einzuwirken.

Im Folgenden ist eine Auswahl der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von *Yersinia enterocolitica* dargestellt. Es existieren zudem noch viele weitere Virulenzfaktoren, über welche bisher noch wenig bekannt ist, so dass hier großes Forschungspotential besteht (Darwin und Miller, 1999; Gort und Miller, 2000; Nelson *et al.*, 2001).

#### 1.4.1. Chromosomal kodierte Pathogenitätsfaktoren

**Inv**     **Adhäsion, Invasin,**

Initiiert über Bindung an  $\beta$ 1-Integrine die Transzytose durch M-Zellen, die Internalisierung in Epithelzellen, sowie die Sekretion von Interleukin (IL) -8. Aktiviert B- und T-Lymphozyten zur Proliferation oder Zytokin-Sekretion, induziert bei T-Lymphozyten die Bildung von Pseudopodien und vermittelt haptotaktische und chemotaktische Wirkung (Isberg und Leong, 1990; Schulte *et al.*, 2000a und b; Pepe und Miller, 1993; Schulte *et al.*, 1998; Kampik *et al.*, 2000; Brett *et al.*, 1993; Ennis *et al.*, 1993; Lundgren *et al.*, 1996; Arencibia *et al.*, 1997).

**Ail**     **Adhäsions und Invasions Lokus**

Vermittelt neben der Adhäsion an, und der Invasion in Epithelzellen auch Serum-Resistenz (Miller und Falkow, 1988; Bliska und Falkow, 1992; Pierson und Falkow, 1990).

**Myf**     **Mukoider Yersinia Faktor**

Fimbrien, welche möglicherweise als intestinaler Kolonisierungsfaktor zusammen mit Yst Diarrhoe auslösen (Iriarte *et al.*, 1993).

**SodA Superoxid Dismutase A**

Detoxifiziert die durch Kontakt mit polymorphonukleären Leukozyten gebildeten Sauerstoff-Radikale und vermittelt Virulenz bei Besiedelung von Leber und Milz, nicht aber bei Kolonisierung der Peyerschen Plaques (Roggenkamp *et al.*, 1997).

**Yst Yersinia Stabiles Toxin**

Hitzestabiles Enterotoxin, welches die Guanylat-Zyklase intestinaler Epithelzellen stimuliert und Diarrhoen auslöst (Delor und Cornelis, 1992; Ramamurthy *et al.*, 1997; Robins-Browne *et al.*, 1979).

**HPI High Pathogenicity Island**

Kodiert für das Siderophor Yersiniabactin und damit assoziierte Gene, und vermittelt so die Aufnahme von Eisen. Hat möglicherweise zusätzlich immunsupprimierende Wirkung auf B- und T- Zellen, Makrophagen und polymorphnukleäre Neutrophile (Haag *et al.*, 1993; Autenrieth *et al.*, 1995; Autenrieth *et al.*, 1994).

**1.4.2. Plasmid kodierte Pathogenitätsfaktoren****YadA Yersinia Adhäsin A**

Vermittelt Adhärenz an Epithelzellen und professionelle Phagozyten. Bindet an Kollagen, zelluläres Fibronectin und Laminin. Übermittelt außerdem Phagozytoseresistenz und Schutz gegen Komplement-vermittelte Lyse (durch Bindung an Faktor H) und Defensine (Heesemann und Grüter, 1987; Roggenkamp *et al.*, 1996; Roggenkamp *et al.*, 1995; Schulze Koops *et al.*, 1993; Tamm *et al.*, 1993; China *et al.*, 1993).

**LcrV Low-Calcium-Response V**

Suppressiert die Expression von Tumornekrosefaktor (TNF) - $\alpha$  und Interferon (IFN) - $\gamma$  und inhibiert die Chemotaxis von Neutrophilen. Induziert

in Makrophagen die Produktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 (Nakajima *et al.*, 1995; Welkos *et al.*, 1998; Sing *et al.*, 2002).

**YopE Yersinia Outer Protein E**

Guanosintriphosphatase (GTPase) aktivierendes Protein, welches durch Interaktion mit den Rho-GTPasen Rho, Rac1 und Cdc42 zur Zerstörung von Aktin-Filamenten führt, und somit die Phagozytose verhindert (Rosqvist *et al.*, 1991; Black und Bliska, 2000; Pawel-Rammingen *et al.*, 2000).

**YopH Yersinia Outer Protein H**

Protein-Tyrosinphosphatase, welche die Proteine des fokalen Adhäsionskomplexes dephosphoryliert. Verhindert durch die Auflösung dieser fokalen Adhäsionskomplexe die Phagozytose durch Makrophagen und Granulozyten. Suppression des „oxidative burst“ und Inhibition der Antigen-Rezeptor assoziierten Signaltransduktionskaskaden in B- und T-Lymphozyten (Guan und Dixon, 1990; Black und Bliska, 1997; Bliska und Black, 1995; Ruckdeschel *et al.*, 1996; Yao *et al.*, 1999).

**YopM Yersinia Outer Protein M**

Agglutination von Plasma, homolog zum von-Willebrand-Faktor. Wird in den Nukleus transportiert (Leung *et al.*, 1990; Leung und Straley, 1989; Skrzypek *et al.*, 1998).

**YopO Yersinia Outer Protein O**

(YpkA in *Yersina pseudotuberculosis*)

Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts von Zellen, was zu deren Abrundung führt. Eine Protein-Kinase, welche durch Aktin aktiviert wird, und die Autophosphorylierung von Serin-Resten katalysiert, interagiert mit den Rho-GTPasen RhoA und Rac1 (Juris *et al.*, 2000; Galyov *et al.*, 1993; Barz *et al.*, 2000).

**YopP Yersinia Outer Protein P**

(YopJ in *Yersinia pseudotuberculosis*)

Induktion von Apoptose und Reduktion der TNF $\alpha$ -Sekretion in Makrophagen. Eine Cystein-Protease, welche die Caspase-Kaskade des Apoptose-Initiationsweges aktiviert, und durch Interaktion mit MAP-Kinase Kinasen und Inhibitor-Kappa-B-Kinase- $\beta$  (IKK $\beta$ ) die MAP-Kinase- und NF- $\kappa$ B-abhängigen Signaltransduktionswege blockiert (Denecker *et al.*, 2001; Boland und Cornelis, 1998; Orth *et al.*, 2000; Ruckdeschel *et al.*, 2001).

**YopT Yersinia Outer Protein T**

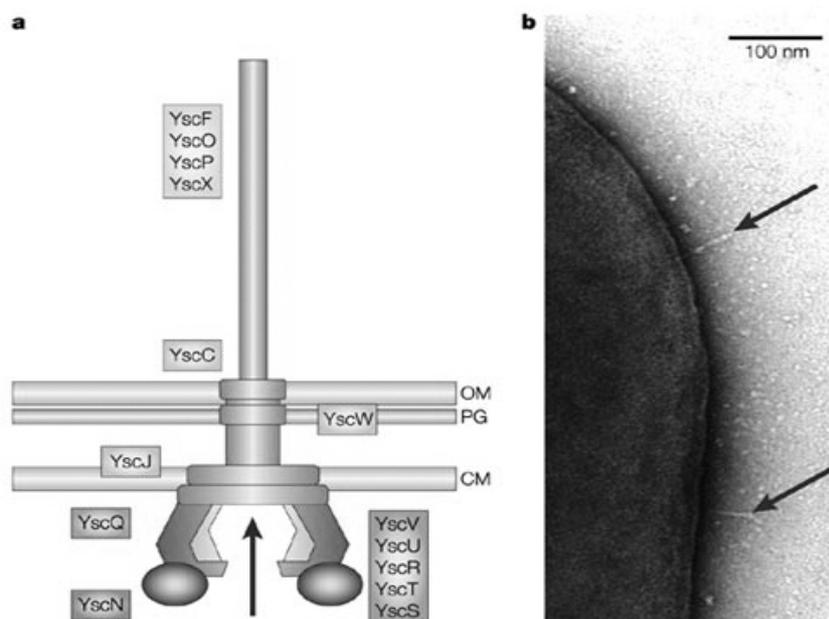
Zerstörung von Aktin-Filamenten und Veränderung des Zytoskeletts durch Modifikation von RhoA, was wiederum zu einer Umverteilung von RhoA von der Membran ins Zytosol führt (Iriarte und Cornelis, 1998; Zumbihl *et al.*, 1999).

**1.4.3. Das Typ III-Sekretionssystem**

Um die beschriebenen Effektor-Yops in die Zielzelle einzuschleusen, nutzen Yersinien den Mechanismus eines Typ III-Sekretionssystems (TTSS). Dieses wird von vielen Gram-negativen Bakterien gebildet, um Virulenzfaktoren zu sekretieren, oder in das Zytosol eukaryotischer Zellen zu injizieren (Galan und Collmer, 1999). Derzeit sind über zwanzig verschiedene Typ III-Sekretionssysteme in Tier- und Pflanzenpathogenen bekannt, wobei deren Wirkung von den sekretierten Proteinen abhängt (Hueck, 1998; Cornelis und van Gijsegem, 2000). Die Basalkörper von Flagellenapparaten und das TTSS sind evolutionär eng miteinander verwandt, so weisen zehn von etwa fünfundzwanzig Proteinen des TTSS Basalkörpers eine signifikante Sequenzhomologie zu Proteinen des Flagellenapparates auf (Cornelis *et al.*, 2002a).

Vor dem Kontakt mit eukaryotischen Zellen bauen Yersinien bei einer Temperatur, die der Körpertemperatur des Wirtes entspricht (37°C), zahlreiche Kopien ihres pYV-kodierten Sekretionsapparates an ihrer Zelloberfläche auf. Durch

diesen als Injektisom bezeichneten Apparat (siehe Abbildung 2a und b) passieren die Proteine die Bakterienhülle und gelangen in die Wirtszelle. Das Injektisom besteht aus einem Basalkörper, welcher die Peptidoglykanschicht und beide Membranen des Bakteriums durchspannt, sowie einer nadelförmigen Struktur, die dem Basalkörper aufgesetzt ist (Kubori *et al.*, 1998). Der distale Teil des Basalkörpers wird aus Polymeren von YscC (*Yersinia secretion C*) gebildet und weist eine zentrale Pore von etwa 50 Å Innendurchmesser auf (Koster *et al.*, 1997), der distale Teil der nadelförmigen Struktur wird durch Polymere von YscF gebildet und schließt einen Kanal von 60-70 Å Innendurchmesser ein (Hoiczyk und Blobel, 2001). Mutanten, welche kein YscF bilden, sind unfähig zur Sekretion von Yops, was darauf hinweist, dass YscF den Kanal während des Sekretionsvorgangs offen hält (Allaoui *et al.*, 1995; Torruellas *et al.*, 2005).



### Abb. 2: Das *Yersinia* Injektisom

**a** schematische Darstellung. Das Injektisom durchspannt äußere Membran (OM), Peptidoglykanschicht (PG) und cytoplasmatische Membran (CM) des Bakteriums. YscF, YscO, YscP und YscX sind extrazelluläre Bauteile des Injektisoms, wobei YscF Hauptbestandteil der Nadel ist. YscN stellt die ATPase, den Energielieferanten des Sekretionssystems dar (aus Cornelis, 2002a).

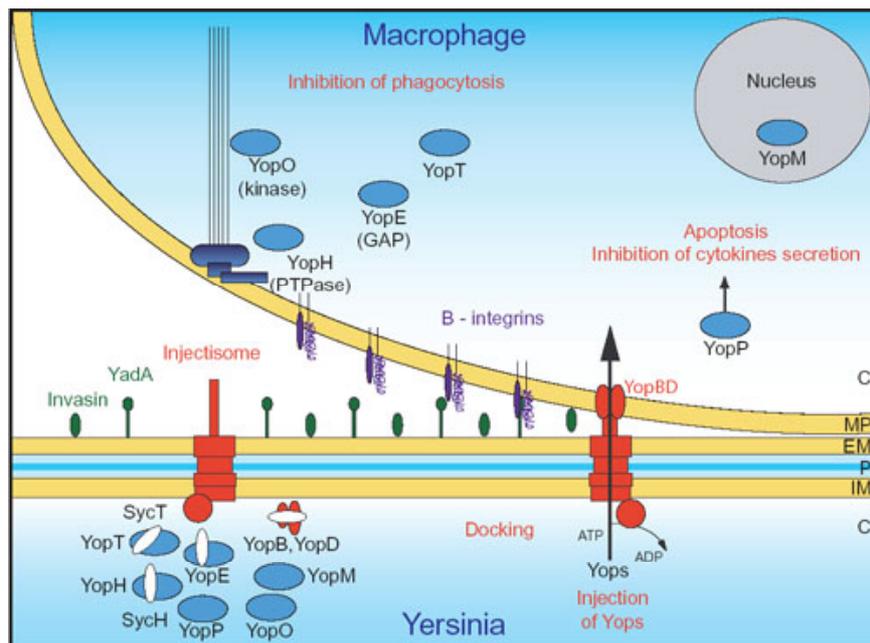
**b** elektronenmikroskopisches Bild der Injektisom-Nadeln an der Zelloberfläche von *Yersinia enterocolitica* (aus Cornelis, 2002a).

An den im Inneren der Bakterienzelle liegenden Teil des Basalkörpers ist YscN, eine Adenosintriphosphatase (ATPase), gebunden, welche als Energielieferant des Sekretionssystems fungiert (Woestyn *et al.*, 1994). Für die Injektion in die Zelle ist neben dem Sekretionsapparat auch ein enger physischer Kontakt der Zellen notwendig, was über die Adhäsine Invasin (Inv) und YadA erreicht wird (Ruckdeschel *et al.*, 1996), sowie die drei Translokator-Yops YopB, YopD und LcrV (Sarker *et al.*, 1998), welche ein Eindringen der Nadel in die eukaryotische Membran erlauben, indem sie diese destabilisieren (Cornelis, 2002a).

Endgültige Klarheit über das Translokationssignal, wie es genau zur Erkennung der Yops vom TTSS und zu der anschließenden Sekretion kommt, gibt es bislang noch nicht und ist Gegenstand laufender Forschung. Die momentan plausibelsten Modelle gehen davon aus, dass für eine optimale Sekretion der Effektor-Yops mehrere kryptische Erkennungssequenzen auf Proteinebene notwendig sind. Die zu sezernierenden Yops besitzen zum einen eine unmittelbar auf den N-Terminus folgende Sequenz von etwa 15 Aminosäuren, welche notwendig ist, um die Bindung an die TTSS-Komponenten zu ermöglichen (Ramamurthi und Schneewind, 2003), die Sekretion einiger Effektor-Yops erfordert zum anderen die Präsenz kleiner zytosolischer Chaperone, der *Specific Yop Chaperone* (Syc), welche keine Ähnlichkeit in Sequenz oder Struktur zu ATP-abhängigen Chaperonen, wie beispielsweise den Hitzeschockproteinen, aufweisen (Wattiau *et al.*, 1994). Syc bindet spezifisch an nur ein Effektor-Yop (zum Beispiel SycE an YopE), genauer gesagt an die oben schon beschriebene Sequenz von 15 Aminosäuren, und sorgt für eine optimale Entfaltung der Proteinstruktur, um die Effektor-Yops sekretionskompetent zu machen. Es konnte für YopE gezeigt werden, dass in Abwesenheit von SycE eine Translokation in die Wirtszelle fast gänzlich ausbleibt (Birtalan und Gosh, 2001). Die Interaktion von Syc mit dem entsprechenden Yop verhindert also dessen Degradation, womit wiederum die Interaktionswahrscheinlichkeit mit dem Translokationsapparat erhöht wird (Boyd *et al.*, 2000), und somit eine schnellere Translokation nach erfolgtem Wirtszellkontakt stattfinden kann (Cheng *et al.*, 1997; Frithz-Lindsten *et al.*, 1995). Möglicherweise dient die Chaperonbindung auch dazu, unter den

Yops eine Sekretionshierarchie zu etablieren, um die Wirkung auf die Zelle zu maximieren (Feldman *et al.*, 2002).

Der Vorgang der Typ III-Sekretion von *Yersinia* ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.



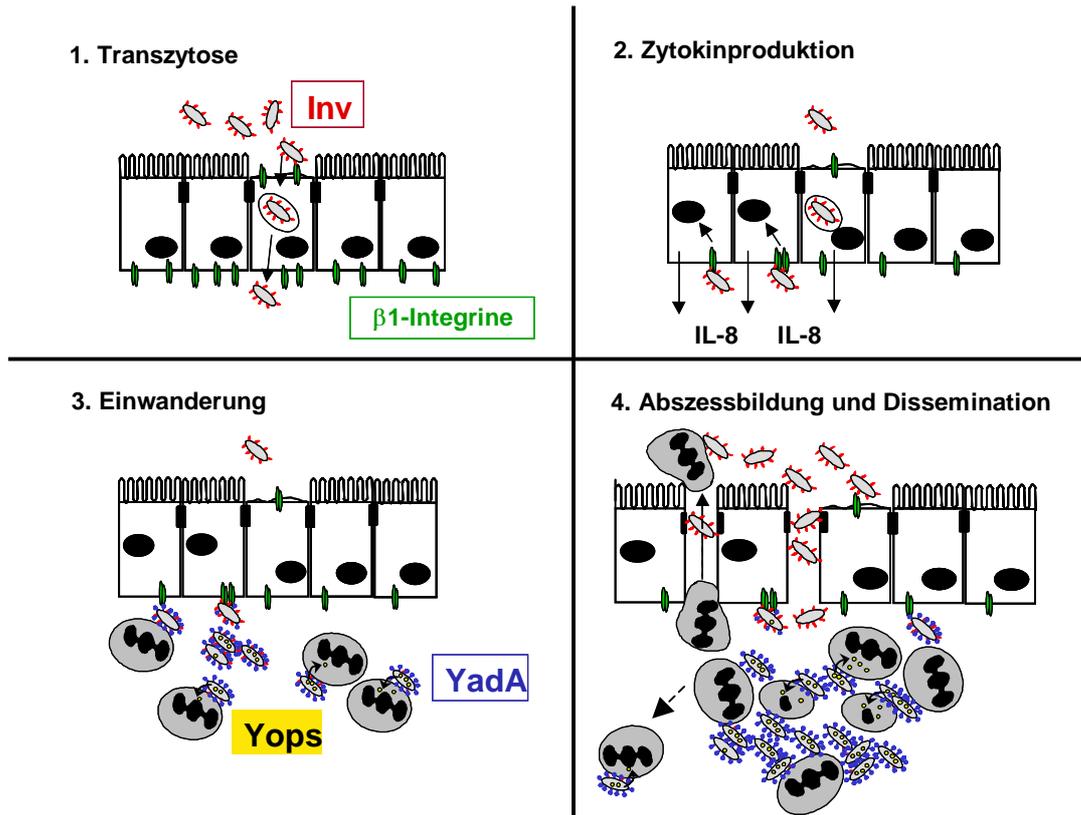
**Abb. 3: Modell der Typ-III-Sekretion von *Yersinia* (aus Cornelis, 2002b)**

Unter geeigneten Bedingungen exprimieren *Yersinia* den Typ III-Sekretionsapparat auf ihrer Zelloberfläche und synthetisieren Yops, welche dann vorerst intrabakteriell an ihr spezifisches Chaperon Syc gebunden vorliegen. Mit Hilfe der Adhäsine Inv und YadA tritt das Bakterium in Kontakt mit der eukaryontischen Zelle. Dies führt zu einer Öffnung des Sekretionskanals und zur Sekretion der Translokator-Yops B, D und LcrV, wodurch sich Poren in der Membran der Zielzelle bilden. Effektor-Yops können jetzt direkt ins Zytosol der Wirtszelle transloziert werden.

### 1.5. Pathogenese von *Yersinia enterocolitica* Infektionen

*Yersinia enterocolitica* kann nicht nur bei Menschen sondern auch bei Nagern eine Yersiniose auslösen, wobei sowohl Verlauf als auch Symptomatik sehr ähnlich sind (Carter 1975a; Carter 1975b). Der Infektionsprozess ist daher am Tiermodell, vor allem dem Mausmodell, besonders gut untersucht (Heesemann *et al.*, 1993).

Nach oraler Aufnahme, üblicherweise über kontaminierte Lebensmittel, und Überwindung des sauren Magensaftes mittels eines bakterieneigenen Urease-Systems (de Koning-Ward *et al.*, 1995; Young *et al.*, 1996) stellen die M-Zellen im follikel-assoziierten Epithel der Peyerschen Plaques des Dünndarms das primäre Ziel von *Yersinia enterocolitica* dar. Diese sind Teil des mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes des Magen-Darm-Traktes (MALT), welches eine immunologische Wächterfunktion im Gastrointestinaltrakt inne hat und Antigene aller Art aufnehmen kann, um diese den B- und T-Lymphozyten zu präsentieren, damit, wenn notwendig, eine Immunantwort ausgelöst werden kann. M-Zellen sind also spezialisierte Epithelzellen, welche potentielle Antigene aus dem Darmlumen phagozytieren, durch die Epithelschicht transportieren und somit in den Peyerschen Plaques für eine eventuelle Immunantwort zugänglich machen. Yersinien überwinden die Barriere der Mucosa durch Proteolyse; die eigentliche Aufnahme aus dem Darmlumen erfolgt dann mittels Transzytose über die M-Zellen, also ein eigentlich physiologischer Vorgang, durch welchen aber eine systemische Infektion überhaupt erst ermöglicht wird. In normale Darmepithelzellen können Yersinien nicht von der apikalen Seite her eindringen (Autenrieth und Firsching, 1996; Grutzkau *et al.*, 1990; Hanski *et al.*, 1989a und b). Der Kontakt mit den M-Zellen wird durch die Bindung von *Yersinia* Invasin an  $\beta$ 1-Integrine auf der M-Zell-Oberfläche hergestellt (Clark *et al.*, 1998; Schulte *et al.*, 2000b). *Yersinia enterocolitica* vermehrt sich dann zunächst in den Peyerschen Plaques (Autenrieth *et al.*, 1996; Grutzkau *et al.*, 1990). Durch die Interaktion mit Epithelzellen und Zellen der Peyerschen Plaques wird die Sekretion von Zytokinen wie IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , *macrophage chemoattractant protein* (MCP) -1 und Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor (GM-CSF) induziert (Arnold *et al.*, 1993; Kampik *et al.*, 2000), wodurch polymorphkernige Leukozyten (PMNs) und Monozyten angelockt werden (Autenrieth *et al.*, 1996). Etwa einen Tag nach Invasion bilden sich deshalb Mikroabszesse unterhalb des follikel-assoziierten Epithels aus (Autenrieth und Firsching, 1996). Der Vorgang der entero-invasiven Yersinien-Infektion ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt.



**Abb. 4: Ablauf einer entero-invasiven Yersinien-Infektion**

1. *Yersinia enterocolitica* bindet über Inv an  $\beta 1$ -Integrine von M-Zellen in den Peyerschen Plaques mit nachfolgender Transzytose. 2. Durch Bindung von Inv an die  $\beta 1$ -Integrine der Epithelzellen wird die Produktion von Zytokinen induziert (IL-8). 3. Durch die Zytokinsekretion werden polymorphkernige Leukozyten angelockt. 4. Von den Yersinien translozierte Yops und YadA verhindern die Phagozytose und es kommt zu Gewebszerstörung, Abszessbildung und Ausbreitung der Infektion (nach Grassl, 2003).

*Yersinia enterocolitica* kann sich der Eliminierung durch das primäre Immunsystem (PMNs, Makrophagen, Komplementsystem) in den Peyerschen Plaques mit Hilfe der verschiedenen Virulenzfaktoren teilweise widersetzen, indem unter anderem mittels YopH, YopE, YadA und SodA eine Eliminierung durch PMNs vermieden wird (Ruckdeschel *et al.*, 1996; Roggenkamp *et al.*, 1997), Makrophagen durch YopE und YopH an der Phagozytose gehindert werden und bei diesen über YopP Apoptose induziert wird (Black und Bliska, 2000; Fallman *et al.*, 1995; Rosqvist *et al.*, 1988; Mills *et al.*, 1997; Monack *et al.*, 1997; Denecker *et al.*, 2001). Folglich ist eine systemische Infektion möglich und es kommt zur Ausbreitung in mesenteriale Lymphknoten und Organe des retikulo-endothelialen Systems wie Leber und Milz. Es gibt Hinweise, dass die-

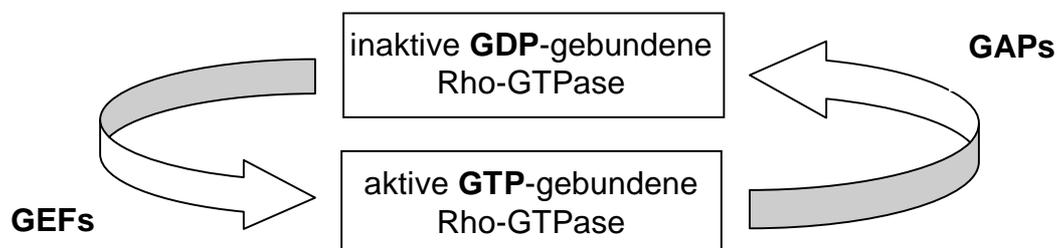
se Ausbreitung zellvermittelt geschieht, indem migrierende PMNs (Rüssmann *et al.*, 1996), B-Lymphozyten (Lundgren *et al.*, 1996) oder dendritische Zellen (Schoppet *et al.*, 2000) als Vehikel genutzt werden. Die systemische Infektion führt zu Abszessen in Milz, Leber und Lunge, in welchen Yersinien, Phagozyten und Lymphozyten beobachtet werden können (Autenrieth *et al.*, 1993).

### **1.6. Rho-GTPasen – multiple zelluläre Regulatoren**

Rho-GTPasen sind Enzyme, welche eine Untergruppe der Ras Superfamilie von kleinen GTPasen bilden (Lacal und McCormick, 1993). Mindestens fünfundzwanzig Mitglieder sind bisher beschrieben, worunter RhoA, Rac1 und Cdc42 bisher am besten untersucht sind (Wennerberg und Der, 2005). Diese GTPasen regulieren ein breites Spektrum zellulärer Vorgänge, wie beispielsweise die Organisation des Zytoskeletts, Gentranskription, Zell- und Tumorstadium sowie Apoptose (Bishop und Hall, 2000). Der Einfluss von Rho, Rac1 und Cdc42 auf stimulusabhängige Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts, welche die Grundlage vieler dynamischer Prozesse, wie etwa Chemotaxis, Adhäsion oder Phagozytose bilden, stellt eine Hauptfunktion der Rho-GTPasen dar (Hall, 1998). Die spezifische Interaktion verschiedener Rho-GTPasen ermöglicht somit die Ausbildung eines kooperativen Signalnetzwerkes, welches die Kontrolle komplexer biologischer Prozesse auf unterschiedlichen Ebenen erlaubt.

Rho-GTPasen wirken durch einen Zyklus aus Bindung und Hydrolyse von Guanin-Nukleotiden. Der Austausch von hydrolysiertem, biochemisch inaktivem Guanindiphosphat (GDP) in aktives Guanintriphosphat (GTP) resultiert in einer Konformationsänderung der GTPasen, welche dann die Bindung an spezifische Zielproteine erlaubt (Symons und Settleman, 2000). Katalysiert wird dieser Austausch durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs, *guanin nucleotide exchange factors*), indem diese die Freisetzung von GDP erleichtern und die nukleotid-freie Form der GTPase transient stabilisieren. Auf der anderen Seite fördern sogenannte GTPasen aktivierende Proteine (GAPs, *GTPase activating proteins*) die GTP-Hydrolyseaktivität von Rho-Proteinen und begünstigen somit

eine rasche Umwandlung in die aktive, GDP-gebundene Form (Ridley, 2001; Narumiya, 1996; Abb. 5). Rho-GTPasen fungieren sozusagen als ein empfindlicher „molekularer Schalter“, welcher in Gegenwart extrazellulärer Stimuli spezifische Signalantworten gezielt einleitet.



**Abb. 5: Schematisches Prinzip der Funktion von Rho-GTPasen**

Zyklischer Wechsel zwischen aktiver Guaninriphosphat (GTP)-gebundener und inaktiver Guanindiphosphat (GDP)-gebundener Form. Als Katalysatoren wirken GEFs (*guanin nucleotid exchange factors*) und GAPs (*GTPase activating proteins*).

## 1.7. CYR61 und CTGF, die CCN-Familie

Chromosomal kodierte Faktoren von *Yersinia enterocolitica*, wie das *Yersinia*-Invasin, induzieren in Epithelzellen nach Infektion mehr als hundert verschiedene Gene. Deren Expression generiert die proinflammatorische Wirtsantwort, welche der Eradikation der Pathogene dient (Bohn *et al.*, 2004). Zu diesen in Epithelzellen induzierten Genen gehören auch eine Reihe Invasin-unabhängiger Gene, wie *cysteine rich 61* (CYR61) und *connective tissue growth factor* (CTGF), welche in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden sollten.

### 1.7.1. Die CCN-Familie

CYR61 und CTGF gehören zur Familie der CCN-Proteine, einer Gruppe von Proteinen, welche erst in den letzten Jahren vermehrt zum Gegenstand der Forschung geworden ist. Der Name CCN ergibt sich aus den Anfangsbuchstaben der wichtigsten Mitglieder der Familie: CYR 61 (CCN1), CTGF (CCN2) und

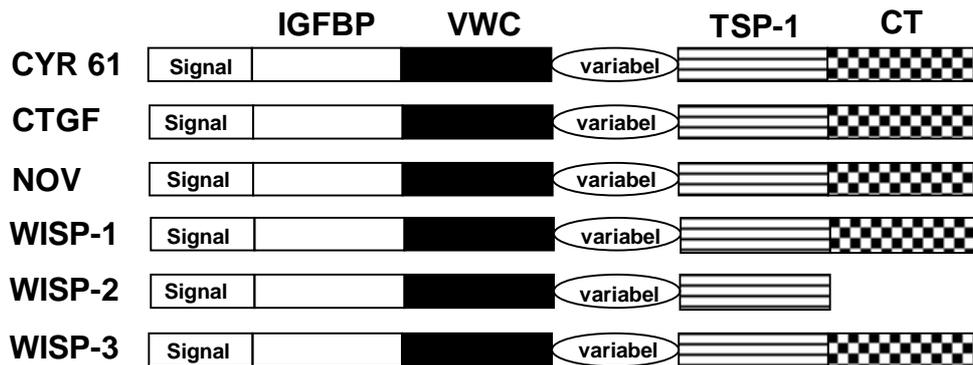
NOV (*nephroblastoma-overexpressed gene*, CCN3). Weitere Mitglieder sind die *WNT-induced secreted proteins*, WISP 1-3 (CCN4-6) (Bork, 1993).

Die etwa 30-40 kDa großen Proteine der CCN-Familie haben mit 10 % der Gesamtmasse einen sehr hohen Cysteinanteil (Brigstock, 1999; Lau und Lam, 1999). CCN-Proteine sind sekretierte, mit der extrazellulären Matrix assoziierte Proteine, welche an einer Vielzahl zellulärer Vorgänge beteiligt sind. Zielzellen können neben Epithelzellen auch Fibroblasten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Nervenzellen sein (Lau und Lam, 1999; Moussad und Brigstock, 2000; Brigstock, 2003).

Die Proteine der CCN-Familie enthalten vier konservierte, homologe Domänen, denen jeweils einzelne Exons auf Genebene zuzuordnen sind (Abbildung 6).

1. Eine *Insulin-like growth factor* -bindende Domäne (IGFBP), welche allerdings eine weit niedrigere Bindungsaffinität als die klassischen IGFBPs aufweist.
2. Eine von-Willebrand TypC Domäne (VWC), die für Interaktionen mit Wachstumsfaktoren wie *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) zuständig sein soll.
3. Eine Thrombospondin Typ 1 Domäne (TSP-1), welche für die Bindung an extrazelluläre Matrix (ECM) Proteine, Integrine und Matrix Metalloproteasen (MMPs) verantwortlich sein soll.
4. Eine Cystein-reiche Domäne (CT) am C-terminalen Ende des Proteins, welcher eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation zugeschrieben wird.

Obwohl bis heute ungeklärt ist, mit welchen Proteinen und auf welchem Weg CYR61/CTGF *in vivo* interagieren, so lassen die konservierten Domänen doch auf eine wesentliche Integrationsfunktion von CYR61/CTGF bei vielen Wachstumsfaktor-, Integrin- und ECM-vermittelten Signalwegen schließen. (Bork, 1993; Brigstock, 1999; Wong *et al.*, 1997; Bornstein, 2001; Lau und Lam, 1999; Brigstock, 1997; Ivkovic *et al.*, 2003)



**Abb. 6: Schematischer Aufbau der CCN-Familie**

Aufbau der CCN-Familie mit N-terminalem Sekretionssignal und vier homologen Domänen: IGFBP (*insulin-like growth factor* bindendes Protein), VMC (von-Willebrand Typ C Domäne), TSP-1 (Thrombospondin Typ 1 Domäne) und CT (cytein-reiches C-terminales Ende). Zentral befindet sich eine variable Region. WISP-2 weist keine CT-Domäne auf. (modifiziert nach Lau und Lam, 1999)

Die Suche nach hochaffinen, spezifischen CCN-Rezeptoren blieb bislang ohne Erfolg, so dass zum derzeitigen Stand der Forschung davon ausgegangen wird, dass die CCN-Proteine Brückenglieder zwischen extrazellulären Matrixproteinen und zellulären Rezeptoren darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass hierbei die Bindung an  $\beta$ 1-Integrine und Heparansulfatproteoglykane (HSPGs) eine große Rolle spielen. So wurde beispielsweise unlängst beschrieben, dass die CYR61 getriggerte Induktion des antiapoptotischen Faktors XIAP durch  $\beta$ 1-Integrine vermittelt wird (Lau und Lam, 1999; Chen *et al.*, 2000; Grzeszkiewicz *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2004).

Die verschiedenen Funktionen der CCN-Proteine werden also entweder durch Interaktion mit spezifischen Integrin Rezeptorsubtypen an der Oberfläche der jeweiligen Zielzelle, durch Bindung an HSPGs als Co-Rezeptoren, durch Interaktion mit anderen Wachstumsfaktorrezeptoren, oder auch aus einer Kombination dieser Vorgänge vermittelt (Brigstock, 2003).

### 1.7.2. Funktion und Regulation der CYR61/CTGF-Proteinexpression

CYR61 und CTGF sind die beiden bisher am besten untersuchten Mitglieder der Familie der CCN-Proteine. Sie sind an einer Vielzahl zellulärer Vorgänge,

wie Mitose, Adhäsion, Apoptose, Produktion von extrazellulärer Matrix und Migration beteiligt. Außerdem können sie regulierend auf Differenzierung, Entwicklung, Embryogenese, Angiogenese sowie Tumorwachstum, Wundheilung und fibrotischen Gewebeumbau einwirken (Brigstock, 2003). Somit sind die Proteine der CCN-Familie sowohl an physiologischen, als auch an pathophysiologischen Vorgängen in Organismen beteiligt.

Die abnorme Expression von CYR61 und CTGF ist mit vielen Erkrankungen, wie arteriosklerotisch bedingten Gefäßerkrankungen, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Tumorerkrankungen assoziiert (Oemar *et al.*, 1997; Dammeier *et al.*, 1998; di Mola *et al.*, 2004). So konnte etwa in steroid-abhängigen Brusttumoren eine übermäßige Expression von CYR61/CTGF festgestellt werden. Des Weiteren ist bekannt, dass CYR61 das Wachstum von Brusttumoren unterstützt und mit fortgeschritteneren, schwereren Krankheitsverläufen assoziiert ist (Tsai *et al.*, 2000; Sampath *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2001). Auch an der Pathophysiologie der Fibrose scheinen CYR61 und CTGF beteiligt zu sein, denn eine Überexpression konnte unter anderem bei Lungen- und Pankreasfibrose, sowie bei Nierenfibrose im Rahmen einer diabetischen Nephropathie oder Glomerulonephritis nachgewiesen werden. Außerdem konnte eine Korrelation der Überexpression mit dem Schweregrad der Erkrankung festgestellt werden (Lasky *et al.*, 1998; di Mola *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 1998; Stratton *et al.*, 2001).

Der Versuch, lebensfähige CYR61/CTGF-defiziente Mäuse zu züchten, scheiterte bislang, da diese auf grund schwerwiegender Defekte der Gefäß- und Skelettentwicklung letal waren. Dies deutet darauf hin, dass CYR61 und CTGF essentielle Regulatoren für Angiogenese und Osteosynthese darstellen (Ivkovic *et al.*, 2003; Mo *et al.*, 2003).

CYR61 und CTGF sind durch eine Reihe verschiedenster Signalstoffe induzierbar. Von großer Bedeutung ist die Induktion durch TGF- $\beta$  (Brunner *et al.*, 1991; Igarashi *et al.*, 1993; Grotendorst, 1997). TGF- $\beta$  ist ein wichtiger Wachstumsfaktor, welcher, wie die CCN-Proteine, an der Regulation vieler zellulärer Vorgänge beteiligt ist. Es liegt also nahe, einen Zusammenhang zwischen CYR61, CTGF und TGF- $\beta$  Expression zu vermuten. TGF- $\beta$  kann in vielen Zelltypen die

CYR61/CTGF Expression induzieren, da deren Promotorregion eine Sequenz aufweist, welche durch TGF- $\beta$  über sogenannte SMAD-Proteine aktiviert werden kann (Holmes *et al.*, 2001; Bartholin *et al.*, 2006). So konnte etwa gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  CTGF-vermittelt die Kollagensynthese in Fibroblasten induziert (Duncan *et al.*, 1999). Des Weiteren konnte auch bei der Wundheilung ein Zusammenhang zwischen TGF- $\beta$ - und CYR61/CTGF-Expression festgestellt werden, so dass man auch hier von einer gemeinsamen Signalkaskade zur Koordination des Wundheilungsprozesses ausgeht (Igarashi *et al.*, 1993).

Weitere Faktoren, welche zu einer verstärkten CCN-Proteinexpression führen, sind Östrogene, Hyperglykämie, *bone morphogenetic proteins* (BMPs), Serotonin, Angiotensin II, sowie verschiedene, etwa im Serum vorhandene Wachstumsfaktoren (Brigstock, 1999 und 2003; Igarashi *et al.*, 1993; Hahn *et al.*, 2000; Iwanciw *et al.*, 2003). Es wurde außerdem beobachtet, dass auch eine Veränderung der Architektur des Zytoskeletts und der Zellmorphologie durch mechanischen Stress, wie beispielsweise bei heilenden Wunden oder fibrotischem Gewebeumbau, ausreicht, um eine CYR61/CTGF Induktion herbeizuführen (Ott *et al.*, 2003; Tamura *et al.*, 2001). An der Induktion von CYR61 und CTGF ist oftmals auch ein Zusammenspiel verschiedener Rho-GTPasen wie RhoA, Rac1 und Cdc41 beteiligt (Han *et al.*, 2003; Chowdhury und Chaqour, 2004). So konnte etwa gezeigt werden, dass es durch eine Zerstörung der Mikrotubuli des Zytoskeletts sowohl zu einer Überexpression von CTGF, als auch zu einer verstärkten Aktivierung von RhoA kommt. Mittels einer Hemmung von RhoA blieb die Überexpression von CTGF aus, was auf einen Zusammenhang im Regulationsmechanismus hinweist (Ott *et al.*, 2003).

Für die vorliegende Arbeit ist außerdem von Bedeutung, dass auch durch Phospholipide wie Sphingosin-1-Phosphat (S1P) oder Lysophosphatidylsäure (LPA) eine Induktion von CYR61 und CTGF erreicht werden kann, da bekannt ist, dass LPA auch von Bakterien gebildet werden kann (Muehlich *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2003).

## 1.8. LPA, S1P und ihre Rezeptoren

Lysophosphatidylsäure (LPA) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) sind natürlich vorkommende, biologisch aktive Lysophospholipide, welche auf Zellfunktionen vielfältig Einfluss nehmen können. Beide wirken über spezifische G-Proteingekoppelte Rezeptoren der *endothelial differentiation gene* (EDG) Familie (Anliker und Chun, 2004). EDG-2, -4 und -7 sind die LPA-spezifischen Rezeptoren, deshalb auch LPA 1-3 genannt (Lynch, 2002). EDG-1, -3, -5, -6, -8 sind die S1P-spezifischen Rezeptoren und werden S1P 1-5 genannt (Spiegel und Milstien, 2002).

Durch Bindung an diese Rezeptoren können über  $G_i$ -,  $G_q$ -,  $G_{12/13}$ -Proteine und kleine GTPasen der Rho-Familie, vor allem Ras und Rac, multiple Effektorsysteme, wie die p38 *mitogen activated protein* (MAP) Kinase, Phospholipase C/D oder Adenylatzyklasten aktiviert werden, worauf es dann z.B. zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Proteinen des Zytoskeletts, oder zur Expression von Adhäsionsmolekülen kommt (Han *et al.*, 2003). So konnte etwa gezeigt werden, dass durch Bindung von LPA an LPA1-Rezeptoren ein  $G_i$ -Phosphoinositid-3-Kinase-Tiam1 Signalweg aktiviert wird, welcher wiederum zu einer Aktivierung von Rac1 führt, wodurch dann unter anderem Zellmotilität vermittelt wird (Van Leeuwen *et al.*, 2003). Auf diese Weise können LPA und S1P viele zelluläre Vorgänge beeinflussen (Han *et al.*, 2003).

LPA war lange Zeit nur als Vorstufe für die Biosynthese von Membranphospholipiden sowohl in Eukaryoten, als auch in Prokaryoten bekannt. Erst kürzlich wurde LPA als ein intrazelluläres Signalmolekül identifiziert, welches von Zellen wie aktivierten Thrombozyten oder Fibroblasten, von verletztem Gewebe oder bei Entzündung in großen Mengen freigesetzt wird. So werden heute für den hohen LPA-Gehalt im Serum (mikromolarer Bereich) die Thrombozyten verantwortlich gemacht. Extrazelluläres LPA ist wasserlöslich und erfüllt hormon- und wachstumsfaktorähnliche Funktionen. LPA spielt eine Rolle bei proliferativen und antiapoptotischen Veränderungen von Zellen, sowie bei Veränderungen des Zytoskeletts, wie etwa bei Zellmotilität, Adhäsion, Sekretion, Kontraktion oder Chemotaxis. Des Weiteren soll LPA an wichtigen Prozessen wie Neuroge-

nese, Myelinisierung, Angiogenese, Wundheilung und Tumorausbreitung beteiligt sein (Moolenaar, 1995; Contos *et al.*, 2000; Goetzl und An, 1998; Eichholtz *et al.*, 1993).

S1P ist ein Ceramid-Metabolit, der in Eukaryoten, nicht aber in Prokaryoten vorkommt (Spiegel und Milstien, 2002). S1P ist wie LPA ein aktives Lyso-phospholipid mit hormon- und wachstumsfaktorähnlicher Wirkung, ähnlich derer von LPA. So hat S1P etwa Einfluss auf Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose und Zellmigration (Spiegel *et al.*, 1998; Rosen und Goetzl, 2005; Han *et al.*, 2003). Es gibt außerdem Hinweise, dass S1P auch intrazelluläre Wirkungen hat, wie z.B. auf den Kalziumhaushalt (Mattie *et al.*, 1994).

Die Phospholipide LPA und S1P sind wichtige Signalmoleküle, welche bei jeglicher Art von mechanischem Stress oder Entzündung und Verletzung von Gewebe verstärkt exprimiert werden. Diese Wirkungen von LPA und S1P können auch über Proteine der CCN-Familie, CYR61 und CTGF, vermittelt werden (Muehlich *et al.*, 2004).

### **1.9. Zielsetzung**

Bei der Infektion von Epithelzellen mit pathogenen *Yersinia enterocolitica* Stämmen werden in den Zellen viele verschiedene Gene induziert, um die proinflammatorische Wirtsantwort zu generieren. Hierzu gehören auch CYR61 und CTGF, Gene der CCN-Familie (Bohn *et al.*, 2004). Bislang war eine Induktion von CYR61 und CTGF nach Infektion mit Bakterien nur von *Chlamydia pneumoniae*, einem obligat intrazellulären Erreger von Pneumonien, bekannt (Peters *et al.*, 2005).

Mit dieser Arbeit sollte die von Bohn *et al.* 2004 erstmals beschriebene Induktion von CYR61 und CTGF in Epithelzellen nach Infektion mit *Yersinia enterocolitica* näher untersucht werden.

Es sollte analysiert werden, über welche Signalstoffe die CYR61/CTGF Induktion vermittelt wird, beziehungsweise wodurch die Induktion gehemmt werden kann. Außerdem interessierte die Frage, ob auch andere Bakterien diese Induk-

tion in Epithelzellen auslösen können, ob die CYR61/CTGF Induktion in Epithelzellen also eine allgemeine Reaktion auf die Infektion mit Bakterien darstellt. Daraus ergab sich dann auch die Frage, welche biologische Funktion und welche Konsequenzen dieser Mechanismus für die Epithelzellen und für den Organismus haben könnte, und welche Schlüsse für die klinische Medizin hieraus zu ziehen sein könnten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

Bakterien-Brutschrank (B20)	Heraeus, Hanau
Drehschüttler (Rotator 220)	Bachofer, Reutlingen
Durchflusszytometer FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Reader	Tecan, Crailsheim
Eppendorf-Zentrifuge (Centrifuge 5417R)	Eppendorf, Hamburg
Filmentwicklermaschine Curix 60	AGFA, Köln
Gasbrenner	Warteweg LB, Göttingen
Geldokumentation Flour-S Multi-Imager	BioRad, München
Software: Quantity one	BioRad, München
Biometra Ti5	Biometra, Göttingen
Software: BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen
Gelelektrophoreseapparatur PowerPac 1000	BioRad, München
Gelschüttler	Ika Labortechnik, Staufen
Gelschüttler Unimax 2010	Heidolph, Kelheim
Heizblock (TR-L-288)	Eppendorf, Hamburg
Immunoblotting-Apparatur (Mini Protean III)	BioRad, München
Kolbenhub-Pipetten (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Kolbenhub-Pipettierhilfe (pipetus-akku)	Hirschmann, Eberstadt
Mäusekäfig (IVC, Sealsafe 1284 L)	Tecniplast, Hohenpreißenberg
Magnetheizrührer (RCT basic)	Ika Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop DM IRE2	Leica, Heidelberg
Mikroskop TelaVal 31, Axiovert 200	Zeiss, Jena
Multistepper	Eppendorf, Hamburg

Neubauer-Zählkammer	Brand, Landshut
PCR-Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
pH-Meter Modell inoLab® Level 2	WTW, Weilheim i. OB
Photometer Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Photometer Ultrospec 3000 pro	Amersham Pharmacia, Freiburg
Rotoren (SM 24, SS-34, SL 1500)	Sorvall, Hanau
Schüttelinkubatoren (Certomat BS-1)	Braun Biotech, Melsungen
SDS-PAGE-Kammern (Protean III; Mini Protean)	BioRad, München
Semi-Dry Transfer-Apparatur (Trans-Blot SD)	BioRad, München
Sicherheitswerkbank (BDK-S 1200, 1500)	BDK Luft-/Reinheitstechnik
Spannungsquellen für Elektrophorese (Power Pack 200, 300)	BioRad, München
Speed-Vag Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
TaqMan Gene Amp 5700 SDS (Sequence Detection System)	Applied Biosystems, USA
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vakuumpumpe (CVC 2000)	Vacuubrand, Wertheim
Vortexer Reax top	Heidolph Instr., Schwabach
Wasserbad (WB 10)	Memmert, Schwabach
Zellkultur-Brutschrank (BBD 6220)	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Eppendorf 5412 R, Minispin plus	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge (Sorvall RC 5C Plus)	DuPont, Bad Homburg

### 2.1.2. Verbrauchsmittel

Autoradiographie-Filme (Kodak X-OMAT)	Kodak, Cedex, Frankreich
Deckplättchen	Menzel, Braunschweig
Einmalküvetten	Sarstedt, Berlin
Eppendorf-Gefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg

FACS Röhrrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Glaskolben und Flaschen	Schott Duran, Mainz
Impfösen (10 µl)	Sarstedt, Berlin
Kanülen (Sterican 0,90 x 40 mm, 0,40 x 20 mm)	B. Braun, Melsungen
Kunststoffflaschen, steril (500ml)	Corning, USA
Kunststoffflaschenaufsatzfilter, steril (0,20 µm, Ø 70mm)	Corning, USA
Membranen für Immunoblots (PVDF, Nitrocellulose)	Millipore, Eschborn
Mikrotiter-Platten (Spitzboden, Rundboden)	Greiner, Nürtingen
Parafilm „M“	American National Can, USA
Pasteurpipetten	WU, Mainz
PCR-Gefäße	Fisher Scientific, Schwerte
pH-Indikatorpapier (pH 1 - 14)	Merck, Darmstadt
Pipetten (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen (10 µl)	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (100 µl)	Sarstedt, Berlin
Pipettenspitzen (1000 µl)	Greiner, Nürtingen
Rundboden-Röhrrchen (13 ml)	Greiner, Nürtingen
Skalpelle	B. Braun, Melsungen
Spitzboden-Röhrrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	B. Braun, Melsungen
Spritzenvorsatzfilter (0,20 µm, Celluloseacetat, Ø 26 mm)	Sartorius AG, Göttingen
TaqMan 96-Napf Thermo-Platten	Applied Biosystems, USA
TaqMan Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, USA
Whatman Filterpapier	Millipore, Eschborn
Zellkulturflaschen (80cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten (6-Napf)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellschaber	Corning Inc, USA

### 2.1.3. Chemikalien

#### 2.1.3.1. Allgemein

$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Acrylamid / Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30 )	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco, USA
Bacto Trypton	Difco, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie R-250	Roth, Karlsruhe
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DEPC (Diethylpyrocarbonat) -Wasser	Ambion, Huntingdon, UK
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
dNTPs (10 mM)	Roche, Mannheim
DTT (Dithiothreitol, 0,1 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
ECL-Western Blot Detektionssystem	Amersham Pharmacia, Freiburg
EDTA (Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)- Tetraacetat)	Serva, Heidelberg
Essigsäure 100% p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
FACS Lösungen (FACS-Flow, -Rinse, -Clean)	Becton Dickinson, Heidelberg
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	ICN, USA
Hirn-Herz-Bouillon (BHI-Pulver)	Difco, USA

Ki 16425 (3-(4-(4-((1-(2-Chlorophenyl)ethoxy)carbonylamino)-3-methyl-5-isoazolyl)benzylthio)propan-Säure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin (200mM)	Invitrogen, Karlsruhe
LPA (L- $\alpha$ -Lysophosphatidylsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
PBS Dulbecco	Gibco, BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin (100 $\mu$ g/ml)	Biochrom, Berlin
RNase Away	Mol Bio Prod, USA
PNPP (p-Nitrophenyl-Phosphat Dinatrium)	ICN, USA
Polymyxin-Agarose und Polymyxin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S Lösung	Serva, Heidelberg
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ROX Reference Dye	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
RT-PCR 5x First-Strand-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
S1P (D-Erythro-Sphingosin-1-Phosphat)	Calbiochem, USA
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
TaqMan Platinum qPCR Supermix-UDG	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco, BRL, Eggenstein
Trypton Peptone	ICN, USA
Tween 20	Merck, Darmstadt

Alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen und besitzen den Reinheitsgrad p.a.

### 2.1.3.2. Antibiotika

Ampicillin	ICN, USA	100 mg/ml in <i>a. dest.</i>
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	50 mg/ml in Ethanol
Gentamycin	ICN, USA	10 mg/ml in Wasser
Kanamycin	ICN, USA	50 mg/ml in Wasser
Nalidixinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	10 mg/ml in Wasser
Natrium m-Arsenit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	400 µM in Wasser

Alle Stammlösungen sind bei  $-20^{\circ}\text{C}$  stabil und werden dem Medium 1:1000 zugesetzt.

### 2.1.3.3. Kommerzielle Kits

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript <sup>TM</sup> cDNA Synthese Kit	Invitrogen, Karlsruhe

Bei der Verwendung von Kits wurden die jeweils von der Herstellerfirma mitgelieferten Puffer verwendet und nach Herstelleranleitung vorgegangen.

### 2.1.4. Proteine

#### 2.1.4.1. Antikörper für Immunoblotting

##### Primärantikörper:

Anti-CTGF (L-20)		
sc-14939 IgG	polyklonal, Ziege	Santa Cruz Biotech, USA
Anti-Cyr61 (H-78)		
sc-13100 IgG	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotech, USA
Anti-β-Aktin	monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Zweitantikörper:

Anti-Ziege IgG	Esel, HRP-Konjugat	Jackson Immuno Research, USA
Anti-Kaninchen IgG	Ziege, HRP-Konjugat	Jackson Immuno Research, USA
Anti-Maus IgG	Kaninchen, HRP-Konjugat	DakoCytomation, DK

**2.1.4.2. Antikörper für Durchflusszytometrie (FACS)**

Epithelzellenfärbung:

Anti-Maus IgG1	Kaninchen, FITC-Konjugat, Isotyp	DakoCytomation, DK
Anti-Cytokeratin human	Maus, FITC-Konjugat	Miltenyi Biotech, Gladbach

Lymphozytenfärbung:

Anti-Maus IgG2a, $\kappa$	Ratte, PE-Konjugat, Isotyp	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Maus IgG1, $\kappa$	Ratte, PE-Konjugat, Isotyp	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Maus IgG1, $\lambda$	Ratte, FITC-Konjugat, Isotyp	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD 11b	Maus, FITC-Konjugat	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD 11c	Maus, FITC-Konjugat	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD 19	Maus, FITC-Konjugat	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD 3	Maus, PE-Konjugat	Becton Dickinson, Heidelberg

**2.1.4.3. Größenstandards**

BenchMark <sup>Tm</sup> Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
---	-----------------------

#### 2.1.4.4. Enzyme

Reverse Transkriptase Super Script III (200 U/ $\mu$ l)	Invitrogen, Karlsruhe
RNAse OUT	Invitrogen, Karlsruhe
TcdB-10463 aus <i>Clostridium difficile</i>	Prof. I. Just, Toxikolog. Institut, Hannover

Alle Enzyme wurden in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet.

#### 2.1.5. Oligonukleotide

##### 2.1.5.1. Oligonukleotide für Reverse Transkription

Oligo-dT <sub>18</sub> -Primer (500ng/ $\mu$ l)	New England BioLabs, USA
---	--------------------------

##### 2.1.5.2. Oligonukleotide für quantitative Echtzeit-PCR

**Tab. I:** In dieser Arbeit verwendete TaqMan-Assays (Applied Biosystems, USA)

TaqMan-Assay	Zielgen
hsG6PD (Hs00166169_m1)	humane Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
hsCTGF (Hs00170014_m1)	humaner <i>connective tissue growth factor</i>
hsCYR61 (Hs00155479_m1)	humaner <i>cysteine rich growth factor 61</i>
mmGAPDH (Mm99999915_g1)	murine Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
mmCTGF (Mm00515790_g1)	muriner <i>connective tissue growth factor</i>
mmCYR61 (Mm00487498_m1)	muriner <i>cysteine rich growth factor 61</i>

## 2.1.6. Zelllinien

Für Zellkulturexperimente wurde die humane Epithelzelllinie HeLa 229 verwendet.

HeLa Zellen stammen aus einem besonders stark proliferierenden Zervixkarzinom, und wurden ursprünglich von der American Type Culture Collection (ATCC), USA, bezogen (No. CCL-2), ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)).

## 2.1.7. Bakterienstämme

### 2.1.7.1. *Yersinia enterocolitica* Stämme

**Tab. II:** In dieser Arbeit verwendete *Yersinia enterocolitica* Stämme

Stämme	Eigenschaften	Herkunft
<i>Y. enterocolitica</i> pYVeO:8 <sup>+</sup> WA-314 genannt: pYV <sup>+</sup>	klinisches Isolat, <i>Y. enterocolitica</i> Wildtypstamm WA-314 mit Virulenzplasmid pYVO:8; Nal <sup>R</sup>	Heesemann <i>et al.</i> , 1987
<i>Y. enterocolitica</i> pYVeO:8 <sup>-</sup> WA-314 genannt: pYV <sup>-</sup>	plasmidloses Derivat vom Wildtypstamm WA-314, Nal <sup>R</sup>	Heesemann <i>et al.</i> , 1987
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314- $\Delta$ <i>yop E</i> :Kan genannt: $\Delta$ <i>yop E</i>	YopE-defiziente Mutante, Deletion von YopE durch Insertion einer Kan-Kassette, am C- und N-Terminus bleiben jeweils 50 bp erhalten, Nal <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	B. Manncke, 2005
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314- $\Delta$ <i>yop H</i> :Kan genannt: $\Delta$ <i>yop H</i>	YopH-defiziente Mutante, Deletion von YopH durch Insertion einer Kan-Kassette, am C- und N-Terminus bleiben jeweils 50 bp erhalten, Nal <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	B. Manncke, 2005
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314- $\Delta$ <i>yop M</i> :Kan genannt: $\Delta$ <i>yop M</i>	YopM-defiziente Mutante, Deletion von YopM durch Insertion einer Kan-Kassette, am C- und N-Terminus bleiben jeweils 50 bp erhalten, Nal <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	B. Manncke, 2005
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314- $\Delta$ <i>yop P</i> :Cm genannt: $\Delta$ <i>yop P</i>	YopP-defiziente Mutante, Deletion von YopP durch Insertion einer Cm-Kassette, Nal <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Ruckdeschel <i>et al.</i> , 2001
<i>Y. enterocolitica</i> O:8 WA-314- $\Delta$ <i>yop T</i> :Cm genannt: $\Delta$ <i>yop T</i>	YopT-defiziente Mutante, Deletion von YopP durch Insertion einer Cm-Kassette, Nal <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Zumbihl <i>et al.</i> , 1999

### 2.1.7.2. *Listeria monozytogenes* Stämme

**Tab. III:** In dieser Arbeit verwendete *Listeria (L.) monozytogenes* Stämme

Stämme	Eigenschaften	Herkunft
<i>L. monozytogenes</i> ATCC BAA-679	klinisches Isolat, Wildtypstamm	ATCC
<i>L. monozytogenes</i> $\Delta$ <i>plc A</i>	Phospholipase C-defiziente Mutante	AG Goebel, Würzburg
<i>L. monozytogenes</i> $\Delta$ <i>hly</i>	Lysteriolysin-defiziente Mutante	AG Goebel, Würzburg
<i>L. monozytogenes</i> $\Delta$ <i>inl A</i>	Internalin-defiziente Mutante	AG Goebel, Würzburg

### 2.1.7.3. Sonstige Bakterienstämme

**Tab. IV:** In dieser Arbeit verwendete sonstige Bakterienstämme

Stämme	Eigenschaften	Herkunft
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	klinisches Isolat	ATCC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	klinisches Isolat	ATCC
<i>Escherichia coli</i> <i>mpk</i>	Isolat aus Colon von IL2 <sup>-/-</sup> SPF-Mäusen	Waidmann <i>et al.</i> , 2003
<i>Enterokokkus faecalis</i> ATCC 29212	klinisches Isolat	ATCC
<i>Staphylokokkus aureus</i> ATCC 25923	klinisches Isolat	ATCC
<i>Bartonella henselae</i> Marseille	klinisches Isolat	Drancourt <i>et al.</i> , 1996

### 2.1.8. Mausstämme

C57BL/6

Inzuchtstamm

Harlan Winkelmann GmbH,  
Borchen

## **2.1.9. Kulturmedien**

### **2.1.9.1. Zellkulturmedien**

Sofern nicht gebrauchsfertig bezogen, wurden die Medien für die Zellkultur steril angesetzt und bei 4°C bzw. nach Herstellerangaben gelagert. Das fötale Kälberserum (FKS) wurde vor der Benutzung 30 min bei 56°C inaktiviert.

RPMI 1640 / 10 % FKS / 1 % L-Glutamin / 1 % Penicillin-Streptomycin (Kulturmedium)

RPMI 1640 wurde als fertige Lösung (Biochrom, Berlin) bezogen. Dem Medium wurden zusätzlich 10 % FKS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 1 % L-Glutamin (Gln; 200 mM) (Invitrogen, Karlsruhe) und 1 % Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep; 100 µg/ml) (Biochrom, Berlin) zugesetzt.

RPMI 1640 / 10 % FKS / 1 % L-Glutamin

RPMI 1640 wurde als fertige Lösung (Biochrom, Berlin) bezogen. Dem Medium wurden zusätzlich 10 % FKS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 1 % L-Glutamin (Gln; 200 mM) (Invitrogen, Karlsruhe) zugesetzt.

RPMI 1640 / 1 % L-Glutamin (Infektionsmedium)

RPMI 1640 wurde als fertige Lösung (Biochrom, Berlin) bezogen. Dem Medium wurde 1 % L-Glutamin (Gln; 200 mM) (Invitrogen, Karlsruhe) zugesetzt.

### **2.1.9.2. Bakterienkulturmedien**

Bakterienkulturmedien wurden aus der institutseigenen Nährbodenküche bezogen. Alle Medien wurden nach der Herstellung im Autoklaven 20 min bei 121°C sterilisiert. Hitzelabile Komponenten wurden sterilfiltriert nachträglich zugege-

ben. Für Selektivmedien wurden nach dem Autoklavieren geeignete Antibiotika zugesetzt.

LB-Medium (Luria-Bertani):	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
	<i>ad 1 l</i>	<i>a. dest.</i>
	pH 7,5	

Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wurde dem Medium 15g/l Bacto Agar zugefügt. Die fertigen Platten wurden bei 4°C gelagert.

Hirn-Herz-Medium (BHI):	37 g/l	BHI-Pulver
<i>(Brain Heart Infusion)</i>	<i>ad 1l</i>	<i>a. bidest.</i>
	pH 7,4	

## 2.1.10. Puffer und Lösungen

### 2.1.10.1. Allgemein

PBS:	4 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	16 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	115 mM	NaCl

### 2.1.10.2. Puffer und Lösungen für die Proteingelektrophorese

10 % APS:	10 % (w/v)	APS in <i>a. bidest.</i>
10 % SDS:	10 % (w/v)	SDS in <i>a. bidest.</i>
AA/BA (30:0,8):	30 % (w/v)	Acrylamid
	0,8 % (w/v)	Bisacrylamid

Sammelgelpuffer:	0,5 M	Tris/HCl (pH 6,8)
Trenngelpuffer:	1,5 M	Tris/HCl (pH 8,6)
10x Laufpuffer (SDS-Page):	500 mM	Tris/HCl (pH 7,0)
	1,92 M	Glycin
	1 % (w/v)	SDS
5 x Probenpuffer (Laemmli):	250mM	Tris/HCl (pH 6,8)
	50 % (v/v)	Glycerin
	10 % (w/v)	SDS
	500mM	Dithiotreitol
	0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
Coomassie-Blue-Lösung:	1,25 g	Coomassie R-250
	500 ml	Methanol
	100 ml	Essigsäure
	<i>ad 1 l</i>	<i>a. dest.</i>
Entfärbelösung:	25 %	Ethanol
	8 %	Essigsäure

### 2.1.10.3. Puffer und Lösungen für Immunoblotting (Westernblot)

WB-Transferpuffer:	50 mM	Tris (pH 8,0)
	105 mM	Glycin
	1,3 mM	SDS
	10 % (v/v)	Methanol
WB-Waschpuffer:	0,9 %	NaCl
	10 mM	Tris/HCl (pH 7,4)
	0,2 % (v/v)	Tween 20
ECL-Lösung 1:	2,5 mM	Luminol
		(0,22 g <i>ad</i> 5 ml DMSO)
	400 µM	Paracoumarseure
		(0,075 g <i>ad</i> 5 ml DMSO)

	100 mM	Tris/HCl (pH 8,5)
ECL-Lösung 2:	5,4 mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	100 mM	Tris/HCl (pH 8,5)

Alle anderen Puffer sind unter der zugehörigen Methode beschrieben.

#### **2.1.10.4. Puffer und Lösungen für Durchflusszytometrie (FACS)**

PBSF:	5 %	FKS (hitzeinaktiviert 1 h, 56 °C)
	<i>ad</i> 10 ml	PBS

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1. Umgang mit RNA**

Aufgrund der Allgegenwärtigkeit und enormen Stabilität von RNasen müssen bei sämtlichen Arbeiten mit RNA (*ribonucleic acid*) besondere Vorsichtsmaßnahmen ergriffen werden.

So wurde stets auf Eis und mit frischen Handschuhen gearbeitet, außerdem wurden nur RNase-freie Materialien verwendet. Arbeitsfläche, ebenso potentiell kontaminierte Materialien und Geräte wurden vor Gebrauch mit RNase-Away gereinigt. Für Lösungen wurde nur DEPC-behandeltes Wasser eingesetzt, sowie Chemikalien, welche ausschließlich für RNA-Anwendungen reserviert waren und dementsprechend gehandhabt wurden.

Die Lagerung von RNA-Isolaten erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und ihre Konzentration wurde nach längerer Aufbewahrungszeit vor Gebrauch neu vermessen.

#### **2.2.1.2. Isolierung von RNA**

Die Isolierung von RNA aus dem Gesamtzell-Lysat der im 6-Well-Format ausgesäten und infizierten HeLa-Zellen erfolgte mit dem RNasy Mini-Kit (Qiagen, Hilden), wobei nach Herstellerangaben gearbeitet wurde.

Das Kit basiert auf Säulen mit Silicagel-Membranen, welche die RNA abhängig von Salzkonzentration und pH-Wert binden und wieder abgeben. Eventuell vorhandene RNasen werden durch einen stark denaturierenden Puffer zerstört.

### 2.2.1.3. Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Bei der reversen Transkription wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus RNA komplementäre *copy*-DNA (cDNA) synthetisiert und mittels einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert.

Aufgrund ihrer hohen Sensitivität erlaubt die RT-PCR eine genaue Quantifizierung der zu untersuchenden *messenger*-RNA (mRNA), welche in Zellkulturversuchen nur in geringer Quantität vorhanden ist.

Den Unterschied von mRNA im Vergleich zu anderen RNA-Formen bildet eine Sequenz aus mehreren aufeinanderfolgenden Adenin-Basen (Poly-A-Sequenz) an einem Ende des RNA-Stranges, so dass sich dieser spezifisch markieren lässt, indem man DNA-Stränge aus Thymidin-Basen (Oligo-dT) zu den RNA-Isolaten gibt, welche sich komplementär als Primer an die Poly-A-Sequenz anlagern (Primer-Annealing). An diesen Primer wiederum lagert sich dann die Reverse Transkriptase an und übersetzt den gesamten Strang in cDNA.

Da die isolierte Gesamt-RNA-Menge abhängig von der ursprünglichen Zellzahl in der Probe variiert, wurde für jede Probe der RNA-Gehalt mittels Photometer bestimmt, um für das weitere Vorgehen immer die gleiche RNA-Menge zu verwenden. Die photometrische Quantifizierung der RNA erfolgte bei 260 nm, hier entspricht eine optischen Dichte (OD) von 1,0 einer RNA-Lösung einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Um genaue Werte bei der RNA-Quantifizierung zu erhalten, wurden die Gesamt-RNA-Proben mit Tris (10 mM; pH 8,0) 1:50 verdünnt; auch die Kalibrierung des Photometers auf den Nullwert vor der Messung erfolgte mit Tris (10 mM; pH 8,0). Der RNA-Gehalt errechnet sich dann aus dem Produkt von gemessenem OD<sub>260</sub>-Wert, Verdünnungsfaktor und der RNA-Konzentration bei OD 1,0 (d.h. 40 µg/ml). Weiterhin liefert das Verhältnis aus den Absorptionswerten einer RNA-Lösung bei 260 nm und 280 nm eine Aussage über den Reinheitsgrad der RNA - und somit über die Qualität der Gesamt-RNA, wobei der optimale Wert bei 2,0 liegt.

Für die RT-PCR wurden 1-3 µg RNA pro Ansatz verwendet. Anhand des bestimmten RNA-Gehaltes der Proben wurde jeweils die einzusetzende Menge an

RNA in  $\mu\text{l}$  errechnet und in ein Reaktionsgefäß vorgelegt. Jede Probe wurde dann mit DEPC-Wasser (Ambion) auf ein Volumen von 9  $\mu\text{l}$  gebracht. Dazu wurden je Ansatz 500 ng Oligo-dT<sub>18</sub>-Primer (GIBCO) hinzupipettiert, so dass jeder Ansatz ein Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  ergab. Die Ansätze wurden dann für 5 min auf 70°C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Das Primer-Annealing erfolgte dann während der anschließenden Abkühlung der Ansätze auf 4°C. Währenddessen erfolgte das Ansetzen des RT-Mastermixes (Bestandteile siehe unten). Nach dem Primer-Annealing wurde zu jedem Ansatz 10  $\mu\text{l}$  des Mastermixes hinzupipettiert und durchmischt. Der gesamte Ansatz wurde nun für die Reverse Transkription 1,5 h bei 42°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Erhitzung auf 70°C für 15 min, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren, und am Ende eine Abkühlung auf 4°C. Die so erhaltene cDNA wurde 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt und bei – 20°C aufbewahrt oder sofort für weitere Analysen verwendet.

Die gesamte Reaktion wurde in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Mastermix RT-PCR (1x Ansatz):

1 $\mu\text{l}$	Reverse Transkriptase Super Script III (200 U/ $\mu\text{l}$ )
1 $\mu\text{l}$	RNase Out
2 $\mu\text{l}$	dNTP-Mix (10 mM)
2 $\mu\text{l}$	DTT (0,1 M)
4 $\mu\text{l}$	5x First-Strand-Puffer (alle Produkte von Invitrogen, Karlsruhe)

#### **2.2.1.4. Quantitative Echtzeit-PCR mit TaqMan**

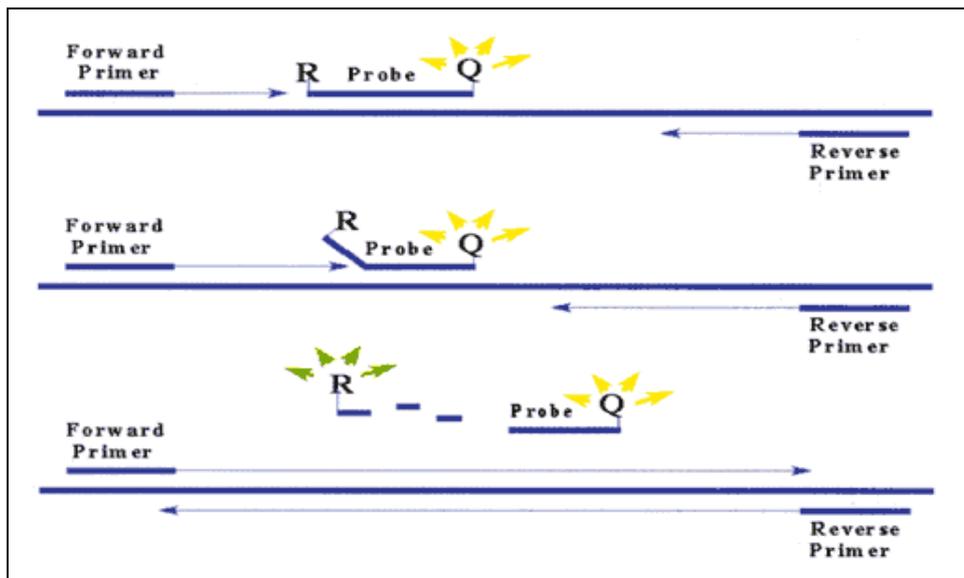
Die Methode der Echtzeit-PCR bietet die Möglichkeit, quantitative Analysen von DNA durchzuführen und damit Aussagen über die Gen-Induktion in einer Zelle zu treffen. Dabei werden nach jedem PCR-Zyklus Fluoreszenzsignale detek-

tiert, welche durch die Abspaltung von an den Oligonukleotiden gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen entstehen, wenn es zur Neustrangsynthese im Laufe des Zyklus kommt. Die Fluoreszenz ist also ein Maß für die Amplifikatmenge. Durch den direkten Vergleich mit parallel vervielfältigten Standards des gleichen Gens können die unbekannt Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Zwecks Normalisierung der Werte wurde in den Proben auch ein Haushaltsgen, also ein in eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimiertes Gen, gemessen (humane Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) bzw. Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) der Maus).

Bei einem TaqMan-Assay liegt zwischen den zwei spezifischen Oligonukleotiden (Primer) ein weiteres fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid (TaqMan-Probe). Dieses ist eine Sonde, welche am 5`-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am 3`-Ende oder intern mit einem Quencher-Farbstoff markiert ist. Bei einer intakten Sonde wird die Reporterfluoreszenzemission durch die Nähe des Quenchers zum Reporter unterdrückt. Kommt es während der Reaktion zur Neustrangsynthese, fragmentiert die Taq-Polymerase durch ihre 5`-3`-Exonukleasetätigkeit die TaqMan-Sonde, woraus die Trennung des Reporters vom Quencher resultiert, und damit die Reporterfluoreszenz freigesetzt wird (Abbildung 7). Die Reporterfluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen und nimmt proportional zur Menge des DNA-Amplifikats im Reaktionsgefäß zu. Die 5`-3` Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase erkennt nur die TaqMan-Sonden, welche an die Zielsequenz gebunden sind. Dadurch werden nur diese fragmentiert und nicht hybridisierte Einzelstränge bleiben unbeschadet.

Vorteil einer Quantifizierung mittels Echtzeit-PCR im Vergleich zur semi-quantitativen PCR ist, dass das entstehende Produkt ständig während der PCR gemessen werden kann. Somit ist in der linearen Phase der PCR-Reaktion eine Mengenbestimmung möglich, welche zu genaueren Ergebnissen als bei der Endpunktmessung einer semi-quantitativen PCR führt.



**Abb. 7: Prinzip der Real-Time-PCR mittels TaqMan-Sonde**

R - Reporterfluoreszenz, Q - Quencherfarbstoff, Probe - fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid. Erklärungen im Text (entnommen aus: Quantifizierung von PCR-Produktmengen durch Real-Time PCR-Verfahren, Wilfingseder und Stoiber, Institut für Hygiene- und Sozialmedizin und Ludwig Boltzmann-Institut für AIDS-Forschung, Innsbruck, <http://www.antibiotika-monitor.at>).

Die Quantifizierung der Echtzeit-PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenzschwellenwertes (Threshold Cycle,  $C_t$ -Wert). Der  $C_t$ -Wert ist derjenige PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Ab diesem Zeitpunkt erfolgt die Amplifikation des PCR-Produktes exponentiell. Gleichzeitig werden in einem PCR-Lauf Proben mit verschiedenen, vorher schon bekannten cDNA-Mengen (Standard) amplifiziert, mit deren Hilfe eine Standardgerade erstellt werden kann, um von einem bestimmten gemessenen  $C_t$ -Wert auf die cDNA-Konzentration der zu bestimmenden Probe zu schließen.

Es wurden jeweils 5  $\mu$ l der zu bestimmenden cDNA in einem Reaktionsansatz verwendet. Dieser enthielt darüber hinaus den TaqMan-Assay mit Primer und TaqMan-Sonde des zu detektierenden Gens, sowie ROX-Reference-Dye, um Schwankungen im Fluoreszenzsignal, die nicht auf die PCR zurückzuführen waren, auszugleichen. Des Weiteren war Platinum qPCR Supermix-UDG, welches aus den notwendigen Puffern, hitzestabiler Taq-DNA-Polymerase, Nukleotiden und einer hitzelabilen Uracil-DNA-Glycosylase bestand, enthalten, außerdem RNase freies DEPC-Wasser (genaue Mengenangaben siehe unten). Die

Uracil-DNA-Glycosylase, ein Enzym, das uracil-glycosidische Bindungen hydrolysiert, wird in diesem Fall eingesetzt, um Kontaminationen in der PCR durch vorausgegangene Amplifikationen zu eliminieren. Zu diesem Zweck wird in der Nukleotidmischung im Reaktionsansatz dTTP (desoxy-Thymidintriphosphat) durch dUTP (desoxy-Uraciltriphosphat) ersetzt, sodass die entstehenden Amplifikate gegenüber der Uracil-DNA-Glycosylase empfindlich werden. Vor dem eigentlichen Beginn der PCR-Reaktion wird diese also in einem extra Reaktionsschritt aktiviert, um eventuell im Reaktionsansatz befindliche, uracilenthaltende DNA abzubauen. Natürliche DNA und cDNA enthalten kein Uracil, so dass die eigentlich zu bestimmende cDNA Probe von diesem Vorgang unberührt bleibt. Die Reaktionsansätze wurden in TaqMan 96-Napf Thermo-Platten pipettiert, die Platte mit durchsichtiger Klebefolie (TaqMan Optical Adhesive Covers) verschlossen und bei 1000g für 2 min zentrifugiert, damit sich das gesamte Reaktionsvolumen am Boden der Platte sammelte und sich die einzelnen Komponenten gut mischten (alle Produkte von Invitrogen, Karlsruhe). Die gesamte Reaktion wurde dann im TaqMan Gene Amp 5700 SDS Sequenz Detektionssystem (Applied Biosystems, USA) durchgeführt.

Reaktionsansatz TaqMan Echtzeit-PCR (1x 20µl Ansatz):

5,0 µl	cDNA Probe
1,0 µl	TaqMan-Assay
0,4 µl	ROX-Reference Dye
10 µl	TaqMan Platinum qPCR Supermix-UDG
auf 20 µl mit DEPC-Wasser auffüllen	
(alle Produkte von Invitrogen, Karlsruhe)	

Echtzeit-PCR Ablauf:

1. 50°C für 2 min - Uracil-DNA-Glycosylase Aktivierung
2. 95°C für 10 min - Uracil-DNA-Glycosylase Inaktivierung
3. 60°C für 1 min - Primer Annealing und Doppelstrang-Synthese
4. 95°C für 15 sek - Aufschmelzen der neugebildeten Doppelstränge
5. - 40-fache Wiederholung von Schritt 3 und 4

### **2.2.1.5. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode zur relativen Quantifikation von mRNA-Mengen**

In dieser Arbeit wurde zur Auswertung der TaqMan Echtzeit-PCR die  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode zur relativen Quantifikation von mRNA-Mengen angewandt (nach Schmittgen *et al.*, 2001; Pfaffl, 2001).

## **2.2.2. Proteinchemische und allgemein biochemische Methoden**

### **2.2.2.1. Präparation von Proteinextrakten**

Mit PBS gewaschene, adhärente Zellen in 80 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen wurden mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco, BRL, Eggenstein) versetzt, und für 5-10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, wodurch sich die Zellen ablösten. Die Zellen wurden dann mit einem Zellschaber endgültig vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst und in 15 ml Röhrchen überführt. Das Lysat wurde mit 10 ml PBS/1%FKS versetzt und durch anschließende Zentrifugation (400 rpm, 5 min, RT) sedimentiert. Das entstandene Zellsediment wurde einmal mit 10 ml PBS gewaschen und erneut durch Zentrifugation sedimentiert. Zum Schluss wurde das Zellsediment in 200 µl PBS aufgenommen und bis zur Weiterverwendung bei -80°C tiefgefroren.

### **2.2.2.2. Proteinbestimmung nach Bradford**

Durch Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G-250 an Proteine tritt eine Veränderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm (protonierte braunrote kationische Form) zu 595 nm (unprotonierte blaue anionische Form) ein. Dabei korreliert die Menge an Protein mit der Absorption bei 595 nm, was eine Quantifizierung des Proteingehaltes einer Lösung ermöglicht.

Um die Gesamtproteinkonzentration von Proteinextrakten aus HeLa-Zellen zu bestimmen, wurden 5 µl der zu bestimmenden Lösung 1:20 mit *a. dest.* verdünnt und in eine 96-Well-Platte überführt. Nach Zugabe von 20 µl Bio-Rad-Färbereagenz und 5 min Inkubation bei RT wurde die Absorption der

Lösung bei 595 nm im ELISA-Reader bestimmt. Auf dieselbe Weise wurde mit bekannten Mengen Rinderserum-Albumin (BSA) eine Eichgerade erstellt, mit deren Hilfe die Proteinmenge über die Absorption der Proteinextrakte bestimmt werden konnte.

### **2.2.2.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen**

Die denaturierende diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-elektrophorese (*disc. SDS-Page*) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht – unabhängig von Ladung und Struktur (Laemmli, 1970).

SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) als anionisches, amphipathisches Detergenz im Probenpuffer bindet im Verhältnis 1:1,4 pro Aminosäure an die kationischen Reste der Proteine und verleiht ihnen dadurch eine negative Überschussladung, welche sich proportional zur Größe des Proteins verhält und dessen Eigenladung vernachlässigbar macht. Die Proteine wandern daher im elektrischen Feld zur Anode. Darüber hinaus nehmen alle SDS-denaturierten Proteine eine stäbchenförmige Konformation an, was den Einfluss der nativen Oberflächenstruktur auf die Wanderungseigenschaften der Proteine aufhebt. Durch DTT werden zusätzlich Disulfidbrücken getrennt. Damit ist die Trennung der Proteine im elektrischen Feld während der Elektrophorese ausschließlich von ihrem Molekulargewicht abhängig. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes (Cooper, 1981).

Bevor die Probe in das Trenngel gelangt, wird sie im Sammelgel, welches sich durch einen geringeren pH-Wert, kleinere Ionenstärke und niedrigere Acrylamidkonzentration als das Trenngel auszeichnet, durch die Bildung eines „Ionen-sandwiches“ fokussiert. Der Trennbereich wird über die Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentrationen im Gel kontrolliert, wobei die Acrylamid-Konzentration zwischen 2% und 30% variieren kann und die Porengröße des Gels bestimmt.

Für die Elektrophorese wurden kleine Gele (Trennstrecke ca. 4 cm) in einer Bio-Rad Apparatur verwendet. Es wurden 12,5% Trenngele eingesetzt, womit eine saubere Auftrennung im Bereich von 5-150 kDa erreicht wird. Die Gießapparatur wurde nach Angaben des Herstellers zusammengesetzt. Die Polymerisierungsreaktionen der Gellösungen (Zusammensetzung siehe Tab. V) wurden mit APS und TEMED eingeleitet und die fertige Lösung bis zu ca.  $\frac{3}{4}$  des Endvolumens in die vertikale Gelkammer gegossen. Um eine glatte Oberkante des Trenngels zu erhalten, wurde jedes Gel mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren (nach ca. 30 min) wurde das Isopropanol dekantiert. Nun wurde die Sammelgellösung aufgebracht und die Kämme eingesteckt. Nach Polymerisieren des Sammelgels (nach ca. 30 min) erfolgte das Auftragen der Proteinproben in die Taschen des Gels. In jede Tasche wurden jeweils 100  $\mu\text{g}$  Protein einer Proteinprobe aufgetragen. Die Proben wurden zuvor mit 2x- oder 5x- Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Neben den Proteinproben wurde ein Molekulargewichts-Standard (Benchmark Ladder) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS-Elektrophorese-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel für ca. 40 min.

**Tab. V:** Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele (Minigele)

	Trenngel 8 %	Trenngel 12 %	Sammelgel 5 %
<i>a. bidest.</i>	4,6 ml	3,3 ml	2,1 ml
30 % AA/BA	2,7 ml	4,0 ml	0,5 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,6)	2,5 ml	2,5 ml	-
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	-	-	0,38 ml
SDS-Lösung (10 %)	0,1 ml	0,1 ml	0,03 ml
TEMED	0,006 ml	0,004 ml	0,003 ml
APS (10 %)	0,1 ml	0,1 ml	0,03 ml

Nach dem Lauf wurde das Gel gefärbt oder für den Immunoblot (siehe 2.2.2.4) weiterbehandelt.

Zum Färben wurde das Gel unter leichtem Schütteln für 10-30 min in Coomassie-Blue-Färbelösung inkubiert, und anschließend durch 1-2 stündige Inkubation in Entfärbelösung entfärbt.

#### **2.2.2.4. Immunoblot (Westernblot)**

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine können aufgrund der negativen Ladung des gebundenen SDS elektrophoretisch weiter auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen werden (Western Blot, WB), wobei das SDS im Laufe des Transfers abgetrennt wird. Anschließend können die geblotteten Proteine durch spezifische, sehr sensitive Immunreaktionen nachgewiesen werden (Immunoblot, Towbin *et al.*, 1979).

Der Blot wurde in einer „semi-dry“-Transfer-Apparatur durchgeführt. Proteingel und Membran wurden hierfür aufeinandergelegt und von beiden Seiten mit je zwei Lagen in WB-Transferpuffer getränktem Whatman-Filterpapier bedeckt. Diese Schichtung wurde in die „semi-dry“-Transfer-Apparatur eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte in WB-Transferpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 70 mA für 1 h. Die Effizienz des Proteintransfers auf die Membran wurde durch reversible Färbung der Membran mit dem wasserlöslichen Farbstoff Ponceau S Rouge (Salinovich *et al.*, 1986) überprüft, und die Banden der Markerproteine des mitangefärbten Standards (Benchmark Ladder) mit einem Kugelschreiber markiert. Die Membran wurde anschließend zur Blockierung von freien Bindungsstellen über Nacht bei 4°C in WB-Waschpuffer 1:2, verdünnt mit Sojamilch, auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit einem gegen das zu detektierende Protein gerichteten Antikörper für 1 h auf einem Gelschüttler bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem, fünfminütigem Waschen der Membran mit WB-Waschpuffer zur Entfernung von nicht oder unspezifisch gebundenem Antikörper wurde die Membran mit einem zweiten, gegen den ersten gerichteten Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Gelschüttler inkubiert. Dieser zweite Antikörper war mit einer Peroxidase (HRP) konjugiert (verwendete Antikörper und deren Verdünnung siehe Tab. VI). Im

Anschluss daran wurde die Membran erneut dreimal für 5 min mit WB-Waschpuffer gewaschen um nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen.

**Tab. VI:** Antikörper für den CYR61/CTGF Immunoblot (die Verdünnung erfolgte mit WB-Waschpuffer/Sojamilch 1:4)

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
<b>CTGF</b>		
Name	Anti-CTGF (L-20) sc-14939 IgG polyklonal, Ziege	POD-konjugierter Esel anti-Ziege IgG
Firma	Santa Cruz Biotech, USA	Santa Cruz Biotech, USA
Verdünnung	1:250	1:2500
<b>CYR61</b>		
Name	Anti-CYR61 (H-78) sc-13100 IgG polyklonal, Kaninchen	HRP-konjugierte Ziege anti-Kaninchen IgG
Firma	Santa Cruz Biotech, USA	Santa Cruz Biotech, USA
Verdünnung	1:250	1:5000
<b><math>\beta</math>-Aktin</b>		
Name	Anti- $\beta$ -Aktin monoklonal, Maus	HRP-konjugierter Kaninchen anti-Maus IgG
Firma	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	DakoCytomation, DK
Verdünnung	1:100000	1:1000

Die darauf folgende Inkubation der Membran mit dem ECL (*enhanced chemoluminescence*)-System erfolgte nach Vorschrift des Herstellers. Die an der Membran spezifisch gebundene Peroxidase oxidiert dabei das im ECL-Reagenz enthaltene Luminol zu einem endogenen Peroxid, welches unter Abgabe von Lichtquanten in den Grundzustand zerfällt. Zur Detektion dieser Che-

molumineszenz wurde in einer Dunkelkammer für 1-5 min ein Röntgenfilm (Kodak X-Omat) auf die Membran gelegt, welcher anschließend maschinell entwickelt wurde.

### **2.2.3. Mikrobiologische Methoden**

#### **2.2.3.1. Konservierung von Bakterienstämmen**

Bakterienstämme wurden langfristig als Glycerin-Kryokulturen aufbewahrt. Glycerin verhindert eine Schädigung der Zellen durch Kristallbildung beim Einfrieren, ist aber auch toxisch für die Bakterien, so dass Glycerinkulturen möglichst rasch eingefroren werden müssen.

Über Nacht in LB-Medium angezogene Bakterienkulturen wurden durch Zentrifugation (10 min, 4500 rpm, RT) sedimentiert und das Pellet in  $\frac{1}{20}$  des Ausgangskulturvolumens in LB-Medium mit 20 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Die Kulturen wurden in 250  $\mu$ l Aliquots in Eppendorf-Gefäßen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und gelagert.

#### **2.2.3.2. Kultivierung von *Y. enterocolitica* Stämmen**

Die Anzucht von *Y. enterocolitica* Stämmen erfolgte standardmäßig bei  $27^{\circ}\text{C}$  in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (siehe 2.1.3.2. und 2.1.7.1.).

War die Expression der auf dem pYV-Virulenzplasmid kodierten Gene erwünscht, wurden die Stämme bei  $37^{\circ}\text{C}$  in RPMI 1640-Medium, welchem 1 % L-Glutamin zugesetzt wurde, für 3 h angezogen.

Flüssigkulturen der Bakterien wurden stets bei 200 rpm geschüttelt.

### **2.2.3.3. Vorbereiten von Bakterien und Bakterienüberständen zur Infektion von Zellen**

Bakterien wurden bei 37°C ( *Y. enterocolitica* Stämme bei 27°C) in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (siehe 2.1.3.2. und 2.1.7.) über Nacht angezogen. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien 1:20 in RPMI 1640 / 1 % Glu – Medium überimpft und für weitere 3 h bei 37°C angezogen, um sie in die Phase des exponentiellen Wachstums zu überführen bzw. die plasmidhaltigen Yersinienstämme zur Expression der plasmidkodierten Gene zu bringen. Danach wurden die Kulturen in einer Zentrifuge für 5 min bei 4500 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, und das Sediment in PBS aufgenommen. Die Bakterienzahl wurde mittels Messung der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) ermittelt, wobei eine  $OD_{600}$  von 1 einer Konzentration von  $5 \times 10^8$  Bakterien pro ml entspricht. Gemäß der gewünschten MOI (*multiplicity of infection*) wurden die Bakterien dann auf die Zellen gegeben. Es wurden, sofern nicht anders angegeben, 20 Bakterien pro Zelle zur Infektion eingesetzt (MOI 20).

Wurden Überstände der Bakterienkulturen benötigt, so wurden diese nach der Zentrifugation abgenommen und vor der weiteren Verwendung sterilfiltriert.

### **2.2.3.4. Extraktion lipophiler Stoffe aus Bakterienüberständen**

Bakterienkulturen wurden wie zur Vorbereitung zur Infektion von Zellen angezogen (siehe 2.2.3.3.), und die so erhaltenen Bakterienüberstände in RPMI-Medium nach Sterilfiltration weiterverwendet. Um lipophile Stoffe aus den Überständen zu extrahieren, wurde als Lösungsmittel ein Chloroform/Methanol-Gemisch (2:1) verwendet, welches 1:1 mit den Bakterienüberständen in einem fest verschließbaren Reaktionsgefäß gemischt wurde. Dieses wurde dann für etwa 10-15 min von Hand geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur für 10 min bei 4500 rpm. Die so erhaltene hydrophile, methanolhaltige Phase wurde verworfen, die lipophile, chloroformhaltige Phase wurde weiterverwendet. Im Speed Konzentrator (Eppendorf, Hamburg) erfolgte das Verdampfen des Lösungsmittels, so dass am Ende ein Gemisch aus orga-

nischen, lipophilen Stoffen übrig blieb, welches dann weiterverwendet werden konnte (modifiziert nach George *et al.*, 1998; Hockmeyer *et al.*, 1978; Folch *et al.*, 1957).

## **2.2.4. Zellkulturmethoden**

### **2.2.4.1. Kultivierung von HeLa-Zellen**

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Materialien und Lösungen wurden bereits steril vom Hersteller bezogen oder sterilfiltriert.

Die verwendeten Zellen wurden in 175 cm<sup>2</sup> Gewebekultur-Flaschen (Polystyren) in einem Zellkultur-Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde 30 ml RPMI 1640-Medium/10 % FKS/1 % L-Glutamin/1 % Penicillin-Streptomycin verwendet. Zwei- bis dreimal wöchentlich wurden die zu 80-90 % konfluenten Zellen im Verhältnis 1:4 bis 1:6 gesplittet.

Hierzu wurden die am Flaschenboden als Monolayer adhärenen Zellen nach einmaligem Waschen mit 20 ml PBS, mit 5 ml Trypsin/EDTA für 5-10 min bei RT inkubiert, wodurch sie sich von selbst vom Boden ablösten. Durch Zugabe der 1,5 fachen Menge an Kulturmedium (10 ml) wurde danach die Trypsin-Aktivität durch im FKS enthaltenes Antitrypsin beendet. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Plastikröhrchen überführt und durch Zentrifugation (5 min, 400 rpm, RT) sedimentiert, um das Trypsin/EDTA aus der Suspension zu entfernen. Das Zellsediment wurde in 6-8 ml Kulturmedium resuspendiert. Je nach gewünschtem Verhältnis wurde ein entsprechendes Volumen auf 30 ml in einer neuen Zellkulturflasche mit Kulturmedium aufgefüllt, die Zellen durch Schwenken gleichmäßig verteilt und wieder bei 37°C unter 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre weiter kultiviert.

#### 2.2.4.2. Auftauen von Gewebekulturzellen

Die in 2 ml-Kryoröhrchen bei -80°C oder im Stickstofftank gelagerten Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein 50 ml-Plastikröhrchen überführt. Um das enthaltene DMSO zu entfernen, wurde die Zellsuspension mit 20 ml Medium/10 % FKS gemischt und die Zellen sedimentiert (5 min, 700 rpm, RT). Das Sediment wurde in 12 ml Medium/10 % FKS resuspendiert und in einer Zellkulturflasche kultiviert. Nach einem Tag wurde das Medium und darin enthaltene abgestorbene Zellen mit einer Pipette abgezogen und erneut 25 ml Medium/10 % FKS zugegeben. Nach zwei bis fünf Tagen waren die Zellen in der Kulturflasche zu 80 % konfluent gewachsen, und konnten für weitere Versuche eingesetzt werden.

#### 2.2.4.3. Einfrieren von Gewebekulturzellen

Zum Einfrieren von Gewebekulturzellen wurden die zu 80-90 % konfluenten Zellen vom Boden der 600ml-Kulturflaschen durch Inkubation mit 3 ml Trypsin/EDTA für 5-10 min bei RT abgelöst, und mit jeweils 17 ml Medium/10 % FKS resuspendiert. Die Zellsuspensionen mehrerer Kulturflaschen wurden vereinigt, und der Titer dieser Suspension in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 700 rpm, RT). Das Zellsediment wurde in Kryomedium (Zusammensetzung siehe unten) resuspendiert und auf einen Titer von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden in 1 ml-Aliquots auf 2 ml-Kryoröhrchen verteilt und zum gleichmäßigen Einfrieren einen Tag lang in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter bei -80°C oder mehrere Stunden bei -20°C inkubiert, bevor sie für die langfristige Lagerung auf -80°C oder in einen Stickstofftank überführt wurden.

Kryomedium:	10%	DMSO
	90%	FKS

#### **2.2.4.4. Bestimmung der Lebend-Zellzahl mit Trypan-Blau**

Zur Bestimmung der Anzahl an lebenden Zellen pro Milliliter Medium wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit der zehnfachen Menge an Trypan-Blau verdünnt. Trypan-Blau ist ein Vitalfarbstoff und kann selektiv nur in nekrotische Zellen mit nicht mehr intakter Membran eindringen und diese somit blau anfärben. Die Zellsuspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm x 0,0025 mm x 0,1 mm) gegeben und ausgezählt. Die Multiplikation der gemittelten Anzahl der nicht angefärbten Zellen in einem Großquadrat mit dem Kammerfaktor ( $1 \cdot 10^4$  Zellen/ml) und dem Verdünnungsfaktor ergab dann die Konzentration der Zellen in der ursprünglichen Zellsuspension (z.B. entsprechen 10 Zellen pro Großquadrat  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro ml).

#### **2.2.4.5. Infektion von HeLa-Zellen mit Bakterien**

Am Tag vor der Infektion von HeLa-Zellen mit bestimmten Bakterienstämmen wurden  $1 \times 10^6$  HeLa-Zellen pro Napf in einer 6-Napf-Platte ausgesät. Dazu wurde die Lebend-Zellzahl, wie oben beschrieben (2.2.4.4.), bestimmt. Die Zellen wurden dann in Kulturmedium über Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

4 Stunden vor der Infektion wurde das antibiotikahaltige Vollmedium abgesaugt, die Zellen 1x mit PBS gewaschen und 2 ml Infektionsmedium ohne FKS und ohne Antibiotika pro Napf zugegeben.

Die Bakterien für die Infektion wurden, wie in 2.2.3.3. beschrieben, vorbereitet. Nachdem sich die HeLa-Zellen für 4 Stunden in FKS-freiem Medium befunden hatten, wurden die Bakterien zu den Zellen gegeben und die Platte zentrifugiert (400 rpm, 2 min, RT) um die Bakterien mit den Zellen in Kontakt zu bringen. Die Platte wurde nun für die gewünschte Infektionsdauer bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der ersten Stunde nach Infektion wurde dem Medium Gentamycin (100 µg/ml) zugesetzt um die extrazellulär verbliebenen Bakterien abzutöten. Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die Überstände bzw. die Zellen abgenommen

und für weitere Analysen verarbeitet, oder bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt (-20°C).

## 2.2.5. Tierexperimentelle Methoden

### 2.2.5.1. Präparation von Darmepithelzellen der Maus

Die Mäuse wurden mit Kohlendioxid getötet, der gesamte Dünndarm und Dickdarm präpariert, und die Därme in eine Petrischale mit auf 37°C vorgewärmtem PBS gegeben. Die Därme wurden in etwa 5 cm lange Stücke zerteilt, der Länge nach aufgeschnitten und die Fäkalien ausgewaschen. Dünndarm und Dickdarm wurden nun in getrennte Falcon-Röhrchen überführt und je 25 ml Separationsmedium zugesetzt, welches die Epithelzellen von dem übrigen Darm ablöst. Für Dünndarm und Dickdarm wurden unterschiedliche Separationsmedien verwendet (siehe unten). Es wurden jeweils zwei Auswaschvorgänge für 15 min unter Rühren bei 37°C im Wasserbad vorgenommen um die Epithelzellen von der Lamina propria abzulösen. Die erhaltenen Suspensionen wurden in neue Falcon-Röhrchen abgeseiht und für 10 min bei 500 rpm Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 5 ml PBS resuspendiert und die Lebend-Zellzahl mit Trypan-Blau bestimmt (siehe 2.2.4.4.). Die auf diese Weise isolierten Epithelzellen konnten dann sofort für weitere Analysen oder Infektionsversuche verwendet werden.

#### A. Dickdarm

- |                     |      |   |
|---------------------|------|---|
| 1. Auswaschvorgang: | 1 mM | DTT (Dithiothreitol)                                  |
|                     | 1 mM | EDTA (Ethylenglycolbis(2aminoethylether)-Tetraacetat) |
|                     | 1 %  | FKS   |
| 2. Auswaschvorgang: | 1 mM | EDTA  |

#### B. Dünndarm

- |  |      |      |
|--|------|------|
|  | 1 mM | EDTA |
|--|------|------|

### **2.2.6. Durchflusszytometrie Methoden (FACS)**

Bei der durchflusszytometrischen Charakterisierung von Zellen mit dem FACS (*fluorescence activated cell sorter*) -Gerät wird eine Zellsuspension von dem Gerät angesaugt, und durch eine Mantelflüssigkeit so fokussiert, dass in der Messküvette die Zellen einzeln an einem Laser vorbeiströmen. Detektiert wird hierbei das Durchlicht (*forward scatter*, FSC), welches ein Maß für die Zellgröße ist, und das Streulicht 90° zum Laser (*side scatter*, SSC), welches durch die Zellgranularität beeinflusst wird. Außerdem lassen sich gleichzeitig verschiedene Fluoreszenzen unterschiedlicher Wellenlänge, die entweder durch endogen produzierte Fluoreszenzfarbstoffe oder durch exogene Färbungen (Propidiumiodid, Fluoreszenz gekoppelte Antikörper) verursacht werden, messen.

#### **2.2.6.1. FACS-Analyse von Darmepithelzellen der Maus**

Zur Überprüfung der Reinheit von isolierten Darmepithelzellen der Maus wurde die Methode der Durchflusszytometrie angewandt. Die Präparation der Darmepithelzellen erfolgte nach 2.2.5.1.

Es wurden je  $1 \cdot 10^6$  Zellen für die jeweiligen Färbungen in ein Reaktionsgefäß überführt, sedimentiert und in 50  $\mu\text{l}$  PBSF resuspendiert. Die verwendeten Antikörper waren schon mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (z.B. FITC oder PE, siehe 2.1.4.2.), so dass nur ein einziger Färbeschritt notwendig war. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 1:25 oder 1:50 den Zellen zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 15-30 min bei Dunkelheit im Eisbad. Nach der Inkubation wurden die Zellen sedimentiert und in 150  $\mu\text{l}$  PBSF zweimal gewaschen (10 min, 1400 rpm), um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Um unspezifische Fluoreszenz auszuschließen, wurden jeweils Färbungen mit einer Antikörperkontrolle (Isotyp, z.B. Anti-Maus IgG) durchgeführt. Nach Färbung und Waschvorgang wurden die Zellen in 500  $\mu\text{l}$  PBSF resuspendiert und im Durchflusszytometer (FACS) analysiert. Es wurden etwa 6000 Zellen gemessen. Tote Zellen und Artefakte wurden aufgrund ihrer Größe und Granularität

von der Analyse ausgeschlossen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Cellquest Pro (Becton Dickinson, Heidelberg).

### **2.2.7. Statistik**

Alle Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt und ergaben vergleichbare Ergebnisse. Die zu untersuchende Gruppe (infizierte Zellen) wurde immer mit einer Kontrollgruppe (nichtbehandelte Zellen) verglichen. Die Datenbewertung erfolgte über den Student t-Test um die Gleichheit der Mittelwerte zu überprüfen. Die Differenz von Werten mit  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant beurteilt und ist in den Ergebnissen mit einem Kreuz gekennzeichnet.

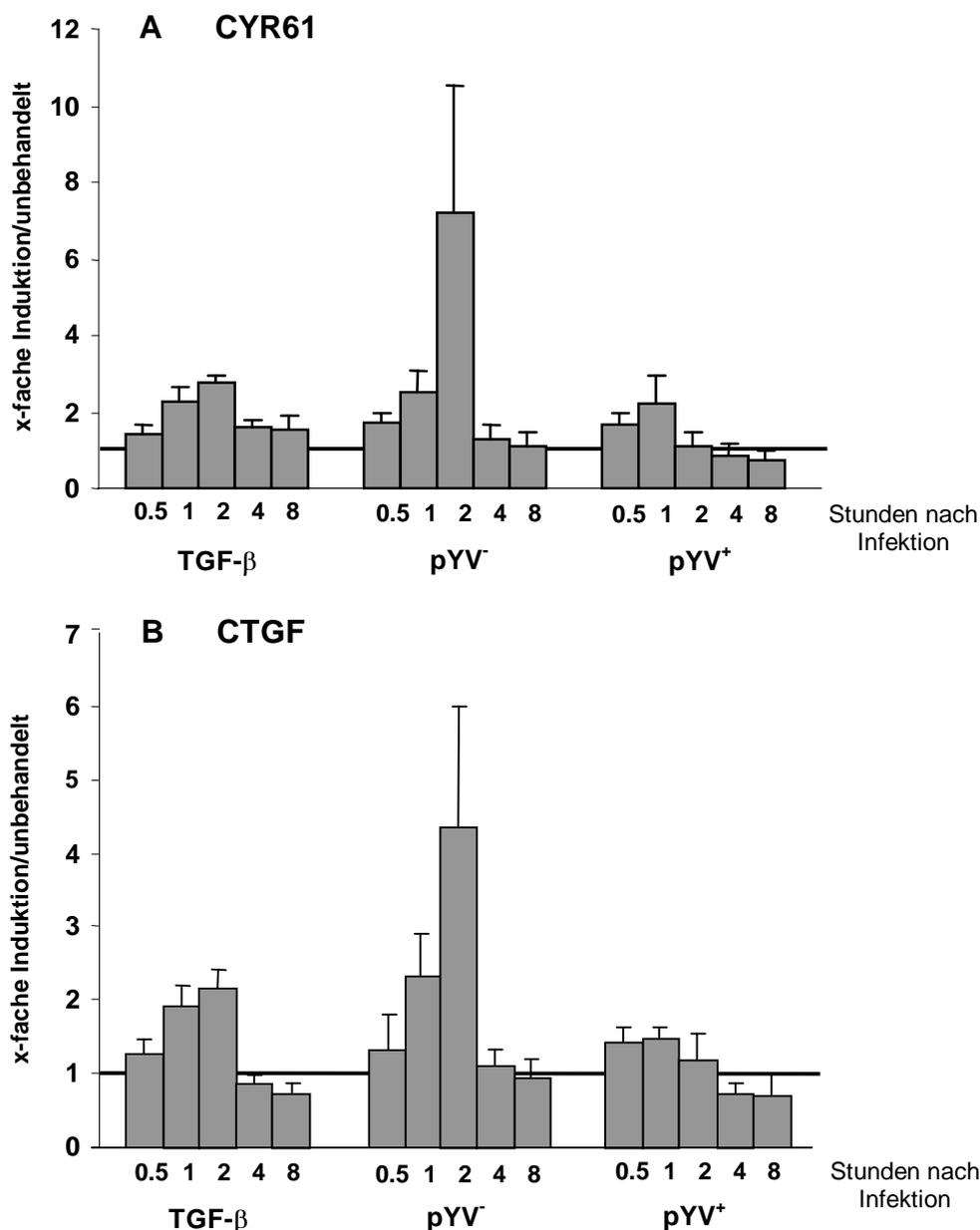
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Induktion von CYR61/CTGF in Epithelzellen durch *Yersinia enterocolitica*

Chromosomal kodierte Faktoren von *Yersinia enterocolitica* induzieren in Epithelzellen nach Infektion mehr als hundert verschiedene Gene. Deren Expression trägt dazu bei, die proinflammatorische Wirtsantwort zu generieren, welche der Eradikation der Pathogene dient. In Microarray-Studien der Arbeitsgruppe wurde die Genexpression in Epithelzellen nach Infektion mit *Yersinia enterocolitica* analysiert (Bohn *et al.*, 2004). Hierbei zeigte sich, dass Yersinien, welchen das Virulenzplasmid pYV fehlt (pYV<sup>-</sup>), eine Induktion der CYR61 und CTGF Expression bewirken, nicht aber der *Yersinia* Wildtyp, welcher das Virulenzplasmid trägt (pYV<sup>+</sup>).

#### 3.1.1 Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression

Zu Beginn der Versuchsreihe sollte zunächst mit Hilfe semiquantitativer Echtzeit RT-PCR die Induktion von CYR61 und CTGF mRNA in Epithelzellen durch Virulenzplasmid-defiziente Yersinien (pYV<sup>-</sup>), nicht aber durch den Wildtyp (pYV<sup>+</sup>) bestätigt werden. Ebenso sollte die in der Literatur beschriebene Induktion von CYR61 und CTGF durch TGF- $\beta$  (Brunner *et al.*, 1991) und Phospholipide wie S1P (Muehlich *et al.*, 2004) nachvollzogen werden. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit *Yersinia enterocolitica* pYV<sup>-</sup> und pYV<sup>+</sup>, TGF- $\beta$  oder S1P für eine halbe, eine, zwei, vier und acht Stunden inkubiert, um die Kinetik der CYR61/CTGF mRNA-Expression zu erfassen. Dadurch sollte zugleich der Zeitpunkt der höchsten CYR61/CTGF Expression ermittelt werden, um in weiteren Versuchen eine mögliche Induktion optimal zeigen zu können (siehe Abbildung 8 und 9).

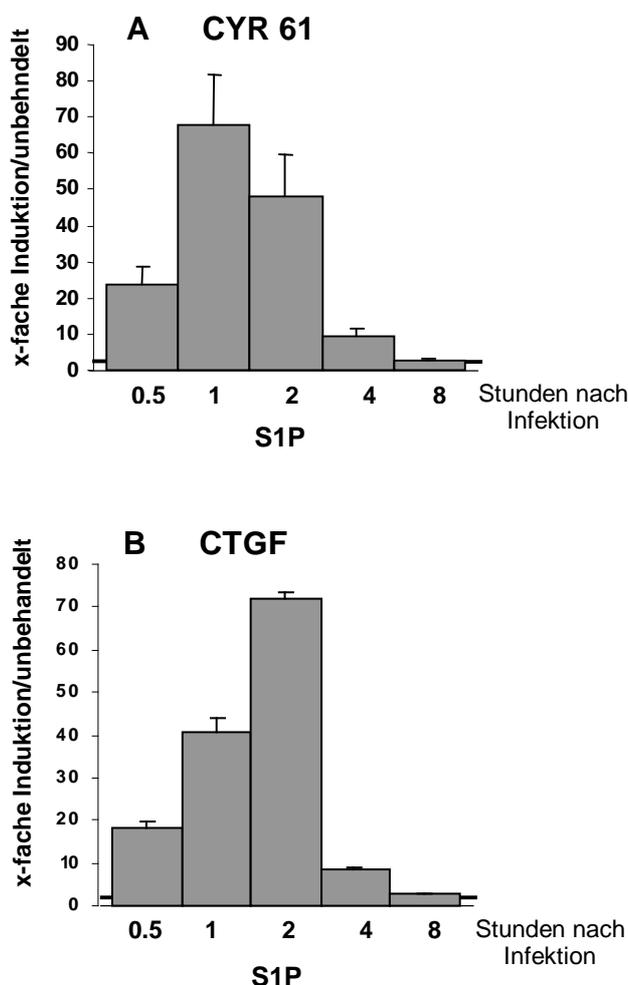


**Abb. 8 A und B: Kinetik der CYR61 und CTGF mRNA-Expression in HeLa-Zellen**

Jeweils  $1 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen wurden für 0,5, 1, 2, 4 und 8 h bei 37°C mit TGF- $\beta$  2  $\mu$ g/ml, pYV<sup>+</sup> (MOI=20) oder pYV<sup>-</sup> (MOI=20) infiziert. Nach reverser Transkription der isolierten mRNA wurde die cDNA von CYR61/CTGF mittels Taqman Echtzeit-PCR gemessen und die Menge, bezogen auf das konstitutiv exprimierte *house keeping gene* G6PD, normalisiert. Gezeigt ist die x-fache Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Die Infektion der Epithelzellen mit pYV<sup>-</sup> führte zu einer transienten CYR61 und CTGF mRNA-Expression mit einem Maximum nach zweistündiger Inkubationszeit. Eine Infektion mit pYV<sup>+</sup> hingegen führte zu keiner Zeit zu einer signifikan-

ten CYR61/CTGF Induktion. Die Stimulation mit TGF- $\beta$  oder S1P zeigte wie erwartet eine Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression, mit maximaler Ausprägung nach ein bis zwei Stunden.



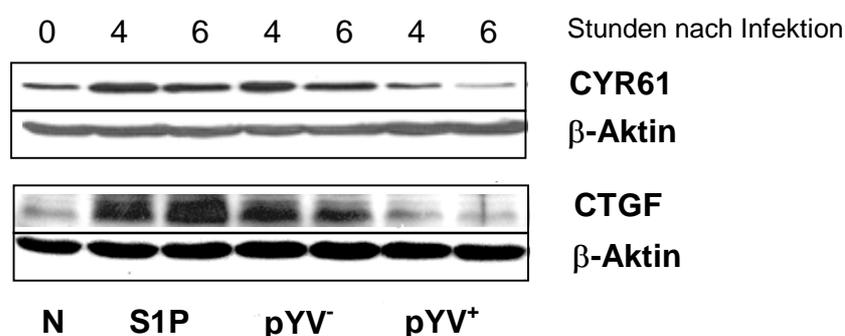
**Abb. 9 A und B:**  
**S1P-Kinetik der CYR61 und CTGF mRNA-Expression in HeLa-Zellen**  
 Jeweils  $1 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen wurden für 0.5, 1, 2, 4 und 8 h bei 37°C mit 10  $\mu$ M S1P infiziert. Nach reverser Transkription der isolierten mRNA wurde die cDNA von CYR61/CTGF mittels Taqman Echtzeit-PCR gemessen und die Menge, bezogen auf das konstitutiv exprimierte *house keeping gene* G6PD, normalisiert. Gezeigt ist die x-fache Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

### 3.1.2 Induktion der CYR61/CTGF Proteinexpression

Um zu verifizieren, dass es nach einer Infektion von HeLa-Zellen mit *Yersinia enterocolitica* pYV<sup>-</sup>, und damit nach Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression auch zu einer entsprechenden Proteinexpression kommt, wurden Epithelzellen für vier und sechs Stunden mit pYV<sup>-</sup>, pYV<sup>+</sup> oder S1P inkubiert. Es

folgte eine Proteinanalyse mittels SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen CYR61 und CTGF (siehe Abbildung 10).

In unbehandelten HeLa-Zellen konnte mittels Immunoblot bereits eine basale CYR61 und CTGF Proteinexpression nachgewiesen werden. Sowohl die Inkubation mit S1P, als auch die Infektion mit pYV<sup>-</sup>, nicht aber die Infektion mit pYV<sup>+</sup> führte zu einer verstärkten Proteinexpression im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Um zu gewährleisten, dass sich in jedem Ansatz die gleiche Proteinnmenge befand, wurde parallel eine interne Kontrolle mit einem Antikörper gegen das konstitutiv exprimierte  $\beta$ -Aktin durchgeführt, was für jedes untersuchte Gesamtzelllysate vergleichbare Bandenintensitäten ergab.



**Abb. 10: CYR61 und CTGF-Proteinexpression in HeLa-Zellen**

Jeweils  $5 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen wurden entweder mit pYV<sup>-</sup> (MOI = 20), pYV<sup>+</sup> (MOI = 20) oder mit S1P (1  $\mu$ M) für 4 und 6 Stunden bei 37°C inkubiert. 1 h nach Infektion wurden die Zellkulturansätze mit Gentamycin behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde eine Zellyse durchgeführt und die Gesamtzelllysate mittels Immunoblot analysiert (anti-CYR61 (H-78) sc-13100 1:250, anti-CTGF (L-20) sc-14939 1:250, anti- $\beta$ -Aktin 1:100000).

### 3.1.3 Induktion von CYR61/CTGF in Darmepithelzellen der Maus

Da es sich bei der von der Arbeitsgruppe verwendeten Epithelzelllinie HeLa um eine Tumorzelllinie aus einem stark proliferierenden humanen Zervixkarzinom handelt, sollte untersucht werden, ob die beobachtete Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in diesen Zellen durch *Yersinia enterocolitica* auch in anderen, nicht tumorös veränderten Epithelzellen nachzuweisen ist,

oder ob es sich hierbei um eine Besonderheit der entarteten Tumorzellen handelt.

Um die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in primären Epithelzellen zu untersuchen, wurde das Intestinum von Mäusen präpariert und Darmepithelzellen isoliert.

### 3.1.3.1 Durchflusszytometrische Analyse von primären Maus-Darmepithelzellen

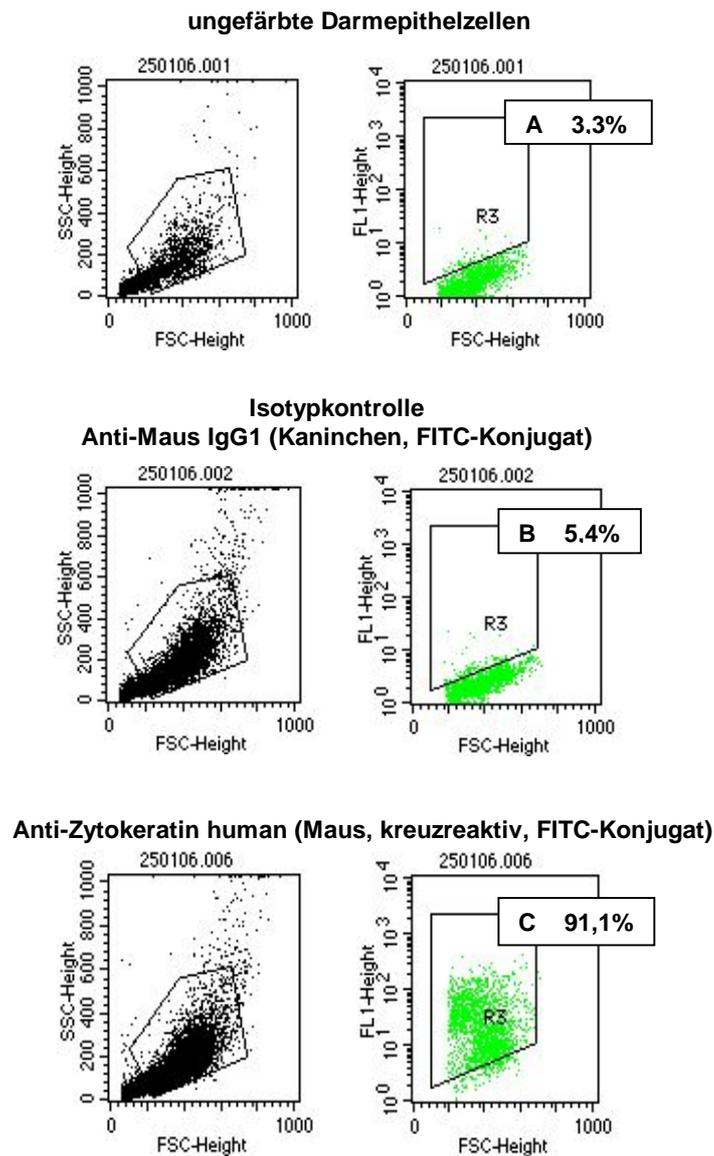
Um die Reinheit der aus dem Intestinum der Mäuse isolierten Epithelzellen zu überprüfen, sollte zunächst eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt werden. Hierzu wurden die Zellen mit einem spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen Zytokeratin, einem typischen Oberflächenmarker von Epithelzellen, inkubiert. Um unspezifische Fluoreszenzfärbung zu ermitteln, wurden die Zellen auch mit einem unspezifischen Antikörper des gleichen IgG Isotypes (Isotypkontrolle) gefärbt (siehe Tabelle VII, Abbildung 11).

Abbildung 12 zeigt als Histogramm den direkten Vergleich der Isotypkontrolle mit der Zytokerationfärbung. Im Diagramm ist dabei die Anzahl der Ereignisse gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen.

Diese Untersuchungen ergaben, dass mehr als 90 % der isolierten Zellen zytokeratin-positiv sind, und es sich darum um Epithelzellen handeln musste.

**Tab. VII:** Quantitative Auswertung der Identifizierung von Darmepithelzellen der Maus mittels Durchflusszytometrie. Als Anteil positiver Zellen ist der Anteil der Ereignisse im ausgewählten Fenster (siehe Abb. 11) angegeben.

	positive Zellen	ausgewertete Zellen
<b>A</b> ungefärbt	3,3 %	5751
<b>B</b> Isotypkontrolle Anti-Maus IgG1-FITC	5,4 %	6557
<b>C</b> Anti-Zytokeratin-FITC	91,1 %	6874



**Abb. 11: Durchflusszytometrie primärer Maus-Darmepithelzellen, Zytokeratinfärbung**

Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern fluoreszenzmarkiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Um unspezifische Fluoreszenz auszuschließen wurde auch eine Färbung mit einer Antikörperkontrolle (Isotyp) durchgeführt. Das ausgewählte Fenster (R3) entspricht jeweils dem Anteil positiver und lebender Zellen.

**A** ungefärbt

**B** Isotypkontrolle Anti-Maus IgG1 (Kaninchen, FITC-Konjugat), 1:25 verdünnt

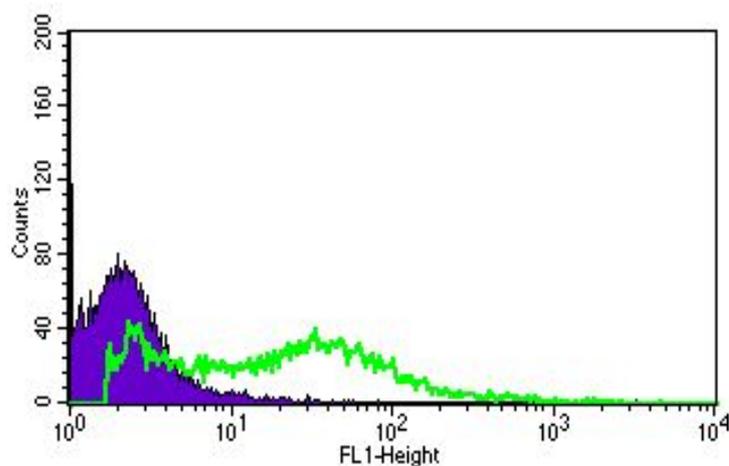
**C** Zytokeratin Färbung Anti-Zytokeratin human (Maus, FITC-Konjugat), 1:25 verdünnt

Achsenbeschriftung:

SSC (Side scatter) - Granularität der Zellen;

FSC (Forward scatter) - Größe der Zellen;

FL1 (Fluoreszenz 1) - Fluoreszenzintensität der mit FITC konjugierten Antikörper markierten Zellen.

**Abb. 12: Histogramm der Zytokeratinfärbung und Isotypkontrolle**

Gemeinsame Darstellung der Zytokeratinfärbung (grün) und der entsprechenden Isotypkontrolle (blau) von Darmepithelzellen der Maus mittels Durchflusszytometrie.

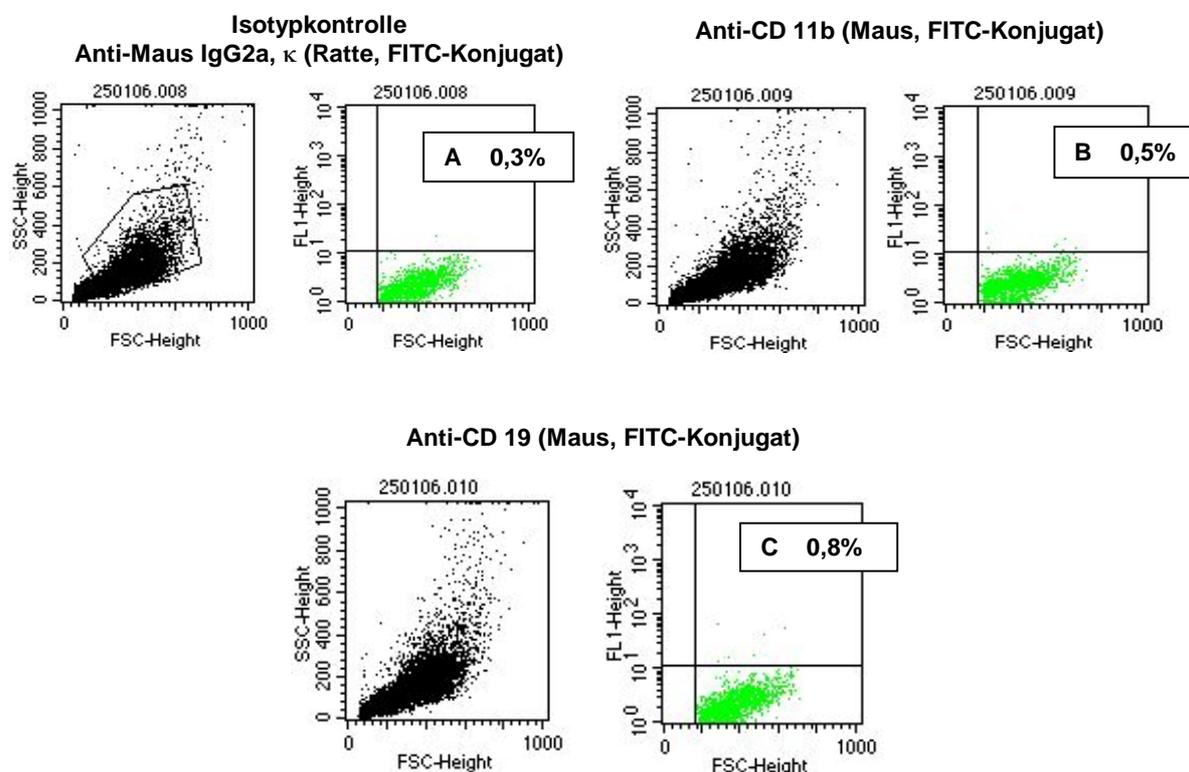
Die Anzahl der Ereignisse (Counts) ist gegen die Fluoreszenzintensität (FL1, Fluoreszenz 1) der mit FITC konjugierten Antikörper markierten Zellen aufgetragen.

Um noch weitere Sicherheit zu erlangen, dass es sich bei den isolierten Zellen um Epithelzellen handelte, wurden im weiteren Verlauf Färbungen gegen Oberflächenmarker, welche charakteristisch für bestimmte Zellsubpopulationen des Immunsystems sind, durchgeführt. So findet man CD11b hauptsächlich auf Makrophagen, Granulozyten, und NK Zellen, CD19 auf B-Zellen, CD3 auf T-Zellen und CD11c auf dendritischen Zellen. Diese Analysen zeigen, dass sich in den Zellisolaten keine signifikanten Mengen an Immunzellen befanden (siehe Tabelle VIII, Abbildung 13).

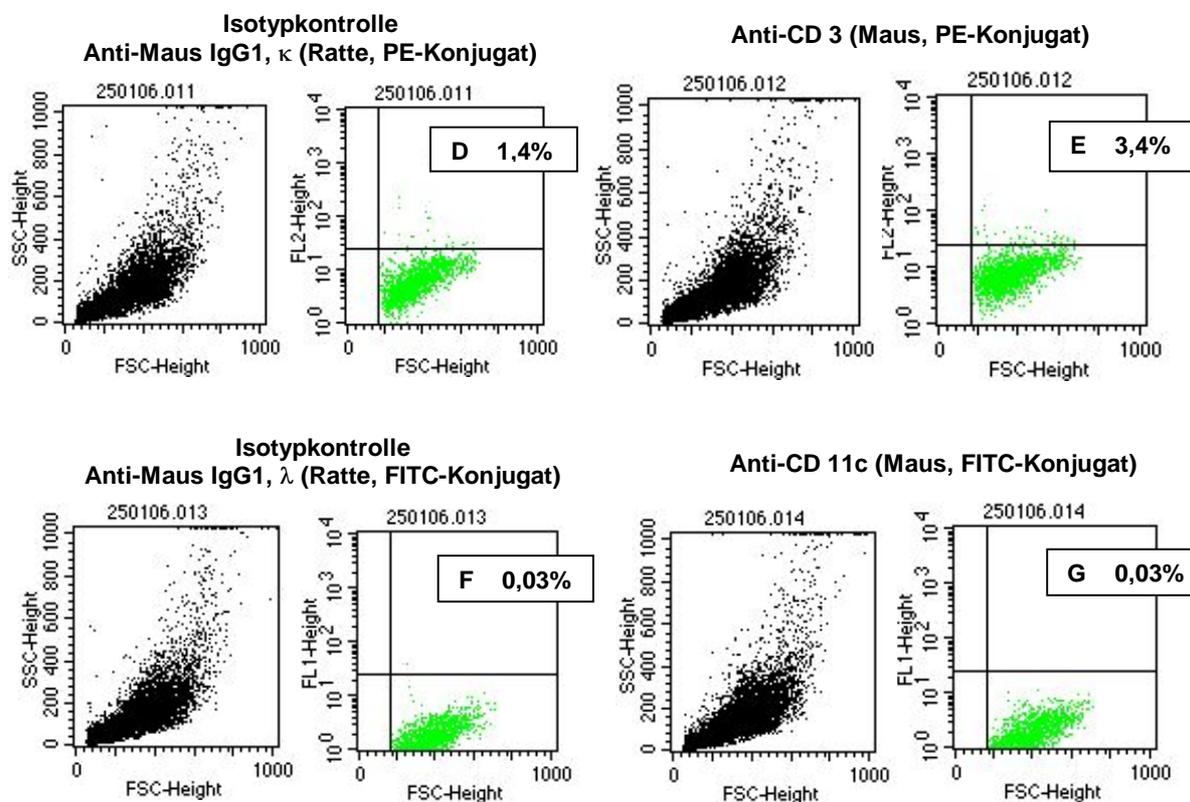
Aus den durchflusszytometrischen Analysen ergibt sich, dass es sich bei den aus dem Intestinum isolierten Zellen zu mehr als 90% um Epithelzellen handelte, und dass keine nennenswerten Verunreinigungen durch Zellen des Immunsystems vorlagen.

**Tab. VIII:** Quantitative Auswertung der Identifizierung von Darmepithelzellen der Maus mittels Durchflusszytometrie. Als Anteil positiver Zellen ist der Anteil der Ereignisse im oberen rechten Quadranten (siehe Abb. 13) angegeben.

	positive Zellen	ausgewertete Zellen
<b>A</b> Isotypkontrolle Anti-Maus IgG2a, $\kappa$ -FITC	0,3 %	5832
<b>B</b> Anti-CD 11b-FITC	0,5%	5808
<b>C</b> Anti-CD 19-FITC	0,8%	5855
<b>D</b> Isotypkontrolle Anti-Maus IgG1, $\kappa$ -PE	1,4%	5853
<b>E</b> Anti-CD 3-PE	3,4%	5965
<b>F</b> Isotypkontrolle Anti-Maus IgG1, $\lambda$ -FITC	0,03 %	5883
<b>G</b> Anti-CD 11c-FITC	0,03 %	5978



(zu Abb. 13, siehe nächste Seite)



**Abb. 13: Durchflusszytometrie primärer Maus-Darmepithelzellen, Lymphozytenfärbung**

Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern fluoreszenzmarkiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Um unspezifische Fluoreszenz auszuschließen, wurden jeweils Färbungen mit einer Antikörperkontrolle (Isotyp) durchgeführt. Das ausgewählte Fenster oben rechts entspricht jeweils dem Anteil positiver und lebender Zellen.

**A** Isotypkontrolle Anti-Maus IgG2,  $\kappa$  (Ratte, FITC-Konjugat), 1:50 verdünnt

**B** Anti-CD 11b (Maus, FITC-Konjugat), 1:50 verdünnt

**C** Anti-CD 19 (Maus, FITC-Konjugat), 1:50 verdünnt

**D** Isotypkontrolle Anti-Maus IgG1,  $\kappa$  (Ratte, PE-Konjugat), 1:50 verdünnt

**E** Anti-CD 3 (Maus, PE-Konjugat)

**F** Isotypkontrolle Anti-Maus IgG1,  $\lambda$  (Ratte, FITC-Konjugat), 1:50 verdünnt

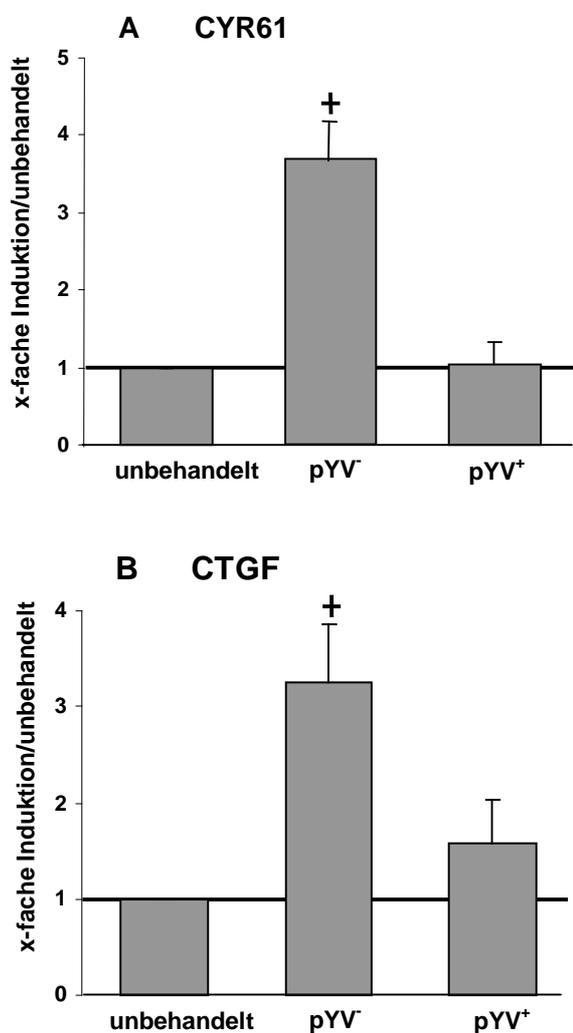
**G** Anti-CD 11c (Maus, FITC-Konjugat), 1:50 verdünnt

Achsenbeschriftung:

- |                       |   |
|-----------------------|---|
| SSC (Side scatter)    | - Granularität der Zellen;  |
| FSC (Forward scatter) | - Größe der Zellen;   |
| FL1 (Fluoreszenz 1)   | - Fluoreszenzintensität der mit FITC konjugierten Antikörper markierten Zellen. |
| FL2 (Fluoreszenz 2)   | - Fluoreszenzintensität der mit PE konjugierten Antikörper markierten Zellen    |

### 3.1.3.2 Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression

Um die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Darmepithelzellen der Maus zu untersuchen, wurden isolierte Epithelzellen sofort nach ihrer Präparation mit *Yersinia enterocolitica* pYV<sup>-</sup> oder pYV<sup>+</sup> infiziert und für zwei Stunden inkubiert. Die Analyse der CYR61/CTGF mRNA-Expression erfolgte mittels semiquantitativer Echtzeit-RT-PCR (siehe Abbildung 14).



**Abb. 14 A und B:**  
CYR61 und CTGF mRNA-Expression in Darmepithelzellen der Maus

Nach Isolation von Maus-Darmepithelzellen wurden jeweils  $3 \cdot 10^6$  Zellen mit pYV<sup>-</sup> oder pYV<sup>+</sup> (MOI = 20) infiziert, und für 2 h bei 37°C inkubiert. 1 h nach Infektion wurden die Zellkulturansätze mit Gentamycin behandelt. Nach reverser Transkription der isolierten RNA wurde die cDNA von CYR61/CTGF mittels Taqman Echtzeit-PCR gemessen und die Menge, bezogen auf das konstitutiv exprimierte *house keeping gene* GAPDH, normalisiert. Gezeigt ist die x-fache Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Kreuz gekennzeichnet.

In den frisch isolierten Darmepithelzellen der Maus konnte eine pYV<sup>-</sup>-induzierte CYR61/CTGF mRNA-Expression nachgewiesen werden. Durch pYV<sup>+</sup> konnte wie erwartet keine entsprechende Induktion detektiert werden.

Die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression ließ sich also sowohl in epithelialen Tumorzelllinien als auch in primären Darmepithelzellen nachweisen.

### **3.2 *Yersinia Outer Protein T (YopT) inhibiert die CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen***

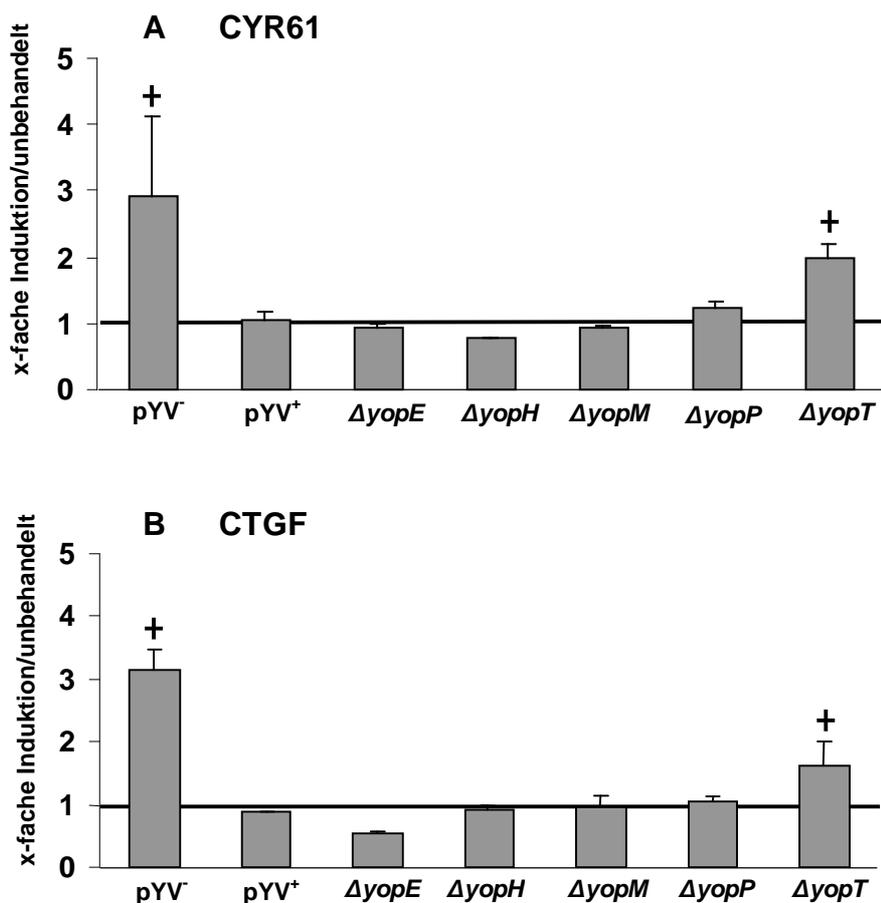
Die Pathogenitätsfaktoren von *Yersinia enterocolitica* sind teilweise chromosomal, teilweise auf dem Virulenzplasmid pYV kodiert. Wichtige auf dem pYV-Plasmid kodierte Faktoren sind hierbei die *Yersinia Outer Proteins* (Yops).

Wie zuvor gezeigt, vermitteln plasmiddefiziente Yersinien eine Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen, nicht aber der plasmidtragende *Yersinia* Wildtypstamm. Somit liegt die Vermutung nahe, dass ein auf dem Plasmid kodierter Faktor, wie etwa eines der Effektor-Yops, die CYR61/CTGF Expression in Epithelzellen supprimiert.

Um herauszufinden, ob tatsächlich Yops an der Suppression der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen beteiligt sind, wurden HeLa Zellen mit pYV<sup>-</sup>, pYV<sup>+</sup> oder verschiedenen Yop-Deletionsmutanten für zwei Stunden infiziert. Die Analyse der CYR61 und CTGF mRNA erfolgte mittels semiquantitativer Echtzeit-RT-PCR (siehe Abbildung 15).

Eine erhöhte CYR61/CTGF mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen konnte nur mit *Yersinia enterocolitica* pYV<sup>-</sup> und der YopT-defizienten Mutante erzielt werden. Eine Infektion mit YopE, H, M oder P-defizienten Mutanten führte nicht zu einer CYR61/CTGF mRNA-Expression.

Mit diesem Versuch konnte demnach eine Beteiligung von YopT an der Inhibition der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen nachgewiesen werden.



**Abb. 15 A und B: CYR61/CTGF mRNA-Expression in HeLa-Zellen durch Yops**

Jeweils  $1 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen wurden mit pYV<sup>-</sup>, pYV<sup>+</sup>, pYV<sup>+</sup> ΔyopE, pYV<sup>+</sup> ΔyopH, pYV<sup>+</sup> ΔyopM, pYV<sup>+</sup> ΔyopP oder pYV<sup>+</sup> ΔyopT bei einer MOI von 20 infiziert, und für 2 h bei 37°C inkubiert. 1 h nach Infektion wurden die Zellkulturansätze mit Gentamycin behandelt. Nach reverser Transkription der isolierten mRNA wurde die cDNA von CYR61/CTGF mittels Taqman Echtzeit-PCR gemessen und die Menge, bezogen auf das konstitutiv exprimierte *house keeping gene* G6PD, normalisiert. Gezeigt ist die x-fache Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Kreuz gekennzeichnet.

### 3.3 Die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression wird durch sezernierte, lipophile Signalstoffe vermittelt

Bakterien können auf vielfältige Weise Einfluss auf ihre Zielzellen im Wirtsorganismus nehmen. Neben Invasion oder direktem Zell-Zell-Kontakt spielt auch die Beeinflussung durch sezernierte Signalstoffe eine große Rolle.

---

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sezernierte Signalstoffe an der Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen nach Infektion mit *Yersinia enterocolitica* mit beteiligt sind.

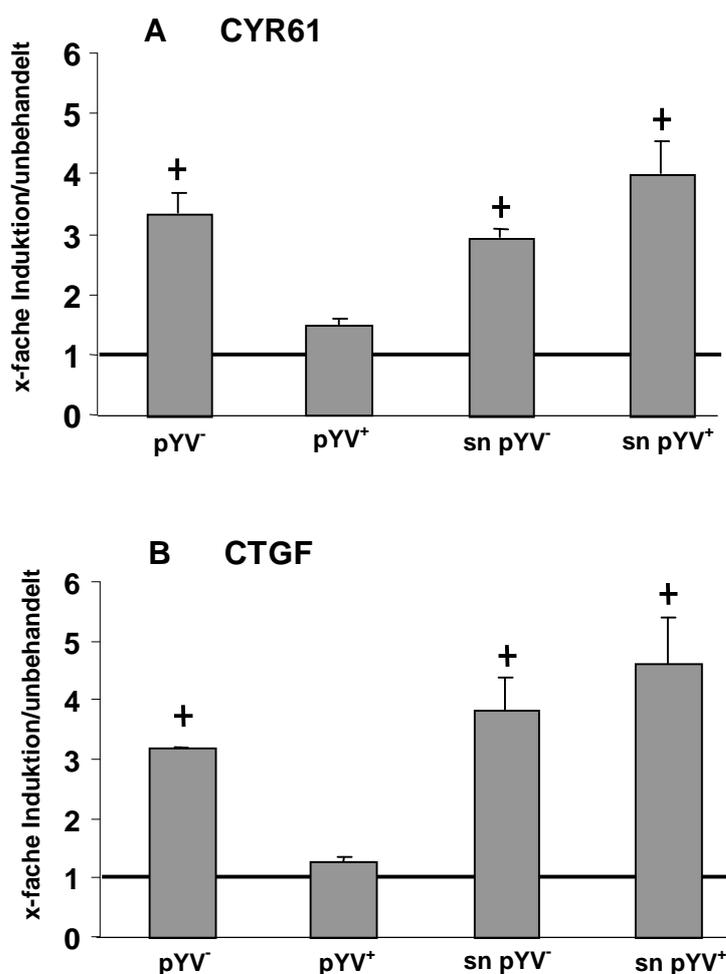
### 3.3.1 Sezernierte Signalstoffe vermitteln CYR61/CTGF mRNA-Expression

Um eine Beteiligung von durch *Yersinia enterocolitica* sezernierten Signalstoffen an der Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression zu überprüfen, wurden *Y. enterocolitica* pYV<sup>-</sup> und pYV<sup>+</sup> Kulturen drei Stunden in RPMI Zellkulturmedium bei 37°C angezogen. Durch anschließende Sedimentation erfolgte die Trennung der Bakterien von dem Medium. Die so erhaltenen Überstände wurden mit einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert, um verbliebene Bakterien und andere größere Moleküle zu entfernen, so dass in dem Überstand nur Bestandteile kleiner als 0,2 µm enthalten blieben, auch potenzielle, von *Yersinia* sezernierte Signalstoffe. Anschließend wurden HeLa-Zellen mit diesen Überständen für zwei Stunden stimuliert. Zum Vergleich erfolgte eine Infektion mit pYV<sup>-</sup> und pYV<sup>+</sup> Bakterienstämmen. Die Analyse der CYR61/CTGF mRNA-Expression erfolgte mittels semiquantitativer Echtzeit-RT-PCR (siehe Abbildung 16).

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen, dass eine Inkubation von HeLa-Zellen sowohl mit Überständen der pYV<sup>-</sup> als auch der pYV<sup>+</sup> Kultur ausreicht, um im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine drei- bis vierfach erhöhte CYR61/CTGF mRNA-Expression, also in einem ähnlichen Ausmaß wie durch Infektion mit pYV<sup>-</sup> Bakterienstämmen, zu bewirken.

Um eine Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression allein durch Bestandteile des verwendeten RPMI-Mediums auszuschließen, wurden HeLa-Zellen parallel mit RPMI-Medium, welches ebenso für drei Stunden bei 37°C inkubiert wurde, stimuliert. Hierbei ließ sich keine signifikante Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression nachweisen (Ergebnisse graphisch nicht dargestellt).

Die vorliegenden Ergebnisse deuten also darauf hin, dass *Yersinia enterocolitica* Signalstoffe sezerniert, die bei der Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression von Bedeutung sind.



**Abb. 16: CYR61 und CTGF mRNA-Expression in HeLa-Zellen**

Jeweils  $1 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen wurden entweder mit pYV<sup>-</sup> oder pYV<sup>+</sup> (MOI = 20) oder mit Überständen (sn) von pYV<sup>-</sup> oder pYV<sup>+</sup> (die Überstände entsprechend einer Bakterienzellzahl von  $1 \cdot 10^9$ , Inkubation der Bakteriensubkultur vor der Infektion 3 h bei 37°C) infiziert, und für 2 h bei 37°C inkubiert. 1 h nach Infektion wurden die Zellkulturansätze mit Gentamycin behandelt. Nach reverser Transkription der isolierten mRNA wurde die cDNA von CYR61/CTGF mittels Taqman Echtzeit-PCR gemessen und die Menge, bezogen auf das konstitutiv exprimierte *house keeping gene* G6PD, normalisiert. Gezeigt ist die x-fache Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Kreuz gekennzeichnet.

### 3.3.2 Lipophile Signalstoffe vermitteln CYR61/CTGF mRNA Expression

In vorangegangenen Versuchen konnte die in der Literatur beschriebene Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression durch das Phospholipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) (Muehlich *et al.*, 2004) bestätigt werden (siehe Abbildung 9). Es ist des weiteren publiziert, dass auch andere Phospholipide, wie etwa Lyso-phosphatidylsäure (LPA) denselben Effekt bewirken können (Sakamoto *et al.*, 2004, Han *et al.*, 2003). Da nicht nur von Eukaryoten, sondern auch von Prokaryoten bekannt ist, dass sie die Fähigkeit besitzen, Phospholipide wie LPA zu sezernieren, stellte sich die Frage, ob es sich bei den von *Yersinia enterocolitica* sezernierten Signalstoffen, die zur Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression führen, um lipophile Phospholipide handeln könnte.

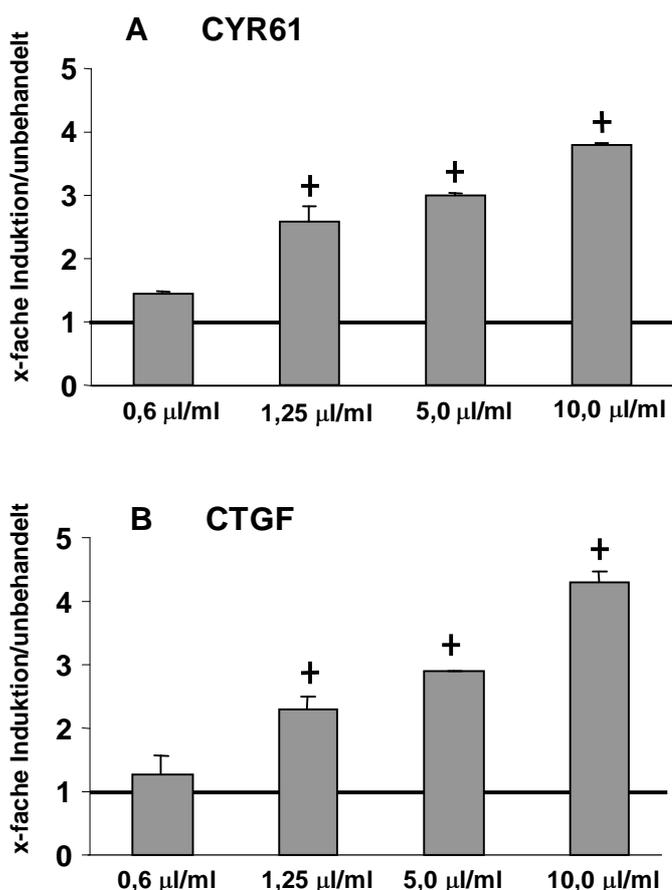
Um dieser Überlegung nachzugehen, wurden Überstände von pYV Bakterienkulturen, welche drei Stunden bei 37°C in RPMI-Medium angezogen, und durch anschließende Sedimentation und Sterilfiltration gereinigt wurden, hergestellt. Um nun lipophile Substanzen aus diesen Überständen zu extrahieren, wurde als Lösungsmittel eine Chloroform/Methanol-Suspension (2:1) verwendet. Die in der chloroformhaltigen Phase angereicherten organischen, lipophilen Bestandteile wurden durch Verdampfen des Lösungsmittels konzentriert. HeLa-Zellen wurden dann mit verschiedenen Konzentrationen der lipophilen Extrakte für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Analyse der CYR61/CTGF mRNA-Expression erfolgte mittels semiquantitativer Echtzeit-RT-PCR (siehe Abbildung 17).

Es zeigte sich, dass durch das extrahierte, lipophile Stoffgemisch eine Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression erreicht werden konnte. Die Menge der CYR61/CTGF mRNA stieg abhängig von der verwendeten Konzentration des lipophilen Stoffgemisches an.

Um auszuschließen, dass lipophile Bestandteile des RPMI-Mediums für die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression verantwortlich sein könnten, wurden auch aus reinem RPMI-Medium in gleicher Vorgehensweise lipophile Stoffe angereichert und HeLa-Zellen damit inkubiert. Hierbei konnte keine signifikante

Induktion der CYR61/ CTGF mRNA-Expression detektiert werden (Ergebnisse nicht graphisch dargestellt).

Von *Yersinia enterocolitica* sezernierte, lipophile Signalstoffe scheinen also an der Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression beteiligt zu sein.



**Abb. 17 A und B: CYR61 und CTGF mRNA-Expression in HeLa-Zellen**

Aus Überständen von pYV Bakterienkulturen (3 h bei 37°C in RPMI-Medium) wurden nach Sterilfiltration mit Hilfe einer Chloroform/Methanol-Suspension lipophile Stoffe extrahiert, in verschiedenen Konzentrationen zu jeweils  $1 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen gegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach reverser Transkription der isolierten mRNA wurde die cDNA von CYR61/CTGF mittels Taqman Echtzeit-PCR gemessen und die Menge, bezogen auf das konstitutiv exprimierte *house keeping gene* G6PD, normalisiert. Gezeigt ist die x-fache Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Kreuz gekennzeichnet.

### 3.4 LPA-Rezeptoren und Rho-GTPasen sind am Signalweg der CYR61/CTGF mRNA-Expression beteiligt

Da gezeigt werden konnte, dass von *Yersinia enterocolitica* sezernierte, lipophile Signalstoffe eine Rolle bei der Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen spielen, sollte nun untersucht werden, ob hierbei das Phospholipid LPA, welches bekanntermaßen von Prokaryoten sezerniert werden kann, oder ein diesem sehr ähnlicher Stoff beteiligt ist, beziehungsweise ob die LPA-spezifischen Rezeptoren LPA 1-3 der EDG-Familie in den Vorgang involviert sind. Es ist allgemein bekannt, dass die für die Experimente verwendete Epithelzelllinie HeLa diese Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche ausbildet. Ein weiteres Phospholipid, welches ebenfalls die CYR61/CTGF mRNA-Expression induziert, ist S1P. Dieses vermittelt seine Wirkung über S1P-spezifische EDG-Rezeptoren (S1P 1-5) und kann nicht von Prokaryoten sezerniert werden.

Für LPA<sub>1</sub>- und LPA<sub>3</sub>-Rezeptoren ist ein selektiver Inhibitor namens 3-(4-(4-((1-(2-Chlorophenyl)ethoxy)carbonylamino)-3-methyl-5-isoazolyl)benzylthio)propan-Säure (Ki16425) beschrieben (Ohta *et al.*, 2003), welcher für diese Versuche eingesetzt wurde.

Um eine mögliche Beteiligung von LPA oder LPA-ähnlichen Phospholipiden beziehungsweise deren Rezeptoren am Signalweg der CYR61/CTGF mRNA-Expression zu erfassen, wurden HeLa-Zellen parallel entweder direkt, oder nach 30 minütiger Vorbehandlung mit Ki16425 mit LPA, S1P oder mit Überständen von pYV<sup>-</sup> Bakterienkulturen für zwei Stunden bei 37°C inkubiert und die resultierende CYR61/CTGF mRNA-Menge der HeLa-Zellen mittels semiquantitativer Echtzeit-RT-PCR bestimmt (Abbildung 18 und 19).

Sowohl durch LPA, als auch durch Überstände der pYV<sup>-</sup> Bakterienkulturen kommt es zu einer zwei- bis dreifachen Erhöhung der CYR61/CTGF mRNA-Expression. Durch Vorbehandlung der HeLa-Zellen mit Ki16425 konnte sowohl die durch LPA als auch die durch Überstände der pYV<sup>-</sup> Bakterienkultur induzierte CYR61/CTGF mRNA-Expression signifikant reduziert werden (Abbildung 18). Im Gegensatz dazu konnte die durch S1P vermittelte, über 20-fache Erhö-

hung der CYR61/CTGF mRNA-Expression durch Vorbehandlung mit Ki16425 nicht signifikant gesenkt werden (Abbildung 19).

Diese Ergebnisse bestätigen die beschriebene Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression durch LPA und S1P (Muehlich *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2003). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Ki16425 die LPA-, nicht aber die S1P-induzierte CYR61/CTGF mRNA-Expression inhibiert.

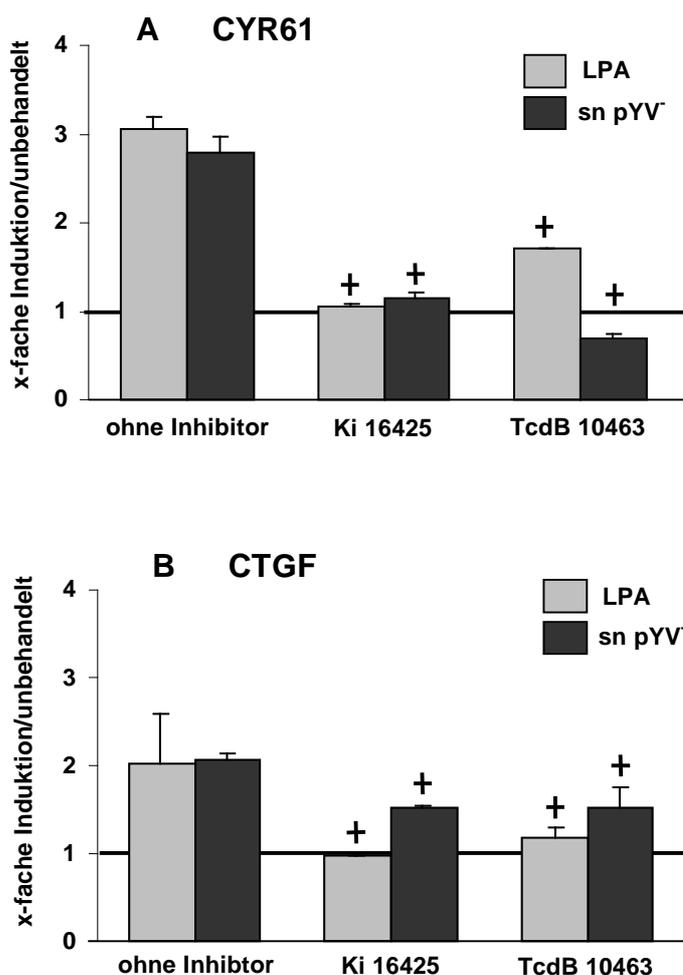
Da die durch Überstände der pYV<sup>-</sup> Bakterienkultur ausgelöste Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression mittels Ki16425 ebenfalls gehemmt wird, legt dies eine Beteiligung von LPA-Rezeptoren an der Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression durch lipophile, von *Yersinia enterocolitica* sezernierte, Signalstoffe nahe.

Aus der Literatur ist darüber hinaus bekannt, dass die über LPA-Rezeptoren aktivierten Zellfunktionen zum Teil über Rho-GTPasen vermittelt werden (Han *et al.*, 2003). Des Weiteren vermittelt auch das *Yersinia outer Protein* YopT seine Wirkung über die Modifikation von Rho-GTPasen (Iriarte und Cornelis, 1998). Da aus den vorangegangenen Analysen schon bekannt ist, dass YopT an der Inhibition der CYR61/CTGF mRNA-Expression beteiligt ist (siehe Kapitel 3.2), sollte nun auch eine eventuelle Beteiligung von Rho-GTPasen an diesem Vorgang geprüft werden.

Die Aktivität der Rho-GTPasen Rho, Rac1 und Cdc42 kann spezifisch durch ein von einem anaeroben Stäbchenbakterium namens *Clostridium difficile* produzierten Toxin (*Clostridium difficile* Toxin B, TcdB 10463) über Glukosylierung gehemmt werden (Just *et al.*, 1995). Es wurden HeLa-Zellen parallel entweder direkt, oder nach Vorbehandlung mit TcdB 10463, mit LPA oder mit Überständen von pYV<sup>-</sup> Bakterienkulturen für zwei Stunden bei 37°C inkubiert, und die resultierende CYR61/CTGF mRNA-Expression der HeLa-Zellen mittels semi-quantitativer Echtzeit-RT-PCR bestimmt (Abbildung 18).

Es konnte mit diesem Versuch demonstriert werden, dass durch Inhibition der Rho-GTPasen Rho, Rac1 und Cdc42 die durch LPA oder durch Überstände von pYV<sup>-</sup> Bakterienkulturen vermittelte Induktion der CYR61/CTGF mRNA-

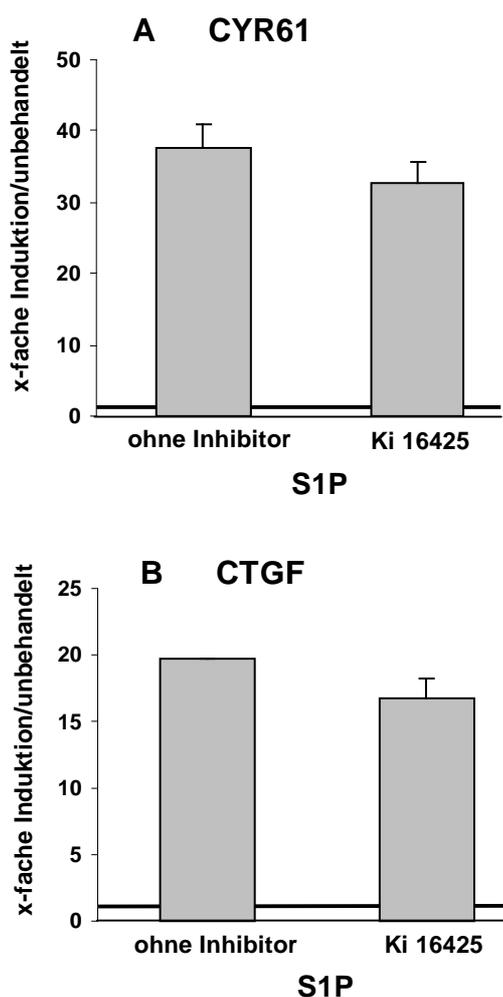
Expression signifikant gemindert werden kann, was eine Beteiligung von Rho-GTPasen an der Vermittlung der Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen nahe legt. Des weiteren deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der hemmende Einfluss von YopT auf die CYR61/CTGF mRNA-Expression über eine Modulation von Rho-GTPasen erfolgt.



**Abb. 18 A und B: CYR61 und CTGF mRNA-Expression in HeLa-Zellen**

Jeweils  $1 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen wurden entweder mit  $10 \mu\text{M}$  LPA oder Überständen (sn) von pYV (die Überstände entsprechend einer Bakterienzahl von  $1 \cdot 10^9$ , Inkubation der Bakterienkultur vor der Infektion 3 h bei  $37^\circ\text{C}$ ) infiziert. Die Zellen wurden entweder ohne Inhibitor, oder nach 30-minütiger Vorbehandlung mit  $10 \mu\text{M}$  Ki 16425 oder *Clostridium difficile* Toxin B 10463 1:20000 für 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach reverser T ranskription der isolierten mRNA wurde die cDNA von CYR61/CTGF mittels Taqman Echtzeit-PCR gemessen und die Menge, bezogen auf das konstitutiv exprimierte *house keeping gene* G6PD, normalisiert. Gezeigt ist die x-fache Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Kreuz gekennzeichnet.



**Abb. 19 A und B:**  
**CYR61 und CTGF mRNA-Expression in HeLa-Zellen**

Jeweils  $1 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen wurden mit  $1 \mu\text{M}$  S1P infiziert. Die Zellen wurden entweder ohne Inhibitor, oder nach Vorbehandlung mit  $10 \mu\text{M}$  Ki 16425 für 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach reverser Transkription der isolierten mRNA wurde die cDNA von CYR61 / CTGF mittels Taqman Echtzeit-PCR gemessen und die Menge, bezogen auf das konstitutiv exprimierte *house keeping gene* G6PD, normalisiert. Gezeigt ist die x-fache Induktion der CYR61 / CTGF mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

### 3.5 Die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression ist eine generelle Reaktion von Epithelzellen nach Interaktion mit Bakterien

*Yersinia enterocolitica* sezerniert, wie in dieser Arbeit schon ausführlich gezeigt wurde, lipophile Stoffe, welche über LPA-Rezeptoren Einfluss auf die CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen nehmen können.

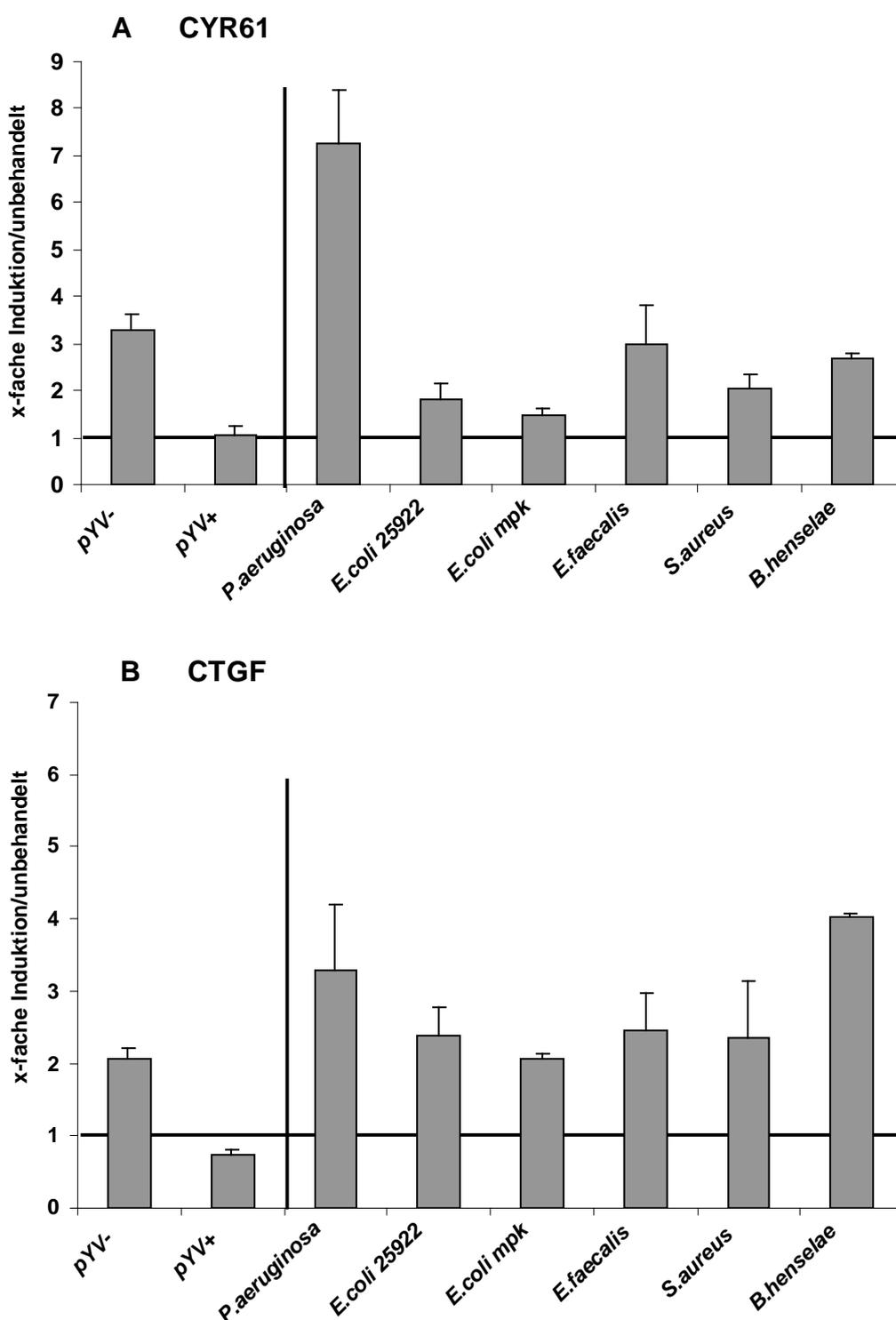
Da lipophile Stoffe wie Phospholipide nicht nur wichtige Baustoffe für die Zellmembranen fast aller Bakterienspezies darstellen, sondern letzthin auch als intrazelluläre Signalmoleküle identifiziert wurden (Moolenaar, 1995; Goetzl und An, 1998), ergab sich die Vermutung, dass die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen über LPA-Rezeptoren durch lipophile Stoffe

wie Phospholipide als eine generelle Reaktion von Epithelzellen nach Interaktion mit Bakterien zu werten sein könnte.

### **3.5.1 Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression durch verschiedene Bakterienspezies**

Um der Hypothese nachzugehen, ob die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen eine generelle Reaktion nach Infektion mit Bakterien darstellt, wurden Zellkulturversuche mit HeLa-Zellen und verschiedenen Bakterienspezies durchgeführt. Die Epithelzellen wurden sowohl mit Gram-positiven Bakterien wie *Staphylokokkus aureus* oder *Enterokokkus faecalis*, als auch mit Gram-negativen Bakterien wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Bartonella henselae* infiziert. Durch die Auswahl sowohl Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien, als auch von Stäbchen- und Kokkenbakterien, sollte ein möglichst breites Spektrum der mannigfaltigen aeroben Bakterienwelt abgedeckt werden. Zum besseren Vergleich wurden gleichzeitig Infektionen mit *Yersinia pYV<sup>-</sup>* und *pYV<sup>+</sup>* Bakterienkulturen durchgeführt. Nach Infektion der HeLa-Zellen mit den entsprechenden Bakterienkulturen erfolgte eine Inkubation für zwei Stunden bei 37°C. Die Analyse der in den Epithelzellen vorhandenen CYR61/CTGF mRNA-Menge erfolgte mittels semiquantitativer Echtzeit-RT-PCR (siehe Abbildung 20).

Die Infektion mit allen untersuchten Bakterienspezies führte zu einer signifikanten Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in HeLa-Zellen. Allerdings zeigten sich durchaus Unterschiede in dem Ausmaß der Induktion. Es bestätigte sich damit die Hypothese, dass aerobe Bakterien generell in der Lage sind, eine Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen zu bewirken.



**Abb. 20 A und B: CYR61 und CTGF mRNA-Expression in HeLa-Zellen**

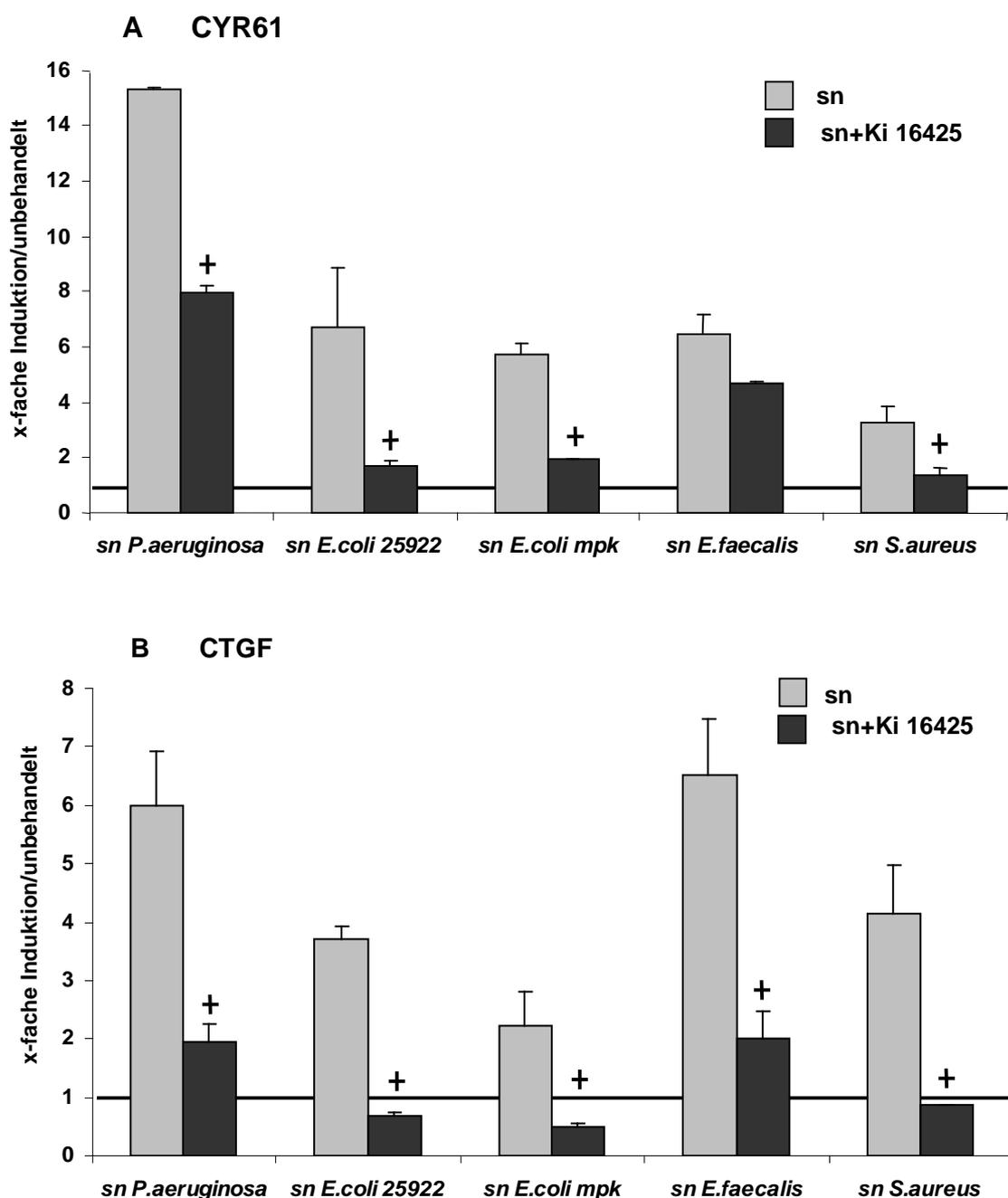
Jeweils  $1 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen wurden mit verschiedenen Bakterienstämmen bei einer MOI von 20 (*B. henselae* MOI 250) infiziert, und für 2 h bei 37°C inkubiert. 1 h nach Infektion wurden die Zellkulturansätze mit Gentamycin behandelt. Nach reverser Transkription der isolierten mRNA wurde die cDNA von CYR61/CTGF mittels Taqman Echtzeit-PCR gemessen und die Menge, bezogen auf das konstitutiv exprimierte *house keeping gene* G6PD, normalisiert. Gezeigt ist die x-fache Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

### 3.5.2 CYR61/CTGF mRNA-Expression ist generell über sezernierte Mediatoren und LPA-Rezeptoren vermittelt

Da gezeigt werden konnte, dass die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen eine generelle Reaktion nach Interaktion mit aeroben Bakterien darstellt, sollte im Folgenden untersucht werden, ob dieser Vorgang auch, wie bei *Yersinia enterocolitica* bereits gezeigt, über sezernierte Signalstoffe und LPA-Rezeptoren vermittelt wird.

Dazu wurden Bakterienkulturen von *Staphylokokkus (S.) aureus*, *Enterokokkus faecalis (E. faecalis)*, *Escherichia coli (E. coli)* und *Pseudomonas (P.) aeruginosa* für drei Stunden in RPMI Zellkulturmedium bei 37°C kultiviert. Anschließend erfolgte die Trennung der Bakterien vom Medium durch Sedimentation. Die so erhaltenen Überstände konnten nach Sterilfiltration (0,2 µm) für Stimulationsversuche eingesetzt werden. HeLa-Zellen wurden parallel entweder direkt, oder nach 30-minütiger Vorbehandlung mit Ki16425 mit den verschiedenen Bakterienüberständen für zwei Stunden inkubiert. Die Auswertung der danach in den Epithelzellen vorhandenen Menge an CYR61/CTGF mRNA erfolgte mittels semiquantitativer Echtzeit-RT-PCR (siehe Abbildung 21).

Als Resultat zeigte sich, dass durch sämtliche verwendete Bakterienüberstände eine signifikante Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in den Epithelzellen erreicht werden konnte, was den Rückschluss zulässt, dass diese Induktion generell durch bakteriell sezernierte Mediatoren vermittelt zu sein scheint. Außerdem konnte bei allen verwendeten Bakterienüberständen durch die Vorinkubation der Epithelzellen mit Ki16425 eine partielle (*E. faecalis*, *P. aeruginosa*), oder vollständige (alle anderen Bakterienstämme), Reduktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression nachgewiesen werden, was die These der Beteiligung von LPA-Rezeptoren an der Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen nach Interaktion mit Bakterien bzw. von Bakterien sezernierten Signalstoffen untermauert.



**Abb. 21 A und B: CYR61 und CTGF mRNA-Expression in HeLa-Zellen**

Jeweils  $1 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen wurden mit Überständen (sn) von diversen Bakterienstämmen (die Überstände entsprechend einer Bakterienzahl von  $1 \cdot 10^9$ , Inkubation der Bakterienkultur vor der Infektion 3 h bei  $37^\circ\text{C}$ ) infiziert. Die Zellen wurden entweder ohne Inhibitor oder nach 30-minütiger Vorbehandlung mit  $10 \mu\text{M}$  Ki 16425 für 2 h mit den Bakterienüberständen bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach reverser Transkription der isolierten mRNA wurde die cDNA von CYR61/CTGF mittels Taqman Echtzeit-PCR gemessen und die Menge, bezogen auf das konstitutiv exprimierte *house keeping gene* G6PD, normalisiert. Gezeigt ist die x-fache Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Kreuz gekennzeichnet.

### 3.6 Die Induktion der CYR61/CTGF mRNA Expression durch *Listeria monozytogenes*

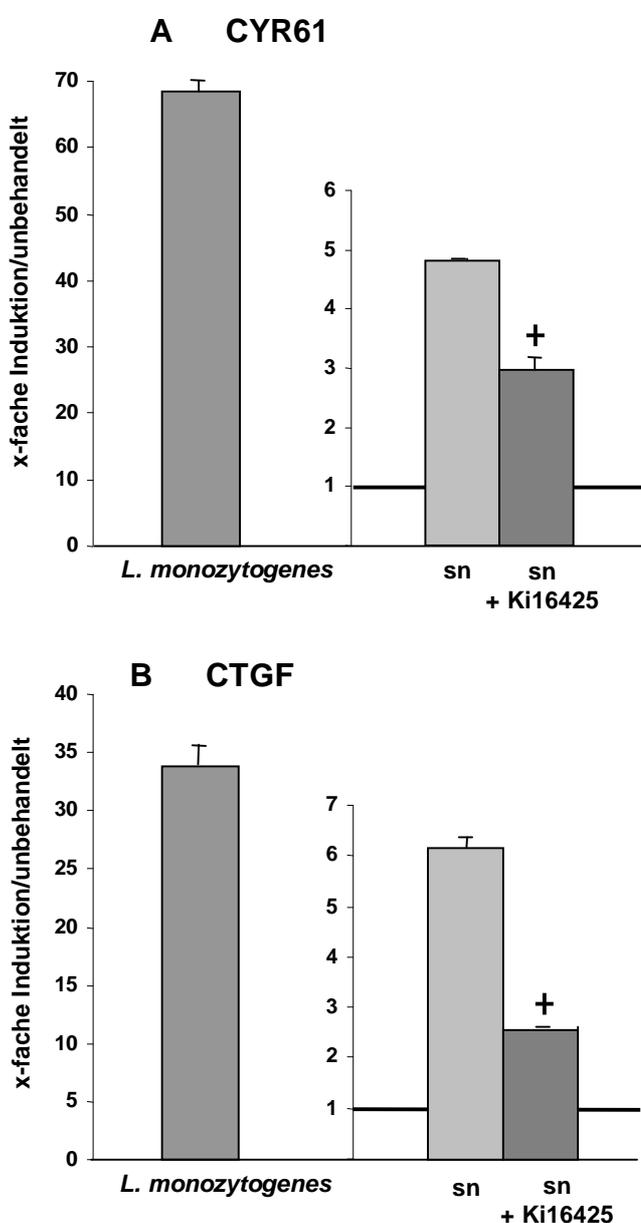
Bei Vorversuchen zu der in Kapitel 3.5 behandelten Fragestellung, ob Bakterien generell eine Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen bewirken können, wurde neben den dort gezeigten Bakterienspezies auch ein Vertreter der Gattung der Listerien, einer Gruppe von Gram-positiven, fakultativ-intrazellulären, fakultativ-anaeroben Stäbchen, untersucht. Hierbei fiel auf, dass es zwei Stunden nach Infektion von HeLa-Zellen mit *Listeria (L.) monocytogenes* zu einer über dreißigfach ansteigenden Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression kam (Ergebnisse nicht dargestellt). Aufgrund dieser übermäßig starken Induktion durch Listerien wurde angenommen, dass diese möglicherweise einem anderen Mechanismus folgt als dem, welcher bei *Yersinia enterocolitica* und den anderen verwendeten Bakterien identifiziert werden konnte.

#### 3.6.1 Sezernierte Signalstoffe vermitteln über LPA-Rezeptoren CYR61/CTGF mRNA-Expression

Die Feststellung, dass die Infektion von Epithelzellen mit *Listeria monozytogenes* zu einer sehr starken, von allen anderen untersuchten Bakterienspezies abweichenden Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression führt, sollte im Folgenden bestätigt und näher untersucht werden.

HeLa-Zellen wurden mit *L. monozytogenes* infiziert, und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Um herauszufinden, ob diese Induktion über sezernierte Signalstoffe vermittelt wird, und ob LPA-Rezeptoren beteiligt sind, erfolgte gleichzeitig eine Inkubation von HeLa-Zellen mit Überständen von *L. monozytogenes* Kulturen für zwei Stunden bei 37°C, parallel entweder direkt oder nach 30-minütiger Vorbehandlung mit Ki16425. Die resultierende CYR61/CTGF mRNA-Menge der HeLa-Zellen wurde mittels semiquantitativer Echtzeit-RT-PCR bestimmt (siehe Abbildung 22).

Mit einer auf das über 30-fach ansteigenden Induktion im Vergleich zu unbehandelten Zellen konnte durch diesen Versuch der starke Einfluss von *L. monocytogenes* auf die CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen bestätigt werden. Des Weiteren führte auch die Inkubation mit Überständen von *Listeria* Bakterienkulturen zu einer Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression, allerdings in einem weit niedrigeren Ausmaß (maximal 6-fache Induktion). Diese, durch Überstände induzierte CYR61/CTGF mRNA-Expression lies sich durch Vorbehandlung mit Ki16425 signifikant reduzieren.



**Abb. 22 A und B:**  
CYR61 und CTGF mRNA Expression in HeLa-Zellen durch *Listeria monocytogenes*

Jeweils  $1 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen wurden mit *L. monocytogenes* (MOI 20) oder Überständen (sn) von *Listeria* (die Überstände entsprechend einer Bakterienzellzahl von  $1 \cdot 10^9$ , Inkubation der Bakteriensubkultur vor der Infektion 3 h bei 37°C), ohne Inhibitor oder nach 30-minütiger Vorbehandlung der Zellen mit  $10 \mu\text{M}$  Ki16425 infiziert und für 2 h bei 37°C inkubiert. 1 h nach Infektion wurden die Zellkulturansätze mit Gentamycin behandelt. Nach reverser Transkription der isolierten mRNA wurde die cDNA von CYR61/CTGF mittels Taqman Echtzeit-PCR gemessen und die Menge, bezogen auf das konstitutiv exprimierte *house keeping gene* G6PD, normalisiert. Gezeigt ist die x-fache Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Kreuz gekennzeichnet.

Somit konnte dargestellt werden, dass Listerien, ebenso wie Yersinien und alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Bakterienspezies, Signalstoffe sezernieren, welche über LPA-Rezeptoren vermittelt zu einer Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen führen. Da aber die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* Bakterienkulturen im Vergleich zur Induktion nach Inkubation mit Überständen um ein Vielfaches höher ist, scheinen noch weitere Mechanismen zu existieren, welche die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen durch die Gattung *Listeria* beeinflussen.

### 3.6.2 Listeriolysin induziert CYR61/CTGF mRNA-Expression

Um neben der bereits dargestellten Induktion durch sezernierte Signalstoffe und LPA-Rezeptoren weitere mögliche Mechanismen zu ermitteln, welche zu einer CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen durch *Listeria monocytogenes* führen, wurden verschiedene Deletionsmutanten von *L. monocytogenes* auf diese Fähigkeit hin analysiert. Neben dem Wildtyp wurden folgende Listerienstämme verwendet:

- ***Listeria*  $\Delta$ inl A,**  
eine Internalin A Deletionsmutante, wodurch Listerien die Fähigkeit verlieren, in Wirtszellen eindringen zu können (Braun und Cossart, 2000),
- ***Listeria*  $\Delta$ plc A,**  
mit Deletion der Phosphatidylinositol spezifischen Phospholipase C, wodurch Listerien zwar in die Wirtszelle eindringen, dort aber nicht aus ihrer Vakuole freigesetzt werden können (Camilli *et al.*, 1991), und
- ***Listeria*  $\Delta$ hly,**  
ein Listeriolysin O-defizienter Stamm. Listeriolysin O (LLO), ein porenbildendes Hämolyysin, ist das wichtigste von *L. monocytogenes* produzierte Toxin und hauptverantwortlich für dessen Pathogenität. Eine Rolle von LLO besteht in dem Aufbrechen von Membranbarrieren und erlaubt so den Listerien aus Phagosomomen in das Zytosol zu gelangen. Eine

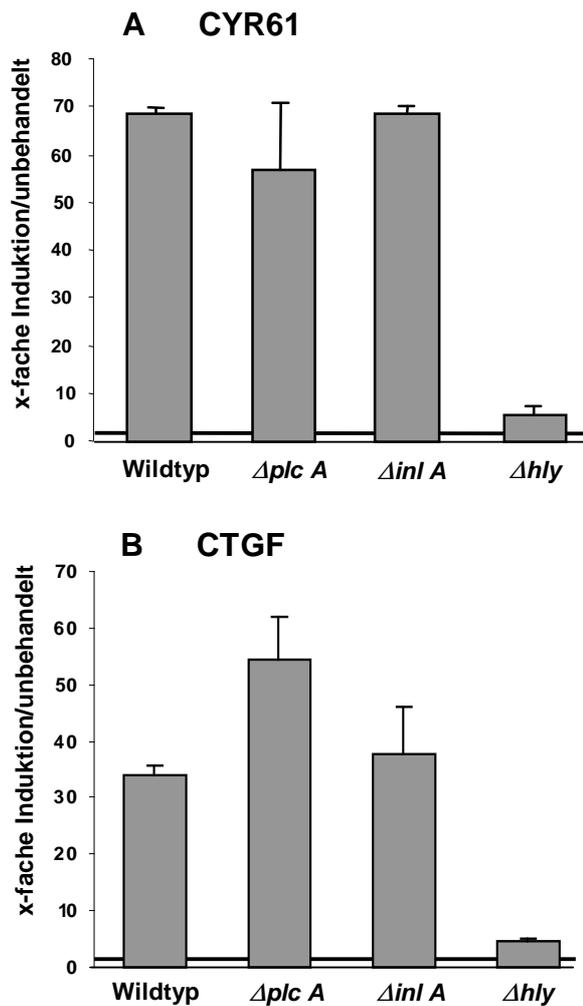
ähnlich wichtige Funktion ist die Induktion von Signaltransduktionswegen in Wirtszellen. Diese Vorgänge modulieren unter anderem die Aufnahme der Bakterien, sowie die Zytokin- und Chemokinexpression (Kayal und Charbit, 2006).

Für dieses Experiment wurden HeLa-Zellen zwei Stunden bei 37°C mit *L. monocytogenes* oder den verschiedenen Deletionsmutanten inkubiert. Die Analyse der in den Epithelzellen vorhandenen CYR61/CTGF mRNA-Menge erfolgte mittels semiquantitativer Echtzeit-RT-PCR (siehe Abbildung 23).

Es zeigte sich, dass sowohl durch den *L. monocytogenes* Wildtypstamm, als auch durch die *inlA*<sup>-</sup>- und *plcA*<sup>-</sup>-defizienten Stämme eine 34-68-fache Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression bewirkt werden konnte. Die Infektion mit der Lysteriolysin O-defizienten Mutante führte im Gegensatz dazu nur zu einer sehr geringen Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression (maximal 5-fache Induktion). Diese geringe Induktion entspricht in etwa der Höhe derjenigen Induktion, welche von Listerien durch sezernierte Signalstoffe erreicht werden konnte (siehe Kapitel 3.6.1, Abbildung 22).

Diese Ergebnisse zeigen, dass für die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression durch Listerien Lysteriolysin O eine Hauptrolle zu spielen scheint. Da eine Internalin-Defizienz keinen Effekt auf die Induktion von CYR61/CTGF mRNA-Expression hat, wird geschlussfolgert, dass Listerien für diese Induktion nicht internalinvermittelt in die Wirtszelle aufgenommen werden müssen.

Mit Lysteriolysin O konnte ein weiterer wichtiger Mechanismus aufgezeigt werden, der zu einer Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* führt.



**Abb. 23 A und B:**  
CYR61 und CTGF mRNA  
Expression in HeLa-Zellen  
durch *Listeria monozyto-*  
*genes*

Jeweils  $1 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen wurden mit verschiedenen *L. monozytogenes* Bakterienstämmen (MOI 20) infiziert und für 2 h bei 37°C inkubiert. 1 h nach Infektion wurden die Zellkulturansätze mit Gentamycin behandelt. Nach reverser Transkription der isolierten mRNA wurde die cDNA von CYR61/CTGF mittels Taqman Echtzeit-PCR gemessen und die Menge, bezogen auf das konstitutiv exprimierte *house keeping gene* G6PD, normalisiert. Gezeigt ist die x-fache Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

### 3.7 Schlussfolgerungen

Aus den durchgeführten Analysen lassen sich zusammenfassend folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien induzieren in Epithelzellen durch Sekretion lipophiler Komponenten eine transiente mRNA-Expression von CYR61 und CTGF.
- Diese Wirtsantwort ist abhängig von LPA-Rezeptoren und RhoGTPasen.
- Virulenzfaktoren von Bakterien können diese Wirtsantwort modulieren. So ist YopT von *Yersinia enterocolitica* an der Hemmung der *Yersinia*-induzierten CYR61/CTGF mRNA-Expression beteiligt. Eine *Listeria mo-*

*nozytogenes* Infektion führt zu einer übermäßig starken CYR61/ CTGF mRNA-Expression, welche hauptsächlich durch Listeriolysin O vermittelt wird.

- Weiterführende Untersuchungen müssen klären, welche infektionsbiologische Bedeutung diese Wirtsantwort hat.

## 4 Diskussion

In Epithelzellen wird durch die Infektion mit pathogenen, Virulenzplasmid-defizienten *Yersinia enterocolitica* Stämmen, meist über Invasin vermittelt, die Induktion vieler verschiedener Gene ausgelöst. Diese generieren die proinflammatorische Wirtsantwort. Eine kleine Gruppe von Genen allerdings wird unabhängig von Invasin induziert. Hier konnten neben Thrombospondin, *early growth response 1* (EGR-1) und *plasminogen activating* Inhibitor (PAI) CYR61 und CTGF, Gene der CCN-Familie, identifiziert werden, welche in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden sollten (Bohn *et al.*, 2004).

CYR61 und CTGF sind als Signalproteine an vielen zellulären Abläufen wie Mitose, Adhäsion und Apoptose beteiligt. Sie nehmen regulierend Einfluss auf physiologische und pathophysiologische Prozesse wie Differenzierung, Entwicklung, Angiogenese, Wundheilung, Tumorwachstum und fibrotischen Gewebeumbau (Brigstock, 2003).

### 4.1 *Yersinia enterocolitica* und die Modulation der CYR61/CTGF Expression in Epithelzellen

Plasmiddefiziente (pYV<sup>-</sup>) *Yersinia enterocolitica* Stämme vermitteln in Epithelzellen eine transiente Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression, sowie konsekutiv CYR61/CTGF Proteinexpression. Dies ist keine spezifische Reaktion der verwendeten Karzinomzelllinie HeLa, sondern wurde auch in primären Maus-Darmepithelzellen nachgewiesen. Es konnte aufgezeigt werden, dass sterilfiltrierte Überstände von sedimentierten *Y. enterocolitica* Bakterienkulturen ausreichen, um eine Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression zu bewirken, was darauf schließen lässt, dass sezernierte Mediatoren die CYR61/CTGF mRNA-Expression vermitteln. Da es möglich war, aus diesen Überständen lipophile Komponenten anzureichern, welche ebenfalls eine CYR61/CTGF

mRNA-Induktion bewirken, scheint es sich bei den für die Induktion verantwortlichen Signalstoffen um lipophile Substanzen zu handeln.

CYR61 und CTGF können durch eine Vielzahl verschiedenster Mediatoren, wie etwa TGF- $\beta$  oder Östrogene induziert werden. Auch ist eine Induktion durch lipophile Phospholipide wie LPA und S1P möglich (Brunner *et al.*, 1991; Brigstock, 2003; Muehlich *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2003).

#### 4.1.1 LPA und LPA-Rezeptoren

LPA vermittelt seine biologischen Funktionen über spezifische EDG-Rezeptoren (LPA<sub>1-3</sub>), die Subtypen 1 und 3 können mittels Ki16425 spezifisch antagonisiert werden (Ohta *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die durch LPA, als auch die durch Überstände von *Yersinia* Bakterienkulturen vermittelte Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression durch Ki16425 inhibiert werden kann. Im Gegensatz dazu hat Ki16425 keinen Einfluss auf die von S1P über S1P-Rezeptoren vermittelte Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression. LPA-Rezeptoren scheinen also an der Induktion der CYR61/CTGF mRNA beteiligt zu sein.

LPA spielt eine Rolle bei proliferativen und antiapoptotischen Veränderungen von Zellen, sowie bei Veränderungen des Zytoskeletts, wie etwa bei Zellmotilität, Adhäsion, Sekretion, Kontraktion oder Chemotaxis. Des Weiteren soll LPA an wichtigen Prozessen wie Neurogenese, Myelinisierung, Angiogenese, Wundheilung und Tumorausbreitung beteiligt sein (Moolenaar, 1995; Contos *et al.*, 2000; Goetzl und An, 1998; Eichholtz *et al.*, 1993). Vergleicht man diese Aufgaben mit den Funktionen von CYR61 und CTGF fallen viele Gemeinsamkeiten auf. Die CCN-Proteine sind an Vorgängen wie Mitose, Adhäsion, Apoptose und Migration beteiligt und wirken regulierend auf Differenzierung, Entwicklung, Embryogenese, Angiogenese sowie Tumorwachstum, Wundheilung und fibrotischen Gewebeumbau ein (Brigstock, 2003). Schon allein diese Ähnlichkeiten in den Funktionen lassen spekulieren, dass es sich bei der von *Yersinia enterocolitica* sezernierten Substanz, welche die Induktion der CYR61/CTGF

mRNA-Expression in Epithelzellen auslöst, um einen LPA-ähnlichen Stoff handeln könnte. Auch die Tatsache, dass Prokaryoten Phospholipide wie LPA, nicht aber S1P, sezernieren können (Moolenaar, 1995; Spiegel und Milstien, 2002), ist ein weiterer Hinweis für diese Vermutung.

LPA-Rezeptoren sind an der Epithelzelloberfläche verschiedenster Organe wie Lunge, Herz, Milz, Niere und Magen ausgebildet. Die Verteilung der verschiedenen Rezeptorsubtypen 1-3 variiert allerdings in unterschiedlichen Zelltypen erheblich. So exprimiert die in der vorliegenden Arbeit verwendete humane Epithelzelllinie HeLa hauptsächlich LPA<sub>1</sub> und LPA<sub>2</sub>-Rezeptoren. Durch den selektiven Antagonist Ki16425 werden vor allem die Rezeptorsubtypen 1 und 3 gehemmt (Ohta *et al.*, 2003). Man kann also davon ausgehen, dass es sich bei dem LPA-Rezeptorsubtyp, der für die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in den verwendeten HeLa Zellen verantwortlich ist, um den LPA<sub>1</sub>-Rezeptor handeln müsste. Für eine Bestätigung dieser Annahmen wären allerdings weiterführende Untersuchungen, etwa mit selektiven LPA<sub>1</sub>-Rezeptor-Inhibitoren, erforderlich.

Auch um weiteren Aufschluss darüber zu erhalten, ob es wirklich eine LPA-ähnliche Substanz oder sogar LPA selbst ist, welche von *Yersinia enterocolitica* sezerniert wird und über LPA-Rezeptoren wirkt, müssten weiterführende Analysen durchgeführt werden. So könnten mittels Dünnschichtchromatographie lipophile Extrakte aus Bakterienüberständen nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt, und mit dem Sprühreagenz *Molybdenium Blue*, einem spezifischen Farbstoff für Phospholipide, sichtbar gemacht werden. Parallel könnte eine reversible Färbung der aufgetrennten Fraktionen mit Jod-Dampf erfolgen, und somit die entsprechenden Phospholipidfraktionen extrahiert und auf ihre Fähigkeit, CYR61 beziehungsweise CTGF zu induzieren, untersucht werden. Exaktere Stoffanalysen wären etwa durch massenspektrometrische Analysen in Kooperation mit der Chemie möglich.

#### 4.1.2 YopT und Rho-GTPasen

Bekanntlich sind Rho-GTPasen wie RhoA, Rac1 und Cdc42 an der Induktion von CYR61 und CTGF beteiligt (Han *et al.*, 2003, Chowdhury und Chaqour, 2004). Passend zu dieser Aussage konnte gezeigt werden, dass der auf dem pYV-Plasmid kodierte und über ein Typ III-Sekretionssystem sezernierte Virulenzfaktor YopT, welcher sich unter anderem dadurch auszeichnet, dass er durch Modifikation von RhoA Aktin-Filamente zerstört und das Zytoskelett der Wirtszelle manipuliert (Iriarte und Cornelis, 1998, Zumbihl *et al.*, 1999), eine Inhibition der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen bewirkt. Derselbe inhibitorische Effekt konnte für ein von *Clostridium difficile* produziertes Toxin (*Clostridium difficile* Toxin B) nachgewiesen werden, ein Toxin, welches Rho-GTPasen mittels Glukosylierung inaktiviert (Just *et al.*, 1995). Mit diesen Erkenntnissen lässt sich folglich die Beteiligung von Rho-GTPasen an der Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression durch *Yersinia enterocolitica* bestätigen.

Da YopT die CYR61/CTGF mRNA-Expression allerdings nicht vollständig supprimiert, liegt die Vermutung nahe, dass noch andere Yops einen inhibitorischen Einfluss haben könnten. Untersuchungen mit Deletionsmutanten deuten allerdings daraufhin, dass weder YopE, YopH, YopM oder YopP für die Inhibition von CYR61/CTGF mRNA-Expression von Bedeutung sind. Ob neben YopT noch YopO von Bedeutung ist, kann in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden, da die entsprechenden Untersuchungen mit einer YopO-Deletionsmutante nicht durchgeführt wurden. Ebenso ist es denkbar, dass mehrere Yops synergistisch die Inhibition der CTGF/CYR61 Expression bewirken.

Es ist besonders beachtenswert, dass zwar YopT durch Modifikation von Rho-GTPasen die CYR61/CTGF mRNA-Expression inhibiert, nicht aber YopE, da zu den funktionellen Eigenschaften von YopE ebenfalls die Interaktion mit Rho-GTPasen und konsekutiv eine Zerstörung von Aktin-Filamenten gehört (Rosqvist *et al.*, 1991, Pawel-Rammingen *et al.*, 2000).

Wo liegen also mögliche Unterschiede in der Wirkung von YopT und YopE? -

Die Wirkungsmechanismen dieser beiden Effektor-Yops, welche zu einer Modifikation von Rho-GTPasen führen, weisen große Unterschiede auf. So kann die YopE-vermittelte GTP-Hydrolyse durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) der Wirtszelle aufgehoben werden, wohingegen die proteolytische Spaltung der Carboxylenden der Rho-GTPasen durch YopT eine irreversible Inaktivierung darstellt (Shao *et al.*, 2002). Ein möglicher Effekt von YopE auf die CYR61/CTGF mRNA-Expression könnte also reversibel und in unseren Analysen nicht erfasst worden sein. Außerdem ist es möglich, dass YopT und YopE selektiv verschiedene spezifische Mitglieder der Familie der Rho-GTPasen nach Infektion von Epithelzellen mit Yersinien modulieren (Shao *et al.*, 2002). Gestützt wird diese Überlegung durch die Feststellung, dass eine durch Immunglobulinrezeptoren und Komplementrezeptoren vermittelte Phagozytose die selektive Aktivierung von Rac1 und Cdc 42 bzw. von RhoA benötigt (Caron und Hall, 1998). YopT könnte also spezifische Rho-GTPasen modulieren, welche die CYR61/CTGF mRNA-Expression supprimieren; YopE hingegen würde mit anderen Rho-GTPasen interagieren, die keinen Einfluss auf die CYR61/CTGF mRNA-Expression haben. Eine weitere mögliche Erklärung könnte eine selektive Sekretion von YopT und YopE in verschiedene Arten von Wirtszellen, beziehungsweise eine Sekretion in dieselbe Wirtszellart, allerdings in unterschiedlichen Konzentrationen, sein (Shao *et al.*, 2002). So könnte ein Einfluss von YopE auf die CYR61/CTGF mRNA-Expression nur aufgrund einer zu niedrigen YopE Konzentration in Epithelzellen ausbleiben. Auch die Art der Inaktivierung könnte bezüglich der unterschiedlichen Wirkungen von YopT und YopE eine Rolle spielen. So konnte für die Rac1-GTPase gezeigt werden, dass YopE membrangebundenes Rac1 direkt inaktivieren kann, während YopT membrangebundenes Rac1 ins Zytoplasma freisetzt, so dass dessen Translokation in den Zellkern gefördert wird. Dort bleibt die Rac1-Aktivität erhalten und beeinflusst die Genexpression der Wirtszelle, die Funktionen von membrangebundenem Rac1 sind dagegen, mangels Vorhandensein von Rac1 an der Membran, ausgeschaltet (Wong und Isberg, 2005).

Es gibt also mehrere plausible Überlegungen warum YopT, nicht aber YopE, die CYR61/CTGF mRNA-Expression beeinflusst. Welche dieser Möglichkeiten

zutritt, ob mehrere Mechanismen in Kombination die eigentliche Ursache sind, oder ob eventuell noch andere Yops eine Rolle spielen, ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar und bedürfte daher weiterer experimenteller Analysen, etwa mit doppel- oder dreifachmutierten *Yersinia* Stämmen.

#### **4.2 Verschiedene Bakterienspezies modulieren die CYR61/CTGF Expression in Epithelzellen, die Bedeutung von Rho-GTPasen**

Nicht nur aerobe Bakterien der Gattung *Yersinia*, sondern auch andere, sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien, Stäbchen- wie Kokkenbakterien (verwendet wurden *Staphylokokkus aureus*, *Enterokokkus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bartonella henselae* und *Listeria monocytogenes*) können eine Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen bewirken, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Diese scheint generell über sezernierte, lipophile Signalstoffe und LPA-Rezeptoren vermittelt. Es ist also anzunehmen, dass die Induktion der CYR61/CTGF Expression durch die verschiedenen Bakterien über denselben, beziehungsweise über einen strukturell sehr ähnlichen Botenstoff vermittelt wird.

Im menschlichen Genom sind zu etwa einem Prozent Proteine kodiert, welche entweder Rho-GTPasen direkt regulieren, oder durch Interaktion mit diesen reguliert werden. Über komplexe Signalwege sind Rho-GTPasen an den meisten grundlegenden zellbiologischen Vorgängen von Eukaryoten beteiligt, dazu gehören etwa Morphogenese, Bewegung und Zellteilung (Jaffe und Hall, 2005). Rho-GTPasen sind zentrale Modulatoren der Aktin-Filamente und des Zytoskeletts von Eukaryoten und stellen folglich ein häufiges Angriffsziel bakterieller Toxine und anderer Virulenzfaktoren von Bakterien dar. Deren Inaktivierung hemmt unter anderem wichtige Funktionen der Immunabwehr, wie Chemotaxis oder Phagozytose, und ermöglicht so den Pathogenen die Infektion und die Ausbreitung im Wirtsorganismus (Aktories *et al.*, 2000). Auch für die Induktion von CYR61 und CTGF spielen Rho-GTPasen eine Rolle (Han *et al.*, 2003; Chowdhury und Chaqour, 2004).

*Yersinien* sind in der Lage, YopT-vermittelt Rho-GTPasen zu modulieren, wodurch die CYR61/CTGF mRNA-Expression inhibiert wird. Interessant ist, dass auch andere Bakterienspezies Virulenzfaktoren besitzen, welche über eine Modulation von Rho-GTPasen wirken, und damit eventuell ebenfalls die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression supprimieren oder anderweitig beeinflussen könnten. Andererseits scheinen Bakterien auch weitere Mechanismen etabliert zu haben, welche die CYR61/CTGF Expression, zusätzlich zu der in dieser Arbeit dargestellten LPA-Rezeptor-abhängigen Induktion verstärken; so fällt etwa die CYR61/CTGF mRNA-Expression durch *Listeria monocytogenes* übermäßig stark aus.

#### **4.2.1 Induktion von CYR61/CTGF in Epithelzellen durch Pseudomonaden**

Der in dieser Arbeit verwendete *Pseudomonas aeruginosa* ATCC Stamm und dessen Bakterienüberstände induzieren die CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen.

Pseudomonaden verfügen über zwei spezialisierte Sekretionssysteme zur Absonderung ihrer Virulenzfaktoren. Diese Systeme sind hauptverantwortlich für die Überwindung der Immunantwort des Wirtes und die Proliferation der Pathogene im Wirtszellorganismus. Ein vergleichsweise langsam arbeitendes Typ II-Sekretionssystem sezerniert Virulenzfaktoren wie Exotoxin A (ExoA), Elastase (LasA) und Phospholipase C. Wie auch *Yersinia enterocolitica* verfügen Pseudomonaden zudem über ein schnell arbeitendes Typ III-Sekretionssystem, welches Effektorproteine direkt in die Wirtszelle injiziert. Diese Proteine, namens Exoenzym (Exo) S, ExoT, ExoU und ExoY, nehmen modulierend Einfluss auf die Organisation des Zytoskelettes der Wirtszelle sowie deren Signaltransduktion. Die meisten Pseudomonadenstämme tragen die Gene für ExoT und ExoY, wohingegen sich die Präsenz von ExoS und ExoU gegenseitig auszuschließen scheint. Über Gründe hierfür kann bislang nur spekuliert werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass eine gleichzeitige Expression der beiden Proteine ver-

zichtbar ist, da sie sehr ähnliche Funktionen erfüllen (Lee *et al.*, 2005; Feltman *et al.*, 2001).

ExoU ist ein potentes Zytotoxin, welches in vielen verschiedenen Zelltypen rasch apoptotisch wirkt und als Phospholipase agiert (Finck-Barbançon *et al.*, 1997; Rabin und Hauser, 2005; Sato und Frank, 2004). ExoS ist ein bifunktionales Zytotoxin (Barbieri, 2000). Das N-terminale Ende hat GTPase aktivierende Proteinaktivität (GAP) zur Modulation von Rho-GTPasen wie RhoA, Rac1 und Cdc42 und beeinflusst dadurch das Zytoskelett des Wirtes. Das C-terminale Ende ist eine 14-3-3-abhängige ADP-Ribosyltransferase und für die Zytotoxizität von ExoS verantwortlich (Krall *et al.*, 2002; Hendriksson *et al.*, 2002).

Man könnte also annehmen, dass durch die Modulation von Rho-GTPasen durch ExoS bei Pseudomonaden ebenso wie durch YopT bei *Yersinia* eine Hemmung der CYR61/CTGF mRNA-Expression herbeigeführt werden kann. Dennoch ist es nicht gänzlich überraschend, dass trotz ExoS-Expression der in dieser Arbeit verwendete *P. aeruginosa* ATCC Stamm zu einer CYR61/CTGF mRNA-Expression führt. Die GAP-Domäne von ExoS weist nämlich große Homologie zu der Proteindomäne von YopE von *Yersinia* auf, welche zwar auch Rho-GTPasen als GAP moduliert, nicht aber die CYR61/CTGF mRNA-Expression inhibiert (Krall *et al.*, 2003; diese Arbeit).

Da sich die Präsenz von ExoS und ExoU in ein und demselben Pseudomonadenstamm gegenseitig auszuschließen scheint (Feltman *et al.*, 2001), wurden in der Arbeitsgruppe weiterführende Analysen mit ExoU-exprimierenden Stämmen durchgeführt. Sowohl durch die verwendeten ExoS-positiven Stämme (ATCC, PAO1), als auch durch den ExoU-positiven Stamm (PA103), konnte eine Induktion der CYR61/CTGF mRNA auf gleichem Niveau erreicht werden (Wiedmaier *et al.*, 2007). ExoS und ExoU scheinen also keinen Einfluss auf die CYR61/CTGF Expression zu haben.

Mit dem spezifischem Inhibitor für LPA-Rezeptoren Ki16425 konnte die durch *P. aeruginosa* erreichte CYR61 mRNA-Expression zwar signifikant gehemmt werden, die resultierende CYR61 mRNA-Menge lag aber im Vergleich zu unbehandelten Zellen mit achtfacher Erhöhung noch immer deutlich über der durchschnittlich in allen Experimenten erreichten CYR61 mRNA-Induktion. Dies ist

ein Hinweis dafür, dass bei *P. aeruginosa* zusätzliche bakterielle Faktoren oder Mechanismen existieren, welche die CYR61 mRNA-Expression verstärken können.

#### **4.2.2 Induktion von CYR61/CTGF in Epithelzellen durch *Staphylokokkus aureus***

*Staphylokokkus aureus* induziert sowohl als Bakterienstamm als auch über dessen Bakterienüberstände in Epithelzellen die CYR61/CTGF mRNA-Expression.

Manche *S. aureus* Stämme produzieren Exotoxine der Gattung epidermaler Zelldifferenzierungs-Inhibitoren (EDIN, C3stau). Diese ADP-ribosylieren Rho-GTPasen wie RhoA, -B oder -C, was zu deren Inaktivierung führt (Sugai *et al.*, 1990; Wilde *et al.*, 2001). Diese Inaktivierung könnte entsprechend der Wirkung von YopT von *Y. enterocolitica* mit einer Suppression der CYR61/CTGF mRNA-Expression einhergehen. Damit würden nur EDIN-negative *S. aureus* Stämme zu einer CYR61/CTGF mRNA-Expression führen. Der in dieser Arbeit verwendete *S. aureus* ATCC Stamm ist EDIN-negativ, was diese Vermutung primär erst einmal bestätigt.

In darüber hinaus durchgeführten Experimenten mit verschiedenen *S. aureus* Mutanten zeigt die Arbeitsgruppe allerdings, dass ein ausschließlich EDIN-B produzierender Stamm in ähnlicher Menge die CYR61/CTGF mRNA-Expression induziert wie ein EDIN-negativer Stamm (Wiedmaier *et al.*, 2008). Das ist insofern aber nicht verwunderlich, da EDIN keine spezifischen Rezeptorbindungsdomänen oder Translokationseinheiten besitzt, die das Eindringen in Zielzellen ermöglichen, um an den Wirkungsort zu gelangen. Die Toxine erreichen ihr Ziel allerdings nach längerer Zeit auch ohne Translokation, da sie nach Invasion von *S. aureus* in eukaryotische Zellen dort freigesetzt werden. Im Zytoplasma der Wirtszellen können sie frühestens drei Stunden nach erfolgter Infektion detektiert werden (Molinari *et al.*, 2006). Diese Zeitspanne könnte zu lang sein, um durch EDIN die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression über Modulation von Rho-GTPasen zu beeinflussen, da die CYR61/CTGF

mRNA transient mit einem Maximum nach zwei Stunden induziert wird (diese Arbeit).

EDIN scheint also, trotz Beeinflussung von Rho-GTPasen keinen Einfluss auf die CYR61/CTGF mRNA-Expression zu haben.

#### **4.2.3 Induktion von CYR61/CTGF in Epithelzellen durch Listerien**

*Listeria monocytogenes*, ein Gram-positives, fakultativ-intrazelluläres, fakultativ-anaerobes Stäbchenbakterium, nimmt in der Reihe der Bakterien, die in Epithelzellen die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression auslösen, eine Sonderrolle ein, da die Induktion übermäßig stark ausfällt, und von derjenigen der anderen Bakterienarten auffallend abweicht.

Die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression nach Infektion mit *L. monocytogenes* Bakterienkulturen ist im Vergleich zur Induktion nach Inkubation mit Bakterienüberständen um ein Vielfaches höher, so dass neben der Induktion über einen sezernierten, lipophilen Signalstoff und Wirkung über LPA-Rezeptoren, noch weitere Mechanismen vorhanden sind, welche die CYR61/CTGF mRNA-Expression beeinflussen und verstärken.

In den durchgeführten Analysen mit Deletionsmutanten für verschiedene wichtige Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* zeigte sich, dass ein Listeriolysin O (LLO) defizienter Stamm, im Vergleich zum Wildtypstamm, nur zu einer geringen Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression führt. Diese geringe Induktion entsprach etwa der Höhe derjenigen Induktion, welche durch sezernierte Signalstoffe erreicht werden konnte, so dass davon ausgegangen werden kann, dass ein kleiner Teil der Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression durch *L. monocytogenes* über sezernierte, lipophile Signalstoffe und LPA-Rezeptoren vermittelt wird, für den Großteil allerdings Listeriolysin O verantwortlich ist.

Listerien haben die Fähigkeit, über zwei verschiedene Mechanismen in Wirtszellen eindringen, dort der Zersetzung durch Phagolysosomen zu entgehen und im Zytosol der Wirtszelle zu replizieren (Drevets *et al.*, 1995): Die direkte Invasion, hauptsächlich vermittelt über den Virulenzfaktor Internalin, sowie die indi-

rekte Invasion über eine primäre Infektion von Phagozyten und sekundäre Aufnahme der infizierten Phagozyten in die Wirtszelle (Drevets *et al.*, 1995). Da das Fehlen des Virulenzfaktors Internalin keinen negativen Effekt auf die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression hatte, lässt sich der Schluss ziehen, dass die internalinvermittelte Internalisierung der Listerien nicht die Voraussetzung für die starke CYR61/CTGF mRNA-Expression darstellt.

Eine wichtige Eigenschaft von *L. monocytogenes* ist die Fähigkeit, systemische Infektionen, wie etwa den Befall des zentralen Nervensystems oder der Plazenta auszulösen (Gray und Killinger, 1966). Neben Internalin ist hier Listeriolysin O mit von Bedeutung, ein porenbildendes Hämolyisin, welches die Fähigkeit besitzt Membranbarrieren aufzubrechen. Eine ähnlich wichtige Funktion von LLO stellt die Induktion von Signaltransduktionswegen in Wirtszellen dar. Diese Vorgänge modulieren unter anderem die Aufnahme der Bakterien, sowie die Zytokin- und Chemokinexpression (Kayal und Charbit, 2006).

Listeriolysin O aktiviert *mitogen-activated protein* (MAP) -Kinasen in Eukaryoten, welche an der Regulation der Zytokinexpression und der Organisation des Zytoskelettes beteiligt sind (Tang *et al.*, 1996). Auch die CYR61/CTGF mRNA-Expression wird unter anderem über eine p38 MAP-Kinase reguliert (Chowdhury und Chaqour, 2004). Daraus folgt, dass LLO über eine Aktivierung von MAP-Kinasen die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression bewirken könnte. Interessant ist auch, dass die Aktivierung der MAP-Kinasen durch LLO unabhängig von der Invasion der Bakterien ist (Tang *et al.*, 1996). Dies ist konform mit der eigenen Beobachtung, dass Internalin keinen negativen Effekt auf die CYR61/CTGF mRNA-Induktion hat; die Bakterien für diese Expression also nicht in die Wirtszelle aufgenommen werden müssen. Des Weiteren führt LLO über eine Aktivierung von Rho-GTPasen wie Rac1 und des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B unabhängig von einer Internalisierung der Listerien zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen wie IL-8 oder MCP-1 in der Wirtszelle (Schmeck *et al.*, 2006, Kayal *et al.*, 1999). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der LLO-abhängigen Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression, da bekannt ist, dass sowohl Rho-GTPasen, als auch NF- $\kappa$ B eine Rolle bei der Regulation der CYR61 und CTGF Expression spielen (Han *et*

*al.*, 2003; Chowdhury und Chaqour, 2004; Chaqour und Goppelt-Struebe, 2006; Lin *et al.*, 2004). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B oder MAP-Kinasen durch LLO könnte also ein potentieller Mechanismus sein, mittels dessen CYR61/CTGF durch LLO induziert werden könnten.

Die starke Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression durch *L. monozytogenes* scheint also im Wesentlichen auf die Wirkung von LLO auf die Wirtszelle zurückzuführen zu sein, und nur zu einem geringen Maße durch die Freisetzung lipophiler Mediatoren bedingt, welche an LPA-Rezeptoren der Wirtszelloberfläche binden.

Wir konnten mit unserer Arbeit zeigen, dass die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression eine generelle Reaktion von Epithelzellen auf die Interaktion mit Bakterien ist und über LPA-Rezeptoren vermittelt werden kann. Allerdings können Bakterien nicht nur durch sezernierte, lipophile Mediatoren über LPA Rezeptoren die CYR61/CTGF mRNA-Expression induzieren, sondern auch distinkte Virulenzfaktoren, wie es hier für LLO gezeigt wurde, können diese Induktion bewirken und damit noch verstärken.

Rho-GTPasen scheinen bei der Hemmung der CYR61/CTGF mRNA-Induktion durch bakterielle Pathogenitätsfaktoren ein wichtiges Angriffsziel darzustellen. Dass deren Modulation hingegen immer mit einer Beeinflussung der CYR61/CTGF mRNA-Expression einhergeht, scheint anhand der hier aufgeführten Beispiele ExoS und ExoU von *P. aeruginosa* und EDIN von *S. aureus* aber unwahrscheinlich.

#### **4.3 Die Beeinflussung von Wirtszellfunktionen durch Bakterien**

Eukaryoten haben zahlreiche Erkennungsmuster entwickelt, um eine Infektion und Invasion durch Bakterien wahrzunehmen, und dieser durch das eigene Immunsystem entgegenzuwirken.

Weit verbreitet sind hier die membrangebundenen *Toll-like* Rezeptoren (TLR). Wenn TLRs Mikroorganismen oder Bestandteile derselben erkennen, wird über

verschiedene Signalwege das Genexpressionsmuster der Wirtszelle so verändert, dass eine Immunantwort gegen das Pathogen generiert wird (Takeda *et al.*, 2005). Neuerdings wurde auch eine Gruppe von zytosolischen Proteinen, sogenannte NODs (benannt nach der N-terminalen Effektor Domäne, eine nukleotid-bindende oligomerisierende Domäne), beschrieben, welche als empfindliche Sensoren im Zytosol von Epithelzellen Bakterien erkennen können, die den *Toll-like* Rezeptoren an der Epithelzelloberfläche zuvor entgangen sind. Diese Erkennungsmechanismen spielen vor allem im Intestinaltrakt eine wichtige Rolle, denn die Generierung einer Immunantwort gegen die natürliche Darmflora muss unbedingt vermieden werden, um die physiologische Darmfunktion zu gewährleisten. Vor allem NOD1 wird in intestinalen Epithelzellen exprimiert und fungiert hier als Sensor für enteroinvasive Bakterien wie Yersinien, Listerien oder Salmonellen (Chamaillard *et al.*, 2004).

Können Bakterien, etwa mittels Toxinen, die Reaktion der Wirtszelle in ihrem eigenen Sinne modulieren, ist die Immunantwort des Wirtes fehlerhaft. Dies ermöglicht den Pathogenen die Epithelbarriere des Wirtes zu überwinden und eine Infektion im Organismus auszulösen (Karin *et al.*, 2006).

Bislang sind verschiedene Mechanismen bekannt, mittels derer Bakterien Wirtszellfunktionen modifizieren können, um sich Zutritt zu Wirtszellen zu verschaffen. Viele enteroinvasive Bakterien wie Yersinien oder Listerien nutzen die M-Zellen des Darmes um in den Wirt einzudringen. Invasin, ein wichtiger Virulenzfaktor der *Yersinia* Spezies, bindet z.B. an  $\beta$ 1-Integrine an der Zelloberfläche von M-Zellen, erreicht so die Invasion der Bakterien in die Zellen und damit auch in das verbundene lymphatische System (Palumbo *et al.*, 2006). Interaktion ist auch über Syndecane, Heparan-Sulfat oder Proteoglycane, welche vor allem auf Epithelzelloberflächen exprimiert werden, möglich. Es konnte gezeigt werden, dass einige Staphylokokken- und Streptokokkenspezies wie *Staphylokokkus aureus* oder *Streptokokkus pyogenes* durch Interaktion mit Syndecanen von Darmepithelzellen in die Zellen eindringen und damit schwere systemische Infektionen bei Risikopatienten, wie beispielsweise Immunsupprimierten, auslösen können (Henry-Stanley *et al.*, 2005). Außerdem können Bakterien Transportsysteme des Wirtes so manipulieren, dass Toxine oder andere bakterielle Produkte in die Wirtszelle eingeschleust werden und dort

Produkte in die Wirtszelle eingeschleust werden und dort Wirtszellfunktionen direkt verändern (Just *et al.*, 1995).

Mit dieser Arbeit konnte ein weiterer Mechanismus aufgezeigt werden, mittels dessen Bakterien Einfluss auf Wirtszellfunktionen nehmen können. So scheinen LPA-Rezeptoren an Epithelzelloberflächen an der Erkennung von Bakterien oder Bestandteile derselben beteiligt zu sein. Diese Rezeptoren erkennen bakterielle Signalstoffe, welche funktionell und/oder strukturell ähnlich, oder sogar identisch mit bioaktiven, lipophilen Signalstoffen sind, welche auch endogen in Wirtszellen existieren. Durch die Rezeptorbindung wird reaktiv eine Wirtszellantwort ausgelöst, wie die in dieser Ausarbeitung dargestellte Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression.

Bislang ist allerdings unklar, ob diese spezifische Ligand-Rezeptor-Bindung mit Koppelung eines von den Bakterien sezernierten Mediators an LPA-Rezeptoren der Wirtszelloberfläche von Epithelzellen und konsekutiver Induktion der CYR61/CTGF mRNA von den Bakterien absichtlich generiert wird, weil es sich günstig auf ihr Überleben im Wirt auswirkt, um eine in ihrem Sinne erfolgreiche Infektion und Invasion zu bewirken. Ebenso könnte nämlich dieser sezernierte Signalstoff als regulärer Bestandteil von Bakterien ein potentielles Erkennungszeichen sein, und den Epithelzellen dazu dienen, die Anwesenheit von Bakterien zu detektieren, um entsprechend die Erzeugung einer Immunantwort einzuleiten.

Möglicherweise ist die LPA-Rezeptor-abhängige CYR61/CTGF mRNA-Induktion durch Bakterien auch ein reines Zufallsgeschehen, denn auch endogen in der Wirtszelle vorhandenes LPA kann Wachstumsfaktoren wie CYR61 und CTGF induzieren (Moolenaar, 1995; Muehlich *et al.*, 2004). Die Induktion durch bakterielle, lipophile Mediatoren würde also zufällig denselben Mechanismus auslösen, was sich entweder für den Wirt oder für das Bakterium als günstig erweist.

Dass die Expression von CYR61 und CTGF bei Infektionsprozessen für Wirt oder Bakterium von Relevanz sein kann, wurde erst kürzlich gezeigt. So findet man nach einer oralen *Yersinia enterocolitica* Infektion eine erhöhte CTGF

mRNA-Expression in mesenterialen Lymphknoten (Handley *et al.*, 2006). Es ist bekannt, dass Yersinien über eine Aufnahme aus dem Darm durch die M-Zellen der Peyerschen Plaques Lymphknoten befallen können und dadurch Infektionen auslösen (Autenrieth und Firsching, 1996; Carter, 1975). Ob nun allerdings diese induzierte CYR61/CTGF Überexpression zur Generierung einer erfolgreichen Immunantwort des Wirtes oder zur Etablierung einer Infektion im Sinne der Pathogene notwendig ist, bedarf weiterer Erforschung.

#### **4.4 Die biologische und physiologische Bedeutung der Induktion von CYR61/CTGF durch Bakterien**

Wir konnten mit dieser Arbeit darstellen, dass durch Bakterien in Epithelzellen die CYR61 und CTGF mRNA-Expression induziert wird.

Welche biologische und physiologische Bedeutung hat nun diese durch Bakterien ausgelöste Induktion? Hierzu gibt es bislang noch keine konkreten Untersuchungen, so dass über die Bedeutung nur spekuliert werden kann.

##### **4.4.1 Induktion der CYR61/CTGF Expression als „Stressreaktion“**

Zellen, insbesondere Epithelzellen, sind dauerhaft mechanischen Kräften wie Kompressions-, Scher- oder Zugkräften ausgesetzt, wodurch es über mechanische Veränderungen der Zellmembran zu Änderungen im Zytoskelett der Zellen kommt, was wiederum die Zellphysiologie beeinflusst. Um trotzdem die normale Zell- und Organfunktion nicht zu gefährden, werden bei Einfluss von mechanischen Kräften in den Zellen Faktoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Hormone verstärkt exprimiert, welche die Zellfunktionen sicherstellen sollen. Hierzu gehören CYR61 und CTGF, diese werden in Zusammenhang mit physikalischem oder auch chemischem Stress zur Adaptation transient sehr stark induziert (Chaqour und Goppelt-Struebe, 2006; Ott *et al.*, 2003).

Bei vielen Gewebspathologien spielen mechanische Kräfte, beziehungsweise mechanischer Zellstress, für die Pathophysiologie eine entscheidene Rolle, so etwa bei der Entstehung von arteriosklerotisch bedingten Gefäßerkrankungen

(Oemar *et al.*, 1997), bei fibrotischem Umbau von Gewebe, wie etwa der Lunge, des Pankreas oder der Niere (Lasky *et al.*, 1998; di Mola *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 1998) oder bei der Wundheilung (Igarashi *et al.*, 1993). Hier konnte überall eine Induktion der CYR61/CTGF Expression nachgewiesen werden. Es wurde publiziert, dass eine Störung der Zellarchitektur durch Zerstörung von Microtubuli mittels Nocodazol und Cholchizin eine RhoA-abhängige Steigerung der CTGF Expression bewirkt (Heusinger-Ribeiro *et al.*, 2001). CTGF gehört zu den am stärksten induzierten Genen nach Exposition von Zellen gegenüber mechanischem Stress (Schild und Trueb, 2002).

CYR61 und CTGF scheinen also bei jeglichem Zellstress, sei es von extern oder intern ausgehend, physikalisch oder chemisch bedingt, verstärkt induziert zu werden. Da auch die Interaktion von Zellen mit Bakterien als Stress für die Zellen gedeutet werden kann, könnte die Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression auch hier als Adaptationsmechanismus zur Sicherstellung der normalen Zellfunktion zu verstehen sein.

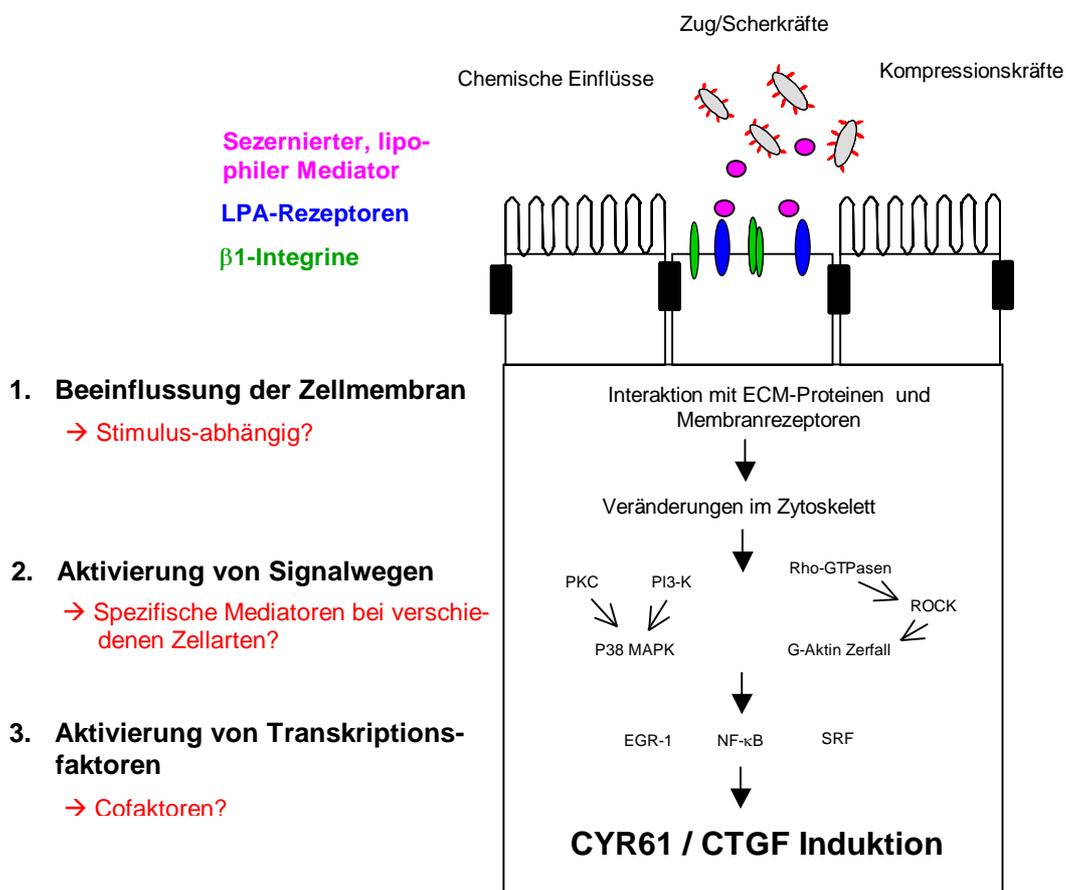
Wie erfolgt nun aber die Übersetzung von mechanischem Stress in die Induktion der CYR61/CTGF Expression? - Der Einfluss von „Stressfaktoren“ führt zu mechanischen Veränderungen der Zellmembran der Wirtszelle. Hauptsensoren für diese Veränderungen an der Zellmembran sind Integrine, welche extrazelluläre Matrixproteine (ECM) mit intrazellulären Signalwegen verbinden (Katz *et al.*, 2000). Integrine sind über Adaptermoleküle mit dem Zytoskelett verbunden, so dass Veränderungen der Zellmembran konsekutiv zu einer Störung der Architektur des Zytoskelettes führen (Chaqour und Goepfert-Strube, 2006). Im Falle von Bakterien scheinen jedoch nicht Integrine, sondern LPA-Rezeptoren, welche über sezernierte, lipophile Mediatoren aktiviert werden, die Sensoren an der Zellmembran zu sein. Bislang ist allerdings ungeklärt, ob die Beeinflussung der Wirtszelle durch Bakterien, welche zur CYR61/CTGF Expression führt, generell auf diesem Wege erfolgt, oder ob es weitere bakterielle Signalmoleküle gibt, welche über einen anderen Regulationsweg und andere Sensoren, eventuell auch über Integrine, dasselbe bewirken können.

An der intrazellulären Übersetzung der „Stressreaktion“ in die CYR61/CTGF Expression sind vor allem Rho-GTPasen, hierbei vor allem RhoA, beteiligt, wel-

ches über Aktivierung einer RhoA-assoziierten Kinase (ROCK) zu einem Umbau von globulären G-Aktin Fasern des Zytoskeletts in filamentöse F-Aktin Faserketten führt (Riento und Ridley, 2003). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Inaktivierung von ROCK, als auch eine artifizielle Störung des G-/F-Aktin Gleichgewichtes hin zu F-Aktin, die Überexpression von CTGF eindämmt (Chaqour und Goppelt-Struebe, 2006; Ott *et al.*, 2003). Der Abbau von G-Aktin und die damit verbundenen Veränderungen im Zytoskelett können Transkriptionsfaktoren wie *early growth response factor 1* (EGR-1), NF- $\kappa$ B oder *serum response factor* (SRF) aktivieren, was konsekutiv zu einer Induktion der CYR61 und CTGF mRNA-Expression führt (Chaqour und Goppelt-Struebe, 2006). Ein weiteres Effektorsystem, welches entsprechende Transkriptionsfaktoren stimuliert, ist die Aktivierung der p38 MAP-Kinase über eine Protein Kinase C (PKC) und eine Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-K) (Han *et al.*, 2003). Unklar ist bislang, ob bei verschiedenen Zellarten intrazellulär jeweils spezifische Mediatoren und Signalwege aktiviert werden, welche die CYR61/CTGF Expression durch Einfluss von mechanischem Stress induzieren, oder ob es einen allgemein gültigen Signalweg gibt. Des Weiteren sind bisher keine Cofaktoren definiert, welche regulatorisch auf die Transkription oder auf beteiligte Signalmoleküle einwirken.

Das vorliegende Modell zur Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression durch „Stressfaktoren“, wie in Abbildung 24 dargestellt (modifiziert nach Chaqour und Goppelt-Struebe, 2006), ist also zum jetzigen Zeitpunkt keineswegs vollständig und beinhaltet noch viele offene Fragen; eine stressassoziierte Induktion zur Aufrechterhaltung der normalen Zell- und Organfunktion scheint aber wahrscheinlich. Mechanismen zur Suppression der CYR61/CTGF mRNA-Expression, wie die YopT vermittelte Inhibition durch *Y. enterocolitica*, kann also von Vorteil für die Pathogene sein, um sich im Wirtsorganismus zu behaupten und eine Infektion auszulösen. Warum aber manche distinkte Virulenzfaktoren, wie Listeriolysin O von *L. monocytogenes*, die CYR61/CTGF mRNA-Expression noch weiter verstärken, kann anhand des vorliegenden Modelles bislang nicht plausibel erklärt werden, und es müsste Gegenstand weiterer For-

schung sein, ob diese Verstärkung eventuell auch Vorteile für die Pathogene haben könnte.



**Abb. 24: Induktion der CYR61 und CTGF Expression**

Schematisches Model zur Induktion der CYR61 und CTGF Expression durch „Stressfaktoren“ und bislang offene Fragen. Erklärung im Text (modifiziert nach Chaqour und Goppelt-Struebe, 2006).

#### 4.4.2 Tumorproliferation und Bedeutung der Induktion der CYR61/CTGF Expression durch Bakterien

CYR61 und CTGF werden in Tumorzellen verstärkt exprimiert und fördern die Tumorzellproliferation. Eine abnorme Expression konnte etwa bei Gliomen, Pankreastumoren, pädiatrischen Tumoren, sowie bei Brusttumoren dargestellt werden (Xie *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2000; Sampath *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2001).

Eine Chemotherapie, deren primäres Ziel die Apoptoseinduktion in den Tumorzellen ist, führt im Tumorgewebe zu einer Stressreaktion, welche wiederum der Grund für eine verstärkte Induktion von CYR61/CTGF sein könnte. Für Brusttumoren konnte nachgewiesen werden, dass es durch die gesteigerte CYR61/CTGF mRNA-Expression über  $\beta$ 1-Integrine und NF- $\kappa$ B vermittelt zu einer verstärkten Expression des antiapoptotischen Faktors XIAP kommt, was eine Resistenz des Tumors gegen die chemotherapeutisch induzierte Apoptose zur Folge hat (Lin *et al.*, 2004).

Auch in Ovarialkarzinomen konnten signifikant erhöhte Mengen von CYR61 und CTGF detektiert werden, was mit einem verstärkten Tumorwachstum einherging. Die Menge an CYR61 und CTGF korreliert hierbei mit dem Tumorstadium – je fortgeschrittener die Erkrankung, desto höher die CYR61/CTGF Expression. Durch die Inhibition der CYR61-Expression konnte ein vermindertes Tumorwachstum und eine höhere Apoptoserate der Tumorzellen beobachtet werden. CYR61-Überexpression verlieh den Karzinomzellen eine gesteigerte Resistenz gegen Carboplatin-induzierte Apoptose. Leider ergab sich allerdings kein statistischer Zusammenhang zwischen der CCN-Überexpression und dem Überleben der Patienten, die CYR61/CTGF Expressionsraten sind also ungeeignet, um Aussagen über das Outcome der Erkrankung machen zu können. (Gery *et al.*, 2005)

Gleichzeitig ist interessant, dass in manchen Tumorzellen LPA-Rezeptoren verstärkt exprimiert werden (Hu *et al.*, 2003). So können auch epitheliale ovarielle Neoplasmen LPA-Rezeptoren ausbilden. Es konnte gezeigt werden, dass LPA<sub>1-3</sub>-Rezeptoren in benignen und malignen ovariellen Tumoren vermehrt ausgebildet werden. Im Sinne einer malignen Transformation werden in Ovarialkarzinomen LPA<sub>2</sub>- und LPA<sub>3</sub>-Rezeptoren signifikant überexprimiert, wohingegen die Menge an LPA<sub>1</sub>-Rezeptoren zurückgeht. Diese Überexpression korreliert mit dem FIGO (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*) - Stadium der Erkrankung, somit also mit dem Tumorwachstum, der Invasion und der Metastasierung. In den niedrigeren Stadien wurden weitaus weniger LPA<sub>2</sub>- und LPA<sub>3</sub>-Rezeptoren ausgebildet als in den fortgeschritteneren Stadien III und IV. LPA stimuliert das Tumorwachstum indirekt über eine verstärkte Expression

des Wachstumsfaktors VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und direkt über Induktion von Cyclin D1, einem Schlüsselregulator der G<sub>1</sub>-Phase von Zellproliferationsprozessen. Die Menge an LPA<sub>2</sub> und LPA<sub>3</sub> könnte also als prognostischer Indikator für Patienten mit solchen Tumoren eingesetzt werden (Ping *et al.*, 2006).

Entsprechendes konnte auch für Schilddrüsenkarzinome dargestellt werden (Schulte *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2003).

Zusammenfassend deuten diese Feststellungen darauf hin, dass sowohl CYR61/CTGF, als auch LPA, beziehungsweise LPA<sub>2</sub>- und LPA<sub>3</sub>-Rezeptoren, als Mediatoren an der Entwicklung und Progression von Tumoren beteiligt sind. Inwiefern allerdings ein direkter Zusammenhang im Sinne eines gemeinsamen Signalweges besteht, ist bislang unklar. Ob die über Bakterien vermittelte, LPA-Rezeptor abhängige CYR61/CTGF Überexpression für die Entstehung und Progression von malignen Tumoren verantwortlich sein kann, ist insofern fraglich, als dass auch endogenes LPA in Tumorzellen über eine CYR61/CTGF Expression die Tumorprogression fördert. Die CYR61/CTGF Expression und konsekutiv Tumorprogression durch bakterielle lipophile Mediatoren könnte also auch ein akzidentiell Geschehen sein, welches die endogenen Vorgänge noch verstärkt.

Werden Bakterien intravenös in lebende Tiere injiziert, so reichern sie sich in soliden Tumoren und Metastasen an und replizieren dort. Dies konnte unter anderem für *Escherichia coli* und *Listeria monocytogenes* gezeigt werden (Yu *et al.*, 2004). Man kann also spekulieren, dass es durch Anreicherung von Bakterien in einem Tumor oder in einzelnen Tumorzellen, über eine gesteigerte Expression von CYR61/CTGF, zu einer verstärkten Proliferation der Tumorzellen und zu einer ausgeprägten Resistenz gegen chemotherapeutisch oder anderweitig induzierte Apoptose kommt. Potentiell könnten Bakterien somit die Tumorentstehung und -proliferation fördern und Resistenzen gegenüber einer Chemotherapie begünstigen. Ein bekanntes Beispiel für einen bakterienassoziiert entstehenden Tumor ist das *Helicobacter pylori* assoziierte Magenkarzinom; eine frühzeitige medikamentöse Eradikation des Erregers verhindert hier die Karzinomentstehung fast immer (Romano *et al.*, 2006).

Ob auch andere Tumorerkrankungen Bakterien assoziiert entstehen oder proliferieren können ist höchst hypothetisch, könnte aber bei Bewahrheitung ein großes therapeutisches Potential für die Antitumorthherapie darstellen. Durch antibiotische Eradikation der verantwortlichen Bakterien, oder direkter pharmakologischer Beeinflussung der konsekutiv entstehenden CYR61/CTGF Überexpression könnte das Wachstum von Tumoren eingeschränkt, und deren Ausbreitung eingedämmt werden, was sich positiv auf das Überleben der Betroffenen auswirken würde. Dies ist allerdings überaus spekulativ und müsste die Forschung wohl noch einige Jahre beschäftigen.

#### **4.5 Schlussfolgerung und Ausblick**

In Wirtszellen werden nach Interaktion mit Bakterien verschiedenste Gene induziert, um die proinflammatorische Wirtsantwort zu generieren. Die hierbei aktivierten Signalwege können durch Bakterien in vielfältiger Weise beeinflusst werden, um der Immunabwehr des Wirtes zu entgehen und eine Infektion zu etablieren.

Mit dieser Arbeit wird erstmalig die Induktion von CYR61 und CTGF in Epithelzellen als Wirtszellantwort auf die Interaktion mit Bakterien beschrieben. *Yersinia enterocolitica* und andere Gram-positive und Gram-negative Bakterien sezernieren einen bioaktiven, lipophilen Signalstoff, welcher in Epithelzellen, über LPA-Rezeptoren vermittelt, diese Induktion auslöst. Ob es sich bei diesem Mediator jedoch um ein Phospholipid, respektive eventuell um LPA handelt, bleibt bei Abschluss der Arbeit Spekulation und bedarf weiterer Erforschung.

Neben der Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression durch sezernierte, lipophile Botenstoffe scheint diese Wirtsantwort auch durch distinkte Virulenzfaktoren ausgelöst werden zu können, was beispielhaft anhand des Virulenzfaktors Listeriolysin O von *L. monocytogenes* gezeigt werden konnte.

Rho-GTPasen des Wirtes sind zentrale Modulatoren des Zytoskelettes von Eukaryoten, und stellen daher oft Angriffspunkte für bakterielle Virulenzfaktoren, wie etwa ExoS von *P. aeruginosa*, EDIN von *S. aureus*, YopT und YopE von *Y.*

*enterocolitica* oder Toxin B von *Clostridium difficile*, dar. Die Aktivierung solcher Rho-GTPasen spielt auch bei der Induktion der CYR61 und CTGF mRNA-Expression eine wichtige Rolle. Nicht immer geht diese Beeinflussung allerdings auch mit einer Auswirkung auf die CYR61/CTGF mRNA-Expression einher. So beeinflusst die distinkte Wirksamkeit der Rho-GTPasen bei Inhibitoren wie YopT und Toxin B die Inhibition der CYR61/CTGF mRNA-Expression, während die Rho-GTPasen bei Inhibitoren wie YopE, ExoS und EDIN B, soweit dies mit den durchgeführten Untersuchungen zu beurteilen möglich ist, keinen Effekt auf die CYR61/CTGF mRNA-Expression zu haben scheinen.

Die biologische und physiologische Bedeutung der Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression als Wirtszellantwort auf die Interaktion mit Bakterien ist bislang nur schwer zu fassen. Die herausragende Rolle der CYR61/CTGF Expression bei der Reaktion von Zellen auf mechanischen Stress und Veränderungen des Zytoskeletts lässt vermuten, dass sie eine wichtige Rolle im Erhalt der normalen Zell- oder Organfunktion spielen (Chaour und Goppelt-Struebe, 2006). Da die Interaktion von Bakterien mit Wirtszellen im allgemeinen als eine Stresssituation für die Zellen angesehen werden kann, scheint die CYR61/CTGF Expression wahrscheinlich ein Adaptionsmechanismus zu sein, um die normale Zell- und Organfunktion trotz Anwesenheit von Bakterien aufrecht zu erhalten.

CYR61 und CTGF werden in Tumorzellen verstärkt exprimiert und vermitteln dort Proliferation und Antiapoptose (Tsai *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2004). Außerdem können sich Bakterien gezielt in Tumorzellen anreichern und dort replizieren (Yu *et al.*, 2004). Da Bakterien in Epithelzellen eine CYR61/CTGF Überexpression induzieren können, ergäbe sich damit neues, interessantes Forschungspotential für die Tumorthherapie, mit der Überlegung, dass Tumore unter Umständen bakterienassoziiert durch eine CYR61/CTGF Überexpression entstehen und proliferieren könnten. Großes therapeutisches Potential für die Antitumorthherapie läge dann in der Eradikation der verantwortlichen Bakterien oder in einer direkten pharmakologischen Inhibition der CYR61/CTGF Überexpression.

Interessant ist, dass nicht nur der Kontakt von Bakterien und Wirtszelle, sondern LPA-Rezeptoren über eine konkrete Ligand-Rezeptor-Bindung als Induktoren für die CYR61/CTGF Expression ausfindig gemacht werden konnten. Es scheint allerdings beinahe unmöglich, verschiedene *in vivo* Situationen abzugrenzen, um weiteren Aufschluss darüber zu erhalten, ob die CYR61/CTGF Überexpression selektiv von den Bakterien generiert wird, weil es sich günstig auf ihr Überleben im Wirt auswirkt, oder ob diese einen wirtseigenen Adaptationsmechanismus auf die veränderte Umgebungssituation durch die Anwesenheit von Bakterien darstellt.

Mit dieser Arbeit konnte erstmalig aufgezeigt werden, dass Bakterien durch Interaktion mit Epithelzellen eine CYR61/CTGF Expression auslösen und modulieren können. Gegenstand weiterer Forschung, da durch die vorliegenden Ergebnisse nicht abschließend geklärt, müssen die genaue Definition des bakteriell sezernierten, lipophilen Signalstoffes, sowie weitere Untersuchungen zur infektionsbiologischen Bedeutung sein, um die klinische Relevanz der vorliegenden Ergebnisse zu untermauern.

## 5 Zusammenfassung

Durch die Infektion von Epithelzellen mit pathogenen *Yersinia enterocolitica* Stämmen wird die Induktion vieler verschiedener Gene ausgelöst, welche die proinflammatorische Wirtsantwort generieren. Hierunter konnten unter anderen *cysteine rich protein 61* (CYR61) und *connective tissue growth factor* (CTGF) identifiziert werden. CYR61 und CTGF sind Mitglieder der Familie der CCN-Proteine und üben pleiotrope Funktionen aus. So sind sie als sezernierte Signalstoffe etwa an der Regulation von Proliferation und Apoptose beteiligt, und spielen eine wichtige Rolle bei der Wundheilung (Brigstock, 2003).

In dieser Arbeit wurde die bislang unbekannte Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression in Epithelzellen nach Interaktion mit Bakterien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch Infektion von Epithelzellen mit attenuierten *Y. enterocolitica* Bakterien, welchen das Virulenzplasmid pYV fehlt, eine transiente CYR61/CTGF mRNA- und konsekutiv Proteinexpression induziert wird. Virulente, das pYV-Plasmid tragende Yersinien supprimieren die mRNA-Expression dieser Gene.

Die Suppression von CYR61/CTGF wird partiell durch den auf dem pYV-Plasmid kodierten Virulenzfaktor YopT vermittelt. YopT bewirkt über Modifikation von Rho-GTPasen eine Veränderung des Zytoskelettes der Wirtszelle (Iriarte und Cornelis, 1998). Eine Beteiligung von Rho-GTPasen an der Inhibition der CYR61/CTGF mRNA-Expression konnte mittels Toxin B von *Clostridium difficile*, welches Rho-GTPasen inaktiviert, bestätigt werden, da hiermit die Induktion der CYR61/CTGF mRNA signifikant gemindert werden konnte.

Weitere Untersuchungen zur Charakteristik der *Yersinia* Mediatoren, welche die CYR61/CTGF mRNA-Expression induzieren, ergaben, dass diese als Signalstoffe sezerniert werden, und in lipophilen Extrakten angereichert werden können. Mittels Inhibitorstudien mit dem spezifischen Lysophosphatidylsäure (LPA)-Rezeptor Inhibitor Ki16425 stellte sich heraus, dass die Bakterien-vermittelte Induktion von CYR61/CTGF via LPA-Rezeptoren erfolgt. Die definitive Charak-

terisierung des sezernierten Botenstoffes allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, und müsste Gegenstand weiterer Forschung sein.

Neben *Y. enterocolitica* induzieren auch verschiedene andere Gram-positive und Gram-negative Stäbchen- und Kokkenbakterien wie *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. henselae* und *L. monozytogenes*, sowie Überstände dieser Bakterienkulturen, die CYR61/CTGF mRNA-Expression, ebenfalls supprimierbar durch Ki16425. Die LPA-Rezeptor abhängige Expression von CYR61/CTGF scheint daher eine allgemeine Wirtsantwort von Epithelzellen nach Interaktion mit Bakterien zu sein.

Darüberhinaus ergaben die vorliegenden Untersuchungen, dass es neben Virulenzfaktoren wie YopT von *Y. enterocolitica* und Toxin B von *Clostridium difficile*, welche die LPA-Rezeptor vermittelte Wirtsantwort inhibieren, auch bakterielle Virulenzfaktoren gibt, welche diese zusätzlich verstärken können. So konnte Listeriolysin O, ein porenbildendes Hämolyysin von *L. monozytogenes*, als ein Virulenzfaktor identifiziert werden, welcher maßgeblich für die starke Induktion der CYR61/CTGF mRNA-Expression durch Listerien verantwortlich ist.

Über die infektionsbiologische Bedeutung der Modulation der CYR61/CTGF Expression durch Bakterien kann bislang nur spekuliert werden. Aufgrund der herausragenden Rolle der CYR61/CTGF Expression bei der Reaktion von Zellen auf Veränderungen des Zytoskelettes und mechanischem Zellstress, wie etwa bei der Wundheilung (Schild und Trueb, 2002), könnte die Induktion dieser Gene durch die Interaktion mit Bakterien, welche man potentiell als Stresssituation für die Wirtszelle auffassen kann, eine protektive Adaptation der Wirtszellen darstellen, um die physiologischen Zellfunktionen sicherzustellen. Zur endgültigen Klärung sind allerdings weiterer Analysen notwendig.

Mit dieser Arbeit ließ sich, auch wenn die biologische Bedeutung bislang nur schwer fassbar ist, erstmalig darstellen, dass durch Interaktion von Bakterien mit Epithelzellen, über eine Freisetzung bakterieller, lipophiler Signalstoffe und vermittelt über LPA-Rezeptoren, die CYR61/CTGF Expression induziert wird und dadurch Wirtszellfunktionen beeinflusst werden.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
Abb	Abbildung
<i>a. bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i> , zweifach destilliertes Wasser
<i>a. dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> , einfach destilliertes Wasser
ADP	Adenosin-5`-Diphosphat
AG	Arbeitsgruppe
Ail	Adhäsions und Invasions Lokus
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5`-Triphosphat
B	<i>Bartonella</i>
BA	Bisacrylamid
BHI	<i>Brain heart infusion</i> , Hirn-Herz Medium
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw	Beziehungsweise
C	Carboxyl
ca	Circa
CCN	<u>C</u> YR61, <u>C</u> TGF und <u>N</u> OV
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i>
Cm <sup>R</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
Ct	<i>Threshold cycle</i>
CT	Cystein-reiche Domäne
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
CYR61	<i>Cysteine rich 61</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidin-5`-Triphosphat
dUTP	Desoxy-Uracil-5`-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterokokkus faecalis</i>
ECL	<i>Enhanced chemo luminescence</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDG	<i>Endothelial differentiation gene</i>
EDIN	Epidermale Zelldifferentierungs-Inhibitoren
EDTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-Tetraacetat)
EGR	<i>Early growth response</i>

ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
Exo	Exotoxin
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FACS	<i>Flourescence activated cell sorter</i>
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
FL	Fluoreszenz
FSC	<i>Forward scatter</i>
g	Erdbeschleunigung
G6PD	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
G-Aktin	Globuläres Aktin
GAP	Guanointriphosphatase aktivierendes Protein
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GEF	<i>Guanin nucleotide exchange factor</i>
GILZ	<i>Glucocorticoid induced leucine zipper</i>
Gln	Glutamin
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
HeLa-Zellen	Epithelzelllinie eines Zervixkarzinoms, benannt nach der Patientin <u>H</u> enrietta <u>L</u> acks
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
hly	Listeriolysin
HPI	<i>High pathogenity island</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
HSPG	Heparansulfatproteoglykane
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor</i> –bindende Domäne
IKK	Inhibitor kappa B Kinase
IL	Interleukin
inl	Internalin
Inv	Invasin
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
Ki 16425	3-(4-(4-((1-(2-Chlorophenyl)ethoxy)carbonylamino)-3-methyl-5-isoazolyl)benzylthio)propan-Säure
L	<i>Listeria</i>
Las	Elastase
LB	Luria-Bertani (Medium)
LcrV	<i>Low-Calcium-Response V</i>
LLO	Listeriolysin O

---

LPA	Lysophosphatidylsäure
MALT	<i>Mucosa associated lymphoid tissue</i>
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
MCP	<i>Macrophage chemoattractant protein</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMP	Matrixmetalloprotease
MOI	<i>Mode of infection</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
Myf	Mukoider <i>Yersinia</i> Faktor
M-Zelle	<i>Microfold</i> Zelle
N	Stickstoff
Nal <sup>R</sup>	Nalidixin-Resistenz
NF	<i>Nuclear factor</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NOD	Nukleotid-bindende oligomerisierende Domäne
NOV	<i>Nephroblastoma-overexpressed gene</i>
OD	Optische Dichte
P	<i>Pseudomonas</i>
p.a.	<i>Pro analysis</i> , chemischer Reinheitsgrad
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	<i>Plasminogen activating inhibitor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBSF	PBS und FKS
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PI3-K	Phosphatidyl Inositol 3-Kinase
PKC	Protein Kinase C
plc	Phospholipase C
PMN	Polymorphonukleare Neutrophile
PNPP	P-Nitrophenyl-Phosphat Dinatrium
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenflourid
pYV	<i>Plasmid Yersinia Virulence</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROCK	RhoA-assoziierte Kinase
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion
S	<i>Staphylokokkus</i>
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SDS	<i>Sodium-dodecylsulfate</i>
sn	<i>Supernatant</i> , Überstand

SodA	Superoxid Dismutase A
SPF	<i>Specific pathogene free</i>
SRF	<i>Serum response factor</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
Syc	<i>Specific Yop chaperone</i>
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TcdB	<i>Clostridium difficile</i> Toxin B
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSP	Thrombospondin
TTSS	<i>Type three secretion system</i>
UDG	Uracil-DNA-Glykosylase
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
v/v	Volumen pro Volumen
VWC	Von Willebrand Typ C Domäne
WB	Westernblot
WISP	<i>WNT (Wingless int1)-induced secreted protein</i>
w/v	Gewicht pro Volumen
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>
Y	<i>Yersinia</i>
YadA	<i>Yersinia</i> Adhäsion A
Yop	<i>Yersinia</i> Outer Protein
YpkA	<i>Yersinia</i> Proteinkinase A
Ysc	<i>Yersinia</i> secretion
Yst	<i>Yersinia</i> stabiles Toxin
z.B.	Zum Beispiel

### Einheiten und Größenordnungen

Å	Angström ( $10^{-10}$ m)	m	Milli
A	Ampere	mm	Millimeter
bp	Basenpaare	μ	Mikro
°C	Grad Celsius	M	Mol/l <sup>-1</sup> , molar
cm	Zentimeter	min	Minuten
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter	nm	Nanometer
g	Gram	rpm	<i>Rounds per min</i>
h	Stunde	s	Sekunden
kb	Basenpaare x 1000	U	<i>Units</i>
kDa	Kilodalton		
l	Liter		

## 7 Literaturverzeichnis

**Achtman, M.; Zurth, K.; Morelli, G.; Torrea, G.; Guiyoule, A.; and Carniel, E. (1999).** *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14043-14048.

**Ahvonen, P. and Dickhoff, K. (1974).** Uveitis, episcleritis and conjunctivitis associated with *Yersinia* infection. *Acta Ophthalmol Suppl Copenh* 123: 209-212.

**Ahvonen, P.; Sievers, K. and Aho, K. (1969).** Arthritis associated with *Yersinia enterocolitica* infection. *Acta Rheumatol Scand* 15: 232-253.

**Aktories, K.; Schmidt, G. and Just, I. (2000).** Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol Chem* 381: 421-426.

**Aleksic, S. and Bockemuhl, J. (1990).** Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen. *Immun Infekt* 18(6): 178-185.

**Allaoui, A.; Schulte, R. and Cornelis, G.R. (1995).** Mutational analysis of the *Yersinia enterocolitica* virC operon: characterization of yscE, F, G, I, J, K required for Yop secretion and yscH encoding YopR. *Mol Microbiol* 18(2):343-355.

**Anliker, B. and Chun, J. (2004).** Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 279(20): 20555-20558.

**Appelbaum, J.S.; Wilding, G. and Morse, L.J. (1983).** *Yersinia enterocolitica* endocarditis. *Arch Intern Med* 143(11):2150-1.

**Arencibia, I.; Suarez, N.C.; Wolf-Watz, H. and Sundqvist, K.G. (1997).** *Yersinia* invasin, a bacterial beta1-integrin ligand, is a potent inducer of lymphocyte motility and migration to collagen type IV and fibronectin. *J Immunol* 159: 1853-1859.

**Arnold, R.; Scheffer, J.; Konig, B. and Konig, W. (1993).** Effects of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* on cytokine gene expression and release from human polymorphonuclear granulocytes and epithelial (HEp-2) cells. *Infect Immun* 61: 2545-2552.

**Autenrieth, I.B.; Bohn, E.; Ewald, J.H. and Heesemann, J. (1995).** Deferoxamine B but not deferoxamine G1 inhibits cytokine production in murine bone marrow macrophages. *J Infect Dis.* 172: 490-496.

**Autenrieth, I.B. and Firsching, R. (1996).** Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J Med Microbiol* 44: 285-294.

**Autenrieth, I.B.; Hantschmann, P.; Heymer, B. and Heesemann, J. (1993).** Immunohistological characterization of the cellular immune response against *Yersinia enterocolitica* in mice: evidence for the involvement of T lymphocytes. *Immunobiol* 187: 1-16.

**Autenrieth, I.B.; Kempf, V.; Sprinz, T.; Preger, S. and Schnell, A. (1996).** Defence mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against *Yersinia enterocolitica* involve integrins and cytokines. *Infect Immun* 64: 1357-1368.

**Autenrieth, I.B.; Reissbrodt, R.; Saken, E.; Berner, R.; Vogel, U.; Rabsch, W. and Heesemann, J. (1994).** Desferrioxamine-promoted virulence of *Yersinia enterocolitica* in mice depends on both desferrioxamine type and mouse strain. *J Infect Dis* 169: 562-567.

**Barbieri, J.T. (2000).** *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S, a bifunctional type-III secreted cytotoxin. *Int J Med Microbiol* 290: 381-387.

**Bartholin, L.; Wessner, L.L.; Chirgwin, J.M. and Guise, T.A. (2006).** The human Cyr61 gene is a transcriptional target of transforming growth factor beta in cancer cells. *Cancer Lett* 246: 230-236.

**Barz, C.; Abahji, T.N.; Trulzsch, K. and Heesemann, J. (2000).** The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett* 482: 139-143.

**Beeching, N.J.; Hart, H.H.; Synek, B.J. and Bremner, D.A. (1985).** A patient with hemosiderosis and multiple liver abscesses due to *Yersinia enterocolitica*. *Pathology* 17(3):530-532.

**Birtalan, S. and Ghosh, P. (2001).** Structure of the *Yersinia* type III secretory system chaperone SycE. *Nat Struct Biol* 8(11):974-978.

**Bishop, A.L. and Hall, A. (2000).** Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348:241-255.

**Black, D.S. and Bliska, J.B. (1997).** Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO J* 16: 2730-2744.

**Black, D.S. and 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.

**Bliska, J.B. and Black, D.S. (1995).** Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. *Infect Immun* 63.2: 681-85.

**Bliska, J.B. and Falkow, S. (1992).** Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3561-3565.

**Bohn, E.; Müller, S.; Lauber, J.; Geffers, R.; Speer, N.; Spieth, C.; Krejci, J.; Manncke, B.; Buer, J.; Zell, A. and Authenrieth, I.B. (2004).** Gene expression patterns of epithelial cells modulated by pathogenicity factors of *Yersinia enterocolitica*. *Cell Microbiol* 6(2): 129-141.

**Boland, A. and Cornelis, G.R. (1998).** Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. *Infect Immun* 66: 1878-84.

**Bork, P. (1993).** The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett* 327(2):125-30.

**Bornstein, P. (2001).** Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest* 107: 929-934.

**Bottone, E.J. (1997).** *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev* 10: 257-276.

**Bouza, E.; Dominguez, A.; Meseguer, M.; Buzon, L.; Boixeda, D.; Revillo, M.J.; de Rafael, L. and Martinez Beltran, J. (1980).** *Yersinia enterocolitica* Septicemia. *Am J Clin Pathol* 74: 404-409.

**Boyd, A.P.; Grosdent, N.; Totemeyer, S.; Geuijen, C.; Bleves, S.; Iriarte, M.; Lambermont, I.; Octave, J.N. and Cornelis, G.R. (2000):** *Yersinia enterocolitica* can deliver Yop proteins into a wide range of cell types: development of a delivery system for heterologous proteins. *Eur J Cell Biol* 79(10):659-671.

**Bradford, W.D.; Noce, P.S. and Gutman, L.T. (1974).** Pathologic features of enteric infection with *Yersinia enterocolitica*. *Arch Pathol* 98(1): 17-22.

**Braun, L. and Cossart, P. (2000).** Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. *Microbes Infect* 2(7): 803-811.

**Brenner, D.J. (1979).** Speciation in *Yersinia*. *Contrib. Microbiol. Immunol* 5: 33-43.

**Brett, S.J.; Mazurov, A.V.; Charles, I.G. and Tite, J.P. (1993).** The invasin protein of *Yersinia* spp. provides co-stimulatory activity to human T cells through interaction with beta 1 integrins. *Eur J Immunol* 23: 1608-1614.

**Brigstock, D.R. (1999).** The connective tissue growth factor / cysteine-rich 61 / nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr Rev* 20: 189-206.

**Brigstock, D.R. (2003).** The CCN family: a new stimulus package. *J Endocrinol* 178(2): 169-175.

**Brigstock, D.R.; Steffen, C.L.; Kim, G.Y.; Vegunta, R.K.; Diehl, J.R. and Harding, P.A. (1997).** Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids. *J Biol Chem* 272: 20275-20282.

**Brunner, A.; Chinn, J.; Neubauer, M. and Purchino, A.F. (1991).** Identification of a gene family regulated by transforming growth factor- $\beta$ . *DNA Cell Biol* 10: 293-300.

**Camilli, A.; Goldfine, H. and Portnoy, D.A. (1991).** *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med* 173(3): 751-754.

**Caron, E. and Hall, A. (1998).** Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282: 1717-1721.

**Carter, P.B. (1975a).** Animal model of human disease. *Yersinia* enteritis. Animal model: oral *Yersinia enterocolitica* infection of mice. *Am J Pathol* 81:703-706.

**Carter, P.B. (1975b).** Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice. *Infect Immun* 11:164-170.

**Chamaillard, M.; Inohara, N. and Nunez, G. (2004).** Battling enteroinvasive bacteria: Nod1 comes to a rescue. *Trends Microbiol* 12: 529-532.

**Chaqour, B. and Goppelt-Struebe, M. (2006).** Mechanical regulation of the Cyr61/CCN1 and CTGF/CCN2 proteins. *FEBS J* 273: 3639-3649.

**Chen, N., Chen, C.C and Lau, L.F. (2000).** Adhesion of human skin fibroblasts to Cyr61 is mediated through integrin alpha 6beta 1 and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 275(32):24953-24961.

**Cheng, L.W.; Anderson, D.M. and Schneewind, O. (1997).** Two independent type III secretion mechanisms for YopE in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 24(4):757-765.

**China, B.; Sory, M.P.; N'Guyen, B.T.; de Bruyere, M. and Cornelis, G.R. (1993).** Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect Immun* 61: 3129-3136.

**Chowdhury, I. and Chaqour, B. (2004).** Regulation of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) gene transcription and mRNA stability in smooth muscle cells. Involvement of RhoA GTPase and p38 MAP kinase and sensitivity to actin dynamics. *Eur J Biochem* 271(22): 4436-4450.

**Clark, M.A.; Hirst, B.H. and Jepson, M.A. (1998).** M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun* 66: 1237-1243.

- Contos, J.J.; Ishii, I. and Chun, J. (2000).** Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* 58(6):1188-96.
- Cooper, T.G. (1981).** Biochemische Arbeitsmethoden, Walter de Gruyter Verlag, 1. deutsche Auflage Berlin 1981, übersetzt von Neumeier, R. und Maurer, H.R.
- Cornelis, G.R. (2002a).** The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(10):742-752.
- Cornelis, G.R. (2002b):** *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol* 158(3): 401-408.
- Cornelis, G.R., Boland, A.; Boyd, A.P.; Geuijen, C., Iriarte, M.; Neyt, C.; Sory, M.P. and Stainier, I. (1998).** The virulence plasmid of *Yersinia*, an anti-host genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1315-1352.
- Cornelis, G.R. and van Gijsegem, F. (2000).** Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* 54:735-74.
- Cover, T.L. and Aber, R.C. (1989).** *Yersinia enterocolitica*. *N Engl J Med* 321: 16-24.
- Crook, L.D. and Tempest, B. (1992).** Plague. A clinical review of 27 cases. *Arch Intern Med* 152 (6): 1253-1256.
- Dammeier, J.; Brauchle, M.; Falk, W.; Grotendorst, G.R. and Werner, S. (1998).** Connective tissue growth factor: a novel regulator of mucosal repair and fibrosis in inflammatory bowel disease? *Int J Biochem Cell Biol* 30(8): 909-922.
- Darwin, A.J. and Miller, V.L. (1999).** Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* 32.1: 51-62.
- De Koning-Ward, T.F. and Robins-Browne, R.M. (1995).** Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 63(10):3790-5.
- Delor, I. and Cornelis, G.R. (1992).** Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect Immun* 60: 4269-4277.
- Denecker, G.; Declercq, W.; Genuijen, C.A.; Boland, A.; Benabdillah, R.; van Gurp, M.; Sory, M.P.; Vandenabeele, P. and Cornelis, G.R. (2001).** *Yersinia enterocolitica* YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid. *J Biol Chem* 276.23: 19706-14.
- Dequeker, J.; Jamar, R. and Walravens, M. (1980).** HLA-B27, arthritis and *Yersinia enterocolitica* infection. *J Rheumatol* 7: 706-710.

- Devenish, J.A. and Schiemann, D.A. (1981).** HeLa cell infection by *Yersinia enterocolitica*: evidence for lack of intracellular multiplication and development of a new procedure for quantitative expression of infectivity. *Infect Immun* 32: 48-55.
- Di Mola, F.F.; Di Sebastiano, P.; Gardini, A.; Innoceni, P.; Zimmermann, A.; Buchler, M.W. and Friess, H. (2004).** Differential expression of connective tissue growth factor in inflammatory bowel disease. *Digestion* 69(4):245-53.
- Di Mola, F.F.; Friess, H.; Martignoni, M.E.; Di Sebastiano, P.; Zimmermann, A.; Innocenti, P.; Graber, H.; Gold, L.I.; Korc, M. and Buchler, M.W. (1999).** Connective tissue growth factor is a regulator for fibrosis in human chronic pancreatitis. *Ann Surg* 230(1):63-71.
- Drevets, D.A.; Sawyer, R.T.; Potter, T.A. and Campbell, P.A. (1995).** *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect Immun* 63: 4268-4276.
- Duncan, M.R.; Frazier, K.S.; Abramson, S.; Williams, S.; Klapper, H.; Huang, X. and Grotendorst, G.R. (1999).** Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor  $\beta$ -induced collagen synthesis: Down regulation by cAMP. *FASEB J* 13: 1774-1786.
- Eckmann, L.; Kagnoff, M.F. and Fierer, J. (1995).** Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system. *Trends Microbiol* 3: 118-120.
- Eichholtz, T.; Jalink, K.; Fahrenfort, I. and Moolenaar, W.H. (1993).** The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J* 291(Pt 3):677-80.
- Ennis, E.; Isberg, R.R. and Shimizu, Y. (1993).** Very late antigen 4-dependent adhesion and costimulation of resting human T cells by the bacterial beta 1 integrin ligand invasins. *J Exp Med* 177: 207-212.
- Fallman, M.; Andersson, K.; Hakansson, S.; Magnusson, K.S.; Stendahl, O. and Wolf-Watz, H. (1995).** *Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. *Infect Immun* 63.8: 3117-3124.
- Feldman, M.F.; Muller, S.; Wuest, E. and Cornelis, G.R. (2002).** SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. *Mol Microbiol* 46(4):1183-1197.
- Feltman, H.; Schulert, G.; Khan, S.; Jain, M.; Peterson, L. and Hauser, A.R. (2001).** Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 147: 2659-2669.

- Fink-Barbançon, V.; Goranson, J.; Zhu, L.; Sawa, T.; Wiener-Kronish, J.P.; Fleiszig, S.M.; Wu, C.; Mende-Mueller, L. and Frank, D.W. (1997).** ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol Microbiol* 25: 547-557.
- Folch, J.; Lees, M. and Stanley, G.H.S. (1957).** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226(1): 497-509.
- Frithz-Lindsten, E.; Rosqvist, R.; Johansson, L. and Forsberg, A. (1995).** The chaperone-like protein YerA of *Yersinia pseudotuberculosis* stabilizes YopE in the cytoplasm but is dispensible for targeting to the secretion loci. *Mol Microbiol* 16(4): 635-647.
- Galan, J.E. and Collmer, A. (1999).** Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284: 1322-1328.
- Galyov, E.E.; Hakansson, S.; Forsberg, A. and Wolf-Watz, H. (1993).** A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* 361: 730-732.
- Gemski, P.; Lazere, J.R. and Casey, T. (1980).** Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 27: 682-85.
- George, K.M.; Barker, L.P.; Welty, D.M. and Small, P.L.C. (1998).** Partial Purification and Characterization of Biological Effects of a Lipid Toxin Produced by *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun* 66(2): 587-593.
- Gery, S.; Xie, D.; Yin, D.; Gabra, H.; Miller, C.; Wang, H.; Scott, D., Yi, W.S.; Popoviciu, M.L.; Said, J.W. and Koeffler, H.P. (2005).** Ovarian carcinomas: CCN Genes Are Aberrantly Expressed and CCN1 Promotes Porliferation of these Cells. *Clin Cancer Res* 11(20): 7243-7254.
- Goetzi, E.J. and An, S. (1998).** Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J* 12(15):1589-1598.
- Gort, A.S. and Miller, V.L. (2000).** Identification and characterization of *Yersinia enterocolitica* genes induced during systemic infection. *Infect Immun* 68.12: 6633-42.
- Grassl, G.A.; Kracht, M.; Wiedemann, A.; Hoffmann, E.; Aepfelbacher, M.; v.Eichel-Streiber, C.; Bohn, E. and Autenrieth, I.B. (2003).** Activation of NF- $\kappa$ B and IL-8 by *Yersinia enterocolitica* invasin protein is conferred by engagement of Rac1 and MAP kinase cascades. *Cell Microbiol* 5: 957-971.
- Gray, M.L. and Killinger, A.H. (1966).** *Listeria monozytogenes* and Listeria infection. *Bacteriol Rev* 30: 309-382.

**Grosdent, N.; Maridonneau-Parini, I.; Sory, M.P. and Cornelis, G.R. (2002).** Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* 70(8): 4165-4176.

**Grotendorst, G.R. (1997).** Connective tissue growth factor: A mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 8: 171-179.

**Grutzkau, A.; Hanski, C.; Hahn, H. and Riecken, E.O. (1990).** Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* 31: 1011-1015.

**Grzeszkiewicz, T.M.; Lindner, V.; Chen, N.; Lam, S.C. and Lau, L.F. (2002).** The angiogenic factor cysteine-rich 61 (CYR61, CCN1) supports vascular smooth muscle cell adhesion and stimulates chemotaxis through integrin alpha(6)beta(1) and cell surface heparane sulfate proteoglycans. *Endocrinology* 143(4): 1441-1450.

**Guan, K.L. and Dixon, J.E. (1990).** Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* 249: 553-56.

**Haag, H.; Hantke, K.; Drechsel, H.; Stojiljkovic, I.; Jung, G. and Zähler, H. (1993).** Purification of Yersiniabactin: a siderophore and a possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J Gen Microbiol* 139: 2159-2165.

**Hahn, A.; Heusinger-Ribeiro, J.; Lanz, T.; Zenkel, S. and Goppelt-Struebe, M. (2000).** Induction of connective tissue growth factor by activation of heptahelical receptors. Modulation by Rho proteins and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 275(48): 37429-37435.

**Hall, A. (1998).** Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514.

**Han, J.S.; Macarak, E.; Rosenbloom, J.; Chung, K.C. and Chaqour, B. (2003).** Regulation of Cyr61/CCN1 gene expression through RhoA GTPase and p38MAPK signaling pathways. *Eur J Biochem* 270(16):3408-3421.

**Handley, S.A.; Dube, P.H. and Miller, V.L. (2006).** Histamine signalling through the H<sub>2</sub> receptor in the Peyer's patch is important for controlling *Yersinia enterocolitica* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(24): 9268-9273.

**Hanski, C.; Kutschka, U.; Schmoranzler, H.P.; Naumann, M.; Stallmach, A.; Hahn, H.; Menge, H. and Riecken, E.O. (1989a).** Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect Immun*. 57: 673-678.

**Hanski, C.; Naumann, M.; Hahn, H. and Riecken, E.O. (1989b).** Determinants of invasion and survival of *Yersinia enterocolitica* in intestinal tissue. An in vivo study. *Med Microbiol Immunol* 178: 289-296.

**Heesemann, J.; Gaede, K. and Autenrieth, I.B. (1993).** Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rodents: a model for human yersiniosis. *APMIS* 101: 417-429.

**Heesemann, J. and Grüter, L. (1987).** Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 40: 37-41.

**Hendriksson, M.L.; Sudin, C.; Jansson, A.L.; Forsberg, A.; Palmer, R.H. and Hallberg, B. (2002).** Exoenzyme S shows selective ADP-ribosylation and GTPase-activating protein (GAP) activities towards small GTPases in vivo. *Biochem J* 367: 617-628.

**Henry-Stanley, M.J.; Hess, D.J.; Erlandsen, S.L. and Wells, C.L. (2005).** Ability of heparan sulfate proteoglycan syndecan-1 to participate in bacterial translocation across the intestinal epithelial barrier. *Shock* 24: 571-576.

**Heusinger-Ribeiro, J.; Eberlein, M.; Wahab, N.A. and Goppelt-Struebe, M. (2001).** Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: regulatory roles of RhoA and cAMP. *J Am Soc Nephrol* 12: 1853-1861.

**Hockmeyer, W.T.; Krieg, R.E.; Reich, M. and Johnson, R.D. (1978).** Further Characterization of *Mycobacterium ulcerans* Toxin. *Infect Immun* 21(1): 124-128.

**Hoiczky, E. and Blobel, G. (2001):** Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8):4669-4674.

**Holmes, A.; Abraham, D.; Sa, S.; Shiwen, X.; Black, C. and Leask, A. (2001).** CTGF und SMADs, Maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* 276: 10594-10601.

**Hoogkamp Korstanje, J.A.; de Koning, J. and Heesemann, J. (1988).** Persistence of *Yersinia enterocolitica* in man. *Infection* 16: 81-85.

**Hu, P.; Elliott, J.; McCready, P.; Skowronski, E.; Garnes, J.; Kobayashi, A.; Brubaker, R.R. and Garcia, E. (1998).** Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* 180: 5192-5202.

**Hu, Y.-L.; Albanese, C.; Pestell, R.G. and Jaffe, R.B. (2003).** Dual Mechanisms for Lysophosphatidic Acid Stimulation of Human Ovarian Carcinoma Cells. *J Natl Cancer Inst* 95(10): 733-740.

**Hueck, C.J. (1998).** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 379-433.

**Igarashi, A.; Okochi, H.; Bradham, D.M. and Grotendorst, G.R. (1993).** Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 4: 637-645.

- Iriarte, M. and Cornelis, G.R. (1998).** YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* 29.3: 915-29.
- Iriarte, M.; Vanooteghem, J.C.; Delor, I.; Diaz, R.; Knutton, S. and Cornelis, G.R. (1993).** The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 9: 507-520.
- Isberg, R.R. and Leong, J.M. (1990).** Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Immunity*. 60: 861-871.
- Ismail, M.H.; Hodkinson, H.J.; Patel, M. and Koornhof, H.J. (1987).** Multiple liver abscesses caused by *Yersinia enterocolitica*. A case report. *S Afr Med J* 72(4):291-2.
- Ito, Y.; Aten, J.; Bende, R.J.; Oemar, B.S.; Rabelink, T.J.; Weening, J.J. and Goldschmeding, R. (1998).** Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int* 53: 853-861.
- Ivkovic, S.; Yoon, B.S.; Popoff, S.N.; Safadi, F.F.; Libuda, D.E.; Stephenson, R.C.; Daluiski, A. and Lyons, K.M. (2003).** Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* 130(12):2779-91.
- Iwanciw, D.; Rehm, M.; Porst, M. and Goppelt-Struebe, M. (2003).** Induction of connective tissue growth factor by angiotensin II: integration of signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(10): 1782-1787.
- Jaffe, A.B. and Hall, A. (2005).** Rho-GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 247-269.
- Juris, S.J.; Rudolph, A.E.; Huddler, D.; Orth, K. and Dixon, J.E. (2000).** A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9431-9436.
- Just, I.; Selzer, J.; Wilm, M.; von Eichel-Streiber, C.; Mann, M. and Aktories, K. (1995).** Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 375(6531): 500-503.
- Kampik, D.; Schulte, R. and Autenrieth, I.B. (2000).** *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in *Yersinia* infections. *Infect Immun* 68 (5):2484-2492.
- Karin, M.; Lawrence, T. and Nizet, V. (2006).** Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 124(4): 823-835.

- Katz, B.Z.; Zamir, E.; Bershady, A.; Kam, Z.; Yamada, K.M. and Geiger, B. (2000).** Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell* 11: 1047-1060.
- Kayal, S. and Charbit, A. (2006).** Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. *FEMS Microbiol Rev* 30(4): 514-529.
- Kayal, S.; Lilienbaum, A.; Poyart, C.; Memet, S.; Israel, A. and Berche, P. (1999).** Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF- $\kappa$ B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol Microbiol* 31: 1709-1722.
- Koornhof, H.J.; Smego, Jr., R.A. and Nicol, M. (1999).** Yersiniosis II: The pathogenesis of *Yersinia* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 87-112.
- Koster, M.; Bitter, W.; de Cock, H.; Allaoui, A.; Cornelis, G.R. and Tommassen, J. (1997).** The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol* 26(4):789-797.
- Krall, R.; Sun, Jianjun; Pederson, K.J. and Barbieri, J.T. (2002).** In Vivo Rho GTPase-Activating Protein Activity of *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoS. *Infect Immun* 70(1): 360–367.
- Krall, R.; Zhang, Y. and Barbieri, J.T. (2004).** Intracellular Membrane Localization of *Pseudomonas* ExoS and *Yersinia* YopE in Mammalian Cells. *J Biol Chem* 279(4): 2747-2753.
- Kubori, T.; Sukhan, A.; Aizawa, S.I. and Galan, J.E. (2000).** Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10225-10230.
- Lacal, J.C. and McCormick, F. (1993).** The ras superfamily of GTPases. *CRC Press Inc, Boca raton, FL*, 259-282.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laski, J.A.; Ortiz, L.A.; Tonthat, B.; Hoyle, G.W.; Corti, M.; Athas, G.; Lungarella, G.; Brody, A. and Friedman, M. (1998).** Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol* 275:L365-371.
- Lau, L.F. and Lam, S.C. (1999).** The CCN Family of Angiogenic Regulators: The Integrin Connection. *Exp Cell Res* 248(1):44-57.
- Lee, L.A.; Gerber, A.R.; Lonsway, D.R.; Smith, J.D.; Carter, G.P.; Pühr, N.D.; Parrish, C.M.; Sikes, R.K.; Finton, R.J. and Tauxe, R.V. (1990).** *Yersinia enterocolitica* O:3 infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings. *N Engl J Med* 322 (14): 984-987.

**Lee, V.T.; Smith, R.S.; Tümmler, B. and Lory, S. (2005).** Activities of *Pseudomonas aeruginosa* Effectors Secreted by the Type III Secretion system In Vitro and during Infection. *Infect Immun* 73(3): 1695-1705.

**Leung, K.Y. and Straley, S.C. (1989).** The yopM gene of *Yersinia pestis* encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPIb alpha. *J Bacteriol* 171: 4623-4632.

**Leung, K.Y.; Reisner, B.S. and Straley, S.C. (1990).** YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect Immun* 58: 3262-3271.

**Lin, M.T.; Chang, C.C.; Chen, S.T.; Chang, H.L.; Su, J.L.; Chau, Y.P. and Kuo, M.L. (2004).** Cyr61 Expression Confers Resistance to Apoptosis in Breast Cancer MCF-7 Cells by a Mechanism of NF- $\kappa$ B-dependent XIAP Up-Regulation. *J Biol Chem* 279(23): 24015-24023.

**Lippi, D. and Conti, A.A. (2002).** Plague, policy, saints and terrorists: a historical survey. *J Infect* 44: 226-228.

**Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001).** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Method. *Methods* 25: 402-408.

**Lundgren, E.; Carballeira, N.; Vazquez, R.; Dubinina, E.; Branden, H.; Persson, H. and Wolf-Watz, H. (1996).** Invasin of *Yersinia pseudotuberculosis* activates human peripheral B cells. *Infect Immun* 64: 829-835.

**Lynch, K.R. (2002).** Lysophospholipid receptor nomenclature. *Biochim Biophys Acta*. 1582: 70-71.

**Marra, A. and Isberg, R.R. (1997).** Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of *Yersinia pseudotuberculosis* across the Peyer's patch intestinal epithelium. *Infect Immun* 65(8): 3412-3421.

**Mattie, M.; Brooker, G. and Spiegel, S. (1994).** Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway. *J Biol Chem* 269(5): 3181-3188.

**Miller, V.L. and Falkow, S. (1988).** Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 56: 1242-1248.

**Mills, S.D.; Boland, A.; Sory, M.P.; van der Smissen, P.; Kerbouch, C.; Finlay, B.B. and 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.

**Mo, F.E.; Muntean, A.G.; Chen, C.C.; Stolz, D.B.; Watkins, S.C. and Lau, L.F. (2002).** CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity. *Mol Cell Biol* 22(24):8709-20.

**Molinari, G.; Rohde, M.; Wilde, C.; Just, I.; Aktories, K. and Chhatwal, G.S. (2006).** Localization of the C3-like ADP-ribosyltransferase from *Staphylococcus aureus* during bacterial invasion of mammalian cells. *Infect Immun* 74: 3673-3677.

**Monack, D.M.; Meccas, J.; Ghori, N. and 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.

**Moolenaar, W.H. (1995).** Lysophosphatidic Acid, a Multifunctional Phospholipid Messenger. *J Biol Chem* 270(22):12949-12952.

**Moussad, E.E. and Brigstock, D.R. (2000).** Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab* 71(1-2): 276-292.

**Muehlich, S., Schneider, N.; Hinkmann, F.; Garlichs, C.D. and Goppelt-Struebe, M. (2004).** Induction of connective tissue growth factor (CTGF) in human endothelial cells by lysophosphatidic acid, sphingosine-1-phosphate, and platelets. *Atherosclerosis* 175(2):261-8.

**Murli, S.; Watson, R.O. and Galan, J.E. (2003).** Role of tyrosine kinases and the tyrosine phosphatase SptP in the interaction of *Salmonella* with host cells. *Cell Microbiol* 3(12): 795-810.

**Nakajima, R.; Motin, V.L. and Brubaker, R.R. (1995).** Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. *Infect Immun* 63: 3021-3029.

**Narumiya, S. (1996).** The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem (Tokyo)* 120: 215-228.

**Nelson, K.M., Young, G.M. and Miller, V.L. (2001).** Identification of a locus involved in systemic dissemination of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 69: 6201-6208.

**Oemar, B.S.; Werner, A.; Garnier, J.-M.; Do, D.-D.; Godoy, N.; Nauck, M.; März, W.; Rupp, J., Pech, M. and Lüscher, T.F. (1997).** Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. *Circulation* 95: 831-839.

**Ohta, H.; Sato, K.; Murata, N.; Damirin, A.; Malchinkhuu, E.; Kon, J.; Kimura, T.; Tobo, M.; Yamazaki, Y.; Watanabe, T.; Yagi, M.; Sato, M.; Suzuki, R.; Murooka, H.; Sakai, T.; Nishitoba, T.; Im, D.; Nochi, H.; Tamoto, K.; Tomura, H. and Okajima, F. (2003).** Ki16425, a Subtype-Selective Antagonist for EDG-Family Lysophosphatidic Acid Receptors. *Mol Pharmacol* 64: 994-1005.

- Orth, K.; Xu, Z.; Mudgett, M.B.; Bao, Z.Q.; Palmer, L.E.; Bliska, J.B.; Mangel, W.F.; Staskawicz, B. and Dixon, J.E. (2000). Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* 290.5496: 1594-97.
- Ott, C.; Iwanciw, D.; Graness, A.; Giehl, K. and Goppelt-Struebe, M. (2003). Modulation of the Expression of Connective Tissue Growth Factor by Alterations of the Cytoskeleton. *J Biol Chem* 278(45): 44305-44311.
- Palumbo, R.N., and Wang, C. (2006). Bacterial invasin: structure, function and implication for targeted oral gene delivery. *Curr Drug Deliv* 3: 47-53.
- Pawel-Rammingen, U.; Telepnev, M.V.; Schmidt, G.; Aktories, K.; Wolf-Watz, H. and Rosqvist, R. (2000). GAP activity of the *Yersinia* YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol Microbiol* 36: 737-748.
- Pepe, J.C. and Miller, V.L. (1993). *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6473-6477.
- Perry, R.D. and Fetherston, J.D. (1997). *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* 10: 35-66.
- Perry, R.D.; Straley, S.C.; Fetherston, J.D.; Rose, D.J.; Gregor, J. and Blattner, F.R. (1998). DNA sequencing and analysis of the low-Ca<sup>2+</sup>-response plasmid pCD1 of *Yersinia pestis* KIM5. *Infect Immun* 66: 4611-4623.
- Peters, J.; Hess, S.; Endlich, K.; Thalmann, J.; Holzberg, D.; Kracht, M.; Schaefer, M.; Bartling, G. and Klos, A. (2005). Silencing or permanent activation: host-cell responses in models of persistent *Chlamydia pneumoniae* infection. *Cell Microbiol* 7(8):1099-1108.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time-RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: No. 9 00.
- Pierson, D.E. and Falkow, S. (1990). Nonpathogenic isolates of *Yersinia enterocolitica* do not contain functional inv-homologous sequences. *Infect Immun* 58: 1059-1064.
- Ping, W.; Xiaohua, W.; Wenxue, C. and Jin, L. (2006). The lysophosphatidic acid (LPA) receptors their expression and significance in epithelial ovarian neoplasms. *Gynecol Oncol* 104(3): 714-720.
- Portnoy, D.A. and Falkow, S. (1981). Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* 148: 877-883.
- Putzker, M.; Sauer, H.; and Sobe, D. (2001). Plague and other human infections caused by *Yersinia* species. *Clin Lab* 47(9-10): 453-466.

- Rabin, S.D. and Hauser, A.R. (2005).** Functional regions of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU. *Infect Immun* 73(1): 573-582.
- Rabson, A.R.; Hallett, A.F., and Koornhof, H.J. (1975).** Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. *J Infect Dis* 131: 447-451.
- Ramamurthi, K.S. and Schneewind, O. (2003).** *Yersinia yopQ* mRNA encodes a bipartite type III secretion signal in the first 15 codons. *Mol Microbiol* 50(4):1189-1198.
- Ramamurthy, T.; Yoshino, K.; Huang, X.; Balakrish, N.G.; Carniel, E.; Maruyama, T.; Fukushima, H. and Takeda, T. (1997).** The novel heat-stable enterotoxin subtype gene (*ystB*) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the *yst* genes. *Microb Pathog* 23: 189-200.
- Revell, P.A. and Miller, V.L. (2001).** *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiol Lett* 205: 159-164.
- Ridley, A.J. (2001).** Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* 11: 471-477.
- Riento, K. and Ridely, A.J. (2003).** Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 446-456.
- Robins-Browne, R.M.; Still, C.S.; Miliotis, M.D. and Koornhof, H.J. (1979).** Mechanism of action of *Yersinia enterocolitica* enterotoxin. *Infect Immun* 25: 680-684.
- Roggenkamp, A.; Bittner, T.; Leitritz, L.; Sing, A. and Heesemann, J. (1997).** Contribution of the Mn-cofactored superoxide dismutase (*SodA*) to the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O8. *Infect Immun* 65: 4705-4710.
- Roggenkamp, A.; Neuberger, H.R.; Flugel, A.; Schmoll, T. and 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.
- Roggenkamp, A.; Ruckdeschel, K.; Leitritz, L., Schmitt, R. and Heesemann, J. (1996).** Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein *YadA* of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect Immun* 64: 2506-2514.
- Romano, M.; Ricci, V. and Zarrilli, R. (2006).** Mechanisms of disease: Helicobacter pylori-related gastric carcinogenesis--implications for chemo-prevention. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3(11): 622-632.
- Rosen, H. and Goetzl, E.J. (2005).** Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol* 5(7):560-570.

**Rosqvist, R.; Bolin, I. and Wolf-Watz, H. (1988).** Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein. *Infection and Immunity* 56: 2139-2143.

**Rosqvist, R.; Forsberg, A. and Wolf-Watz, H. (1991).** Microinjection of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Biochem Soc Trans* 19: 1131-1132.

**Ruckdeschel, K.; Mannel, O.; Richter, K.; Jacobi, C.A.; Trulzsch, K.; Rouot, B. and Heesemann, J. (2001).** *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J Immunol* 166: 1823-1831.

**Ruckdeschel, K.; Roggenkamp, A.; Schubert, S.; and Heesemann, J. (1996).** Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun* 64: 724-733.

**Rüssmann, H.; Ruckdeschel, K. and Heesemann, J. (1996).** Translocation of *Yersinia enterocolitica* through an endothelial monolayer by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 64: 1016-1019.

**Sakamoto, S., Yokohama, M.; Zhang, X.; Prakash, K., Nagao, K.; Hatanaka, T.; Getzenberg, R.H. and Kakehi, Y. (2004).** Increased expression of CYR61, an extracellular matrix signaling protein, in human benign prostatic hyperplasia and its regulation by lysophosphatidic acid. *Endocrinology* 145(6):2929-2940.

**Salinovich, O. and Montelaro, R.C. (1986).** Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 156: 341-347.

**Sampath, D.; Winneker, R.C. and Zhang, Z. (2001).** Cyr61, a member of the CCN family, is required for MCF-7 cell proliferation: regulation by 17 beta-estradiol and overexpression in human breast cancer. *Endocrinology* 142: 2540-2548.

**Sarker, M.R.; Neyt, C.; Stainier, I. and Cornelis, G.R. (1998).** The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J Bacteriol* 180: 1207-1214.

**Sato, H. and Frank, D.W. (2004).** ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol Microbiol* 53: 1279-1290.

**Schild, C. and Trueb, B. (2002).** Mechanical stress is required for high-level expression of connective tissue growth factor. *Exp Cell Res* 274: 83-91.

**Schleifstein, J.I. and Coleman, M.B. (1939).** An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *Pasteurella pseudotuberculosis*, and pathogenic for man. *NY State J Med* 39: 1749-1753.

**Schmeck, B.; Beermann, W.; van Laak, V.; Opitz, B., Hocke, A.C.; Meixenberger, K.; Eitel, J.; Chakraborty, T.; Schmidt, G.; Barth, H.; Suttorp, N. and Hippenstiel, S. (2006).** *Listeria monocytogenes* induced Rac1-dependent signal transduction in endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 72: 1367-1374.

**Schoppet, M.; Bubert, A. and Huppertz, H.I. (2000).** Dendritic cell function is perturbed by *Yersinia enterocolitica* infection in vitro. *Clin Exp Immunol* 122: 316-323.

**Schulte, K.M.; Beyer, A.; Köhrer, K., Oberhäuser, S. and Röher, H.D. (2001).** Lysophosphatidic acid, a novel lipid growth factor for human thyroid cells: over-expression of the high-affinity receptor edg4 in differentiated thyroid cancer. *Int J Cancer* 92(2): 249-256.

**Schulte, R. and Autenrieth, I.B. (1998).** *Yersinia enterocolitica*-induced interleukin-8 secretion by human intestinal epithelial cells depends on cell differentiation. *Infect Immun* 66: 1216-1224.

**Schulte, R.; Grassl, G.A.; Preger, S.; Fessele, S.; Jacobi, C.A.; Schaller, M.; Nelson, P.J. and Autenrieth, I.B. (2000a).** *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J* 14(11):1471-1484.

**Schulte, R.; Kerneis, S.; Klinke, S.; Bartels, H.; Preger, S.; Kraehenbuhl, J.P.; Pringault, E. and Autenrieth, I.B. (2000b).** Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta1 integrins apically expressed on M-like cells. *Cell Microbiol* 2: 173-185.

**Schulze Koops, H.; Burkhardt, H.; Heesemann, J.; Kirsch, T.; Swoboda, B.; Bull, C.; Goodman, S. and Emmrich, F. (1993).** Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect Immun* 61: 2513-2519.

**Sebes, J.I.; Mabry, Jr., E.H. and Rabinowitz, J.G. (1976).** Lung abscess and osteomyelitis of rib due to *Yersinia enterocolitica*. *Chest* 69(4): 546-548.

**Shao, F.; Merritt, P.M.; Bao, Z.; Innes, R.W. and Dixon, J.E. (2002).** A *Yersinia* Effector and a *Pseudomonas* Avirulence Protein Define a Family of Cysteine Proteases Functioning in Bacterial Pathogenesis. *Cell* 109: 575-588.

**Shepel, M.; Boyd, J.; Luider, J. and Gibb, A.P. (2001).** Interaction of *Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* with platelets. *J Med Microbiol* 50: 1030-1038.

**Simonet, M.; Richard, S. and Berche, P. (1990).** Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. *Infect Immun* 58: 841-845.

**Sing, A.; Roggenkamp, A.; Geiger, A.M. and Heesemann, J. (2002).** *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J Immunol* 168: 1315-1321.

**Skrzypek, E.; Cowan, C. and Straley, S.C. (1998).** Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol Microbiol* 30: 1051-1065.

**Smego, R.A.; Frean, J. and Koornhof, H.J. (1999).** Yersiniosis I: microbiological and clinicoepidemiological aspects of plague and non-plague *Yersinia* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 1-15.

**Snellings, N.J.; Popek, M. and Lindler, L.E. (2001).** Complete DNA sequence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 low-calcium-response plasmid reveals a new virulence plasmid-associated replicon. *Infect Immun* 69: 4627-4638.

**Spiegel, S.; Cuvillier, O.; Edsall, L.C.; Kohama, T.; Menzeleev, R.; Olah, Z.; Olivera, A.; Pirianov, G.; Thomas, G.M.; Tu, Z.; Van Brocklyn, J.R. and Wang, F. (1998).** Sphingosine-1-phosphate in cell growth and cell death. *Ann NY Acad Sci* 845:11-18.

**Spiegel, S. and Milstien, S. (2002).** Sphingosine 1-Phosphate, a Key Cell Signaling Molecule. *J Biol Chem* 277(29): 25851-25854.

**Stenhouse, M.A. and Milner, L.V. (1982).** *Yersinia enterocolitica*. A hazard in blood transfusion. *Transfusion* 22(5): 396-398.

**Straley, S.C. (1991).** The low-Ca<sup>2+</sup> response virulence regulon of human-pathogenic *Yersiniae*. *Microb Pathog* 10(2):87-91.

**Straley, S.C.; Plano, G.V., Skrzypek, E.; Haddix, P.L. and Fields, K.A. (1993).** Regulation by Ca<sup>2+</sup> in the *Yersinia* low-Ca<sup>2+</sup> response. *Mol Microbiol* 8(6):1005-1010.

**Stratton, R.; Shiwen, X.; Martini, G.; Holmes, A.; Leask, A.; Haberberger, T.; Martin, G.; Black, C. and Abraham, D. (2001).** Iloprost suppresses connective tissue growth factor production in fibroblasts and in the skin of scleroderma patients. *J Clin Invest* 108: 241-250.

**Sugai, M.; Enomoto, T.; Hashimoto, K.; Matsumoto, K.; Matsuo, Y.; Ohgai, H.; Hong, Y.M.; Inoue, S.; Yoshikawa, K. and Suginaka, H. (1990).** A novel epidermal cell differentiation inhibitor (EDIN): purification and characterization from *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 92-98.

**Symons, M. and Settleman, J. (2000).** Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol* 10: 410-419.

**Takeda, K. and Akira, S. (2005).** Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17: 1-14.

- Tamm, A.; Tarkkanen, A.-M.; Korhonen, P.K.; Toivanen, P. and Skurnik, M. (1993).** Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 10: 995-1011.
- Tamura, I.; Rosenbloom, J.; Macarak, E. and Chaqour, B. (2001).** Regulation of Cyr61 gene expression by mechanical stretch through multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 281(5): 1524-1532.
- Tang, P.; Rosenshine, I.; Cossart, P. and Finlay, B. (1996).** Listeriolysin O Activates Mitogen-Activated Protein Kinase in Eucaryotic Cells. *Infect Immun* 64: 2359-2361.
- Toivanen, A.; Granfors, K.; Lahesmaa Rantala, R.; Leino, R.; Stahlberg, T. and Vuento, R. (1985).** Pathogenesis of *Yersinia*-triggered reactive arthritis: immunological, microbiological and clinical aspects. *Immunol Rev* 86: 47-70.
- Torruellas, J.; Jackson, M.W.; Pennock, J.W. and Plano, G.V. (2005).** The *Yersinia pestis* type III secretion needle plays a role in the regulation of Yop secretion. *Mol Microbiol* 57(6):1719-1733.
- Towbin, H.; Staehelin, T. and Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354.
- Tsai, M.S.; Hornby, A.E.; Lakins, J. and Lupu, R. (2000).** Expression and function of CYR61, an angiogenic factor, in breast cancer cell lines and tumor biopsies. *Cancer Res* 60(20):5603-7.
- Van Leeuwen, F.N.; Olivo, C.; Grivell, S.; Giepmans, B.N.; Collard, J.G. and Moolenaar, W.H. (2003).** Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1. *J Biol Chem* 278(1): 400-406.
- Wattiau, P.; Bernier, B.; Deslee, P.; Michiels, T. and Cornelis, G.R. (1994):** Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22):10493-10497.
- Welkos, S.; Friedlander, A.; McDowell, D.; Weeks, J. and Tobery, S. (1998).** V antigen of *Yersinia pestis* inhibits neutrophil chemotaxis. *Microb Pathog* 24: 185-196.
- Wennerberg, K. and Der, C.J. (2005).** Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 117: 1301-1312.
- Wenzel, B.E.; Peters, A. and Zubashev, I. (1996).** Bacterial virulence antigens and the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases (AITD). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104: 75-78.

**Wiedmaier, N; Müller, S; Köberle, M; Manncke, B; Krejci, J; Authenrieth, I.B. and Bohn, E. (2008).** Bacteria induce CTGF and CYR61 expression in epithelial cells in a LPA receptor dependent manner. *Int J Med Microbiol.*298: 231-243.

**Wilde, C.; Chhatwal, G.S.; Schmalzing, G.; Aktories, K. and Just, I. (2001).** A novel C3-like ADP-ribosyltransferase from *Staphylococcus aureus* modifying RhoE and Rnd3. *J Biol Chem* 276: 9537-9542.

**Woestyn, S.; Allaoui, A.; Wattiau, P. and Cornelis, G.R. (1994).** YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J Bacteriol*176(6):1561-1569.

**Wong, K.B. and Isberg, R.R. (2005).** *Yersinia pseudotuberculosis* spatially controls activation and misregulation of host cell Rac1. *PLoS Pathog* 1(2):e16. Epub 2005.

**Wong, M.; Kireeva, M.L.; Kolesnikova, T.V. and Lau, L.F. (1997).** Cyr16, product of a growth factor-inducible immediate-early gene regulates chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells. *Dev Biol* 192: 492-508.

**Xie, D.; Miller, C.W.; O'Kelly, J.; Nakachi, K.; Sakashita, A.; Said, J.W.; Gornbein, J. and Koeffler, H.P. (2001).** Breast cancer. Cyr61 is overexpressed, estrogen-inducible, and associated with more advanced disease. *J Biol Chem* 276: 14187-14194.

**Xie, D.; Yin, D.; Tong, X.; O'Kelly, J.; Mori, A.; Miller, C.; Black, K.; Giu, D.; Said, J.W. and Koeffler, H.P. (2004).** Cyr61 is overexpressed in gliomas and involved in integrin-linked kinase-mediated Akt and  $\beta$ -catenin-TCF/Lef signaling pathways. *Cancer Res* 64 (6): 1987-1996.

**Yao, T.; Meccas, J.; Healy, J.I.; Falkow, S. and Chien, Y. (1999).** Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH. *J Exp Med* 190: 1343-1350.

**Young, G.M., Amid, D. and Miller, V.L. (1996).** A bifunctional urease enhances survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at low pH. *J Bacteriol* 178(22):6487-95.

**Yu, Y.A.; Shabahang, S.; Timiryasova, T.M.; Zhang, Q.; Beltz, R.; Gentshev, I.; Goebel, W. and Szalay, A.A. (2004).** Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. *Nat Biotechnol* 22:313-320.

**Zumbihl, R., Aepfelbacher, M.; Andor, A.; Jacobi, C.A.; Ruckdeschel, K.; Rouot, B. and 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: 29289-29292.

## 8 Veröffentlichungen

### Publikation

**Wiedmaier, N; Müller, S; Köberle, M; Manncke, B; Kreijci, J; Authenrieth, I.B. and Bohn, E. (2008).** Bacteria induce CTGF and CYR61 expression in epithelial cells in a LPA receptor dependent manner. *Int. J. Med. Microbiol.* 289: 231-243.

### Kongressbeiträge

**Wiedmaier, N; Müller, S; Köberle, M; Manncke, B; Kreijci, J; Authenrieth, I.B. and Bohn, E.** Bacteria induce CTGF and CYR61 expression in epithelial cells in a LPA receptor dependent manner.

Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V., Oktober 2006 in Würzburg, Deutschland

**Wiedmaier, N; Müller, S; Köberle, M; Manncke, B; Kreijci, J; Authenrieth, I.B. and Bohn, E.** Bacteria induce CTGF and CYR61 expression in epithelial cells in a LPA receptor dependent manner.

Posterpräsentation, DGHM-Fachgruppe 'Mikrobielle Pathogenität', Minisymposium Juni 2006 in Bad Urach, Deutschland

## 9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt. Ich danke Herrn Prof. Dr. I. B. Autenrieth für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die Ausschreibung des Dissertationsthemas. Außerdem gilt Ihm und Herrn Prof. Dr. S. Stevanovic mein Dank für Ihre Gutachtertätigkeit.

Besonderer Dank gebührt meinem Arbeitsgruppenleiter und direktem Betreuer Dr. Erwin Bohn, welcher jederzeit für mich ansprechbar war und großes Interesse an meiner Arbeit zeigte. Ich bin ihm außerordentlich dankbar für seine Unterstützung, für sein Vertrauen in meine Selbständigkeit und für seine Kommentare zu meinem Manuskript. In den Anfangsphasen dieser Arbeit wurde ich von Dr. Steffen Müller eingearbeitet und betreut, wofür ich ihm herzlich danken möchte.

Bedanken möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe „*Yersinia*“ für die Unterstützung und die hervorragende Zusammenarbeit. Insbesondere Martin Köberle, der sich sehr viel Zeit für mich und mein Manuskript genommen hat, mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und bei so mancher Darmpräparation und FACS Analyse maßgeblich mit zum Erfolg beitrug. Birgit Manncke, die einen großen Anteil am Gelingen der Westernblots hatte und immer freundlich Auskunft gab, wenn ich wieder einmal auf der Suche nach Materialien oder Anleitungen war. Juliane Krejci für die Hilfe bei Zellkulturproblemen und das nicht endende Angebot an HeLa-Zellen. Auch allen anderen, hier nicht namentlich erwähnten Institutsmitarbeitern und –Mitarbeiterinnen danke ich für die schöne Zeit, die ich mit Ihnen verbringen durfte, für so manche Kaffeepause, moralische Stütze und das tolle Arbeitsklima.

Mein Dank gilt auch meinem Onkel Martin Schnabel, der sich viel Zeit genommen hat für das sorgfältige und konstruktive Korrekturlesen.

Schließlich danke ich auch meinem Freund Nicolas und meinen Eltern für die große Unterstützung und das Vertrauen, das sie in mich haben.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Nina Wiedmaier  
geboren: 10. November 1981 in Stuttgart

### Schulbildung

09/88 – 07/92 Schönbuchschule Grundschule in Leinfelden  
09/92 – 07/2001 Phillipp-Matthäus-Hahn-Gymnasium in Echterdingen,  
Abitur 2001

### Hochschulstudium

10/2001 – 05/2008 Studium der Humanmedizin an der  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
1. Ärztliche Prüfung 11.09.2003  
2. Ärztliche Prüfung 09.05.2008

### Promotionsarbeit

03/2004 – 12/2007 Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie  
und Hygiene an der Eberhard-Karls-Universität Tü-  
bingen, Prof. Dr. I. B. Autenrieth  
Thema: Modulation der CYR61 und CTGF Expres-  
sion in Epithelzellen durch *Yersinia enterocolitica*  
und andere Bakterien