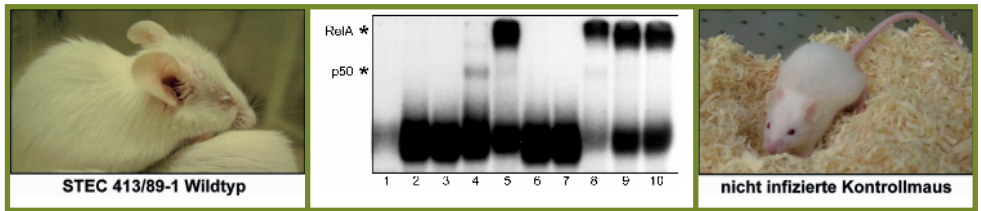


Untersuchungen zur Suppression der NF- κ B-Aktivierung in Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC) infizierten Säugerzellen



Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Humanbiologie
(Dr. biol. hom.)
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Isabel Krabs
Tierärztin aus Unna

Gießen 2006

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2007

© 2007 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-939902-30-0

Verlag: DVG Service GmbH
Frankfurter Straße 89
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

**Untersuchungen zur Suppression
der NF- κ B-Aktivierung in
Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli*
(STEC) infizierten Säugerzellen**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Humanbiologie
(Dr. biol. hom.)
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Isabel Krabs
Tierärztin aus Unna**

Gießen 2006

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie

Direktor: Prof. Dr. T. Chakraborty
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Holger Hackstein

Gutachter: Prof. Dr. Michael U. Martin

Tag der Disputation: 04. April 2007

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Für meinen Vater

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
ZUSAMMENFASSUNG	XV
SUMMARY	XVIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Enteropathogene <i>Escherichia coli</i> - Allgemeines	1
1.2 ETEC, EAEC und EIEC	2
1.3 EPEC und STEC/EHEC – A/E-Läsionen formende Darmpathogene	4
1.3.1 Shiga Toxin-produzierende <i>Escherichia coli</i> (STEC)	4
1.3.2 Pathogenitätsinsel – Locus of Enterocyte Effacement (LEE)	5
1.3.2.1 Typ-III-Sekretions-System (TTSS)	7
1.3.2.2 <i>Escherichia coli</i> secreted proteins (Esp)	7
1.3.2.3 "Attaching and effacing" (A/E)	8
1.4 Signaltransduktion	10
1.4.1 Mitglieder der Rel/NF-κB-Familie	11
1.4.2 Mitglieder der IκB-Familie	13
1.4.3 Mitglieder der IκB Kinase (IKK)-Familie	15
1.4.4 Mechanismus und Regulation der NF-κB-Aktivierung	17
1.4.5 Der NF-κB-Signaltransduktionsweg	18
1.4.5.1 Klassischer Signaltransduktionsweg	18
1.4.5.1.1 Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Signaltransduktionsweg	19
1.4.5.1.2 Toll/-IL-1-Rezeptor-Signaltransduktionsweg	20
1.4.5.2 p105 Signaltransduktionsweg	22
1.4.5.3 Alternativer Signaltransduktionsweg (p100)	23
1.5 Zielsetzung und Aufgabenstellung	27

2	MATERIAL	29
2.1	Bakterienstämme	29
2.2	Plasmide	30
2.3	Eukaryontische Zelllinien	30
2.4	Mauslinie	31
2.5	Nukleotide und Nukleinsäuren	31
2.6	Für die Gelretardationsexperimente verwendete doppelsträngige Oligonukleotide	31
2.7	Antikörper	32
2.7.1	Antikörper für Western Blots	32
2.7.2	Antikörper für Gel-Supershift-Experimente	33
2.8	Chemikalien, Enzyme, Antibiotika	34
2.9	Lösungen, Puffer und Medien	34
2.9.1	Reagenzien zur Bakterienkultur	35
2.9.2	Medien und Medienzusätze für die Zellkultur	35
2.9.3	Puffer zur Proteinextraktion	38
2.9.3.1	Puffer zur Proteinextraktion aus Zellen permanenter Zelllinien	38
2.9.3.2	Puffer zur Proteinextraktion aus Primärzellen	39
2.9.4	Puffer und Lösungen zur Proteinanalytik	39
2.9.5	Puffer und Lösungen zu Protein-DNA-Bindungsstudien	41
2.9.6	Puffer für den Luciferase-Reporter-Gen-Assay	42
2.10	Molekulargewichtsstandards	42
2.10.1	Protein-Größenstandard	42
2.11	Verwendete "Kits"	43
2.12	Gele	43
2.12.1	5%-iges, natives Polyacrylamidgel für Gelretardationsexperimente	43
2.12.2	Polyacrylamid-Trenngele zur Proteinanalytik	44
2.12.3	Polyacrylamid-Sammelgel zur Proteinanalytik	44
2.13	Geräte und sonstige Verbrauchsmaterialien	44
3	METHODEN	47
3.1	Bakterienkultur	47
3.1.1	Haltung und Anzucht von Bakterien	47

3.1.2	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> für die Infektion von Zellen oder Mäusen	47
3.2	Zellkultur eukaryontischer Zellen	48
3.2.1	Permanente Zelllinien	49
3.2.1.1	Passagieren von adhärenen Zellen	49
3.2.1.1.1	Trypsinieren von Zellen (HeLa-Zellen)	49
3.2.1.1.2	Abschaben von Zellen (P388D ₁ -Makrophagen)	50
3.2.1.2	Cryokonservierung und Auftauen von Zellen	50
3.2.1.2.1	Cryokonservierung	51
3.2.1.2.2	Auftauen	51
3.2.2	Primärzellen	51
3.2.2.1	Isolation muriner Knochenmarksmakrophagen	52
3.2.2.2	Differenzierung und Anzucht muriner Knochenmarksmakrophagen	52
3.2.2.3	Passagieren	52
3.2.3	Bestimmung der Lebendzellzahl eukaryontischer Zellen mittels Trypanblau-Färbung	53
3.2.4	Infektion von Säugerzellen mit extrazellulären Bakterien	54
3.2.4.1	Infektion von permanenten Zelllinien mit extrazellulären Bakterien	54
3.2.4.2	Infektion von Primärzellen mit extrazellulären Bakterien	55
3.2.5	Inkubation von Säugerzellen mit verschiedenen Agenzien (LPS, TNF- α , LMB, MG132)	55
3.2.6	Transfektion eukaryontischer Zellen	56
3.2.6.1	Transfektion mit FuGENE [®]	56
3.3	Bestimmung der T-Zell-Proliferationsfähigkeit nach <i>in vivo</i> Infektion (Mausinfektionsmodell)	57
3.3.1	Infektion von Balb/C Mäusen	58
3.3.2	Milzzellisolierung	58
3.3.3	Milzellstimulierung mit Concanavalin A	58
3.3.4	Detektion mit WST-1 und Auswertung	59
3.4	Allgemeine molekulargenetische Methoden	59
3.4.1	Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	59
3.4.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im mittleren Maßstab (Midi-Präp)	60
3.5	Proteinbiochemische Methoden	61
3.5.1	Präparation von zytoplasmatischen sowie nuklearen Proteinen	

	aus Säugerzellen	61
3.5.1.1	Extraktion zytoplasmatischer Proteine	62
3.5.1.2	Extraktion nuklearer Proteine	62
3.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration von zellfreien Extrakten mit dem "Bio-Rad Protein Microassay"	63
3.6	Proteinanalytik	64
3.6.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) [1]	64
3.6.2	Western Blot (Immunoblot)	65
3.6.2.1	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran	65
3.6.2.2	PonceauS-Färbung der PVDF-Membran	66
3.6.2.3	Western Blot-Entwicklung mit Antikörpern und Detektion immunreaktiver Proteine	66
3.7	Protein-DNA-Bindungsstudien	67
3.7.1	Radioaktiv markierte DNA-Sonden	67
3.7.1.1	Hybridisierung ("Annealing") von synthetischen, komplementären ss Oligonukleotiden	67
3.7.1.2	Radioaktive Markierung der doppelsträngigen (ds) Oligonukleotide	68
3.7.1.3	Reinigung der DNA-Sonde	68
3.7.2	Messung der spezifischen Aktivität einer radioaktiv markierten DNA-Sonde	69
3.7.3	Gelretardationsexperiment ("Electrophoretic Mobility Shift Assay") [EMSA]	69
3.7.3.1	Protein-DNA-Bindungsreaktion	69
3.7.3.2	Elektrophoretische Auftrennung von Protein-DNA-Komplexen in nativen Polyacrylamidgelen	70
3.7.4	Identifizierung spezifischer NF-κB-Proteine in Protein-DNA-Komplexen durch Verwendung von Antikörpern ("Gel-Supershift-Experiment")	71
3.8	Luciferase-Reportergen-Assay	72
3.8.1	Infektionsversuch für den Luciferase-Reportergen-Assay	72
3.8.2	Zell-Lyse	73
3.8.3	Messung der Luciferase-Aktivität mit dem Dual-Luciferase [®] Reporter Assay	73
3.8.4	Berechnung der Relativen Licht Einheiten (Relative Light Units, RLU)	73

4	ERGEBNISSE	75
4.1	NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit in mit STEC 413/89-1 Wildtyp infizierten HeLa-Zellen und P388D ₁ -Makrophagen	75
4.2	NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit in mit STEC 413/89-1 Wildtyp und STEC 413/89-1 "in frame"-Deletionsmutante <i>ΔespB</i> infizierten ausdifferenzierten murinen Knochenmarksmakrophagen	78
4.3	Determinierung der spezifischen NF- κ B-Dimere in STEC-infizierten ausdifferenzierten murinen Knochenmarksmakrophagen	79
4.4	Infektion/Stimulation von ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen mit STEC 413/89-1 WT und dessen Kulturüberstand unbehandelt und hitze-inaktiviert	81
4.5	Untersuchung der induzierbaren NF- κ B-Aktivierung 23 Stunden nach Infektion mit STEC 413/89-1 Wildtyp in Makrophagen	83
4.6	Untersuchung der NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit in mit STEC 413/89-1 Wildtyp, <i>E. coli</i> HB101 (pMAR7/pCVD462) und <i>E. coli</i> DH5 α (pMAR7) infizierten HeLa-Zellen (ohne und mit TNF- α -Stimulation)	85
4.7	NF- κ B-Reportergen-Assay in STEC infizierten HeLa-Zellen	87
4.8	Untersuchung des nukleo-zytoplasmatischen Shuttlings von NF- κ B durch CRM1/Exportin1	89
4.9	Untersuchung der I κ B- α -Degradation in STEC-infizierten HeLa-Zellen	92
4.9.1	Darstellung der I κ B- α -Degradation in STEC-infizierten HeLa-Zellen	92
4.9.2	Darstellung der I κ B- α -Degradation in STEC-infizierten und anschließend TNF- α -stimulierten HeLa-Zellen	95
4.9.3	Darstellung von I κ B- α und phospho-I κ B- α -Ser32/36 in STEC-infizierten und anschließend TNF- α -stimulierten HeLa-Zellen	97
4.9.4	Darstellung von I κ B- α und phospho-I κ B- α -Ser32/36 in STEC 413/89-1 Wildtyp und STEC 413/89-1 <i>ΔespB</i> infizierten HeLa-Zellen mit anschließender TNF- α -Stimulation nach vorheriger Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor MG132	98
4.10	Nachweis des Transkriptionsfaktors PPAR- β nach STEC-Infektion in P388D ₁ -Makrophagen	101

4.11	Untersuchung der T-Zell-Proliferationsfähigkeit <i>in vitro</i> nach STEC-Infektion im 2-Tages-Mausmodell <i>in vivo</i>	104
5	DISKUSSION	108
5.1	Die Suppression der NF-κB-DNA-Bindungsaktivität durch Infektion mit STEC 413/89-1 wird auch in Makrophagen hervorgerufen	110
5.1.1	STEC 413/89-1 Wildtyp supprimiert die initiale NF- κ B-Aktivierung in P388D ₁ -Makrophagen schneller und effizienter als in HeLa-Zellen	110
5.1.2	Die durch STEC 413/89-1 WT vermittelte NF- κ B-Suppression sinkt während der Infektion in ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen unter das Basalniveau unbehandelter, nicht infizierter Zellen	111
5.2	Wird der NF-κB-supprimierende Faktor von STEC 413/89-1 in den Überstand einer Bakterienkultur sezerniert? Ist die NF-κB-Suppression irreversibel?	113
5.2.1	Nur ein vitales STEC 413/89-1 Wildtyp Bakterium kann NF- κ B supprimieren	113
5.2.2	Die Hemmung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges ist irreversibel	114
5.2.3	Der Locus of Enterocyte Effacement (LEE) ist nicht allein verantwortlich für die NF- κ B-Inhibition durch STEC/EPEC	115
5.3	Auf welcher Stufe hemmt STEC 413/89-1 Wildtyp den NF-κB-Signaltransduktionsweg in eukaryontischen Zellen?	117
5.3.1	STEC 413/89-1 beeinträchtigt nicht die Genregulierung des κ B-Motivs am Gen selbst	117
5.3.2	Der nukleare Export von NF- κ B während der Infektion mit STEC 413/89-1 geschieht unabhängig vom CRM1/Exportin1-Weg	119
5.3.3	STEC 413/89-1 Wildtyp verhindert die Phosphorylierung von I κ B- α	120
5.4	STEC 413/89-1 induziert den Transkriptionsfaktor PPAR-β stärker als der apathogene <i>E. coli</i> K-12 MG1655	124
5.5	Die STEC 413/89-1 Infektion im eukaryontischen Organismus (Balb/C-Maus) – Die Inhibierung der T-Zell-Proliferationsfähigkeit ist nach 48 Stunden Infektion manifest	126

5.6	Ausblick	131
6	LITERATURVERZEICHNIS	133
7	ANHANG	148
7.1	Dezimale Vielfache und Teile von Einheiten	148
7.2	Symbole für Aminosäuren	148
7.3	Relevante griechische Buchstaben	148
	DANKSAGUNG	149
	LEBENS LAUF	151

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	α -Helical domain
AA	Aggregative Adherence
AAF	Aggregative adherence fimbriae
Abb.	Abbildung
A/E	attaching and effacing
APS	Ammoniumpersulfat
AP-1	Activator protein-1
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AR	Ankyrin repeat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BAFF	B-cell activating factor
Bcl	B-cell-leukemia antigen
Bfp	Bundle-forming pili
bp	base pairs
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CC1/2	Coiled-coil domain
CD	Cluster of determination
CD40L	CD40 Ligand
Ces	Chaperone for <i>E. coli</i> secretion of EspD
CFA	Colonization fimbriae
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Ci	Curie
Cif	Cycle inhibiting factor

ConA	Concanavalin A
COOH	carboxy-terminales Ende eines Proteins
cpm	counts per minute
CRM1	Chromosome region maintenance 1
CT	Cholera Enterotoxin
C-terminal	carboxy-terminales Ende eines Proteins
Cul	Cullin
<i>ΔespB</i>	in frame- <i>espB</i> -Deletionsmutante von STEC 413/89-1
DD	Death domain
d = x cm	Durchmesser in cm
DMEM _{HEPES}	DMEM mit HEPES gepuffert
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinacid
ds	double stranded (doppelsträngig)
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen u. Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EAEC	Enteraggregative <i>Escherichia coli</i>
EAF-Plasmid	EPEC adherence factor-plasmid
EAST1	Enteraggregative <i>E. coli</i> heat-stable enterotoxin 1
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ECL	Enhanced chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECSIT	Evolutionary conserved signaling intermediate in toll pathways
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-(aminoethylether)-Tetraessigsäure
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
ELAM	Endothelial leucocyte adhesion molecule
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELKS	Protein, das reich ist an folgenden konstitutiven Aminosäuren: Glutaminsäure (E), Leucin (L), Lysin (K), und Serin (S)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
Esc	<i>E. coli</i> secretion
Esp	<i>E. coli</i> secreted protein
ETEC	Enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
FCS	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
Femur	Oberschenkelknochen
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
G	Guanin
gk	Gentamicin killed (Gentamicin getötet)
GRR	Glycine-rich region
H ₂ O _{dest.}	Destilliertes Wasser
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
hi	hitzeinaktiviert (z.B. FCS)
HLH	Helix-loop-helix domain
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
Ig	Immunglobulin
IFN-β	Interferon β
IκB	Inhibitor of NF-κB
IKK	IκB kinase
IL-1	Interleukin 1
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IL-1RAcP	IL-1R Accessory protein
IRAK	Interleukin-1 receptor associated kinase
IRF3	Interferon-regulatory factor 3
K	Abkürzung der Aminosäure Lysin
kB	Kilobasen

kDa	Kilodalton
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria Bertani
LBP	LPS-binding protein
LEE	Locus of enterocyte effacement
Ler	LEE-encoded regulator
LMB	Leptomycin B
LPS	Lipopolysaccharid
LT	hitzelabiles Toxin
LT- α/β	Lymphotoxin α/β
LU	Light Units (Licht Einheiten)
Lys	Lysin
LZ	Leucine zipper
M	Molar
mA	Milliampere
Map	Mitochondrion-associated protein
MAP	Mitogen-activated protein
MAP3K	MAP kinase kinase kinase
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor
MEKK3	MAP kinase kinase kinase 3
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
mM	Millimolar
μ M	Mikromolar
MOI	Multiplicity of infection
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
N	steht in Sequenzen für irgendeine Base
NaCl	Natriumchlorid
NBD	Nemo binding domain
NEA	Non essential amino acids
NEMO	NF- κ B essential modifier

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NES	Nuclear export signal
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
NF- κ B1	p50 und sein Vorläuferprotein p105
NF- κ B2	p52 und sein Vorläuferprotein p100
NH ₂	amino-terminales Ende eines Proteins
NI	non infected (unbehandelt, nicht infiziert)
NIK	NF- κ B-inducing kinase
NLS	Nuclear localization sequence
N-terminal	amino-terminales Ende eines Proteins
O127:H6	Serotypenbezeichnung
OD	Optische Dichte
Orf	Open reading frame
p65	Synonym für RelA
p.A.	pro Analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEST-Sequenz	Proteinbereich, der reich ist an den Aminosäuren: Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T)
pi	post infectionem
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PHA	Phytohämagglutinin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	Peroxisome-proliferator activated receptor
PPRE	PPAR responsive element
PRR	Pattern recognition receptor
Pu	Purin-Base
Py	Pyrimidin-Base
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand

RHD	Rel homology domain
RIP	Receptor-interacting protein
RLU	Relative Light Units (Relative Licht Einheiten)
RNA	Ribonucleinacid
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid-X Receptor
SCF ^{βTrcP}	Skp1/Cul1/F-box ubiquitin E3 ligase komplex; β-Transducin repeat-containing Protein (Untereinheit von SCF)
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Sep	Secretion of <i>E. coli</i> proteins
Ser	Serin
SODD	Silencer of death domain
ss	single stranded
ST	hitzestabiles Toxin
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STEC	Shiga Toxin-produzierende <i>Escherichia coli</i>
Stx	Shiga Toxin
TAB	TAK binding protein
TAD	Transactivation domain
TAK	TGF-β-activated kinase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris Buffered Solution
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF-β	Transforming-growth-factor β
Tir	Translocated intimin receptor
TIR	Toll/IL-1R Domäne
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TOLLIP	Toll interacting protein
TRADD	TNF-Receptor associated via death domain
TRAF	TNF-Receptor associated factor
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRIF	Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN- β
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TTSS	Typ-III-Sekretions-System
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolette Licht
V	Volt
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp (gemeint ist damit der wildtypische Stamm STEC 413/89-1)
Ysc	Yersinia type III secretion
Z	Zink finger domain
z.B.	zum Beispiel
ZK	Zellkultur

ZUSAMMENFASSUNG

Die Erforschung der Infektionsstrategien pathogener Darmbakterien stellt einen wichtigen und notwendigen Beitrag zum Verständnis der Infektion, die diese Erreger hervorrufen, dar. Von besonderer Bedeutung sind dabei Keime, die im Tierwirt keine Symptome hervorrufen, im Menschen jedoch schwerwiegende Krankheitsbilder verursachen. Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli* (STEC) gehören zu diesen Erregern. Sie schädigen ihren Wirt, ähnlich wie *Yersinia* spp. und *Salmonella* spp., indem sie die wirtseigene Immunantwort durch Modulation von eukaryontischen Signaltransduktionswegen inhibieren. Dies wird ihnen durch in ihr Genom inserierte Pathogenitätsinseln, die für Virulenzfaktoren kodieren, ermöglicht, wodurch sie sich von apathogenen *Escherichia coli* unterscheiden, die solche Faktoren und Inseln nicht besitzen.

Die vorliegende Arbeit dient der Aufklärung des molekularen Infektionsmechanismus von STEC sowie der Untersuchung der pathobiologischen Bedeutung der STEC-Infektion für die angeborene Immunität. Die Untersuchungen basieren auf der von STEC hervorgerufenen Suppression des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Epithelzellen, der die Transkription proinflammatorischer Zytokine initiiert und damit eine Proinflammation auslöst.

So zeigte sich, dass diese NF- κ B-Suppression nach STEC-Infektion auch in Zellen, die der angeborenen Immunität angehören – Zellen der etablierten murinen makrophagen-ähnlichen Zelllinie P388D₁ und ausdifferenzierte primäre Knochenmarksmakrophagen –, entsteht. Auffällig war dabei, dass die initiale NF- κ B-Aktivierung und die anschließende Suppression in den Immunzellen wesentlich schneller und effizienter erfolgte als in den Epithelzellen. Somit ist die Inhibierung der Proinflammation kein Epithelzell-spezifisches Ereignis. Sie scheint vielmehr ein genereller Mechanismus für den Erreger zu sein. Auch die initiale NF- κ B-Aktivierung scheint nicht nur eine Reaktion der Wirtszellen auf 'Pathogen-associated molecular patterns' (PAMPs), sondern vielmehr ein nötiger Mechanismus des Bakteriums zu sein, um letztendlich eine vollständige NF- κ B-Suppression herbeiführen zu können. Diese ist irreversibel, so dass auch nachfolgend, für mindestens 25 Stunden, keine Stimulation der Zellen mit bekannten NF- κ B-aktivierenden Substanzen (LPS, TNF- α) mehr möglich ist.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann mit Sicherheit gesagt werden, dass der bakterielle Faktor, welcher die Inhibierung der NF- κ B-aktivierenden Signaltransduktionswege bewirkt, nicht in den bakteriellen Kulturüberstand abgegeben, sondern direkt aus

dem bakteriellen Zytoplasma in das Zytoplasma der Wirtszelle transloziert wird. Folglich können nur lebende STEC-Bakterien die Suppression von NF- κ B herbeiführen.

Die am besten untersuchte Pathogenitätsinsel (PAI) von STEC (sowie EPEC und EHEC) ist der 'Locus of enterocyte effacement' (LEE). Auf ihm ist das komplette Typ-III-Sekretions-System (TTSS), durch welches Effektoren aus der Bakterienzelle in die Wirtszelle transloziert werden können, lokalisiert. Ursprünglich nahm man an, dass der Effektor, der für die NF- κ B-Suppression verantwortlich ist, auch auf dieser PAI liegt. Mit Hilfe von apathogenen *E. coli*, die den klonierten LEE von EPEC E2348/69 in sich tragen, konnte gezeigt werden, dass dies nicht der Fall ist. Das entscheidende Molekül muss demnach entweder von einer anderen PAI oder dem übrigen Genom kodiert werden. Dennoch wird der LEE benötigt, damit das TTSS aufgebaut und der Effektor transloziert werden kann.

Von viel größerem Interesse war jedoch die Stufe der zur NF- κ B-Aktivierung führenden Signaltransduktionswege, die vom Bakterium moduliert wird. Durch die systematische retrograde Untersuchung konnte gezeigt werden, dass das κ B-Motiv durch die STEC-Infektion nicht beeinträchtigt wird. Das in der Literatur beschriebene CRM1/Exportin1-abhängige nukleo-zytoplasmatische 'Shuttling' von NF- κ B konnte weder für unbehandelte, nicht infizierte noch für STEC infizierte HeLa-Zellen beobachtet werden. Demnach scheint der Rücktransport von NF- κ B aus dem Kern in das Zytoplasma CRM1/Exportin1-unabhängig zu verlaufen. Die eingehende Untersuchung der I κ B- α -Phosphorylierung zeigte eindeutig, dass I κ B- α im Verlauf der STEC-Infektion nicht mehr phosphoryliert wird. Daher muss die Stufe, auf der die Inhibierung von NF- κ B-aktivierenden Signaltransduktionswegen durch STEC stattfindet, oberhalb von I κ B- α liegen, was zukünftig noch zu eruieren ist.

Die Untersuchungen erweiterten sich auf den antiinflammatorischen Transkriptionsfaktor PPAR- β . Dessen stärkere Induktion durch STEC, als durch den apathogenen *E. coli* K-12 MG1655, lässt darauf schließen, dass nicht nur die Inflammation der Zelle gehemmt, sondern im Gegenzug die Antiinflammation aktiviert wird, was die Suppression der Inflammation durch den Erreger unterstützen würde.

Mit den durchgeführten Mausinfektionsversuchen konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit dem STEC 413/89-1 Wildtyp, im Gegensatz zur Infektion mit STEC 413/89-1 Δ espB, starke Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens der infizierten Mäuse bewirkt. Die parallel dazu festgestellte Inhibierung der T-Zell-Proliferationsfähigkeit scheint somit

die Hypothese zu stützen, dass die Signalweitergabe der Makrophagen auf die T-Zellen durch die Infektion mit STEC WT beeinträchtigt ist.

SUMMARY

The investigation of infectious strategies of pathogenic gut bacteria represents an important and necessary contribution to the understanding of the infection caused by these pathogens. These bacteria are of particular interest because they do not cause any symptoms in their animal host but result in severe clinical manifestations in human. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) are an example of such bacteria. Like *Yersinia* spp. and *Salmonella* spp., STEC inhibits the host specific immune response by modulating the eukaryotic signal transduction pathways using factors encoded on pathogenicity islands (PAI). Pathogenicity islands are discrete genetic elements that usually reside on the genome of pathogenic forms of *Escherichia coli*.

The present study examines molecular mechanism of STEC infection and investigates the pathobiological meaning of the STEC infection for innate immunity. The analyses are based on the STEC-dependent suppression of the transcription factor NF- κ B in epithelial cells. NF- κ B initiates the transcription of proinflammatory cytokines and thereby triggers the proinflammation.

It was shown that NF- κ B suppression after infection with STEC is also a property seen in primarily involved in innate immunity i.e. either cells of the established murine macrophage-like cellline P388D₁ or bone marrow derived macrophages. It was conspicuous that initial NF- κ B activation and subsequent suppression were faster and more efficient in the immune cells than in the epithelial cells. Thus the inhibition of the proinflammation is not an epithelial cell specific event. It seems rather to be a general mechanism for the pathogen. Also the initial NF- κ B activation seems not to be only a reaction of the host cell against pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) but also a necessary mechanism of the bacterium to finally lead to complete NF- κ B suppression. This suppression is irreversible and no stimulation of the cells with well known NF- κ B activators (LPS, TNF- α) is possible for at least 25 hours.

From studies reported here it is now clear that the bacterial factor which causes the inhibition of the NF- κ B activating signal transduction pathway is not secreted into the bacterial culture supernatant but translocated directly from the bacterial cytoplasm into the cytoplasm of the host. Thus, only live STEC-bacteria are able to induce the NF- κ B suppression.

The best analyzed PAI of STEC (both in EPEC and EHEC) is the 'Locus of enterocyte effacement' (LEE). It encodes the complete Type-III-secretion-system (TTSS), which is used for translocating effectors out of the bacterium into the host cell. Originally the effector responsible for the NF- κ B suppression was thought to be located on this PAI. With the help of an apathogenic *E. coli* containing the cloned LEE from EPEC E2348/69, it was shown that this is not true. The crucial molecule must either be encoded by a gene on another PAI or present in the rest of the genome. The LEE is however needed for constructing the TTSS and translocating the effector.

Of much more interest was the step of the signal transduction pathways leading to NF- κ B activation and modulated by the bacterium. We showed by systematic retrograde investigations of the NF- κ B pathway that the κ B motive was not impaired by the STEC infection. In the literature a CRM1/Exportin1-dependend nucleo-cytoplasmic shuttling of NF- κ B has been described. We did not observe such an effect with either untreated, non-infected nor with STEC infected HeLa cells. Therefore, the transport of NF- κ B out of the nucleus into the cytoplasm seems to be independent of CRM1/Exportin1. The detailed investigations of the I κ B- α phosphorylation demonstrate unequivocally that I κ B- α is not phosphorylated during the STEC infection. Thus the step of the NF- κ B activating signal transduction pathway by STEC must be upstream of I κ B- α . However, future studies are required for further details.

The investigations were extended to the anti-inflammatory transcription factor PPAR- β . STEC was able to induce the expression of this factor much more than the apathogenic *E. coli* K-12 MG1655. This suggests that not only the inflammation of the cell is inhibited but in the counterpart the anti-inflammation is activated. This would assist the suppression of inflammatory processes initiated by the pathogen.

We showed with mouse infection experiments that infection with STEC 413/89-1 wild type in contrast to infection with the STEC 413/89-1 *AespB* results in a strong reduction of the general state of health of the infected mice. The observation that inhibition of the T-cell-proliferation capability occurs, seems to support the hypothesis that the signal transduction from the macrophages to the T-cells is affected by the infection with STEC wild type.

1 EINLEITUNG

1.1 Enteropathogene *Escherichia coli* – Allgemeines

Escherichia coli sind Gram negative, meist bewegliche, fakultativ anaerobe, stäbchenförmige Bakterien, welche zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören [2]. Sie wachsen auf herkömmlichen Agar- oder Blutnährböden bei 37°C und lassen sich daher leicht kultivieren. Ihr natürlicher Lebensraum ist der Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier. Daher gilt *E. coli* auch als Indikatorkeim für fäkale Verunreinigungen von Wasser und Lebensmitteln.

Als nicht-pathogenes Bakterium ist es Teil der intestinalen Normalflora und trägt somit wesentlich zu deren Homöostase bei. Gelangen jedoch diese Keime in Wunden oder andere Organsysteme, so rufen sie dort Infektionen in Form von Entzündungen hervor.

Neben nicht-pathogenen *E. coli*, die typischerweise den Darm kolonisieren, existieren jedoch auch pathogene *Escherichia coli*, die neben verschiedenen Formen der Enteritis auch Infektionen des Urogenitaltraktes sowie Meningitiden und Sepsis hervorrufen. *E. coli* werden anhand verschiedener Antigenstrukturen eingeteilt. Dabei bildet jedes O-Antigen, welches spezifische Polysaccharidketten des Lipopolysaccharid-Komplexes der äußeren Membran darstellt, eine eigene Serogruppe. H-Antigene charakterisieren Proteine der Geißelantigene. Die Antigene der Kapseln werden als K-Antigene bezeichnet und bestehen aus linearen Polymeren der äußeren Membran, die aus sich repetierenden Kohlenhydrateinheiten, gelegentlich auch Proteinen, aufgebaut sind. Sie können die Bakterienzelle dicht bedecken und eine O-Inagglutinabilität bedingen. Die spezifische Kombination aus O- und H-Antigenen definieren einzelne Serotypen. Im modifizierten Kauffman-Schema sind alle derzeit bekannten Serotypen aufgelistet [3].

Die Einteilung der pathogenen *E. coli* erfolgt aufgrund ihres jeweiligen Serotyps und ihrer jeweiligen Infektionsstrategien und -mechanismen. So unterscheidet man "Enterotoxische *E. coli*" (ETEC), "Enteropathogene *E. coli*" (EPEC), "Enterohämorrhagische *E. coli*" (EHEC), "Enteroaggregative *E. coli*" (EAEC) und "Enteroinvasive *E. coli*" (EIEC) [3]. Ähnlich anderen, die Schleimhaut besiedelnde, Keimen, haben *E. coli* notwendige Strategien zur Haftung ihrer Infektion entwickelt. Unzweifelhaft steht die Kolonisierung der Mukosa an erster Stelle. Dem folgt zumeist die Umgehung der Wirtsabwehr mit anschließender Vermehrung des Erregers und abschließender Schädigung des Wirtes. Gerade die letztgenannten Punkte, die man als pathogene Strategien bezeichnen muss,

variieren bei den einzelnen *E. coli*s: die Bildung und Sezernierung von Enterotoxinen ist typisch für ETECs und EAECs, EIECs bedienen sich des Mittels der Invasion, wohingegen EPECs und EHECs durch enge Haftung an die Wirtszelle mit anschließender Translokation von bakteriellen Proteinen ihren Wirt schädigen [4].

Um diese doch sehr unterschiedlichen Strategien ausführen zu können, muss das Genom pathogener *E. coli* sehr vielseitig sein. Daher besitzt es zwei prinzipielle genetische Konfigurationen: chromosomale Pathogenitätsinseln (z.B. LEE) und Virulenz-Plasmide (z.B. EAF-Plasmid [5-7]). Das Shiga-Toxin (Stx) der STEC wird durch Phagen kodiert [8].

1.2 ETEC, EAEC und EIEC

Enterotoxische *E. coli* (ETEC) sind durch die Bildung von Enterotoxinen charakterisiert [9]. Je nach Stamm werden entweder ein hitzelabiles (LT-I, LT-II) und/oder ein hitzestabiles (STa, STb) Toxin gebildet und nach Kolonisation der Mukosa abgegeben. Das LT weist große Ähnlichkeit mit dem Cholera Enterotoxin (CT) von *Vibrio cholerae* auf [10]. Sein Molekulargewicht beträgt 86 kDa. Es aktiviert in der Wirtszelle die Adenylatcyclase, was zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration und somit zur Sekretion von Chlorid-Ionen und der Inhibierung der NaCl-Absorption führt [11]. Es liegt eine osmotische Diarrhoe vor. Im Gegensatz dazu wirkt das kleinere ST (2-5.1 kDa) schnell. Sein Rezeptor ist die Guanylatcyclase C, die durch Aktivierung eine Erhöhung der cGMP-Konzentration bewirkt, was ebenfalls zu einer erhöhten Chlorid-Ionen-Sekretion und/oder inhibierten NaCl-Resorption führt, die eine intestinale Flüssigkeitssekretion nach sich zieht [12]. Die Enterotoxine sind, wie die Kolonisierungsfaktoren, Plasmid-kodiert. Die Kolonisierungsfaktoren sind Oberflächenfimbrien (CFA), die an den Enterozyten des Dünndarmes haften [13]. ETECs sind der Auslöser von Kleinkinderdiarrhöen in Entwicklungsländern und der so genannten Reise-Diarrhö.

Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) produzieren per definitionem keine Enterotoxine (LT, ST) und haften an HEp-2-Zellen im Muster der Aggregative Adherence (AA) [14]. Die AA zeichnet sich durch eine prominente Autoagglutination der Bakterienzellen untereinander aus. Sie steigern die Schleimproduktion der Mukosa und schließen sich in einen Bakterien-Schleim-Biofilm ein. Es entsteht eine Verkürzung der Villi mit hämorrhagischer Nekrose der Villispitzen, sowie Ödembildung und mononukleare Infiltration der Submukosa [4]. Der AA-Phänotyp wird durch Adhärenzfaktoren, die auf einem 60-MDa-Plasmid liegen,

kodiert: die aggregative adherence fimbriae (AAF/I, AAF/II) sind flexible, Bündel formende Fimbrienstrukturen mit einem Durchmesser von 2 bis 3 nm [15]. Während die AAF/I von allen EAEC gebildet werden, werden die AAF/II nur von einer Minderheit der EAEC exprimiert. Es ist möglich, jedoch noch nicht bekannt, dass auch andere Adhärenzfaktoren an der Ausbildung des EAEC-Biofilms beteiligt sind. Auch wenn EAEC nach derzeitigem Stand der Wissenschaft keine Enterotoxin-Bildner sind, wird eine ST-Homolog, das Enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin (EAST1), sowie ein weiteres Zytotoxin für EAEC beschrieben.

Derzeit besteht folgendes 3-Stufen-Pathogenese-Modell:

1. initiale Anheftung der Keime an die Darmmukosa und/oder den Mukus (AAF/I und AAF/II sind dafür möglicherweise verantwortlich);
2. erhöhte Mukusproduktion, die zu einer Ablagerung eines dicken Mukus-EAEC-Biofilm führt;
3. Bildung eines Zytotoxins, das zu einer Schädigung der Darmzellen führt.

Auch dieses Pathovar spielt bei Säuglingsinfektionen in Entwicklungsländern eine Rolle [4]. Daneben konnte eine Zunahme von Lebensmittelinfektionen in anderen Ländern mit diesem Erreger beobachtet werden.

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) sind biochemisch, genetisch und pathogenetisch mit *Shigella* spp. eng verwandt und dringen in die Wirtszellen ein. Sie sind generell Lysin-Decarboxylase negativ, nicht-beweglich und Laktose negativ.

Das derzeit bekannte Pathogenese-Modell sieht wie folgt aus [16, 17]:

1. Penetration der Epithelzellen;
2. Lyse der endozytischen Vakuole;
3. intrazelluläre Vermehrung;
4. gerichtete Bewegung durch das Zytoplasma;
5. Ausdehnung in angrenzende Epithelzellen.

Die inflammatorische Reaktion der Wirtszellen endet in deren Ulzeration. EIEC besitzen, so wie nicht-*Shigella sonnei Shigella*-Serotypen, ein 140-MDa-Plasmid, welches Gene für ihre Invasivität trägt [18]. Es werden ein Homolog zum Typ-III-Sekretions-System von EPEC und EHEC, sowie sezernierte Proteine, vor allem Effektoren des invasiven Phänotyps angenommen [19]. Klinisch äußert sich die Infektion mit EIEC zuerst in einer wässrigen Diarrhö, gefolgt von eher kleinen Mengen ruhrähnlichem Stuhl, der Blut und Schleim enthält.

1.3 EPEC und STEC/EHEC – A/E-Läsionen formende Darmpathogene

Enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC) und enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC), welche eine Untergruppe der Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli* (STEC) darstellen, zählen zu den “attaching and effacing (A/E)“-Läsionen verursachenden darmpathogenen *E. coli*. Generell können EPECs und EHECs in insgesamt 4 Gruppen unterteilt werden: EPEC 1 (H6) und EPEC 2 (H2, non-motile), sowie EHEC 1 (O157:H7, enger verwandt mit dem atypischen EPEC O55:H7) und EHEC 2 (O26 und O111, enger verwandt mit typischen EPECs) [20].

Als Gemeinsamkeit haben sie die Fähigkeit, A/E-Läsionen hervorzurufen (siehe 1.3.3 [21-25]). Im Unterschied zu STEC/EHEC besitzen EPEC zusätzlich den Virulenzfaktor *bfp*, welcher die bundle-forming pili kodiert und somit für die initiale Anheftung der Bakterien verantwortlich ist. Dieser liegt auf dem 50-70 MDa EPEC adherence factor (EAF)-Plasmid [5, 6]. Des Weiteren können EPECs kein Shiga Toxin (STEC) und kein Hämolysin (EHEC) bilden. Die mitunter sehr schnell (innerhalb von drei Stunden [26]) eintretende Diarrhö bei EPEC-Infektionen scheint eine Folge des Mikrovilli-Verlustes zu sein, der mit einer Malabsorption einhergeht. Dabei scheint der signifikante Abfall des transmembranen Potentials den Influx von positiv oder den Efflux von negativ geladenen Ionen zu fördern. Die meisten Untersuchungen zu dem Geno- und Phänotyp der A/E-Läsionen wurden an dem humanen EPEC E2348/69 (O127:H6) und humanen EHEC EDL933 (O157:H7) durchgeführt. Daher gelten diese beiden Stämme als Prototypen für EPECs und EHECs. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente erfolgten mit dem bovinen STEC 413/89-1 (O126:H-) [27].

1.3.1 Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli* (STEC)

Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli* (STEC) gehören zur Gruppe der Enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). Sie stellen als Erreger schwerwiegender gastrointestinaler Erkrankungen weltweit ein bedeutendes Gesundheitsrisiko dar [28]. Das durch STEC verursachte Krankheitsbild reicht von wässrigen und wässrigblutigen Durchfällen bis hin zum lebensbedrohlichen hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS), welches durch drei Zustände definiert wird: akutes Nierenversagen - Thrombozytopenie - mikroangiopathische, hämolytische Anämie. Dies ist auf die nierenschädigende Wirkung

des in die Zirkulation gelangten Shiga Toxins zurückzuführen. Trotz der systemischen Implikationen bleibt die STEC-Infektion auf das Darmepithel begrenzt.

In den letzten 15 Jahren wurden die Virulenzfaktoren von EPEC und STEC/EHEC bereits weitreichend, jedoch nicht erschöpfend, untersucht. Die meisten Ergebnisse liegen uns heute für EPEC vor. Jedoch kann man diese auch auf STEC übertragen, da es in weiten Teilen Homologien zwischen den beiden Erreger-Gruppen gibt.

1.3.2 "Locus of Enterocyte Effacement" (LEE)

Ausgehend von dem Phänotyp der "attaching and effacing (A/E)"-Läsionen, identifizierten McDaniel *et al.* 1995 einen Locus im EPEC (EPEC E2348/69) und EHEC (EDL933) Genom, jedoch nicht im apathogenen *E. coli*-Stamm K-12, der neben anderen Faktoren auch das Gen für den Rezeptor Intimin enthält. Sie nannten diese Pathogenitätsinsel (PAI) Locus of Enterocyte Effacement, kurz LEE [29]. Er ist beispielhaft für Pathogenitätsinseln und ist sowohl in weiteren EPEC- als auch STEC-Stämmen [30] sowie im Genom von *Citrobacter rodentium* und *Hafnia alvei* inseriert [4, 31, 32]. Drei Jahre später, 1998, bestimmten Elliott *et al.* die gesamte DNA-Sequenz des LEE von EPEC E2348/69, welcher 35624 bp groß ist und 41 offene Leserahmen (open reading frames, Orf), die in 10 Operons (*LEE1* - *LEE10*) gruppiert sind, enthält [33]. Der LEE von STEC 413/89-1 weist eine Größe von 59.4 kB auf und befindet sich bei 94 min auf dem *E. coli* Chromosom im *pheU*-trNS-Locus [34, 35].

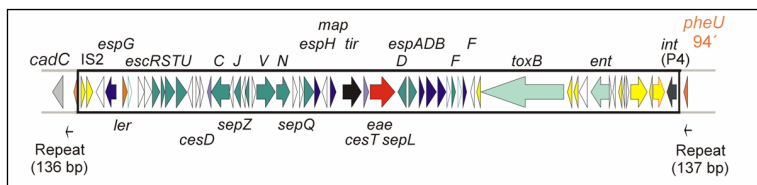


Abb. 1-1:
Locus of Enterocyte Effacement (LEE) von STEC 413/89-1.

Die wichtigsten Operons sind *LEE1*, *LEE2*, *LEE3*, *tir/LEE5* und *LEE4*. *LEE1* - *LEE3* kodieren vor allem für die Gene des TTSS (*esc* und *sep*). Der LEE-encoded regulator (Ler) befindet sich ebenfalls in *LEE1* und wird zur Expression der LEE Operons *LEE2* bis *LEE5* sowie von *espF*, *espG* und *map* benötigt [36]. *LEE5* kodiert die Rezeptoren Intimin (*eae*)

1 EINLEITUNG

und Tir (*tir*, Translocated intimin receptor) und *LEE4* die *Escherichia coli* secreted proteins (*esp*). Das Mitochondrion-associated protein Map (*map*) erhielt seinen Namen, da es in der eukaryontischen Zelle um die Mitochondrien anzutreffen ist [35]. Man nimmt an, dass es das mitochondriale Membranpotential unterbricht, was typisch für Erreger ist, die Apoptose induzieren [37]. Wainwright und Kaper zeigten 1998, dass ein weiteres Protein, welches durch den LEE kodiert wird, *cesD* (Chaperone for *E. coli* secretion of EspD), als Sekretions-Chaperon für EspD dient und ebenfalls für die komplette extrazelluläre Sekretion von EspB benötigt wird [38].

Untersuchungen zur Homologie der LEE zwischen EPEC E2348/69 und EHEC EDL933 zeigten vor allem im Bereich der Gene, die für das TTSS kodieren, nahezu 100%-ige Übereinstimmungen, wohingegen die Homologien zwischen den Esp-kodierenden Genen weniger stark ausgeprägt sind [20].

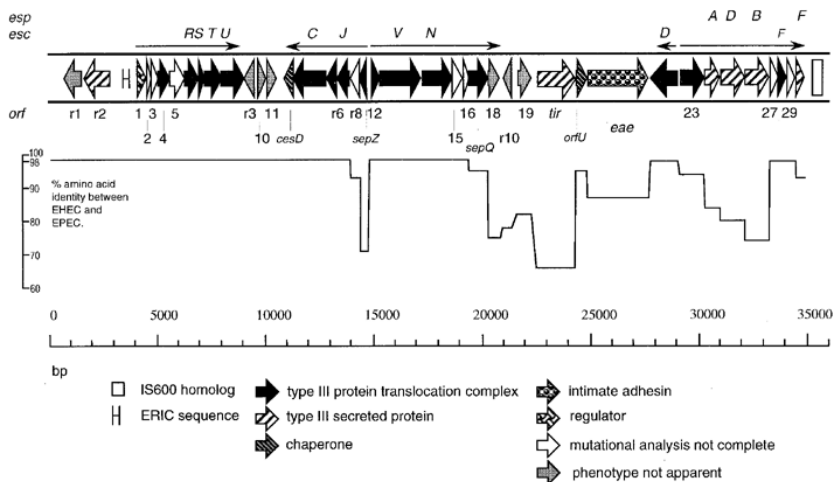


Abb. 1-2:

Darstellung der EPEC und EHEC Homologie-Bereiche in der Pathogenitätsinsel LEE. Entnommen aus [20].

Dies lässt darauf schließen, dass die Erreger im Laufe ihrer Evolution die Strategien zur Virulenz und Überlebensfähigkeit erweitert und sich den gegebenen Umständen angepasst haben.

1.3.2.1 Typ-III-Sekretions-System (TTSS)

Die Sekretionssysteme der Gram negativen Bakterien zählen zu den Sekretions-Signalwegen. Neben bisher vier (Typ I - IV) definitiv beschriebenen, wird auch noch ein weiteres (V), bisher wenig untersuchtes, diskutiert [39].

Typ-III-Sekretions-Systeme sind meist in die Virulenz und Proteinsekretion von tierischen und pflanzlichen Pathogenen involviert. Dabei stellt das Typ-III-Sekretions-System (TTSS) eine direkte Verbindung zwischen Pathogen und Wirtszelle dar. Es wird durch bislang 10 identifizierte verschiedene Gene des LEE kodiert. Ursprünglich wurden diese Gene als *sep* (secretion of *E. coli* proteins) bezeichnet, später jedoch in *esc* (*E. coli* secretion) umbenannt. Diese etwas verwirrende Namensgebung resultiert aus früheren Untersuchungen in *Yersinia* spp. Dabei stellen die *esc* Homologe zu den *ysc* (*Y*ersinia type III secretion) dar. Gene, die keine Homologie zu *ysc* haben, aber in die Typ-III-Sekretion (TTS) involviert sind, werden nach wie vor als *sep* bezeichnet.

Zu den *esc* (alte Bezeichnung) zählen *escC* (*sepC*), *escD* (*sepD*), *escF* (*orf28*), *escJ* (*sepD*), *escN* (*sepB*), *escR* (*sepI*), *escS* (*sepH*), *escT* (*sepG*), *escU* (*sepF*) und *escV* (*sepA*). Augenblicklich sind vier Sep-Proteine bekannt: SepD, SepL, SepQ und SepZ. All diese Proteine sind an der TTSS Biogenese beteiligt, wobei die genaue Funktion jedes einzelnen noch nicht für alle genau geklärt ist. Man weiß, dass EscV, ein 72 kDa großes Protein, an der inneren Bakterienmembran verankert ist, wohingegen EscC (56 kDa) und EscD (110 kDa) in der äußeren Bakterienmembran eingelagert werden. EscN (31.5 kDa) besitzt eine ATP/GTP-Bindungsstelle und liefert das nötige ATP zur Proteinsekretion. Von SepD und SepL wird berichtet, dass sie zur effizienten Sekretion des Translokationsapparates benötigt werden, miteinander interagieren und an der Ausbildung der A/E-Läsionen beteiligt sind [40, 41].

Weitere Bestandteile des TTSS sind die so genannten "*E. coli* secreted proteins" (Esp) EspA, EspB und EspD.

1.3.2.2 *Escherichia coli* secreted proteins (Esp)

Die *Escherichia coli* secreted proteins (Esp) werden durch die LEE-kodierten *esp*-Gene gebildet. Bis heute sind folgende Esps bekannt: EspA, EspB, EspD, EspE (Tir), EspF, EspG und EspH. Sie stellen sowohl Translokatoren (EspA, EspB und EspD) als auch Effektoren (EspB, EspF, EspG und EspH) dar. Deibel *et al.* (1998) beschrieben EspE als

ein direkt in die Wirtszelle transloziertes und dort Tyrosin-phosphoryliertes 90 kDa Protein [42]. Fast zeitgleich wurde von Kenny *et al.* (1997) ein EPEC-Protein beschrieben, welches identisch mit Hp90 ist und als Rezeptor für das bakterielle Intimin fungiert, indem es in die eukaryontische Zellmembran eingebaut wird [43]. Man gab diesem Protein den Namen Tir für Translocated intimin receptor. Zwischen EspE und Tir herrscht eine hohe Homologie (66.9% identische Reste), so dass davon auszugehen ist, dass es sich bei EspE um ein EPEC-Tir-Homologon handelt. Im Weiteren wird daher nicht mehr von EspE, sondern nur noch von Tir gesprochen. Spätere Untersuchungen ergaben, dass das Gen, welches Tir kodiert, auf einem eigenen Orf (*LEE5*) liegt. Im Gegensatz dazu liegen die Esps A, B und D, die an der Ausprägung des TTSS beteiligt sind auf einem andern Orf (*LEE4*). Untersuchungen zu EspF ergaben, dass dieses Protein nicht an Adhärenz, Ausbildung des TTSS, Sekretion von Proteinen und Bildung der A/E-Läsionen beteiligt ist. Es scheint, dass es als typischer Effektor am Zelltod (Apoptose und Nekrose) mit verantwortlich ist [44]. Welche Funktion EspG, ein 44 kDa Protein, hat, ist bislang noch unbekannt [45].

Besondere Bedeutung kommt EspA, EspB und EspD zu. EspA ist eine filamentöse Struktur, die in vitro von EPEC und STEC/EHEC nur in Zellkulturmedien exprimiert wird und einen Durchmesser von ~ 50 nm und eine Länge von bis zu 2 µm aufweist [46]. Es ist eine direkte tubulöse Verbindung zwischen Erreger und Wirtszelle, durch die die Effektorproteine in die eukaryontische Zelle transloziert werden. EspB und EspD werden ebenfalls durch diesen Translokations-Kanal geschleust und bilden in der Zellmembran eine Pore, womit ein geschlossenes System entsteht. Es scheint, dass EspB neben der Funktion als Translokator auch noch als Effektor wirkt [46-51], dessen Effekt jedoch noch unbekannt ist.

Nach der Ausbildung dieses Sekretions-Komplexes können Effektoren und vor allem der Rezeptor Tir in die Wirtszelle transloziert werden.

1.3.2.3 "Attaching and effacing" (A/E)

"Attaching and effacing" (A/E) stellt ein typisches histopathologisches Merkmal von EPEC und STEC/EHEC dar. Hierunter versteht man die lokale Rückbildung der Mikrovilli der Enterozyten ("effacement") sowie die enge bakterielle Anheftung an die eukaryontische Oberfläche ("intimate attachment") unter Ausbildung podestartiger Aktinstrukturen (A/E-Läsionen). Für die Ausprägung der A/E-Läsionen wird sowohl ein intaktes Typ-III-

Sekretions-System als auch ein Translokationsapparat, der durch die *Escherichia coli* secreted proteins A, B und D generiert wird, benötigt. Die Pathogenese erfolgt bei EPEC und STEC/EHEC in gleicher Weise. Der große Unterschied zwischen beiden Erregergruppen besteht in der initialen Anheftung der Bakterien. Nur EPEC besitzen das EAF-Plasmid, welches das *bfp*-Gen für die Bildung der bundle-forming pili kodiert. STEC/EHEC fehlt dieser Adhärenzfaktor.

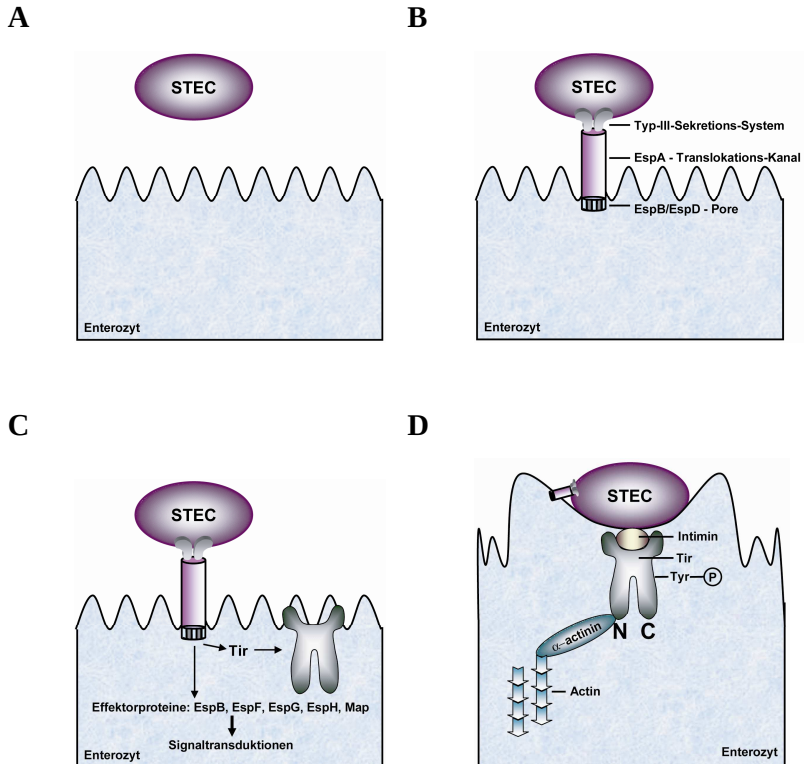


Abb. 1-3:
Ablauf der Adhäsion von STEC und Entstehung von A/E-Läsionen, Details siehe Text.

Nach initialer Kontaktaufnahme des Bakteriums mit der Wirtszelle (Abb. 1-3 A) bildet der Erreger das Typ-III-Sekretions-System in seiner inneren und äußeren Membran aus. Hier hinein wird die Translokations-Röhre (EspA) inseriert. Nun können die ersten Proteine zur Wirtszelle transloziert werden. Dies sind EspB und EspD, welche eine Pore in der Wirtszellmembran formieren (Abb. 1-3 B). Durch das vollständig ausgebildete Trans-

lokations-System wird als erstes der Intimin-Rezeptor Tir geschleust (Abb. 1-3 C). Und dies ist sozusagen einmalig in der Bakterienwelt: der Erreger synthetisiert einen eigenen Rezeptor, den er in die Wirtszelle transloziert und der sich dort in die Zellmembran einlagert, um engen Kontakt zur Wirtszelle aufnehmen zu können. In der Wirtszelle angelangt, wird Tir an Tyrosin-Resten phosphoryliert und somit aktiviert. Nun kann das bakterielle Adhäsın Intimin an seinen Rezeptor binden (Abb. 1-3 D). Somit ist eine feste und dauerhafte Anheftung gegeben ("attaching"). Parallel dazu erfolgt die lokale Rückbildung der Mikrovilli der Enterozyten ("effacement") sowie eine Umstrukturierung des Aktinzytosklets unter Bildung von charakteristischen podestartigen Strukturen.

1.4 Signaltransduktion

Signaltransduktionswege (engl. Signal transduction pathways) sind für eukaryontische Zellen überlebenswichtige, molekularbiologische Reaktionen, die es Zellen ermöglichen, auf einwirkende Reize zu reagieren. Sie werden eng reguliert und besitzen kritische Schaltstellen. Dabei treten Proteine in Wechselwirkungen, welche dann zumeist von Kinasen aktiviert werden, was zu einem kaskadenartigen Ablauf des entsprechenden Weges führt. Gerade die kaskadenartig ablaufenden Reaktionen sind besonders wichtig. Wird solch eine Kaskade durch zum Beispiel äußere Einflüsse wie bakterielle Effektorproteine unterbrochen, kann sie nicht mehr bis zum Ende ablaufen, was zu einem Ausfall physiologischer Zellfunktionen führen kann.

Viele Signaltransduktionswege korrespondieren und interagieren miteinander. Zudem treten sie in Wechselwirkung miteinander, so dass es oftmals schwer fällt, einen einzelnen aus der Menge der existierenden, isoliert zu betrachten.

Das für die Untersuchungen dieser Arbeit, nach Infektion mit dem Shiga Toxin-produzierenden *E. coli* (STEC) 413/89-1, relevante Zielprotein ist der Transkriptionsfaktor Nuclear Factor-κB (NF-κB). Es existieren viele Signaltransduktionswege, die in einer Aktivierung von NF-κB resultieren. Daher werden die Teile der Signaltransduktionswege von Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), Lipopolysaccharid (LPS) und Interleukin-1 (IL-1), die in einer NF-κB-Aktivierung resultieren, unter 1.4.5.1 eingehend dargestellt.

1.4.1 Mitglieder der Rel/NF- κ B-Familie

Der vor 20 Jahren von Baltimore *et al.* (1986) entdeckte Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) ist ein Transkriptionsfaktor, der seinen Namen erhalten hat, da er zuerst in den Kernen von B-Zellen gefunden wurde. Er bindet an die DNA-Sequenz, die das Ablesen der leichten Kappa-Kette des Immunglobulins verstärkt (Enhancer-Sequenz) [52]. Mittlerweile weiß man, dass er im Zytoplasma aller Zellen exprimiert wird. Dort liegt NF- κ B als Komplex mit seinem spezifischen Inhibitorprotein I κ B (Inhibitor of NF- κ B) vor und wird dadurch an der Translokation in den Kern gehindert. Damit ist der Komplex von NF- κ B und I κ B transkriptionell inaktiv. Über unterschiedliche Signaltransduktionswege wird eine I κ B Kinase aktiviert, die I κ B phosphoryliert. Dieses erlaubt eine nachfolgende Polyubiquitinierung. Die so zum Abbau markierte inhibitorische Untereinheit des zytoplasmatischen NF- κ B:I κ B-Komplexes wird am Proteasom abgebaut. Dadurch wird die bisher verborgene Kerntranslokationssequenz am NF- κ B-Dimer frei und NF- κ B selbst kann in den Kern translozieren. Dort bindet der Transkriptionsfaktor an dekamere κ B-Motive mit der Konsensussequenz 5'-GGGPuNNPyPyCC-3' und ist aktiv. Somit aktiviert NF- κ B vor allem die Transkription von Zielgenen, die in erster Linie der Inflammation und/oder Immunmodulation dienen. Dysregulation von NF- κ B führt zur konstitutiven Überexpression von proinflammatorischen Zytokinen, welche man bei chronischen Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis, findet. Des Weiteren spielt es eine wichtige Rolle bei der Regulation der Expression anti-apoptotischer Proteine.

Heute weiß man, dass NF- κ B ein evolutionär konserviertes Signalmodul ist.

Der Ausdruck 'NF- κ B' wird inzwischen als Sammelbegriff für dimere Komplexe zwischen Mitgliedern der Rel/NF- κ B-Familie verwendet. Diese Familie besteht aus fünf Elementen, die sich in zwei Gruppen unterteilen lassen:

- 1) Rel-Familie mit den Mitgliedern RelA (p65), RelB und c-Rel (Rel)
- 2) NF- κ B-Familie mit den beiden Mitgliedern p50/Vorläuferprotein p105 (NF- κ B1) und p52/Vorläuferprotein p100 (NF- κ B2).

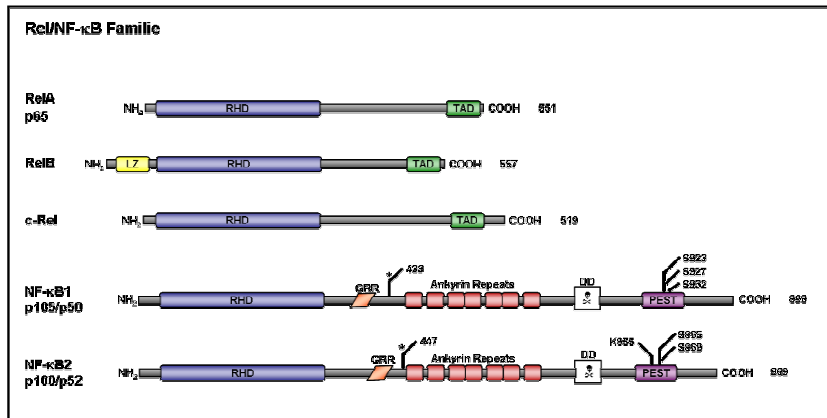


Abb. 1-4:

Mitglieder der Rel/NF- κ B-Familie.

COOH – C-terminales Ende // DD – Death domain // GRR – Glycine rich region // LZ – Leucine zipper // NH₂ – N-terminales Ende // PEST – Proteinbereich, der reich ist an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) // RHD – Rel homology domain // TAD – Transactivation domain.

K(Zahl) – Lysin-Reste // S(Zahl) – Serin-Reste.

* markiert das nach Prozessierung entstehende C-terminale Ende von p50 und p52.

Die Anzahl der Aminosäuren je Protein sind rechts angegeben.

Erstellt nach [53, 54].

Allen Mitgliedern der Rel/NF- κ B-Familie ist das Vorhandensein einer Rel Homology Domain (RHD) gemein. Die sich am N-terminalen Ende befindliche, konservierte, 300 Aminosäuren große RHD, ist verantwortlich für die Dimerisierung der Monomere, Interaktionen mit I κ B und die Bindung an die DNA. Sie enthält die Nuclear localization sequence (NLS, Kerntranslokationssequenz), die für die Translokation der NF- κ B-Dimere aus dem Zytoplasma in den Zellkern sorgt. RelA, RelB und c-Rel, die drei Mitglieder der Rel-Familie, weisen zudem eine "Transactivation domain" (TAD) auf, die am C-terminalen Ende der Proteine lokalisiert und nötig für deren Transaktivierung ist [53]. Diese TADs fördern die Transkription, indem sie die Rekrutierung von Koaktivatoren und die Verdrängung von Repressoren erleichtern.

Die beiden Mitglieder der NF- κ B-Familie, NF- κ B1 (p105/p50) und NF- κ B2 (p100/p52), lassen sich sowohl zur NF- κ B- als auch I κ B-Familie zählen. Als Vorläuferproteine p105 und p100 besitzen sie neben der für NF- κ B typischen RHD ein C-terminales Ende, das eine Glycine-rich region (GRR), sieben Ankyrin-repeats (AR), eine Death domain (DD) sowie eine PEST-Sequenz, enthält. Die GRR ist das Stop-Signal für die Proteolyse der Vorläuferproteine zu den NF- κ B-Monomeren. Bei p105 befindet sie sich zwischen den Aminosäuren 376 und 404. Die AR können an die RHD von anderen NF- κ B-Monomeren

binden. Unter der PEST-Sequenz versteht man einen Proteinbereich, der reich ist an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T).

Generell kann gesagt werden, dass alle NF- κ B-Monomere untereinander dimerisieren können. Dies kann als Homodimer, aber auch als Heterodimer geschehen. Eine Ausnahme bildet dabei RelB, welches lediglich mit p50 und p52 Heterodimere bilden kann [55].

Das erste beschriebene Dimer bestand aus RelA und p50. Diese Verbindung, die durch Heterodimerisierung entsteht, wird auch heute noch als Hauptkomplex angesehen. Andere NF- κ B-Dimere können aber auch, in Abhängigkeit vom Zelltyp, ebenfalls in signifikanten Mengen detektiert werden.

Die Mitglieder der Rel-Familie werden, im Gegensatz zu denen der NF- κ B-Familie, nicht als Vorläuferproteine synthetisiert. NF- κ B1 und NF- κ B2 haben eine Zwitterfunktion, da ihre Vorläuferproteine p105 und p100 genauso wie I κ B als NF- κ B-Inhibitoren fungieren.

1.4.2 Mitglieder der I κ B-Familie

Heute sind sieben Mitglieder der Inhibitor of NF- κ B (I κ B)-Familie bekannt. Dazu zählen I κ B- α , I κ B- β , I κ B- ϵ , I κ B- γ und Bcl-3 (B-cell-leukemia-3 antigen) (Abb. 1-5) sowie die beiden NF- κ B1 und NF- κ B2 Vorläuferproteine p105 und p100 (Abb. 1-4).

Ihnen allen gemein ist eine Ankyrin-Domäne mit fünf bis sieben Ankyrin-Repeats, die sich zu einem verlängerten Zylinder zusammensetzen und zur Bindung an die RHD von NF- κ B befähigt sind. Durch diese Bindung bilden sie einen ternären Komplex mit dem NF- κ B-Dimer, und halten es im Zytoplasma zurück. Zudem weist I κ B- α , jedoch kein anderes Mitglied der I κ B-Familie, am C-terminalen Ende (Aminosäuren 265 bis 277) ein Nuclear export signal (NES) auf [56]. Dieses NES ist dafür verantwortlich, dass NF- κ B:I κ B- α -Komplexe aus dem Kernkompartiment zurück in das Zytoplasma exportiert werden können.

Somit fallen den I κ B gleich mehrere Aufgaben zu. Zum einen bewirken sie durch die Bindung an NF- κ B, dass dieses im Zytoplasma der Zelle zurückgehalten wird. Des Weiteren inhibieren sie durch diese Bindung die DNA-Bindungsfähigkeit der NF- κ B-Dimere. Sie sorgen durch eine starke NES für den Rücktransport des Transkriptionsfaktors aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Daher wird den I κ B eine wichtige Rolle in der Regulierung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges zugeschrieben.

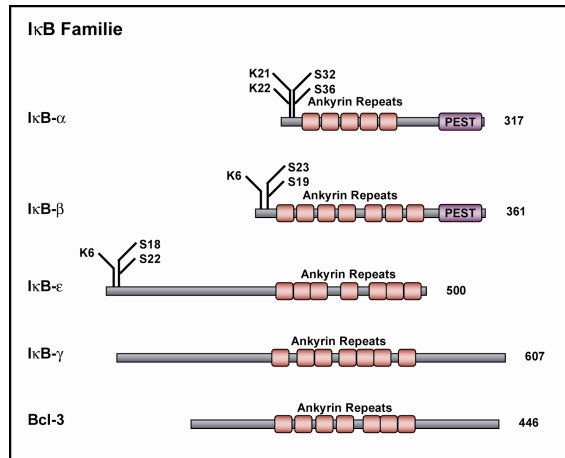


Abb. 1-5:

Mitglieder der IκB-Familie.

PEST – Proteinbereich, der reich ist an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) // K(Zahl) – Lysin-Reste // S(Zahl) – Serin-Reste.

Die Anzahl der Aminosäuren je Protein sind rechts angegeben.

Erstellt nach [53].

Damit NF-κB in den Kern translozieren kann, muss sein Inhibitor IκB zuvor abgebaut werden. Dies geschieht in zwei Schritten. Zuerst werden bestimmte Serin-Reste durch den IκB Kinase Komplex (IKK, 1.4.3) phosphoryliert. Anschließend werden ein bis zwei Lysin-Reste durch den SCF^{β_TCP} (Skp1/Cul1/F-box; β-Transducin repeat-containing Protein) Ubiquitin E3 Ligase Komplex ubiquitiniert, wodurch das nunmehr markierte IκB als Substrat für das 26S Proteasom zur Verfügung steht, von dem es dann degradiert wird (siehe auch Abbildung 1-8).

IκB-α wird an Ser32 und Ser36, IκB-β an Ser19 und Ser23, IκB-ε an Ser18 und Ser22 phosphoryliert. Die Ubiquitinierung erfolgt bei IκB-α an Lys21 und Lys22, bei IκB-β und IκB-ε jeweils an Lys6.

NF-κB1/p50 und NF-κB2/p52 entstehen durch Prozessierung ihrer Vorläuferproteine p105 und p100. Unter der Prozessierung versteht man die partielle Proteolyse durch das Proteasom. Dazu werden die Serin-Reste der PEST-Sequenzen phosphoryliert und der Lysin-Rest von p100 ubiquitiniert. Bei p105 sind dies Ser923, Ser927 und Ser932 und bei p100 Ser865 und Ser869 sowie Lys855.

1.4.3 Mitglieder der I κ B Kinase (IKK)-Familie

Zur Familie der I κ B Kinasen zählt man heute drei Mitglieder, welche in der Regel einen 700 bis 900 kDa großen Komplex bilden. Dabei stellen die Serin/Threonin-Kinasen IKK- α (IKK1) und IKK- β (IKK2) die katalytischen Untereinheiten dar, wohingegen IKK- γ /NEMO (NF- κ B essential modifier) als regulatorische Untereinheit fungiert [57].

IKK- α (85 kDa) und IKK- β (87 kDa) können sowohl Homo- als auch natürlicherweise Heterodimere bilden. Die Dimerisierung ist abhängig von der Leucine zipper (LZ) Domäne, die auch für die Kinase-Aktivität benötigt wird [58]. Ihre Bindung an IKK- γ /NEMO (48 kDa) geschieht durch eine am C-terminalen Ende angeordnete Hexapeptid-Sequenz (Leu-Asp-Trp-Ser-Trp-Leu) welche daher die Bezeichnung Nemo binding domain (NBD) erhielt. Neben der NBD weisen sie ebenfalls am C-terminalen Ende eine Helix-loop-helix (HLH) Domäne auf. Diese HLH wird für eine voll ausgeprägte Kinaseaktivität benötigt. Daneben ist sie aber auch an der "Down"-Regulierung der Kinaseaktivität beteiligt. Die eigentliche Kinase Domain befindet sich am N-Terminus. Sie wird durch Phosphorylierung an jeweils zwei Serin-Resten (IKK- α : Ser176 und Ser180; IKK- β : Ser177 und Ser181) aktiviert. Die Bindung von IKK- γ /NEMO an IKK- α - β benötigt die Aminosäuren-Reste 135 bis 231, welche in der ersten Coiled-coil (CC1) Domäne lokalisiert sind [53].

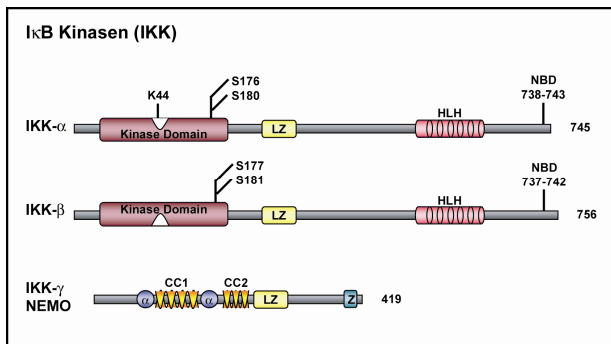


Abb. 1-6:

Mitglieder der I κ B Kinasen-Familie.

α – α -Helical domain // CC1/2 – Coiled-Coil Domain // HLH – Helix-loop-helix domain // LZ – Leucine zipper // NBD – Nemo binding domain // Z – Zink finger domain
K(Zahl) – Lysin-Reste // S(Zahl) – Serin-Reste.

Die Anzahl der Aminosäuren je Protein sind rechts angegeben.

Erstellt nach [53].

Untersuchungen zeigten, dass IKK- α und IKK- β unterschiedliche Präferenzen zur I κ B-Phosphorylierung aufweisen. So ist IKK- α in der Lage, I κ B- α direkt und spezifisch an den Serin-Resten 32 und 36 zu phosphorylieren, wohingegen I κ B- β nicht mit der gleichen Effektivität an seinen beiden Serin-Resten 19 und 23 phosphoryliert wird (Ser23 wird gegenüber Ser19 der Vorzug gegeben) [59]. IKK- β phosphoryliert I κ B- α und I κ B- β in gleichem Maß an ihren Serin-Resten [58].

Von besonderer Wichtigkeit sind mögliche Interaktionspartner auf- und abwärts des IKK-Komplexes, da durch sie die Verbindungen zu aktivierenden Rezeptor/Liganden-Bindungen und den I κ B vermittelt werden. Das Augenmerk sei dabei auf die NF- κ B-inducing kinase (NIK) gelegt, da sie zum einen ein Interaktionspartner von IKK- α [59] und/oder IKK- β ist, und zum anderen anscheinend eine Verbindung zwischen Tumor-Nekrose-Faktor- und Interleukin-1-Signaltransduktionsweg darstellt [60]. NIK weist Homologien zur Familie der MAP3K (MAP kinase kinase kinase) auf und wurde durch Interaktion mit TRAF2 (TNF-Receptor-associated factor 2) identifiziert [60, 61]. Spätere Untersuchungen mit verschiedenen Zellarten einer NIK-deletierten Maus zeigten jedoch, dass die NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität nach Behandlung dieser NIK-null Zellen mit TNF- α oder IL-1 und LPS genauso stark war wie die der NIK-Wildtyp Maus. Diese Ergebnisse belegen, dass NIK anscheinend weder im TNF- α - noch im IL-1- und LPS-Weg zwingend benötigt wird, um eine NF- κ B-Aktivierung zu initiieren. Die Rolle, die NIK in diesen NF- κ B-Aktivierungswegen innehat, bleibt kontrovers. Gesichert scheint jedoch, dass NIK im alternativen NF- κ B-Signaltransduktionsweg (siehe dafür 1.4.5.3) über den LT- β -Rezeptor IKK- α aktiviert [62].

IKK- α kann direkt mit NIK und I κ B- α interagieren. Interagiert IKK- β mit NIK, so ist diese Bindung schwächer als diejenige zwischen IKK- α und NIK [59]. IKK- α weist eine höhere Affinität zu NIK auf als IKK- β , wobei IKK- β jedoch die effizientere I κ B-Kinase ist. Im Gegenzug dazu ist IKK- α aber die effizientere p100-Kinase (siehe auch 1.4.5.3). Im Endeffekt scheint es jedoch, dass NIK auch mit dem IKK- α /IKK- β -Heterodimer in Verbindung tritt [58]. Des Weiteren kann NIK direkt an I κ B- α binden, wodurch dieses an Ser32/36 phosphoryliert wird [59].

1.4.4 Mechanismus und Regulation der NF- κ B-Aktivierung

Nachdem der IKK-Komplex über die für diese Arbeit relevanten Rezeptor-Aktivierungen phosphoryliert wurde, ist dieser nun in der Lage den NF- κ B-Inhibitor I κ B- α an Ser32 und Ser36 zu phosphorylieren. Kürzlich wurde das regulatorische Protein "ELKS" (105 kDa; der Name stammt von der Menge der konstitutiven Aminosäuren Glutaminsäure (E), Leucin (L), Lysin (K), und Serin (S)) beschrieben, welches augenscheinlich sowohl mit dem IKK-Komplex als auch I κ B- α , jedoch nicht I κ B- β , interagieren kann und so die Interaktion zwischen dem IKK-Komplex und I κ B- α vermitteln könnte [63]. Nach der Phosphorylierung ist I κ B- α Substrat für die Ubiquitin-Ligase SCF ^{β TrCP}, die das phosphorylierte I κ B- α an Lys21 und Lys22 polyubiquitiniert, so dass es durch das 26S Proteasom degradiert werden kann [64]. Das nun freie und somit aktive RelA-p50-Dimer transloziert via die RelA-NLS in den Zellkern und bindet dort an das κ B-Motiv, wodurch die Transkription von Zielgenen initiiert wird.

Neben der Aktivierung von NF- κ B ist aber auch die Regulierung im Sinne von 'Abschalten' der Signaltransduktionskaskade wichtig. Man fand heraus, dass sowohl neusynthetisiertes als auch bereits vorhandenes I κ B- α nach Translokation in den Zellkern, NF- κ B aktiv vom κ B-Motiv dissoziieren, es binden und anschließend zurück in das zytoplasmatische Zellkompartiment befördern kann. Dies wird über CRM1/Exportin1 (Chromosome region maintenance 1) vermittelt. Untersuchungen ergaben, dass NF- κ B und I κ B- α alleine eher in den Kern translozieren, als in komplexierter Form, wobei jedoch I κ B- α schneller als NF- κ B transloziert. Dass sie überhaupt zwischen Zytoplasma und Kern pendeln können, liegt daran, dass sowohl RelA als auch I κ B- α über eine NES verfügen. (Solch eine Sequenz konnte für I κ B- β nicht gefunden werden [65].) Die Funktion der NES ist dominant über der der NLS, wodurch NF- κ B:I κ B- α eher im Zytoplasma verbleiben kann. Daneben wurde auch in NIK je eine NLS und NES (Aminosäuren 795-805) und in IKK- α der Lysin-Rest 44 als Faktor identifiziert und festgestellt, dass beide Proteine ebenfalls einem Zytoplasma-Kern-'Shuttling' unterliegen [66].

Ein weiterer Sachverhalt unterstützt diese Ergebnisse. Die Phosphorylierung von I κ B- α findet im Zytoplasma statt. Die Ubiquitin-Ligase SCF ^{β TrCP} ist jedoch ausschließlich im Kern lokalisiert, so dass die I κ B- α -Polyubiquitinierung im Kern stattfinden muss, bevor I κ B- α der proteasomalen Degradation unterliegt, welche im Zytoplasma vonstatten geht [57].

1.4.5 Der NF- κ B-Signaltransduktionsweg

Seit nunmehr 20 Jahren wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B untersucht; und ebenso lange wird daran gearbeitet, seinen Signaltransduktionsweg zu erforschen. Heute kann man mit Sicherheit sagen, dass es nicht 'den einen' allumfassenden NF- κ B-Signaltransduktionsweg gibt, der nach Aktivierung immer in gleicher Art und Weise abläuft. Vielmehr zeigen die Untersuchungen der letzten Jahre, dass wir es mit mindestens drei Signaltransduktionswegen zu tun haben, die jedoch alle ein Teil der unspezifischen und somit angeborenen Immunität sind. Somit lassen sich folgende Wege unterscheiden:

1. Klassischer Signaltransduktionsweg
2. p105 Signaltransduktionsweg
3. Alternativer Signaltransduktionsweg (p100)

1.4.5.1 Klassischer Signaltransduktionsweg

Der klassische Signaltransduktionsweg wird durch verschiedenste Stoffe über unterschiedliche Rezeptoren aktiviert. So erfolgt die NF- κ B-Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α über den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 (TNFR1) und IL-1 über den Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R); bakterielles LPS aktiviert NF- κ B über den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4).

Die NF- κ B-Aktivierung des klassischen Signaltransduktionsweges führt zur gesteigerten Transkription von Genen, die an der Immunantwort – und hier vor allem an der Inflammation – sowie der Förderung des Überlebens der Zelle beteiligt sind. Dazu zählen Chemokine, Zytokine, Adhäsionsmoleküle, wie ICAM-1 (Intracellulär adhesion molecule 1), VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1) und ELAM (Endothelial leucocyte adhesion molecule), Enzyme, die sekundäre inflammatorische Mediatoren produzieren und Apoptoseinhibitoren. All diese Substanzen sind Bestandteil des älteren Teils des Immunsystems, nämlich der angeborenen Immunität. Daher ist dieser Teil des NF- κ B-Signaltransduktionsweges essentiell für die unspezifische Immunität.

Die entscheidenden Merkmale des klassischen Signaltransduktionsweges sind seine Induzierbarkeit durch Aktivatoren (siehe oben), seine IKK- β - und IKK- γ -abhängige I κ B-Degradation und das Faktum, dass er essentiell für die unspezifische Immunität ist, was ganz im Gegensatz zum alternativen Signaltransduktionsweg (1.4.4.3) steht.

Die für diese Arbeit relevanten Aktivatoren sind TNF- α (in HeLa-Zellen), LPS (in Makrophagen) und IL-1, weswegen deren Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung von NF- κ B führen, im Folgenden beschrieben werden.

1.4.5.1.1 Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Signaltransduktionsweg

Die Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie besteht aus 19 Liganden und 29 Rezeptoren und ist in vielen Geweben vorhanden sowie an unzähligen physiologischen Vorgängen beteiligt. Diese Rezeptor/Liganden-Paarungen leiten eine Vielzahl von biologischen Antworten, in erster Linie durch Aktivierung induzierbarer Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1 (Activator protein-1), ein. Dabei stellt der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) das am besten untersuchte Mitglied der Zytokin-Familie dar und spielt eine wichtige Rolle in Immunantworten der angeborenen und erworbenen Immunität. Er wird vornehmlich von aktivierten Makrophagen und Monozyten gebildet, die sich an der Aktivierung von Lymphozyten und Leukozyten beteiligen. TNF- α ist in der Lage, NF- κ B zu aktivieren und somit auch das Überleben der Zelle zu fördern. Ist jedoch der NF- κ B-Signaltransduktionsweg blockiert, so induziert er den programmierten Zelltod (Apoptose) in den meisten Zelltypen.

Nach Bindung von TNF- α an seinen Rezeptor TNFR1 (die Bindung an TNFR2 wird nur über TRAF2 weitergeleitet) erfolgt dessen Trimerisierung und die Dissoziation von SODD (Silencer of death domain), einem endogenen Inhibitor der TNF-Rezeptor-Aktivität, wodurch das Adaptor Proteins TRADD (TNF Receptor associated via death domain) mit seiner DD (Death domain) an die zytoplasmatische DD des TNFR binden kann (siehe auch Abb. 1-8). Danach interagiert TRADD mit dem C-terminalen Ende von TRAF2 (TNF-Receptor-associated factor 2). TRAF2 kann ebenfalls, diesmal über seine DD, mit der Serin/Threonin Kinase RIP1 (Receptor-interacting protein 1) interagieren, welche aber auch unabhängig davon mit TRADD in Kontakt treten kann. RIP1 ist in der Lage, unabhängig von TRAF2, direkt an IKK- γ /NEMO zu binden, um so den IKK-Komplex zum TNFR1-Signal-Komplex zu bringen [67]. Untersuchungen zeigten, dass das Zusammenführen des TNFR1-Komplexes mit IKK ohne RIP1, demnach über TRAF2, eine unzureichende IKK-Aktivierung bewirkt [68], was dafür spricht, dass RIP1 an diesem Prozess in irgendeiner Art und Weise beteiligt ist.

Die TNF- α -induzierte Signalkaskade bewirkt direkt über MEKK3 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3) oder über NIK eine IKK- β -Aktivierung, welche eine I κ B-Phosphorylierung nach sich zieht.

1.4.5.1.2 Toll-/IL-1-Rezeptor-Signaltransduktionsweg

NF- κ B spielt eine essentielle Rolle in den frühen Stadien der unspezifischen Immunantworten, die über TLR-Signaltransduktionswege vermittelt werden. TLR fungieren als Pattern recognition receptors (PRR), deren Liganden als Pathogen-associated molecular patterns (PAMP) bezeichnet werden. Mittlerweile sind zehn TLR beschrieben worden, die alle in der NF- κ B-Signalkaskade resultieren. Sie sind membrangebunden und zeichnen sich durch viele Kopien von LRR in ihrer extrazellulären Domäne und einer zytoplasmatischen Toll/IL-1R (TIR) Domäne aus. Das von Gram negativen Bakterien produzierte LPS aktiviert NF- κ B über den TLR4, wohingegen Peptidoglykane und Lipoproteine Gram positiver Bakterien an den TLR2 binden. Der Rezeptor des bakteriellen Flagellin ist der TLR5. Des Weiteren sei noch die Bindung von nicht-methylierter DNA an TLR9 und dsRNA von Viren an TLR3 zu nennen [69]. Der TLR2 erkennt, durch heterodimere Interaktionen mit TLR6 oder TLR1, viele bakterielle Produkte wie Lipoproteine, Peptidoglykane und Zymosan (Hefen) [70]. Die Liganden der TLR7 und TLR8 scheinen ssRNA zu sein [71].

TLR4 und IL-1R besitzen beide eine zytoplasmatische TIR Domäne über deren Bindung mit zytoplasmatischen Signalmolekülen die Aktivierung von NF- κ B, sowie AP-1 und IRF3 (Interferon-regulatory factor 3), vermittelt werden. Daher werden die beiden Signaltransduktionskaskaden von TLR4 und IL-1R im Folgenden gemeinsam beschrieben (siehe auch Abb. 1-8).

Die Toll/IL-1-Signalkaskade wird durch Rekrutierung zytosolischer Adapterproteine, die ebenfalls eine TIR Domäne besitzen, eingeleitet. Dazu wird beim TLR4 zuerst ein Rezeptor-Komplex gebildet: durch LBP (LPS-binding protein) opsoniertes LPS wird von CD14 erkannt und kann nun mit TLR4 und MD-2 komplexieren, welche sodann ein Homodimer ausbilden [72, 73]. IL-1 bindet an den Typ I IL-1R, wodurch das Corezeptor Molekül IL-1RAcP (IL-1R Accessory protein) den IL-1R erkennt und mit ihm einen heterodimeren Komplex bildet. Die miteinander in Verbindung getretenen TIR Domänen der beiden Rezeptoruntereinheiten erlauben nun die Interaktion mit den Adaptormolekülen

MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) via DD und TOLLIP (Toll interacting protein), welches, vermutlich als Silencer, an das N-terminale Ende von IRAK1 (IL-1-Receptor-associated kinase 1) gebunden, IRAK1 zum aktiven Rezeptorkomplex bringt. TOLLIP selbst disloziert daraufhin vom Rezeptorkomplex, so dass IRAK1 mit seiner DD an die DD von MyD88 binden kann.

Es wird angenommen, dass IRAK4 IRAK1 phosphoryliert, wodurch dann im Folgenden IRAK1 durch Autophosphorylierung hyperphosphoryliert und sich vom Rezeptorkomplex in das Zytoplasma lösen kann. Dort interagiert es mit TRAF6 (TNF-Receptor associated factor 6). Die Verbindung zwischen TRAF6 und dem IKK-Komplex wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Es scheint zwei Wege über Adaptermoleküle zu geben, die beide in der Aktivierung der IKK enden. Zum einen ist der Weg über TAK1 (TGF- β activated kinase 1) zusammen mit den beiden Adapterproteinen TAB1 und TAB2 (TAK1 binding protein 1/2) direkt oder über NIK, zum anderen der Weg über ECSIT (Evolutionary conserved signaling intermediate in toll pathways) und MEKK3 möglich. TAK1 wurde in Assoziation mit TRAF6 in Zellen gefunden. In Verbindung mit TAK1 scheint TRAF6 als Ubiquitin-Ligase zu fungieren, die nach Stimulation entweder sich selbst oder/und Teile von TAK1/TAB1/TAB2 ubiquitiniert, um sie so für die IKK Aktivierung vorzubereiten [74]. ECSIT wurde als möglicher TRAF6-Bindungspartner ermittelt. Untersuchungen ergaben, dass es in der TLR- und IL-1R-Signalkaskade benötigt wird [75, 76] und wahrscheinlich die MEKK3-Funktionen moduliert.

Neben dem oben beschriebenen MyD88-abhängigen TLR4-Signaltransduktionsweg, gibt es auch noch einen MyD88-unabhängigen TLR4-Signaltransduktionsweg. Dieser benötigt kein MyD88, um den Signalweg zur NF- κ B-Aktivierung zur beschreiten. Man stellt sich vor, dass TRAM (TRIF-related adapter molecule) dazu mit seiner DD an die TIR Domäne des TLR4-Komplexes bindet, worauf TRIF (Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN- β) via DD mit TRAM interagieren kann. Untersuchungen zeigten, dass TRIF in der Lage ist, an RIP1 zu binden [77], welches wiederum über MEKK3 oder direkt IKK- β zu aktivieren vermag. Im Unterschied zum MyD88-abhängigen Weg, der zur Transkription proinflammatorischer Zytokine und B-Zell-Aktivierung führt, induziert der MyD88-unabhängige Weg IFN- β (Interferon- β), IFN- β -induzierbare Gene [78] und NF- κ B selbst.

1.4.5.2 p105 Signaltransduktionsweg

Beim p105 Signaltransduktionsweg müssen zwei Zustände unterschieden werden. Zum einen kann p105 als NF- κ B Inhibitor, ähnlich den I κ B, fungieren. In diesem Fall wird es nach Stimulation mit Agonisten vollständig durch das Proteasom degradiert, wodurch im Zytoplasma zurückgehaltene Rel-Untereinheiten (RelA, c-Rel und p50) in den Kern translozieren können. Dennoch scheint es so, dass p105 nur für die zytoplasmatische Retention von p50 essentiell ist [79]. Zum anderen kann es einer Prozessierung unterzogen werden, die in der Proteolyse des C-terminalen Endes besteht, wodurch p50 generiert wird. Da das Proteasom normalerweise die komplette Degradation von ubiquitinierten Proteinen ausführt, stellt die partielle Proteolyse von p105 (und p100) durch das Proteasom ein außergewöhnliches Ereignis dar. Die Prozessierung findet konstitutiv in den meisten Zelltypen statt und resultiert in ähnlich hohen Mengen von p105 und p50 [64].

Nach einer Stimulierung der Zelle mit Agonisten, wie z.B. TNF- α , IL-1 oder LPS wird der Signaltransduktionsweg beschritten, was zu einer Aktivierung des IKK-Komplexes führt (siehe auch 1.4.4.1), die in der Phosphorylierung der IKK- β an den Serin-Resten 177 und 181 besteht. So aktivierte IKK- β phosphoryliert in einem konservierten Motiv (Asp-Ser⁹²⁷-Gly-Val-Gly-Thr-Ser⁹³²) der C-terminalen PEST-Region von p105, welche homolog zu der IKK-Zielsequenz in I κ B- α ist, die beiden Serin-Reste. Dies induziert die Rekrutierung der SCF ^{β TrCP} E3 Ligase, welche die Ubiquitinierung von p105 katalysiert, was zu seiner späteren Degradation durch das Proteasom führt.

Untersuchungen haben ergeben, dass die Stimulus-induzierte Proteolyse von p105 die Expression funktionaler IKK-Komplexe benötigt [80-82], wobei IKK- α und IKK- β mit der DD von p105 interagieren müssen, um die Phosphorylierung der PEST-Region zu vermitteln [83, 84]. Im Gegensatz zur Signal-induzierten Proteolyse von p100, geschieht dies nach TNF- α Behandlung unabhängig von IKK- α [80]. Demnach verläuft die p105-Proteolyse ähnlich der Degradation von I κ B- α . Bis heute ist jedoch noch nicht bekannt, welcher Signalweg oberhalb der IKK (TRAF, MAP3K) beschritten wird, um die Proteolyse zu vermitteln.

Die GRR, welche im zentralen Abschnitt, zwischen RHD und Ankyrin Repeats, von p105 lokalisiert ist, ist essentiell für die **konstitutive Prozessierung** von p105 zu p50, wobei sie jedoch nicht zur Ubiquitinierung benötigt wird, sondern als Stop-Signal für die Prozessierung fungiert, so dass die RHD nicht in das Proteasom eintreten kann. Zusätzlich

trägt die Faltung der RHD dazu bei, dass sie vor einem Eintritt in das Proteasom geschützt ist. Neben der GRR wird für die Prozessierung zusätzlich eine so genannte 'acidic region', die im Bereich der Aminosäuren 446 bis 454 des humanen p105 lokalisiert ist, benötigt. Sie scheint als Erkennungssignal für eine derzeit noch uncharakterisierte Ubiquitin E3 Ligase zu fungieren, welche die Lysin-Reste 441 und 442 für die Ubiquitinierung markiert [85].

Es wird angenommen, dass die Prozessierung von p105 parallel zur Translation abläuft, um p50 zu produzieren. Anscheinend werden zur p50-Synthese keine vollständigen p105-Moleküle benötigt.

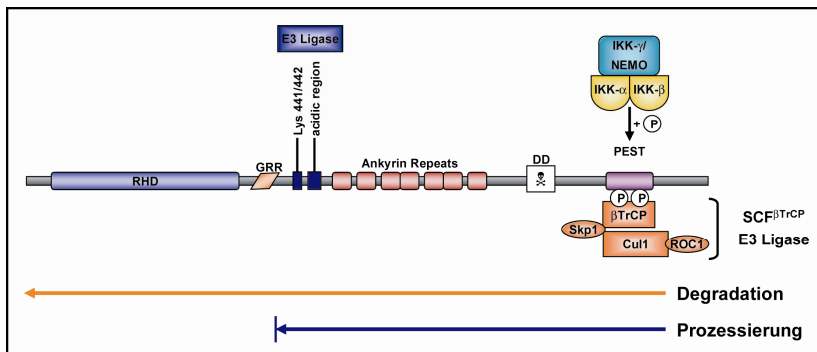


Abb. 1-7:

Proteolyse von NF-κB1 p105.

βTrCP – β-Transducin repeat-containing Protein (Untereinheit von SCF) // Cul1 – Cullin, ROC1, Skp1 – Untereinheiten von SCF // DD – Death domain // GRR – Glycine rich region // PEST – Proteinbereich, der reich ist an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) // RHD – Rel homology domain // Erläuterungen siehe Text.

Erstellt nach [54].

p50-Homodimere können als transkriptionelle Aktivatoren oder Repressoren fungieren. Welche Funktion ihnen zukommt, ist abhängig vom jeweiligen Zelltyp, der sie expremiert. Dies scheint eine Erklärung für ihre positive und negative Rolle in Immun- und Inflammationsantworten zu sein.

1.4.5.3 Alternativer Signaltransduktionsweg (p100)

Der alternative NF-κB-Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige Rolle in der Organogenese der sekundären Lymphorgane, der B-Zell-Reifung und der adaptiven humoralen Immunität. Er wird über die Liganden der TNFR-Familie, Lymphotoxine α/β2

(LT- α/β), den CD40 Ligand (CD40L), den B-cell activating factor (BAFF) sowie den Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) [54], aber nicht TNF- α selbst, induziert. Charakteristikum dieses Weges ist, dass er streng IKK- α -abhängig, und somit IKK- β -, NEMO/IKK- γ - sowie I κ B-unabhängig, ist [86]. IKK- α liegt dabei als Homodimer vor, welches mit NIK assoziiert (siehe auch Abb. 1-7), um so phosphoryliert und damit aktiviert zu werden. Das Vorläuferprotein p100 kann mit anderen Rel-Untereinheiten, wie p50, RelA, c-Rel und RelB, assoziieren. Das vornehmlich auftretende NF- κ B-Dimer in diesem Signaltransduktionsweg ist ein RelB-p100-Heterodimer, wodurch die RelB-Transkriptionsaktivität reguliert wird [87, 88]. Die p100-Prozessierung selbst wird durch NIK reguliert [62]. Untersuchungen ergaben, dass NIK und TRAF2 Bindungspartner sein können, so dass es möglich ist, dass TRAF2 durch Interaktion NIK zum CD40-Rezeptor bringt [60]. IKK- α kontrolliert abwärts die p100-Proteolyse. IKK- α ist ein mit NIK interagierendes Protein [59], wobei NIK IKK- α an Ser176 und Ser180 phosphoryliert. Dadurch wird die IKK- α -Kinaseaktivität stimuliert [89]. IKK- α wiederum ist in der Lage p100 direkt an den beiden C-terminalen Serin-Resten 865 und 869 der PEST-Region, welche mit der β TrCP-Bindungsregion von I κ B- α verwandt ist, zu phosphorylieren [90]. Somit wird die Prozessierung induziert [86]. β TrCP selbst kann daraufhin daran binden und die Polyubiquitinierung an Lys855 vollziehen. Das so markierte p100 stellt das Substrat für das 26S Proteasom dar. Es bindet an S9, eine nicht ATPase-Untereinheit im 19S 'lid' des 26S Proteasoms [91], von dem dann der C-terminale Abschnitt bis zu Aminosäure 447 degradiert wird. Das so entstandene RelB-p52-Heterodimer kann nun in den Kern translozieren und transkriptionell aktiv werden.

Im Gegensatz zum p105-Signaltransduktionsweg, welcher in erster Linie von konstitutivem Charakter ist, wird der alternative Signaltransduktionsweg induziert. Die p100-Prozessierung, ein posttranslationelles Ereignis, verläuft im Gegensatz zur Signal-induzierten NF- κ B-Aktivierung via klassischen Signaltransduktionsweg wesentlich langsamer (mehrere Stunden) ab. Alle identifizierten Rezeptoren des alternativen Signaltransduktionsweges aktivieren innerhalb von Minuten die I κ B- α -Degradation.

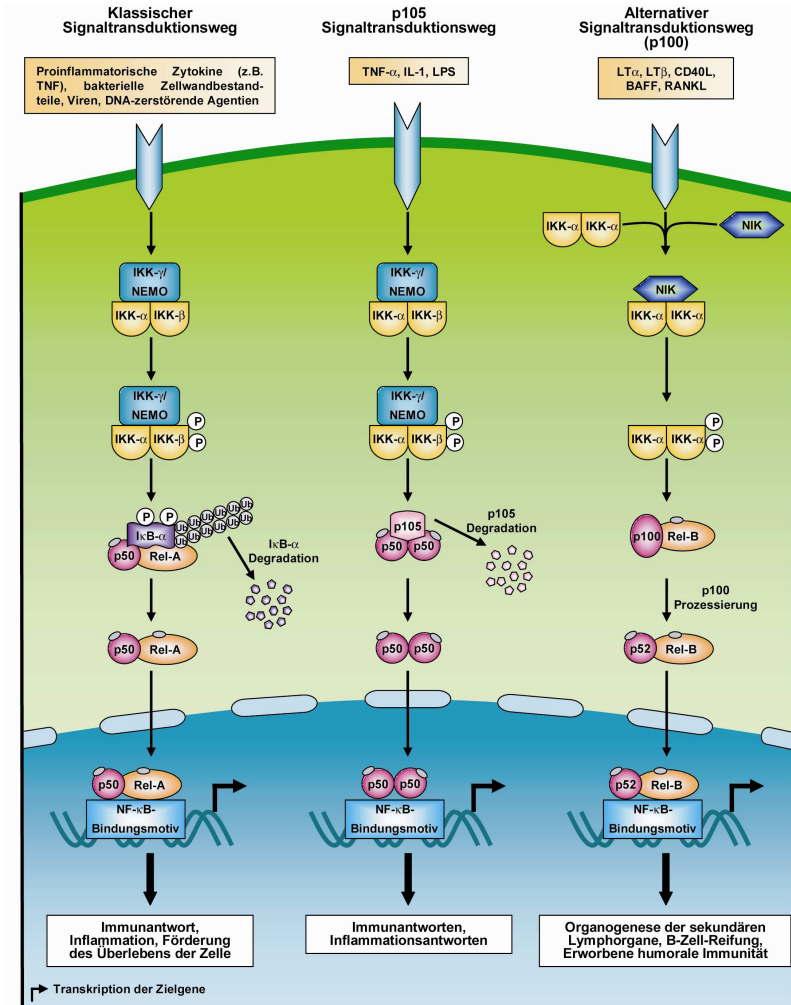


Abb. 1-7:

Vergleichende Darstellung des klassischen und alternativen NF-κB-Signaltransduktionsweges, sowie des p105-Signaltransduktionsweges. Für Details siehe Text.

P – Phosphat // Ub – Ubiquitin.

Weitere Abkürzungen siehe Text und Abkürzungsverzeichnis.

Zusammengestellt und modifiziert nach [53, 54, 57, 90].

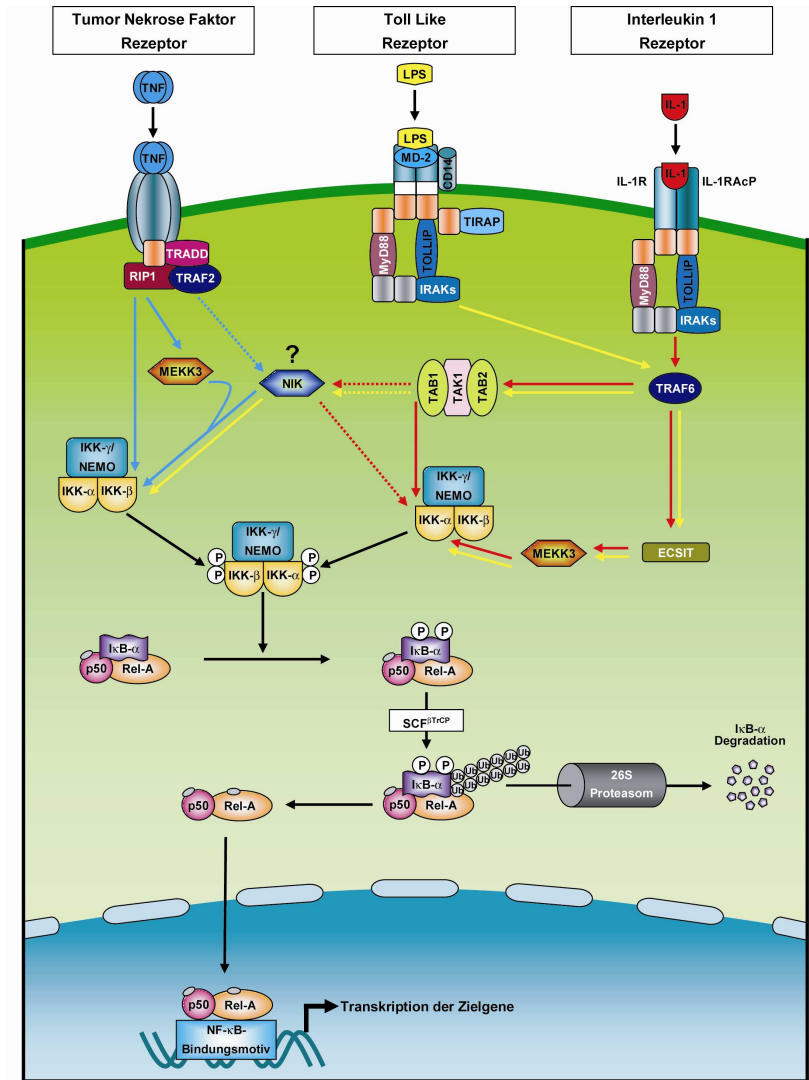


Abb. 1-8:

Darstellung der Rezeptor-Liganden-induzierten NF-κB-Aktivierung und Berührungspunkte der einzelnen Aktivierungswege von TNFR/TNF-α, TLR4/LPS und IL-1R/IL-1. Für Details siehe Text.

■ – TIR domain // ■ – Death domain // P – Phosphat // Ub – Ubiquitin.

blaue Pfeile – TNF-α-Signaltransduktionsweg // gelbe Pfeile – LPS-Signaltransduktionsweg // rote Pfeile – IL-1-Signaltransduktionsweg // schwarze Pfeile – keine Unterscheidung zwischen den einzelnen Aktivatoren // gestrichelte Pfeile – mögliche, jedoch nicht zwingend notwendige Interaktionen über NIK.

Weitere Abkürzungen siehe Text und Abkürzungsverzeichnis.

Zusammengestellt nach den im Text angegebenen Referenzen, sowie bereits erstellten Signaltransduktionsweg-Schemen von Biocarta und der Firma Cell Signaling Technology®.

1.5 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Bakterien nehmen auf positive und negative Art und Weise Einfluss auf den menschlichen Organismus. Als Kommensalen bilden sie die Normalflora der Haut und des Darmes. Sie sind in der Lage eine kontinuierliche Stimulation auf das Immunsystem auszuüben, wodurch dieses in seiner Funktion gestärkt wird. Damit schützen sie diese Organe und üben einen positiven Einfluss auf die Verdauung aus. Mittlerweile werden so genannte Probiotika gezielt zur Gesunderhaltung der intestinalen Flora eingesetzt. Gelangen diese apathogenen Keime jedoch in Wunden, so rufen sie Entzündungsreaktionen im Wirt hervor. Daneben gibt es auch pathogene Bakterien, die immer eine Infektion verursachen (z.B. *Staphylococcus aureus*). Der Wirt reagiert sodann mit einer Inflammation, um die Noxe unschädlich zu machen und letztendlich zu eliminieren. Im Laufe der Evolution haben bestimmte Pathogene regelrechte Mechanismen entwickelt, um der Unschädlichmachung und Eliminierung durch den Wirt, den sie befallen haben, zu entgehen. Zu diesen Mechanismen zählt die Suppression der Immunantwort, die z.B. bei *Yersinia* spp. und *Salmonella* spp. gefunden wurde. Daneben gibt es auch noch den Mechanismus der Anti-inflammation. Sie wurde für den weit verbreiteten anaeroben Kommensalen *Bacteroides thetaiotaomicron* beschrieben, der damit Entzündungsreaktionen, die durch pathogene Bakterien hervorgerufen wurden, abschwächen konnte.

Für "attaching and effacing"-verursachende Keime (EPEC, STEC/EHEC) wird ein ähnlicher Mechanismus zur Umgehung der wirtseigenen Abwehr, wie sie für *Yersinia* spp. und *Salmonella* spp. ermittelt wurde, vermutet. Die Ausprägung der A/E-Läsionen benötigt eine gewisse Zeitspanne (ca. 1.5 Stunden), in der das Bakterium anscheinend nicht vom Wirt angegriffen wird. Des Weiteren bleiben diese Läsionen lange bestehen, ohne dass das Pathogen durch die Immunabwehr des Wirtes eliminiert wird.

Daher besteht das Ziel der vorliegenden Arbeit in der Entschlüsselung des molekularen Infektionsmechanismus des Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli* 413/89-1 (O26:H⁻) in Säugerzellen basierend auf der Suppression des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch dieses Bakterium.

Die Aufgabe bestand darin, den NF- κ B-Signaltransduktionsweg zu untersuchen. Es sollte versucht werden, den eukaryontischen Faktor dieser Kaskade, welcher durch einen noch derzeit unbekannten prokaryontischen Faktor inhibiert wird, zu identifizieren, so dass die finale NF- κ B Suppression, und somit die Unterdrückung der Immunantwort, entsteht.

Um einen Einblick in die Modulation der unspezifischen Immunantwort nach STEC-Infektion zu bekommen, wurden neben Epithelzellen auch Makrophagen in die Untersuchungen einbezogen.

Daneben sollte auch der Effekt dieser Infektion *in vivo* betrachtet werden, wozu der Aufbau eines Maus-Infektionsmodells angestrebt wurde, welches der Signalweitergabe von Zellen der angeborenen Immunität (Makrophagen) auf Zellen der erworbenen Immunität (T-Zellen) dient.

2 MATERIAL

2.1 Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften [Genotyp]	Herkunft [Referenz]
STEC 413/89-1 WT	Wildtyp (Serotyp O26:H ⁻); isoliert von einem an Diarrhoe leidenden Kalb	[27]
STEC 413/89-1 $\Delta espB$	"in-frame"- <i>espB</i> Deletionsmutante von STEC 413/89-1 [$\Delta espB$]	[92]
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	apathogener <i>E. coli</i>	ATCC 700926
<i>E. coli</i> XL2-Blue	<i>recA1 endA1 hsdR17 supE44</i> <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>lacI</i> ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r) Amy ^r Cam ^r]	Fa. Stratagene, Amsterdam; NL
<i>E. coli</i> DH5 α (pMAR7)	kloniertes EAF-Plasmid von EPEC E2348/69, Amp ^r	[93]
<i>E. coli</i> HB101 (pMAR7/pCVD462)	kloniertes EAF-Plasmid von EPEC E2348/69, Amp ^r klonierter LEE von EPEC E2348/69, Cm ^r und Amp ^r	[93]

2.2 Plasmide

Plasmid	relevanter Genotyp	Antibiotika- Resistenz	Herkunft [Referenz]
pcDNA TM 3.1 (+)	P_{CMV} , P_{T7} , BGH pA, f1 ori, SV 40 ori, Neo ^r , SV40 pA, pUC ori, Amp ^r	Neo ^r /Amp ^r	Invitrogen, Karlsruhe
pEGFP-N1	P_{CMV} IE, MCS, EGFP, SV40 poly A, f1 ori, SV40 ori, P_{SV40} e, Kan ^r /Neo ^r , HSV TK polyA, pUC ori	Kan ^r /Neo ^r	Clontech Laboratories, Heidelberg
pNF- κ B-Luc	κB_4 , P_{TAL} , <i>luc</i> -Gen, SV40 polyA, pUC, Amp ^r , f1 ori, TB	Amp ^r	Clontech Laboratories, Heidelberg
pRL-TK Vektor	HSV TK, T7, <i>Rluc</i> , SV40 late polyA, Amp ^r , ori	Amp ^r	Promega GmbH, Mannheim

2.3 Eukaryontische Zelllinien

- P388D₁ ATCC CCL-46 Makrophagenähnliche Zelllinie der Maus, die 1956 durch Dawe und Potter aus einem Methylcolanthren-induzierten lymphoiden Neoplasma (P388) einer DAB/2-Maus isoliert wurde und erst 1975 aufgrund ihrer Morphologie und Funktion als makrophagen-ähnlich charakterisiert wurde [94].
- HeLa ATCC CCL-2 Epithelzellähnliche Zelllinie des Menschen, die 1951 durch Gey, Coffman und Kubizek aus einem Cervical-Adenokarzinom isoliert wurde.

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland

CCL: Certified Cell Lines

2.4 Mauslinie

- Balb/C
H. J. Bagg entwickelte die "Bagg albino" 1913 aus einem Stamm eines aus Ohio stammenden Tierhändlers. Die Inzucht erfolgte 1923 durch McDowell; durch Snell 1932 ab F26; durch Andervont 1935; weitergezüchtet durch NIH 1952 durch Andervont ab F72; an CRL 1974 von NIH. Fellfarbe weiß (albino).
Zur Verwendung kamen in etwa 6 Wochen alte weibliche Tiere.

2.5 Nukleotide und Nukleinsäuren

- α -³²P-dATP (3000 Ci/mmol) (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)
- α -³²P-dCTP (3000 Ci/mmol) (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)
- dGTP (100 mM) (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)
- dTTP (100 mM) (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)
- Poly[d(I-C)] (2,6-3,5 µg/µl) (Roche, Grenzach-Wyhlen)

2.6 Für die Gelretardationsexperimente verwendete doppelsträngige Oligonukleotide

κB
5' - AGCTTCAGAGGGGACTTTCCGAGAGG - 3'
3' - AGTCTCCCCTGAAAGGCTCTCCAGCT - 5' [95]

2 MATERIAL

'NF-IL6' 5' - AGCTTTAAGATTTGCACAATGTGACGTCA - 3'
3' - AATTCTAAACGTGTTACACTGCAGTTCGA – 5' [96]

Die doppelsträngigen Oligonukleotide wurden durch Hybridisierung der komplementären Einzelstränge, welche von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen) stammen, erzeugt. Die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren sind unterstrichen.

2.7 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper stammen von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg) und Cell Signaling (New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main).

2.7.1 Antikörper für Western Blots (3.6.2.3)

- NF- κ B p65 (F-6) affinitätsgereinigter, monoklonaler Mausantikörper, der gegen die am N-terminalen Ende lokalisierten Aminosäuren 1-286 von humanem RelA (p65) gerichtet ist.
(Santa Cruz Biotechnology; cat# sc-8008)
- PPAR β (H-74) affinitätsgereinigter, polyklonaler Kaninchenantikörper, der gegen die am N-terminalen Ende lokalisierten Aminosäuren 2-75 des humanen PPAR β gerichtet ist.
(Santa Cruz Biotechnology; cat# sc-7197)
- I κ B- α (C-21) affinitätsgereinigter, polyklonaler Kaninchenantikörper, der gegen das C-terminale Ende des humanen I κ B- α gerichtet ist.
(Santa Cruz Biotechnology; cat# sc-371)
- Phospho-I κ B- α -Ser32/36 (5A5) affinitätsgereinigter, monoklonaler Mausantikörper,

der gegen das an Serin 32 und 36 phosphorylierte I κ B- α gerichtet ist.
(Cell Signaling; #9246)

- Goat-anti-rabbit IgG-HRP Meerrettich-Peroxidase (horse-radish-peroxidase, HRP)-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology; cat# sc-2004)
- Goat-anti-mouse IgG-HRP Meerrettich-Peroxidase (horse-radish-peroxidase, HRP)-konjugierter Ziege-anti-Maus-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology; cat# sc-2005)

2.7.2 Antikörper für Gel-Supershift-Experimente (3.7.4)

- NF- κ B p65 (A) X affinitätsgereinigter polyklonaler Kaninchenantikörper, der gegen das N-terminale Ende von humanem RelA (p65) gerichtet ist.
(Santa Cruz Biotechnology; cat# sc-109 X)
- NF- κ B p50 (NLS) X affinitätsgereinigter polyklonaler Kaninchenantikörper, der gegen die NLS Region von humanem NF- κ B p50 gerichtet ist.
(Santa Cruz Biotechnology; cat# sc-114 X)
- RelB (C-19) X affinitätsgereinigter polyklonaler Kaninchenantikörper, der gegen das N-terminale Ende von humanem RelB gerichtet ist.
(Santa Cruz Biotechnology; cat# sc-226 X)
- c-Rel (B-6) X affinitätsgereinigter monoklonaler Mausantikörper, der gegen die am N-terminalen Ende lokalisierten Aminosäuren 1-300 des humanen c-Rel (p75) gerichtet ist.
(Santa Cruz Biotechnology; cat# sc-6955 X)

2 MATERIAL

- NF- κ B p52 (K-27) X affinitätsgereinigter polyklonaler Kaninchenantikörper, der gegen ein konserviertes Epitop von murinem NF- κ B p52 gerichtet ist.
(Santa Cruz Biotechnology; cat# sc-298 X)

2.8 Chemikalien, Enzyme, Antibiotika

Bei der Durchführung der Experimente wurden handelsübliche Chemikalien der Firmen GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg; früher Amersham Pharmacia Biotech), Boehringer Mannheim (Mannheim), Fluka (Seelze), Life Technologies (Karlsruhe), Roche (Grenzach-Wyhlen), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und VRL (Darmstadt; früher Merck) verwendet.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O _{dest.} ; sterilfiltriert	100 µg/ml
Kanamycin	100 mg/ml in H ₂ O _{dest.} ; sterilfiltriert	50 µg/ml
Chloramphenicol	20 mg/ml in Ethanol	20 µg/ml
Gentamicin	50 mg/ml in H ₂ O; gebrauchsfertig gekauft	50 µg/ml (in ZK-Versuchen)

2.9 Lösungen, Puffer und Medien

Alle verwendeten Puffer und Lösungen werden mit destilliertem H₂O hergestellt und – sofern nicht anders angegeben – autoklaviert, sterilfiltriert oder aus bereits sterilen Lösungen hergestellt. Die zu ihrer Herstellung verwendeten Chemikalien besitzen den Reinheitsgrad pro analysis (p.a.).

2.9.1 Reagenzien zur Bakterienkultur (3.1)

Flüssigmedien und Nährböden zur Bakterienkultur wurden von der institutseigenen Nährbodenküche zur Verfügung gestellt. Die Trockensubstanzen für die Flüssigmedien sowie der Agar für die festen Nährmedien wurden von Becton Dickinson GmbH (Heidelberg) geliefert.

LB (Luria-Bertani)-Medium

Bacto-Trypton	10,00 g
Yeast-Extrakt	5,00 g
NaCl	5,00 g
H ₂ O ad 1000 ml	

LB-Platten (LB-Agar)

Zugabe von 10 g Agar/l LB-Medium

Die Medien wurden für 20 Minuten bei 120°C autoklaviert. Erfolgte der Zusatz von Antibiotikum, wurde das autoklavierte Medium zuvor auf 45°C abgekühlt. Die Lagerung der Agarplatten erfolgt im Kühlraum, die der Flüssigmedien bei RT.

2.9.2 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur (3.2)

MEM Minimum Essential Medium mit Earle's Salts, L-Glutamin
(Gibco® Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

RPMI 1640 mit L-Glutamin (Gibco® Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

DMEM Dulbeccos's Mod Eagle Medium mit L-Glutamin, 1000 mg/l
HEPES gepuffert Glucose, Natriumpyruvat, 25 mM HEPES (Gibco® Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

FCS 100% Fetal Calf Serum (Sigma, Deisenhofen; "FCS GOLD" PAA Laboratories GmbH, Cölbe)
Hitzeinaktivierung für 30 Minuten bei 56°C

2 MATERIAL

<u>NEA</u>	100 x Non-Essential Aminoacids (Biochrom AG, Berlin)		
<u>Pen/Strep</u>	10000 Einheiten Penicillin (Penicillin G) und 10000 µg Streptomycin (Streptomycin Sulfat)/ml (Gibco® Invitrogen GmbH, Karlsruhe)		
<u>Hanks' Salt Solution</u>	1 x; mit 0,35g/l NaHCO ₃ ; ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Phenolrot (Biochrom AG, Berlin)		
<u>10x PBS</u>	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung; 10 x (Gibco® Invitrogen GmbH, Karlsruhe)		
<u>1x PBS</u>			
	10x PBS _{steril}	50 ml	
	H ₂ O _{steril}	450 ml	
<u>20 x Ca²⁺/Mg²⁺</u>			
	CaCl ₂	2 g	
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2 g	
	H ₂ O ad 1000 ml		
<u>1 x PBS + Ca²⁺/Mg²⁺</u>			
	10 x PBS _{steril}	50,00 ml	
	20 x Ca ²⁺ /Mg ²⁺	25,00 ml	
	H ₂ O _{steril} ad 500 ml		
<u>Zellkultur-Wasser</u>	Water, sterile for cell culture (PAN Biotech GmbH, Aidenbach)		
<u>Trypsin/ EDTA</u>	1 x; 0,5 g Trypsin (1:250)/l; 0,2 g EDTA/l in 1 x PBS (PAA Laboratories GmbH, Cölbe)		
<u>MEM-Komplettmedium für HeLa</u>	MEM		
	FCS (hitzeinaktiviert)	10 %	
	NEA	1 %	

<u>MEM-Hungermedium für HeLa</u>	MEM	
	FCS (hi)	1 %
	NEA	1 %
<u>RPMI-Komplettmedium für P388D₁</u>	RPMI	
	FCS (hi)	14 %
<u>RPMI-Hungermedium für P388D₁</u>	RPMI	
	FCS (hi)	1 %
<u>Einfriermedium</u>	Komplettmedium	40 %
	FCS (hi)	50 %
	DMSO	10 %
<u>DMEM-Anzuchtmedium für KMM</u>	DMEM _{HEPES}	
	FCS (hi)	10 %
	NEA	5 %
	Pen/Strep	1 %
	β-Mercaptoethanol	50 μM
	M-CSF	20 %
<u>DMEM-Splitmedium für KMM</u>	DMEM _{HEPES}	
	FCS (hi)	10 %
	NEA	5 %
	β-Mercaptoethanol	50 μM
<u>DMEM-Hungermedium für KMM</u>	DMEM _{HEPES}	
	FCS (hi)	2,50 %
	NEA	5,00 %
	β-Mercaptoethanol	50,00 μM
	M-CSF	10,00 %
<u>Zellproliferationsmedium für Milzzellen</u>	RPMI	
	FCS (hi)	10 %

2 MATERIAL

Pen/Strep	1 %
β -Mercaptoethanol	50 μ M

Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), produziert von L-929 580 Fibroblasten, wurde mir von der Zellkultur des Instituts zur Verfügung gestellt.

<u>Erythrozyten-Lyse-Puffer</u>	2,06 g Tris
	7,49 g NH_4Cl
	H_2O ad 1000 ml, pH 7,2

2.9.3 Puffer zur Proteinextraktion (3.5.1)

2.9.3.1 Puffer zur Proteinextraktion aus Zellen permanenter Zelllinien

Puffer A

HEPES pH 7,9	10 mM
KCl	10 mM
EDTA pH 8,0	0,1 mM
EGTA pH 8,0	0,1 mM
DTT	1,0 mM (Zugabe kurz vor Gebrauch)
PMSF	0,5 mM (Zugabe kurz vor Gebrauch)
Lagerung ohne DTT und PMSF bei 4°C	

Puffer C

HEPES pH 7,9	20 mM
NaCl	400 mM
EDTA pH 8,0	1 mM
EGTA pH 8,0	1 mM
DTT	1 mM (Zugabe kurz vor Gebrauch)
PMSF	1 mM (Zugabe kurz vor Gebrauch)
Lagerung ohne DTT und PMSF bei 4°C	

2.9.3.2 Puffer zur Proteinextraktion aus Primärzellen

Puffer A

siehe 2.9.3.1

Puffer C nach Dignam *et al.*, 1983 – modifiziert [97]

HEPES pH 7,9	20,00	mM
Glycerol	10,00	%
NaCl	0,42	M
MgCl ₂	1,50	mM
EDTA pH 8,0	0,20	mM
DTT	1,00	mM (Zugabe kurz vor Gebrauch)
PMSF	1,00	mM (Zugabe kurz vor Gebrauch)
Lagerung ohne DTT und PMSF bei 4°C		

2.9.4 Puffer und Lösungen zur Proteinanalytik (3.5)

10% SDS

SDS	50 g
H ₂ O ad 500 ml	

5x SDS-Laufpuffer

Tris	15,15 g
Glycin	93,85 g
10% SDS-Lösung	50,00 ml
H ₂ O ad 1000 ml	

1x SDS-Laufpuffer (Gebrauchslösung)

5x SDS-Laufpuffer	200 ml
H ₂ O ad 1000 ml	

10x Transferpuffer für Naßblots (ohne Methanol)

Tris	30,30 g
Glycin	144,00 g

2 MATERIAL

H₂O ad 1000 ml

1x Transferpuffer für Naßblots zur Anwendung (mit Methanol)

10x Naßblotpuffer 100,00 ml

Methanol 150,00 ml

H₂O ad 1000 ml

TBS

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

NaCl 150 mM

H₂O ad 1000 ml

TBS-Tween

1x TBS 1000 ml

0,05% [v/v] TWEEN 20

PonceauS-Lösung

PonceauS 2 %

TCA 5 %

Blotto A

5 % Magermilchpulver gelöst in TBS oder TBS-Tween

Trenngel-Überschichtungslösung

Tris-HCl pH 8,8 0,375 M

SDS 0,1 % [v/v]

4x Laemmli-Puffer

87 % Glycerin 4,00 ml

10 % SDS 3,00 ml

2 M Tris-HCl pH 6,8 2,00 ml

β-Mercaptoethanol 750 µl

Bromphenolblau 10,00 mg

H₂O ad 10 ml

Lagerung: -20°C

Methylgrünlösung

50 % Glycerin	2,00 ml
0,5 m Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O	1,75 ml
Methylgrün	50,00 mg
Lagerung: -20°C, lichtgeschützt	

2.9.5 Puffer und Lösungen zu Protein-DNA-Bindungsstudien (3.7)

STE

NaCl	100,00 mM
Tris-HCl pH 7,5	20,00 mM
EDTA pH 8,0	10,00 mM

10x TBE-Puffer

Tris	108,00 g
Borsäure	55,00 g
0,5 M EDTA pH 8,0	40,00 ml
H ₂ O ad 1000 ml	

0,4x TBE-Puffer (Gebrauchslösung)

H ₂ O	960 ml
10 x TBE	40 ml

3x Bindungspuffer

HEPES pH 7,9	60,00 mM
KCl	150,00 mM
EDTA pH 8,0	3,00 mM
DTT	3,00 mM
Ficoll	12,00 %

2 MATERIAL

Farbpuffer EMSA

HEPES pH 7,6	10,00 mM
Glyzerin	10,00 %
Bromphenolblau	0,01 %

Fixierlösung für EMSA-Gele

Eisessig (100 %)	100,00 ml
H ₂ O ad 1000 ml	

2.9.6 Puffer für den Luciferase-Reportergen-Assay (3.8)

PBS für Luciferase Assay pH 7,3

Na ₂ HPO ₄	4,3 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM
NaCl	137,0 mM
KCl	2,7 mM
H ₂ O ad 1000 ml	

1x Passive Lysis Buffer pro 24-well

5x Passive Lysis Buffer (Promega)	20 µl
H ₂ O	80 µl

2.10 Molekulargewichtsstandard

2.10.1 Protein-Größenstandard

Prestained "Broad Range"-Standard (Bio-Rad)

Myosin	194,20 kDa
β-Galactosidase	115,60 kDa
Rinderserumalbumin	97,30 kDa
Ovalbumin	53,50 kDa
Carboanhydrase	37,20 kDa

Trypsininhibitor	29,30 kDa
Lysozym	20,40 kDa
Aprotinin	7,00 kDa

Die Größen variieren leicht in den einzelnen Chargen und dienen zur Orientierung. Der Größenstandard wird in den Abbildungen nicht mit angegeben.

2.11 Verwendete "Kits"

- "Bio-Rad Protein Assay Kit II" (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) zur Bestimmung der Proteinkonzentration von zellfreien Extrakten (3.5.2)
- "ECL™ Western blotting detection reagents"-Kit (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) zur ECL-Entwicklung von Western Blots (3.6.2.3)
- "Dual-Luciferase® Reporter Assay System" (Promega GmbH, Mannheim) zum Nachweis der Luciferase-Aktivität in transfizierten eukaryontischen Zellen (3.8.2 und 3.8.3)
- QIAfilter® Plasmid Midi Kit, QIAGEN® Plasmid Purification (QIAGEN GmbH, Hilden), zur Midipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (3.4.2)

2.12 Gele

2.12.1 5%-iges, natives Polyacrylamidgel für Gelretardationsexperimente (3.7.3.2)

	100 ml/kleines Gel	200 ml/großes Gel
Wasser	78,50 ml	157,00 ml
Rotiphorese® Gel 30	16,70 ml	33,40 ml
10 x TBE	4,00 ml	8,00 ml
10 % APS	667 µl	1334 µl
TEMED	100 µl	200 µl

2 MATERIAL

2.12.2 Polyacrylamid-Trenngele zur Proteinanalytik (3.6.1)

	10 %	12 %
Wasser	7,90 ml	6,60 ml
Rotiphorese® Gel 30	6,70 ml	8,00 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	5,00 ml	5,00 ml
10 % SDS	200 µl	200 µl
10 % APS	200 µl	200 µl
TEMED	8 µl	8 µl

2.12.3 Polyacrylamid-Sammelgel zur Proteinanalytik (3.6.1)

	5 %
Wasser	5,50 ml
Rotiphorese® Gel 30	1,30 ml
1,0 M Tris-HCl pH 6,8	1,00 ml
10 % SDS	80 µl
10 % APS	80 µl
TEMED	8 µl

2.13 Geräte und sonstige Verbrauchsmaterialien

Gerät	Herkunft
Autoklaven	Geringe, Tuttnauer Systec 2540 EL
Begasungsbrutschrank für Zellkultur	Heraeus Thermo Forma Model 381
Brutschrank für Bakterienkultur	Forma Scientific Water-Jacketed Inkubator 3250
Densitometer	GSF-Film-GD 40
Eismaschine	Icematic F90 Compact Electronic
EMSA-Elektrophoresekammer	Eigenbau der Institutswerkstatt
Feinwaage	Kern 770
Gefriertruhen	Heraeus, Bosch

Geigerzähler	FAG Contamat FHT 111M
Geltrockner	Bio-Rad Model 583 Gel Dryer
Luminometer	Lmax [®] , Molecular Devices Corporation
Magnetrührer	Ikamag [®] REO und RCT
Mikropipetten	Eppendorf, Gilson, Matrix
Mikroskope	Hund, Wiovet S
Mikrowellengerät	Moulinex
Minigel-Elektrophoresekammer	Hoefer Mighty Small™ II SE 250
Minigel-Gießapparatur	Hoefer Mighty Small™ II SE 245
Naßblotkammer	Hoefer Mighty Small™ Transphor
pH-Meter	Knick
Photometer	Pharmacia Biotech Ultrospec 3000, Nano Drop Technologies, Inc., ND-1000 Pharmacia Biotech Gene Quant
Reinstwassersystem	Millipore
Röntgenfilmkassetten	Kodak BioMax
Schüttler	GFL3017
Spannungsgeräte	Pharmacia LXB MultiDrive XL, Consort E455
Sterilbank	ASW-UP 1200 NUARE NU 440-401 E
Szintillationszähler	EG&G Wallac 1209 Rack-Beta
Thermocycler	bio-med Thermocycler 60
Thermomixer	Eppendorf Comfort
Thermoblock	Eigenbau der Institutswerkstatt
Tumbler	Heidolph Polymax 1040
Verstärkerfolien	Kodak BioMax MS intensifying screens
Vertikale Elektrophoresekammern	Eigenbau der Institutswerkstatt
Vortexer	Janke & Kunkel IKA [®] Vibrofix VF1
Waagen	Kern EG, Mettler Toledo PB801
Wasserbäder	Grant Instruments Type SUB 14
Zellzählgerät	IVO
Zellzählkammer	Neubauer
Zentrifugen	Kühlzentrifuge: Heraeus Sepatech Megafuge 1.0R

2 MATERIAL

Tischzentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5415D
und 5810R, Heraeus Sepatech Biofuge 15

Verbrauchsmaterial	Herkunft
Blotpapier	Schleicher & Schüll Gel Blotting Paper GB002 und GB003
Filme	Röntgenfilme: Kodak Scientific Imaging Film BioMax™ MR Lumineszenzfilme: GE Healthcare Europe GmbH High performance luminescence film Hyperfilm™ ECL
Filmentwickler, s/w	Agfa Rodinal B/W Film Developer
Filmfixierer	Agfa Acidofix Fixer
Handschuhe	Ansell SensiClean® Kimberly-Clark SAFESKIN Purple Nitrile
Immobilon-P Transfer Membran (PVDF)	Millipore 0.45 µm
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf
Petrischalen, steril	Greiner
Pipettenspitzen	Saarstaedt, MBT
Serologische Kunststoffpipetten, steril	Falcon® (Becton Dickinson Labware)
Sterile Kunststoffgefäße	Greiner, Falcon
Zellkulturschalen, verschiedene Formate	Falcon® (Becton Dickinson Labware), Nalge Nunc
Zellschaber	Greiner

3 METHODEN

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Haltung und Anzucht von Bakterien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind bereits in der institutseigenen Stammsammlung enthalten oder an uns weitergereicht worden (2.1). Sie können über mehrere Monate bei 4°C auf geeigneten Agarplatten (2.9.1) gehalten werden. Die langfristige Lagerung erfolgt in Form von Glycerinkulturen, welche aus Übernachtskulturen (ÜNK) hergestellt werden, indem diese mit sterilem Glycerin versetzt werden, so dass eine Glycerin-Endkonzentration von 20% erreicht wird. So sind die Kulturen bei - 80°C sogar über mehrere Jahre haltbar.

Zur Herstellung von Flüssigkulturen werden 10 bzw. 100 ml LB-Medium (2.9.1) - je nach Selektionsdruckeigenschaften des Keimes mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz - mit wenig Bakterienmaterial, das mit einer sterilen Impföse von einer Agarplatte genommen wurde oder 20 µl einer Glycerinkultur, angeimpft. Die Anzucht erfolgt bei 37°C unter permanentem Schütteln (180 rpm) über Nacht.

3.1.2 Anzucht von *Escherichia coli* für die Infektion von Zellen oder Mäusen

Die Anzucht erfolgt bereits am Vortag der Infektion, indem 10 ml ÜNK angesetzt werden. Diese wird am darauf folgenden Tag mit dem entsprechenden Zellkulturmedium 1:40 verdünnt (10 ml Zellkulturmedium + 250 µl ÜNK). Es hat sich gezeigt, dass reines DMEM das Bakterienwachstum am besten unterstützt. Nach 3 bis 3½ Stunden Wachstum, je nach Keim, in einem Zellkulturbrutschrank bei 37°C und 5% CO₂ (ohne Schütteln) erreicht die Bakteriensuspension eine optische Dichte (OD) von 0.962 bei der eine Bakterienkonzentration von 4.25×10^8 *E. coli* pro ml Medium vorliegt. Je nach Versuchsbedingungen werden die Bakterien gewaschen oder direkt auf das entsprechende Infektionsvolumen mit einer "Multiplicity of infection" (MOI) von 50 eingestellt. Unter der Multiplizität der Infektion versteht man die Anzahl der pro Eukaryontenzelle eingesetzten Bakterien. Anschließend werden die Zellen infiziert.

Für die Infektion von Mäusen werden die Bakterien zweimal mit reinem Medium gewaschen und auf eine Dichte von 3×10^7 Bakterien/200 μ l Medium pro Maus eingestellt.

3.2 Zellkultur eukaryontischer Zellen

Die hier verwendeten eukaryontischen Zelllinien (P388D₁-Makrophagen und HeLa-Zellen; die primären Knochenmarksmakrophagen werden gesondert in 3.2.2 behandelt) werden in befeuchteten Zellkulturbrutschränken bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Beide Zelllinien werden in Gewebekulturschalen (Falcon 94/16; d = 85 mm) gehalten und adhären am Boden der Schalen.

Bei P388D₁-Makrophagen sollte das Medium alle zwei Tage, bei HeLa-Zellen alle drei Tage gewechselt werden, um abgestorbene Zellen, Zelltrümmer und Stoffwechselprodukte zu entfernen sowie die Zellen mit neuen Nährstoffen und Wachstumsfaktoren zu versorgen. Im Allgemeinen sind folgende Regeln beim Arbeiten mit Zellkulturen zu beachten:

- Sämtliche Puffer, Medien und Medienzusätze müssen steril sein. Die Flaschen und Gefäße, in denen sie gelagert oder gemischt werden, dürfen nur unter sterilen Bedingungen geöffnet werden.
- Plastikgefäße, Zellkulturschalen und sonstige Gegenstände, die mit den Zellen oder den Medien in Berührung kommen, müssen steril sein.
- Die Fläche unter der Sterilbank ist vor Arbeitsbeginn und nach Arbeitsende mit 70%-igem Ethanol abzuwischen. Ebenso sind die behandschuhten Hände damit zu desinfizieren.
- Die Sterilbank ist in regelmäßigen Abständen mit UV-Licht zu bestrahlen. Die Zellkulturbrutschränke sind auf eventuellen Pilzbefall hin zu kontrollieren und dementsprechend zu säubern und zu desinfizieren.
- Alle verwendeten Gefäße sind nach Gebrauch sofort zu verschließen.
- Puffer und Medien sind nur in vorgewärmten Zustand (37°C) zu verwenden.
- Permanente Zelllinien sollten nicht länger als 30 Passagen (das entspricht in etwa 3 Monate) in Kultur bleiben und in Experimente eingesetzt werden.

3.2.1 Permanente Zelllinien

3.2.1.1 Passagieren von adhärenenten Zellen

Permanente, adhärenente Zellen wachsen in einem Monolayer. Die Kulturen müssen in regelmäßigen Abständen geteilt werden, da die Zellen nach Erreichen der Konfluenz die Teilung einstellen. Dieses Phänomen wird als Kontaktinhibition (dichteabhängige Inhibition) der Zellteilung bezeichnet. Hierzu werden sie von ihren Zellkulturschalen abgelöst, mit frischem Medium versetzt und in neue Zellkulturschalen ausgesät.

HeLa-Zellen lassen sich sehr einfach mit Trypsin ablösen. Makrophagen hingegen müssen mit einem Zellschaber mechanisch von ihrer Unterlage gelöst werden, wodurch ein Teil der Zellen dieses Prozedere nicht überlebt.

Generell ist es ratsam einen festen Teilungsrhythmus in die Zellkultur zu bringen, um überflüssiges Splitten zu vermeiden und somit die Qualität der Zellen länger zu erhalten.

HeLa-Zellen lassen sich gut in einen Teilrhythmus von 3 bzw. 4 Tagen bringen. Somit müssen die Zellen zum Weiterkultivieren nur zweimal pro Woche passagiert werden. Die in dieser Arbeit benutzten HeLa-Zellen wurden montags im Verhältnis 1:8 und donnerstags im Verhältnis 1:11 geteilt.

P388D₁-Makrophagen dürfen höchstens im Verhältnis 1:6 gesplittet werden, da sie immer einen Zell-zu-Zell-Kontakt benötigen, um weiter zu wachsen. Daher ist bei dieser Zelllinie die Frequenz der Spaltung höher. Die in dieser Arbeit verwendeten P388D₁-Makrophagen wurden montags und mittwochs im Verhältnis 1:4 und freitags im Verhältnis 1:6 gesplittet. Beide Zelllinien wiesen zu den angegebenen Passagetagen eine Konfluenz auf.

Fanden die Zellen jedoch in einem Infektionsversuch Verwendung, für den eine definierte Menge an Zellen ausgesät werden musste, so wurde ihre Lebendzellzahl (3.2.3) ermittelt, anschließend die benötigte Dichte eingestellt und die Zellen ausgesät.

3.2.1.1.1 Trypsinieren von Zellen (HeLa-Zellen)

Trypsin ist ein Enzym, das, damit es voll wirken kann, auf 37°C erwärmt werden muss. Damit es nicht durch das im Medium enthaltene FCS inaktiviert wird, müssen die Zellen vor dem Trypsinieren mindestens zweimal mit 7 ml angewärmter Hanks' Salt Solution

gewaschen und diese dann vollständig abgesaugt werden. Diese Prozedur hat auch den Vorteil, dass die Zellen gründlich gewaschen werden und frei von Zelltrümmern und toten Zellen sind. Für eine Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 8.5 bis 10 cm ist ein ml Trypsin zum Ablösen der Zellen vollkommen ausreichend. Durch Schwenken der Platte verteilt es sich gleichmäßig über den Zellrasen. Die Zellen werden dann für 3 Minuten im Zellkulturbrutschrank bei 37°C (und 5% CO₂) inkubiert. Nach Ablauf der Zeit erscheinen die Zellen unter dem Mikroskop dann als kugelige Gebilde, die sich durch leichtes Stoßen der Schale ablösen. Die Trypsinwirkung wird durch Zugabe von 7 bis 10 ml MEM-Komplettmedium inhibiert. Die Zellen werden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vollständig von der Unterfläche gelöst und vereinzelt, so dass eine homogene Zellsuspension entsteht. Die Zellen werden dann, ihrer Bestimmung gemäß, mit frischem MEM-Komplettmedium verdünnt und in neue sterile Zellkulturschalen ausgesät.

3.2.1.1.2 Abschaben von Zellen (P388D₁-Makrophagen)

Bevor Makrophagen abgeschabt werden, müssen sie gewaschen werden. Dies geschieht zweimal mit 1xPBS+Ca²⁺/Mg²⁺. Danach gibt man mindestens 5 ml frisches RPMI-Komplettmedium auf die Zellen und schabt sie dann mit einem Zellschaber vorsichtig ab. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren werden die Makrophagen vereinzelt. Die Zellen werden dann, ihrer Bestimmung gemäß, mit frischem RPMI-Komplettmedium verdünnt und in neue sterile Zellkulturschalen ausgesät.

3.2.1.2 Cryokonservierung und Auftauen von Zellen

Eukaryontische Zellen lassen sich problemlos mehrere Jahre in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -196°C aufbewahren. Das hat den Vorteil, dass man über lange Zeit eine gleich bleibende Zellqualität aufrechterhalten kann. Die Art und Weise wie Zellen eingefroren und somit konserviert werden, ist entscheidend für ihre Überlebensfähigkeit. Während des Einfriervorganges bilden sich normalerweise intrazelluläre Eiskristalle, die die Zellen irreversibel schädigen. Es ist unerlässlich, dies durch ein geeignetes Gefrierschutzmittel zu unterbinden. Daher wird bei der Cryokonservierung von eukaryontischen Zellen Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzu gegeben. DMSO ist zytotoxisch, weswegen es nach langsamem Wiederauftauen stark verdünnt und durch Waschschrte und Mediumwechsel schließlich entfernt werden muss.

3.2.1.2.1 Cryokonservierung

Die zu einem konfluenten Monolayer herangewachsene Zellkultur wird wie unter 3.2.1.1.1 bzw. 3.2.1.1.2 vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst und die Lebendzellzahl bestimmt (3.2.3). Währenddessen werden die Zellen für mindestens 5 Minuten auf Eis inkubiert, um die Stoffwechselaktivität zu reduzieren, um somit die Schädigung durch DMSO zu minimieren. Die Zellen werden dann zentrifugiert (900 rpm, 9 min, 4°C) und mit vorgekühltem Einfriermedium (2.9.2) auf eine Dichte von $1\text{--}2 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Die Suspension wird in 1- bis 1.5-ml-Portionen in Cryovials (Nalgene, United Kingdom) überführt. Diese werden in Nalgene-Einfrierboxen, die für eine konstante Temperaturerniedrigung von 1°C pro Minute mit Isopropanol gefüllt sind, bis zu einer Temperatur von -80°C eingefroren. Danach werden die Vials in flüssigem Stickstoff gelagert und sind dort für mehrere Jahre haltbar.

Um die Sterilität der Kultur und das Zytotoxizitätspotential des DMSO zu überprüfen, werden ca. 200 µl der Zellsuspension in 10 ml frischem Zellkulturmedium ausgesät und am darauf folgenden Tag auf Kontamination und Zelltod überprüft.

3.2.1.2.2 Auftauen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Eukaryontenzellen werden langsam bei 37°C im Wasserbad oder in der Hand aufgetaut, vorsichtig resuspendiert, in 25 ml frisches vorgewärmtes Komplettmedium überführt und dann zentrifugiert (900 rpm, 8 min, RT). Der Überstand wird quantitativ abgezogen und das Zellpellet in 10 ml Komplettmedium aufgenommen. Abschließend werden die Zellen in eine neue Zellkulturschale ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

3.2.2 Primärzellen

Unter Primärzellen versteht man Zellen, die neu aus einem Organismus isoliert werden und nicht über längeren Zeitraum in Kultur gehalten werden können. Diese Zellen haben anspruchsvollere Kulturbedingungen als permanente Zelllinien und bedürfen daher einer eingehenden Betrachtung.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Primärzellen handelt es sich um ausdifferenzierte Knochenmarksmakrophagen, die aus dem Knochenmark der Oberschenkelknochen (Femur) von ca. 6 Wochen alten weiblichen Balb/C Mäusen isoliert worden sind.

3.2.2.1 Isolation muriner Knochenmarksmakrophagen

Es hat sich gezeigt, dass man aus dem Knochenmark zweier Femure soviel Zellmaterial erhält, so dass nach einer Woche drei konfluente Zellkulturschalen mit ausdifferenzierten Makrophagen vorliegen.

Je nach Menge der benötigten Makrophagen werden entsprechend viele Mäuse *leige artis* getötet. Alle nun folgenden Schritte werden unter der Sterilbench durchgeführt. Die Oberschenkelknochen werden, so aseptisch wie eben möglich, vollständig extirpiert und von Muskelgewebe befreit. Zuerst wird das Kniegelenk mit einem Skalpell vorsichtig abgetrennt, dann der Femurkopf. Mit einer Kanüle (0.45 x 12 mm) und 10 ml DMEM_{HEPES} wird das Knochenmark vollständig in eine sterile Petrischale gespült. Diese Zellsuspension wird vorsichtig auf- und abpipettiert, um eine Vereinzelung der Zellen zu erhalten und anschließend zum Zentrifugieren (1000 rpm, 10 min, RT) in 15-ml-Greiner-Röhrchen überführt. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand abgenommen und die Zellen in DMEM_{HEPES}-Anzuchtmedium aufgenommen.

3.2.2.2 Differenzierung und Anzucht muriner Knochenmarksmakrophagen

Die isolierten Knochenmarkszellen werden in 30 ml DMEM_{HEPES}-Anzuchtmedium resuspendiert und in drei Petrischalen ausgesät. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkulturbrutschrank. Die Ausdifferenzierung der Makrophagen dauert 7 Tage, in denen das Anzuchtmedium alle drei Tage erneuert wird.

3.2.2.3 Passagieren

Ein Passagieren im eigentlichen Sinn der Zellkultur ist mit ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen nicht möglich. Die Zellen lassen sich nicht einmal über eine Woche in Kultur halten. Stattdessen müssen sie direkt nach der Differenzierung zu Makrophagen in entsprechenden Experimenten eingesetzt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten aus-

differenzierten Knochenmarksmakrophagen wurden allesamt in Infektionsversuche eingesetzt. Dazu müssen sie in Zellkulturschalen überführt werden.

Die ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen werden einmal mit DMEM_{HEPES} gewaschen, pro Schale mit 10 ml DMEM_{HEPES}-Splitmedium versehen und für 10 bis 20 Minuten bei -20°C eingefroren. Danach werden die Zellen vorsichtig mit dem Medium abgespült und gegebenenfalls mit einem Zellschaber abgeschabt. Alle Zellen werden vereinigt, mit 15% M-CSF supplementiert und in drei neue sterile Falcon-Zellkulturschalen (96/14; d = 85 mm) ausgesät. Die Kultivierung erfolgt weiterhin bei 37°C in einem CO₂-Brutschrank.

3.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl eukaryontischer Zellen mittels Trypanblau-Färbung

Trypanblau ist ein Farbstoff, der in tote Zellen schnell eindringen kann, von lebenden Zellen hingegen nur langsam aufgenommen wird. Somit eignet er sich hervorragend, um tote Zellen von lebenden unter dem Lichtmikroskop zu unterscheiden. Tote Zellen sind blau angefärbt, lebende Zellen erscheinen transparent.

Zur Bestimmung werden gleiche Volumina der gut gemischten Zellsuspension und des Farbstoffes gemischt. Eine Neubauer-Zählkammer wird mit diesem Gemisch bestückt und die nicht angefärbten Zellen im Leukozytenzählfeld (16 Kleinstquadrate) gezählt. Die Lebendzellzahl pro ml errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Lebendzellzahl/ml} = \text{gezählte transparente Zellen pro Leukozytenzählfeld} \\ \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10.000 \text{ (Kammerfaktor)}$$

Um die Fehlerrate möglichst klein zu halten, empfiehlt es sich, die zu bestimmende Zellsuspension im Vorhinein (Erfahrungswerte) so einzustellen, dass mindestens 100 Zellen pro 16 Kleinstquadrate gezählt werden können. Daneben sollten mehrere Großquadrate ausgezählt und ein Mittelwert gebildet werden.

Eine entscheidende Fehlerquelle stellt die schnell sedimentierende Zellsuspension dar, so dass die Zellsuspension vor dem Mischen mit Trypanblau noch einmal gut gemischt werden sollte.

3.2.4 Infektion von Säugerzellen mit extrazellulären Bakterien

3.2.4.1 Infektion von permanenten Zelllinien mit extrazellulären Bakterien

48 Stunden vor der Infektion werden 5.3×10^6 P388D₁-Makrophagen bzw. 1.83×10^6 HeLa-Zellen in einer Zellkulturschale (Falcon 94/16; d = 85 mm) in 13 ml Kompletmedium ausgesät und bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. 21 Stunden vor Infektionsbeginn werden die Zellen je zweimal mit 1xPBS+Ca²⁺/Mg²⁺ bzw. Hanks' Salt Solution gewaschen und mit 10 ml Hungermedium (2.9.2) weiter kultiviert. Für die Infektion werden die Bakterien wie unter 3.1.2 beschrieben angezüchtet und in 5 ml des entsprechenden Hungermediums auf eine MOI von 50 eingestellt, was einer Bakterienzahl von 5.3×10^8 für P388D₁-Makrophagen und 1.83×10^8 für HeLa-Zellen pro Zellkulturschale entspricht. Die Bakterien verbleiben entsprechend den Versuchsbedingungen auf den Zellen. Da es sich jedoch um extrazelluläre adhärente Bakterien handelt, müssen die nicht adhärenen Bakterien nach zwei Stunden Infektionsdauer im zwei-Stunden-Rhythmus von den Zellen abgewaschen werden, um diese durch Stoffwechselprodukte oder Toxine nicht weiter zu schädigen. Dies geschieht, indem die Zellen dreimal gründlich mit 7 bis 10 ml Waschpuffer (1xPBS+Ca²⁺/Mg²⁺ bzw. Hanks' Salt Solution) gewaschen und anschließend mit frischem Hungermedium versehen werden.

Die Infektionszeiten betragen in der Regel bei Makrophagen bis zu 4 und bei HeLa-Zellen bis zu 6 Stunden. Die genaue Länge der Infektionskinetiken wird an den entsprechenden Stellen angegeben.

Nach der Infektion wurden aus den infizierten Zellen zytoplasmatische und nukleare Proteinextrakte hergestellt (3.4.1.1 und 3.4.1.2).

Die Infektion und Stimulation von HeLa-Zellen zur 'Untersuchung der NF-κB-DNA-Bindungsfähigkeit in mit STEC 413/89-1 Wildtyp, *E. coli* HB101 (pMAR7/pCVD462) und *E. coli* DH5α (pMAR7) infizierten HeLa-Zellen (ohne und mit TNF-α-Stimulation)' wurden von Frau Nadja Hauf durchgeführt (vgl. 4.6).

3.2.4.2 Infektion von Primärzellen mit extrazellulären Bakterien

Die in 3.2.2.3 passagierten Knochenmarksmakrophagen werden am folgenden Tag, 21 Stunden vor Infektionsbeginn, einmal mit DMEM_{HEPES} gewaschen und danach mit 10 bis 15 ml DMEM_{HEPES}-Hungermedium (2.9.2) pro Schale versorgt. Für die Infektion werden die Bakterien wie unter 3.1.2 beschrieben angezüchtet. Das Infektionsvolumen beträgt 5 ml, in denen sich 800 µl der Bakteriensuspension befinden. Die Bakterien verbleiben entsprechend den Versuchsbedingungen auf den Zellen. Da es sich jedoch um extrazelluläre adhärente Bakterien handelt, müssen die nicht adhärenenten Bakterien nach zwei Stunden Infektionsdauer im zwei-Stunden-Rhythmus von den Zellen abgewaschen werden, um diese durch Stoffwechselprodukte oder Toxine nicht weiter zu schädigen. Dies geschieht, indem die Zellen dreimal gründlich mit 7 bis 10 ml 1xPBS+Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und anschließend mit frischem Hungermedium versehen werden. Die genauen Versuchsbedingungen werden im Ergebnisteil dargestellt.

Nach der Infektion wurden aus den infizierten Zellen zytoplasmatische und nukleare Proteinextrakte hergestellt (3.4.1.1 und 3.4.1.2).

3.2.5 Inkubation von Säugerzellen mit verschiedenen Agenzien (LPS, TNF-α, LMB, MG132)

48 Stunden vor der Infektion werden 5.3×10^6 P388D₁-Makrophagen bzw. 1.83×10^6 HeLa-Zellen in einer Zellkulturschale (Falcon 94/16; d = 85 mm) in 13 ml Komplettmedium ausgesät und bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. 21 Stunden vor Inkubationsbeginn werden die Zellen je zweimal mit 1xPBS+Ca²⁺/Mg²⁺ bzw. Hanks' Salt Solution gewaschen und mit 10 ml Hungermedium (2.9.2) weiter kultiviert.

Die zumeist NF-κB-aktivierende Substanz (LPS, TNF-α) oder der Inhibitor (LMB, MG132) wird in 5 ml Hungermedium verdünnt.

Folgende Endkonzentrationen und Inkubationszeiten wurden in dieser Arbeit verwendet:

Substanz	Endkonzentration	Inkubationszeit
Lipopolysaccharid (LPS)	1 µg/ml	50 min
Tumor Necrosis Factor α (TNF-α)	15 ng/ml	20 min
Leptomycin B (LMB)	15 ng/ml	1 h prae + 6 h
MG132	10 µM	30 min prae + Infektion

Zu definierten Zeitpunkten werden die so behandelten Zellen geerntet und anschließend zytoplasmatische und nukleare Proteinextrakte hergestellt.

3.2.6 Transfektion eukaryontischer Zellen

Bei der Transfektion der in dieser Arbeit verwendeten HeLa-Zellen wird Fremd-DNA in Form von Plasmiden in die Wirtszelle gebracht und in das eukaryontische Genom integriert. Hierzu stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. In der hier vorliegenden Arbeit wird ein nicht-lipidhaltiges Transfektionsreagenz benutzt. Anfängliche Versuche mit lipidhaltigen Transfektions-Reagenzien zeigten eine starke Zytotoxizität, weswegen sie keine Verwendung fanden.

3.2.6.1 Transfektion mit FuGENE6® (Roche)

Die Versuche mit transfizierten HeLa-Zellen werden im 24-well-Format durchgeführt. Dazu werden 0.1×10^6 HeLa-Zellen pro 24-well ausgesät und 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert bis die Zellen adhärirt sind. Das Transfektionsreagenz-DNA-Verhältnis beträgt 6:1 (1.2 µg FuGENE6® : 200 ng Plasmid-DNA). Es werden drei verschiedene Plasmide in die Zellen transfiziert: pNF-κB-Luciferase, pRL-TK-Vektor (Renilla) und der Leervektor pcDNA™3.1 (+) (Mock). Diese Plasmide wurden in folgendem Verhältnis eingesetzt:

pNF-κB-Luciferase : pRL-TK-Vektor (Renilla) : pcDNA™3.1 (+) (Mock)

8	:	1	:	11	
80 ng	:	10 ng	:	110 ng	(Σ 200 ng)

Die Verhältnisse wurden in Vorversuchen mit dem Plasmid pEGFP-N1 (Clontech) ermittelt (Daten werden nicht gezeigt).

Die Transfektion wird nach dem Transfektionsprotokoll der Firma Roche durchgeführt. Dies gibt an, dass pro well ein Volumen von 20 µl, bestehend aus serumfreiem Medium, FuGENE6® und Plasmid-DNA, auf die Zellen gegeben werden soll. Dazu wird pro well 1.2 µl FuGENE6® in 18.8 µl serumfreies MEM pipettiert, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Dann wird die Plasmid-DNA laut oben angegebenem Verhältnis dazu pipettiert, der Ansatz wiederum gemischt und 15 Minuten bei RT stengelassen. In

der Zwischenzeit werden die 4 Stunden zuvor ausgesäten HeLa-Zellen einmal mit Hanks' Salt Solution gewaschen und pro well mit 1 ml serumfreiem MEM versorgt. Das Transfektionsreagenz-DNA-Gemisch wird nun vorsichtig gleichmäßig verteilend auf die Zellen pipettiert und diese anschließend für 3 Stunden im CO₂-Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der 3 Stunden wird pro well 1 ml MEM-Komplettmedium substituiert, so dass dann eine FCS-Konzentration von in etwa 5 % vorliegt.

Vorversuche mit dem Plasmid pEGFP-N1 (Clontech) haben gezeigt, dass mit dieser Methode eine Transfektionsrate von 25 bis 30 % zu erwarten ist.

Die Bedingungen und der Verlauf der Infektion mit den transfizierten HeLa-Zellen werden unter 3.8.1 behandelt.

3.3 Bestimmung der T-Zell-Proliferationsfähigkeit nach in vivo Infektion (Mausinfektionsmodell)

Concanavalin A, das Lectin von *Canavalia ensiformis* (Schwertbohne), besitzt die Eigenschaft, die mitogene Aktivität von T-Lymphozyten zu aktivieren. Dies geschieht durch die Bindung des Lectins an der Lymphozyten-Oberfläche. Ist die Mitose-Fähigkeit der Zellen nicht beeinträchtigt, so findet unter Concanavalin A-Einfluss eine Vermehrung derselben statt. Mit Hilfe eines spezifischen Zell Proliferations Reagenzes, WST-1 (Roche, Grenzach-Wyhlen), kann diese Vermehrung detektiert werden. WST-1 enthält Tetrazolium-Salze, welche durch die mitochondriale Dehydrogenase viabler Zellen zu Formazan gespalten werden. Diese Reaktion bewirkt einen Farbumschlag von einem zart-roten zu einem kräftig-roten Farbton, welcher im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm, gemessen gegen eine Referenz von 620 nm, quantifiziert wird. Dabei gilt, dass eine höhere Zellzahl eine höhere enzymatische Aktivität aufweist, was zu einem höheren Farbstoffumsatz und schließlich zu einer höheren Absorption führt.

Neben den eigentlichen Proben muss daher auch immer eine Kontrolle ohne Zellen durchgeführt werden, um die Eigenfärbung des Reagenzes und des Mediums zu ermitteln.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen sollen zeigen, dass durch eine Infektion mit STEC die Proliferationsfähigkeit der T-Lymphozyten, und somit ein kleiner Teil der spezifischen Immunität, derart gehemmt wird, so dass diese Zellen keine Signale

mehr an Zellen der unspezifischen Immunabwehr, z.B. Makrophagen, geben können, wodurch auch deren Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Zellen inhibiert wird.

3.3.1 Infektion von Balb/C Mäusen

Für die Infektion werden die Bakterien wie unter 3.1.2 beschrieben in RPMI-Medium angezüchtet und zweimal mit Medium gewaschen. Anschließend werden die Bakterien auf eine Dichte von 3×10^7 Bakterien/200 μ l Medium pro Maus eingestellt.

Für die Bestimmung der T-Zell-Proliferationsfähigkeit werden 6 Wochen alte weibliche Balb/C Mäuse verwendet. Die Infektion erfolgt in die Schwanzvene. Pro Erreger und Tag werden 3 Mäuse infiziert. Das entspricht insgesamt 6 infizierten Mäusen pro Erreger. Zur Kontrolle wird jeweils 2 Mäusen 200 μ l steriles RPMI gespritzt.

3.3.2 Milzzellisolierung

Für die Isolierung der Milzzellen werden 24 und 48 Stunden post infectionem jeweils 3 Mäuse pro Erreger und eine Kontrollmaus getötet. Alle weiteren Tätigkeiten erfolgen nun unter der Sterilbank.

Die Milzen werden extirpiert. Die Milzzellen werden mit 5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer (2.9.2) und mit Hilfe einer Spritze aus der Milz herausgespült und für 5 Minuten im Puffer stehen gelassen. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert (10', 1000 rpm und RT), mit 5 ml purem RPMI gewaschen und wiederholt zentrifugiert (10', 1000 rpm und RT). Danach werden die Zellen in Zellproliferationsmedium resuspendiert, wie unter 3.2.3 beschrieben gezählt und auf eine Dichte von 3×10^6 Zellen/ml eingestellt.

3.3.3 Milzellstimulierung mit Concanavalin A

Die Stimulierung der Milzzellen findet im 96-well-Format statt. Dazu werden zweimal je 180 μ l der in 3.3.2 präparierten Milzzellen im Triplet pro Maus ausgesät und 4 Stunden bei 37°C im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Dann werden 20 μ l einer Concanavalin A-Lösung (1 μ g/ml) auf die eine Hälfte der Triplets gegeben und die Zellen für weitere 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Bei der zweiten Hälfte Triplets wird mit 20 μ l Medium das Volumen dem der Con A behandelten angepasst. Diese Gruppe bildet in der Auswertung den Leerwert für die Proliferation ohne Stimulans.

3.3.4 Detektion mit WST-1 und Auswertung

24 Stunden nach Concanavalin A-Gabe werden 100 µl des Überstandes pro well abgenommen und 10 µl WST-1 pro well auf die Zellen gegeben. Dieser Ansatz wird 3 Stunden unter Zellkulturbedingungen bei 37°C inkubiert. Die Detektion erfolgt im ELISA-Reader bei 450/620 nm.

Die Auswertung geschieht wie folgt: aus den entsprechenden Triplets werden die Mittelwerte gebildet und die Werte der nicht mit Concanavalin A stimulierten Zellen von den Werten der mit Concanavalin A stimulierten Zellen abgezogen. Es erfolgt eine graphische Darstellung als Balkendiagramm.

3.4 Allgemeine molekulargenetische Methoden

3.4.1 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration einer doppelsträngigen (ds) DNA-Lösung oder einer einzelsträngigen (ss) Oligonukleotidlösung kann anhand ihrer optischen Dichte (OD) bei 260 nm ermittelt werden. Dazu wird eine wässrige Lösung (z.B. 1:100) der zu bestimmenden Nukleinsäurelösung in einer 1-cm-starken Quarzküvette bei 260 und 280 nm mit H₂O als Referenz gemessen. Dabei gelten folgende Verhältnisse:

$$OD_{260} \text{ von } 1 = 50 \text{ µg/ml ds DNA}$$

$$OD_{260} \text{ von } 1 \approx 20 \text{ µg/ml ss Oligonukleotid}$$

Damit kann die Konzentration der Nukleinsäurelösung mit der entsprechenden nachstehenden Formel berechnet werden:

$$OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{ds DNA-Konzentration (µg/ml)}$$

$$OD_{260} \times 20 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{ss Oligonukleotid-Konzentration (µg/ml)}$$

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden mit einem Nano-Drop gemessen, welcher direkt die DNA-Konzentration in ng/ml berechnet.

Das in dieser Arbeit verwendete Poly[d(I-C)] wurde mit dem Gene Quant gemessen, welcher ebenfalls die Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ direkt berechnet und auch die DNA-Reinheit angibt.

Die DNA-Reinheit sollte nicht unter 1.5 (bei ss Oligonukleotiden) bzw. 1.8 (bei ds DNA) liegen und wird durch das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ angezeigt.

3.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im mittleren Maßstab (Midi-Präp)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* werden, wie in 3.1.1 beschrieben, 100 ml ÜNK mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz eingesetzt. Die Präparation erfolgt komplett mit dem Kit QIAfilter® Plasmid Midi Kit der Firma QIAGEN (Hilden). Alle benötigten Puffer und die Kartuschen sind Bestandteile dieses Kits. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen sowie die genaue Durchführung sind dem vom Hersteller mitgelieferten Standardprotokoll zu entnehmen.

Die ÜNK wird bei 6000 rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 4 ml kalten Puffer P1 resuspendiert. Zur Lyse werden 4 ml Puffer P2 dazugegeben, gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zugabe von weiteren 4 ml Puffer P3 mit anschließendem Mischen wird die Lösung neutralisiert. Um chromosomale DNA, Zelltrümmer und Proteine von der gelösten Plasmid-DNA zu separieren, wird das Gemisch durch eine QIAfilter Patrone gedrückt und die Plasmid-DNA direkt in der QIAGEN-Tip-Säule aufgefangen. Hier wird die Plasmid-DNA gebunden, zweimal mit je 10 ml Puffer QC gewaschen und schließlich in 5 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wird durch Zugabe von 3.5 ml Isopropanol präzipitiert und bei 9500 rpm für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Daraufhin wird das DNA-Pellet zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Abschließend wird die Plasmid-DNA in 800 μl 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) gelöst und die Konzentration mit Hilfe eines Nano-Drops gemessen (3.3.1).

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Präparation von zytoplasmatischen sowie nuklearen Proteinen aus Säugerzellen

Die Präparation zytoplasmatischer und nuklearer Extrakte erfolgt, mit leichten Modifikationen, nach der von Schreiber *et al.* (1989) beschriebenen Methode [98]. Prinzipiell wird die Extraktion im Kühlraum in einem Eisbad durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen sollen vorgekühlt sein. Um ausreichende Kernextraktmengen zu erhalten, werden in etwa 1.06×10^7 Zellen P388D₁-Makrophagen, 2.12×10^7 ausdifferenzierte Knochenmarksmakrophagen oder 3.66×10^6 HeLa-Zellen benötigt. Hierbei nehmen die ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen eine besondere Stellung ein, da aus dieser Menge Zellen nur die Hälfte der Proteinmengen von P388D₁-Makrophagen zu erhalten ist.

Diese Werte werden empirisch ermittelt. Dabei ist grundsätzlich zu beachten, dass die Kernproteinausbeute aus Epithelzellen von Natur aus wesentlich höher ist, als diejenige aus Makrophagen. Das beruht auf der Tatsache, dass Epithelzellen ein leicht resuspendierbares Kernpellet besitzen, wohingegen Makrophagen ein schwer lösliches aufweisen. Proteinextrakte werden normalerweise direkt im Anschluss an Infektionen oder Stimulationen hergestellt. Es hat sich jedoch gezeigt, dass sich die Zellpellets, aus denen die Proteine isoliert werden, auch schockgefrieren und somit zu einem späteren Zeitpunkt verarbeiten lassen.

Dazu werden die infizierten oder stimulierten P388D₁-Makrophagen zweimal mit je 7 ml warmem $1 \times \text{PBS} + \text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen, in 5 ml kaltem $1 \times \text{PBS} + \text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ abgeschabt (3.2.1.1.2) und zentrifugiert (Heraeus Sepatech, Megafuge 1.0 R, 1500 rpm, 8 min, 4°C). Das Zellpellet wird in 1 ml kaltem $1 \times \text{PBS} + \text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ resuspendiert und in ein 1.5-ml-Mikroreaktionsgefäß überführt. Abschließend werden die Zellen bei 12.800 rpm für 30 Sekunden pelletiert und der Überstand vorsichtig und vollständig abgenommen, so dass ein trockenes Zellpellet im Reaktionsgefäß verbleibt. Dieses wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert bis es extrahiert wird.

Knochenmarksmakrophagen werden ebenfalls zweimal mit je 7 ml warmem $1 \times \text{PBS} + \text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen, mit 5 ml kaltem $1 \times \text{PBS} + \text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ bedeckt und dann für 15 Minuten bei -20°C eingefroren, damit sie sich vom Zellkulturschalenboden ablösen. Anschließend werden sie mit einem Zellschaber abgeschabt (3.2.2.3) und zentrifugiert

(Heraeus Sepatech, Megafuge 1.0 R, 1500 rpm, 8 min, 4°C). Die weitere Verarbeitung des Zellpellets erfolgt wie bei P388D₁-Makrophagen.

HeLa-Zellen werden nach der Stimulation oder Infektion zweimal mit je 7 ml warmer Hanks' Lösung gewaschen und anschließend trypsiniert. Um das Trypsin zu inhibieren werden 6 ml kaltes 1xPBS+Ca²⁺/Mg²⁺ auf die Zellen gegeben und diese zentrifugiert (Heraeus Sepatech, Megafuge 1.0 R, 1500 rpm, 8 min, 4°C). Die weitere Verarbeitung des Zellpellets erfolgt wie bei P388D₁-Makrophagen.

3.5.1.1 Extraktion zytoplasmatischer Proteine

Die eigentliche Proteinextraktion wird im Kühlraum durchgeführt.

Die Zellpellets werden, nachdem sie für zwei Minuten in einem Eisbad stehen, in 400 µl Puffer A resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit schwellen die Zellen, da der Puffer A hypotone Eigenschaften besitzt. Durch die Zugabe von 50 µl 5%-igem Nonidet P-40 mit anschließendem 10 sekündigem Vortexen werden die Zellen lysiert, wobei die Zellkerne jedoch intakt bleiben. Die Zellkerne werden daraufhin für 30 Sekunden bei 12.500 rpm abzentrifugiert und der Überstand, welcher die zytoplasmatischen Proteine enthält, quantitativ abgenommen und in 50-µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Extrakte erfolgt bei -80°C. Hier sind sie zur Analyse im Western Blot (3.5.2) für ca. ein Jahr haltbar und können, nach erfolgter Konzentrationseinstellung mit Puffer A, direkt in den Versuch eingesetzt werden.

3.5.1.2 Extraktion nuklearer Proteine

Die abzentrifugierten Kernpellets von permanenten Zelllinien (3.4.1.1) werden in 100 bis 140 µl Puffer C (2.9.3.1), die von Primärzellen in 50 µl Puffer C modifiziert nach Dignam (2.9.3.2) resuspendiert. Dieses Prozedere geht mit Epithelzellen sehr leicht vonstatten, indem das Kernpellet mit einer gelben Spitze mehrfach auf- und abpipettiert wird, mit Makrophagen hingegen nicht. Diese müssen regelrecht mit den Pipettenspitzen zerstoßen werden. Das zähe Makrophagen-Kernpellet wird dazu erst mit einer blauen Spitze und anschließend mit einer gelben zerstoßen, dabei vorsichtig auf- und abpipettiert bis es schließlich ganz einfach in die gelbe Pipettenspitze gezogen werden kann. Nur so kann eine gute Kernproteinausbeute gewährleistet werden. Die so resuspendierten Zellkerne werden für 30 Minuten bei 1.300 rpm geschüttelt, damit die salzlöslichen Kernproteine

extrahiert werden können. Anschließend wird der Ansatz zur Abtrennung von Kernmembranfragmenten und chromosomaler DNA für 5 Minuten bei 12.500 rpm zentrifugiert. Die Kernproteine befinden sich nunmehr im Überstand, der in 12- μ l-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren wird. Die Lagerung der Extrakte erfolgt bei -80°C. Hier sind sie zur Analyse in Gelretardationsexperimenten (3.6.3) für ca. ein halbes Jahr, zur Analyse im Western Blot (3.5.2) ca. ein Jahr haltbar und können, nach erfolgter Konzentrations-einstellung mit Puffer C, direkt in die Versuche eingesetzt werden.

3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von zellfreien Extrakten mit dem "Bio-Rad Protein Microassay"

Der "Bio-Rad Protein Microassay" (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) stellt eine verbesserte Form der Bradford-Methode dar. Dabei bildet der Farbstoff Coomassie Brilliantblau G-250 in saurer Lösung mit Proteinen blaue Komplexe. Diese Reaktion erfolgt wahrscheinlich durch die Bindung mit freien NH_2 -Gruppen von Argininresten. Die Komplexbildung geht mit einer Verschiebung des für den Farbstoff charakteristischen Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm einher. Am besten lassen sich Proteinmengen im Bereich von 1 bis 20 μ g bestimmen, wobei stets eine Dreifachbestimmung durchgeführt werden sollte.

Dazu werden 2 bis 3 μ l des zu bestimmenden zytoplasmatischen oder nuklearen Extraktes in einer Einmalküvette mit H_2O verdünnt, so dass das Endvolumen 800 μ l beträgt, um anschließend mit 200 μ l des Farbstoff-Konzentrates (5-fach konzentriertes Bradford-reagenz) versetzt zu werden. Die Extinktion der Proben wird nach gutem Mischen und einer 52-minütigen Inkubationszeit bei RT bei 595 nm gegen eine Leerprobe, welche aus 800 μ l H_2O + 200 μ l Farbstoffkonzentrat besteht, zeitkonstant gemessen.

Um die Proteinmenge aus der gemessenen Extinktion ableiten zu können, muss für jede Charge des Farbstoffkonzentrates eine Eichgerade erstellt werden. Dazu wird die Absorption von 1 bis 10 μ l einer BSA-Stammlösung (1.44 mg/ml in H_2O) bestimmt und mit den erhaltenen Werten die Eichgerade erstellt. An dieser Eichgerade kann der Proteingehalt der einzelnen Proben direkt abgelesen werden.

3.6 Proteinanalytik

3.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) [1]

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung und anschließenden Analyse von Proteinen oder Proteingemischen. Die Auftrennung erfolgt in vertikalen, diskontinuierlichen Gelen, die aus einem Sammel- und einem Trenngel bestehen. Um die Form und Eigenladung der Proteine zu eliminieren, werden diese vor der Elektrophorese in der Gegenwart von Laemmli-Puffer, der β -Mercaptoethanol und SDS enthält, für 3 Minuten bei 96°C erhitzt. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein starkes, negativ geladenes Detergens, das an hydrophobe Bereiche von Proteinen bindet und sie denaturiert. Dadurch können die Proteine in der SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

In dieser Arbeit wurden, abhängig vom zu untersuchenden Protein, 10%-ige und 12%-ige SDS-Polyacrylamid-Minigele (2.12) der Größe 10 x 8 cm verwendet. Zur Herstellung dieser Minigele werden die in 2.12 angegebenen Lösungen zusammenpipettiert, wobei APS als Radikalbildner und TEMED als Katalysator der Polymerisierungsreaktion erst unmittelbar vor dem Gießen des Trenn- bzw. Sammelgels zugegeben werden.

Als erstes wird die Trenngellösung bis 3 cm unterhalb des oberen Glasplattenrandes zwischen eine gut gereinigte Glas- und eine gut gereinigte Keramikplatte gegossen, die durch 1.5 mm starke Abstandshalter voneinander getrennt und in eine Minigelgießapparatur (Mighty Small™ II SE 245, Hoefer) eingespannt sind. Um eine gerade Trenngelgrenze zu erhalten, wird die Trenngellösung mit n-Butanol oder einer Trenngel-Überschichtungslösung (2.9.4) überschichtet und für ca. 30 Minuten bei RT stehen gelassen, damit eine vollständige Polymerisation stattfinden kann. Danach wird die Trenngel-Überschichtungslösung dekantiert, die Sammelgellösung auf das Trenngel pipettiert und ein 10-Spur-Teflonkamm (Taschenausmaße: 5 x 11 x 1.5 mm) eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wird der Kamm vorsichtig herausgezogen, das Gel in eine vertikale Minigel-Elektrophoresekammer (Mighty Small™ II SE 250, Hoefer) eingespannt, und die obere sowie untere Pufferkammer mit 1x SDS-Laufpuffer (2.9.4) gefüllt. Vor dem Beladen werden die Taschen mit dem Laufpuffer gut gespült und Luftblasen, die sich am unteren Gelrand befinden, entfernt. Die Proteinproben werden entsprechend ihrer Konzentrationen mit Puffer A oder C verdünnt, so dass alle

Proben die gleichen Konzentrationen aufweisen, mit 4x Laemmli-Puffer vermischt, für 3 Minuten bei 96°C erhitzt und schließlich auf Eis gestellt. Parallel zu den Proben wird dann ein Proteinmarker (2.10.1) zur Orientierung und Kontrolle des Molekulargewichts der zu analysierenden Proteine aufgetragen. Der Gellauf benötigt, je nach Polyacrylamidkonzentration der Gele, 60 bis 68 Minuten bei 150 V und 400 mA. Nach der SDS-PAGE werden die aufgetrennten Proteine zur weiteren Analyse durch Western Blot-Experimente (3.5.2) auf eine Immobilon-P Transfer Membran (PVDF, Millipore 0.45 µm) geblottet (3.5.2.1).

3.6.2 Western Blot (Immunoblot)

Mit der Methodik des Western Blots werden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Gel auf eine geeignete Trägermembran (PVDF-Membran) überführt (geblottet) und somit immobilisiert. Hier können sie nun unter Verwendung spezifischer Antikörper detektiert werden. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Western Blots werden unmarkierte Primärantikörper gegen das entsprechende Protein mit anschließender Bindung HRP-konjugierter Sekundärantikörper gegen die Tierart der ersten Antikörper eingesetzt (indirekter Nachweis).

3.6.2.1 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran

Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf die PVDF-Membran erfolgt nach der Naßblot-Methode in einer Naßblotkammer (Hoefer Mighty Small™ Transphor), wobei der Transferpuffer durch ein Kühlaggregat konstant bei 10°C gehalten wird.

Dazu wird nach der SDS-PAGE die Glasplatte 'abgesprengt' und das Sammelgel mit einem Skalpell vorsichtig abgeschnitten. Das Trenngel wird in 1x Transferpuffer bei 4°C inkubiert, wodurch es etwas schrumpft und äquilibriert wird. Die PVDF-Membran wird 10 Sekunden in Methanol aktiviert und dann für jeweils 10 Minuten in Aqua MilliQ und 1x Transferpuffer auf dem Tumbler geschwenkt. Die Naßblotkammer wird an das Kühlaggregat angeschlossen und bis zur unteren Markierung mit 1x Transferpuffer gefüllt. Die luftblasenfreie Schichtung der Kassetten erfolgt in einem 1x Transferpuffer-Bad beginnend auf der grauen Kassetteninnenseite und geschieht wie folgt beschrieben:

- Graue Kassetteninnenseite

- Dünner Schwamm
- 1 Lage in 1x Transferpuffer getränktes Blottpapier GB003
- PVDF-Membran
- Gel
- 1 Lage in 1x Transferpuffer getränktes Blottpapier GB003
- Dicker Schwamm
- Schwarze Kassettenseite schließen

Die Kassetten werden noch einmal gut in 1x Transferpuffer getränkt, bevor sie in die Kammer eingesetzt werden. Sind alle Kassetten geschichtet und in die Kammer gesetzt, wird diese bis zur oberen Markierung mit 1x Transferpuffer gefüllt und der Deckel aufgesetzt. Der Transfer erfolgt für genau 1 Stunde bei 10°C mit einer Stromstärke von 400 mA und 200V.

3.6.2.2 PonceauS-Färbung der PVDF-Membran

Zur Prüfung der Bloteffizienz und des gleichmäßigen Transfers der Proteine aus dem Gel auf die Membran, kann diese nach dem Blotten reversibel mit PonceauS gefärbt werden. Hierzu wird die PVDF-Membran für 2 bis 5 Minuten bei RT in PonceauS-Lösung geschwenkt und zum Entfärben der proteinfreien Membranbereiche mit H₂O_{dest.} gespült. Zum vollständigen Entfärben wird die Membran zweimal für 10 Minuten in TBS-Tween gewaschen.

3.6.2.3 Western Blot-Entwicklung mit Antikörpern und Detektion immunreaktiver Proteine

Zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen der Membran wird diese über Nacht in einer Blockierungslösung, Blotto A (3.5), welche in TBS gelöstes Magermilchpulver enthält, unter stetigem Schwenken auf einem Tumbler bei 4°C inkubiert. Danach wird die Membran – in Abhängigkeit von der Affinität des Antikörpers zum Protein – für 1 bis 2 Stunden bei RT unter Schwenken mit dem Primärantikörper (1:1000 verdünnt in Blotto A mit TBS-Tween) inkubiert. Anschließend wird die Membran zweimal mit TBS-Tween gespült und viermal in TBS-Tween (1 x 15 min, 3 x 5 min) gewaschen. Schließlich wird die Membran, ebenfalls unter leichtem Schwenken, für 1.5 Stunden mit dem Meerrettich-

Peroxidase-gekoppelten Nachweisantikörper (1:1000 anti-Maus und 1:3000 anti-Kaninchen verdünnt in Blotto A mit TBS-Tween) bei RT inkubiert. Danach wird die Membran wiederum zweimal in TBS-Tween gespült und viermal in TBS-Tween (1 x 15 min, 3 x 5 min) gewaschen und abschließend in TBS (ohne Tween) überführt.

Die Detektion der Proteine, die durch den Primärantikörper erkannt wurden, erfolgt mittels eines "enhanced chemiluminescence (ECL)"-Assays unter Verwendung der Lösungen des "ECL™ Western blotting detection reagents"-Kits (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg; Durchführung nach Anleitung des Herstellers). Durch anschließende 1- bis 20-minütige Exposition mit dem "Hyperfilm™ ECL" (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) werden die spezifisch erkannten Proteine sichtbar gemacht.

3.7 Protein-DNA-Bindungsstudien

3.7.1 Radioaktiv markierte DNA-Sonden

Das in dieser Arbeit verwendete doppelsträngige (ds) Oligonukleotid, welches die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF- κ B enthält, wurde durch Hybridisierung komplementärer, einzelsträngiger (ss) Oligonukleotide hergestellt und weist 5'-überhängende Enden auf, die eine radioaktive Markierung mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I unter Verwendung von α - 32 P-dATP und α - 32 P-dCTP erlauben.

3.7.1.1 Hybridisierung ("Annealing") von synthetischen, komplementären ss Oligonukleotiden

Für die Hybridisierung werden je 50 μ g der komplementären ss Oligonukleotide (1 μ g/ μ l) in einem Mikroreaktionsgefäß mit Schraubdeckelverschluß vereinigt und zum Schmelzen eventuell vorliegender Doppelstrangbereiche 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Während der anschließenden schrittweisen Abkühlung (10 min 65°C, 10 min 37°C, 5 min RT) erfolgt die Zusammenlagerung der komplementären Einzelstränge zu Doppelsträngen. Diese können entweder direkt zur Herstellung der radioaktiv markierten DNA-Sonde für die Gelretardationsexperimente (3.7.1.2) verwendet oder in 10- μ l-Aliquots bei -20°C gelagert und bei Bedarf aufgetaut werden.

3.7.1.2 Radioaktive Markierung des doppelsträngigen (ds) Oligonukleotids

Zur Markierung des durch "Annealing" (3.6.1.1) erzeugten κ B-Oligonukleotids (2.6) wird folgender 20- μ l-Ansatz zusammenpipettiert:

H ₂ O	11 μ l
10x One-Phor-All Buffer PLUS (Pharmacia)	2 μ l
ds Oligonukleotid κ B (1 μ g/ μ l)	1 μ l
dGTP (2mM)	1 μ l
dTTP (2mM)	1 μ l
α - ³² P-dATP (10 μ Ci/ μ l)	1 μ l
α - ³² P-dCTP (10 μ Ci/ μ l)	1 μ l
Klenow-Enzym (1 U/ μ l)	2 μ l

Nach 45-minütiger Inkubation bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe von 1 μ l 0.5 M EDTA pH 8.0 gestoppt und das Gemisch auf Eis gestellt.

3.7.1.3 Reinigung der DNA-Sonde

Die Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide von der markierten DNA-Sonde erfolgt durch Säulenreinigung mittels einer "NucTrap™ push column" (Stratagene) nach Anleitung des Herstellers. Hierzu wird die Säule zuerst mit 70 μ l STE (2.9.5) äquilibriert. Danach wird der Ansatz mit 49 μ l STE versetzt und über die Säule gegeben. Das Eluat wird in einem Mikroreaktionsgefäß aufgefangen. Die Säulenmatrix wird mit weiteren 70 μ l STE gewaschen und dieses Eluat mit dem ersten vereinigt.

Die Lagerung der so hergestellten markierten und gereinigten κ B-Sonde erfolgt bei -20°C.

Die in Gelretardationsexperimenten eingesetzten radioaktiv markierten DNA-Sonden sollten nicht älter als 3 Tage sein.

3.7.2 Messung der spezifischen Aktivität einer radioaktiv markierten DNA-Sonde

Zur Messung der spezifischen Aktivität einer radioaktiv markierten DNA-Sonde, wird 1 μl derselben auf einen Whatman GF/C-Filter (Whatman GmbH, Dassel) aufgetragen und luftgetrocknet. Der Filter wird dann in ein Szintillationsröhrchen überführt, welches 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Beckman, Fullerton CA, USA)) enthält. Anschließend wird die Radioaktivität im Szintillationszähler (EG&G Wallac1209 Rack-Beta, Oy, Finnland) als cpm (counts per minute) gemessen. Mit Hilfe der gemessenen cpm wird die spezifische Aktivität der Sonde berechnet, die in etwa $3\text{-}4 \times 10^7$ cpm/ μg DNA betragen sollte.

3.7.3 Gelretardationsexperiment ("Electrophoretic Mobility Shift Assay" [EMSA])

Gelretardationsexperimente werden angewendet, um Protein-DNA-Interaktionen nachzuweisen. Dazu werden Kernproteinextrakte (3.5.1.2) oder gereinigte Proteine mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde (3.7.1.2), die ein bestimmtes Proteinbindungsmotiv aufweist, inkubiert. Die sich bildenden DNA-Protein-Komplexe werden anschließend in einem nativen Polyacrylamidgel (in dieser Arbeit: 5%ig) aufgrund ihrer geringeren Mobilität von ungebundener DNA abgetrennt. Die Komplexe werden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.7.3.1 Protein-DNA-Bindungsreaktion

Die Protein-DNA-Komplexbildung erfolgt auf Eis in einem 15- μl -Ansatz, der in dieser Reihenfolge zusammenpipettiert wird:

H ₂ O	x μl
Poly[d(I-C)]	1,6 μg
NF-IL6	6,0 ng (in Verbindung mit HeLa-Kernextrakten)
3x Bindungspuffer	5,0 μl
Kernproteinextrakt	2,6-3,8 μg
DNA-Sonde (κB)	20500 cpm

Es ist zu beachten, dass der Ansatz vor Zugabe der markierten DNA-Sonde abzentrifugiert und für 10 Minuten vorinkubiert werden sollte. Das zugesetzte Poly[d(I-C)] dient hierbei zur Verhinderung unspezifischer Protein-DNA-Bindungen. Das zugesetzte NF-IL6 dient der Bindung NF- κ B-ähnlicher Proteine, welche ansonsten die NF- κ B-Bindungsstelle blockieren würden. Die hierzu benötigten Konzentrationen von Poly[d(I-C)] und NF-IL6 wurden der Literatur entnommen [99], wobei der Zusatz von NF-IL6 lediglich bei den HeLa-Kernextrakten Verwendung findet.

Nach Zugabe der DNA-Sonde wird der gesamte Bindungsansatz erneut abzentrifugiert und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wird er sofort auf ein 5%-iges, nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen, welches einem 1,5- bis 3- stündigen Gelvorlauf bei 200 bis 250 Volt unterzogen wurde (3.6.3.2). Als Marker dient eine Spur mit 15 μ l Farbpuffer (2.9.5).

Die eingesetzten Mengen der oben genannten Komponenten des Bindungsansatzes sind in den Legenden der einzelnen Gelretardationsexperimente angegeben.

3.7.3.2 Elektrophoretische Auftrennung von Protein-DNA-Komplexen in nativen Polyacrylamidgelen (2.12.1)

Zur Herstellung eines 5%-igen, nativen Polyacrylamidgels werden die in 2.12.1 genannten Komponenten zusammenpipettiert.

Nach Zugabe von TEMED als Katalysator der Polymerisierungsreaktion wird die Lösung gemischt und luftblasenfrei zwischen zwei gut gereinigte Glasplatten (kleines Gel: 20 x 30 cm; großes Gel: 30 x 30 cm) gegossen, welche mit drei 1,5 mm starken Abstandshaltern voneinander getrennt und außen mit 1%-iger Agarose abgedichtet sind. Bei den kleinen Gelen wird ein 15-Spur-Kamm (Taschenmaße: 8 x 12 x 1,5 mm), bei den großen Gelen ein 26-Spur-Kamm (Taschenmaße: 8 x 15 x 1,5 mm) eingesetzt. Die Gelflüssigkeit benötigt in etwa 1 bis 1,5 Stunden bei RT zum Polymerisieren.

Für den darauf folgenden Gelvorlauf werden Kamm und unterer Abstandshalter entfernt und das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt. Die obere sowie die untere Pufferkammer werden mit 0,4x TBE gefüllt. Um einen einwandfreien Lauf zu ermöglichen werden die Geltaschen sorgfältig mit Laufpuffer gespült und die Luftblasen am unteren Gelrand entfernt. Zur Gleichgewichtseinstellung der Ionen erfolgt vor dem Auftragen der Proben eine Präelektrophorese. Diese wird bei den kleinen Gelen mit konstanten 250 Volt durchgeführt und dauert in etwa 1,5 Stunden; wohingegen die

Präelektrophorese der großen Gele bei konstanten 200 Volt erfolgt, um eine Überhitzung der Gele zu vermeiden und somit ca. 3 Stunden dauert. Der Gelvorlauf wird gestoppt, wenn eine Stromstärke von 20 mA erreicht ist. Für die Elektrophorese der Proben wird der Laufpuffer durch frischen ersetzt und wiederum die Geltaschen gespült sowie die Luftblasen am unteren Gelrand beseitigt. Dann werden die Proben – parallel zu einer Spur mit 15 µl Farbpuffer (2.9.5) – auf das Gel aufgetragen und bei 200 Volt elektrophoretisch getrennt. Die optimale Trennstrecke wurde der Literatur entnommen [99] und beträgt für die κ B-Sonde, deren unkomplexierte Form ungefähr 2 cm unterhalb der Bromphenolblaufront des Farbpuffers läuft, 12 bis 13 cm.

Nach der Elektrophorese wird eine der beiden Glasplatten mit einem Spatel "abgesprengt" und das Gel auf der anderen Glasplatte für 12 Minuten in 10%-iger Essigsäure fixiert. Um das Gel auf einen Vakuum-Geltrockner überführen zu können, wird es durch Auflegen und Andrücken eines trockenen Whatman-Papiers von der Glasplatte auf dieses übertragen, mit einer feuchten Zellophanfolie luftblasenfrei bedeckt und mit einer Lage angefeuchtetem Whatman-Papier bedeckt. So geschichtet kann es auf den Vakuum-Geltrockner gelegt werden und für ca. 2 Stunden bei 80°C getrocknet werden.

Das getrocknete Gel wird – je nach Stärke des Signals – für mehrere Tage in einer Röntgenfilmkassette mit einem aufgelegten Röntgenfilm und Verstärkerfolie bei -80°C exponiert.

3.7.4 Identifizierung spezifischer NF- κ B-Proteine in Protein-DNA-Komplexen durch Verwendung von Antikörpern ("Gel-Supershift-Experiment")

Für den Nachweis bestimmter NF- κ B-Proteine in Protein-DNA-Komplexen wird der Kernextrakt mit spezifischen Antikörpern für 25 Minuten auf Eis vorinkubiert, bevor er mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde in ein Gelretardationsexperiment eingesetzt wird. Die zu diesem Zweck in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper sind ausschließlich gegen Peptidsequenzen gerichtet, welche die Protein-DNA-Bindung nicht beeinflussen, und somit die elektrophoretische Mobilität des Komplexes reduzieren, wodurch dieser "geshiftet" wird ("Supershift").

Um die Zusammensetzung der Protein- κ B-Komplexe zu analysieren, werden 2.6 µg Kernproteinextrakt aus Knochenmarksmakrophagen mit je 2 µg eines spezifischen Antikörpers für 25 Minuten auf Eis vorinkubiert. Nach Zugabe von H₂O, 1.6 µg Poly[d(I-

C)], 5 µl 3x Bindungspuffer sowie 20500 cpm κB-Sonde wird der 15-µl-Bindungsansatz für weitere 25 Minuten auf Eis inkubiert. Die Trennung der Protein-DNA-Komplexe bzw. der Antikörper-Protein-DNA-Komplexe erfolgt wie unter 3.7.3.2 beschrieben in einem 5%-igen, nativen Polyacrylamidgel.

3.8 Luciferase-Reportergen-Assay

Zur Analyse der Aktivität des κB-Motives wird ein Luciferase-Reportergen-Assay durchgeführt. Dabei findet ein Plasmid Verwendung, welches sechs NF-κB Response Elemente mit gekoppeltem Firefly Luciferase Reporter Gen enthält. Die Luciferase entstammt dem Glühwürmchen *Photinus pyralis*. Nachdem endogene Proteine der NF-κB-Familie an die κB Elemente binden, wird der Luciferase-Reporter aktiviert und die Luciferase gebildet, deren Halbwertszeit 3 bis 5 Stunden beträgt.

In dieser Arbeit fand neben der Firefly-Luciferase auch die TK-Renilla-Luciferase Verwendung, die von der Seeanemone *Renilla reniformis* stammt. Die TK-Renilla-Luciferase wird, im Gegensatz zur Firefly-Luciferase, konstitutiv von den Zellen, in die sie hinein transfiziert wurde, gebildet und dient zur Normalisierung der gemessenen "Light Units" (LU, Licht Einheiten). Durch die Normalisierung werden folgende Fehlerquellen eliminiert: Transfektion, Anzahl der lebenden Zellen und Pipettierfehler.

3.8.1 Infektionsversuch für den Luciferase-Reportergen-Assay

Die, wie in 3.2.6.1 beschrieben, transfizierten Zellen werden einen Tag nach der Transfektion und 21 Stunden vor der Infektion zweimal mit Hanks' Salt Solution gewaschen und mit 2 ml Hungermedium (2.9.2) pro well weiter kultiviert. Für die Infektion werden die Bakterien, wie unter 3.1.2 beschrieben, angezüchtet und in 2 ml MEM-Hungermedium auf eine MOI von 50 eingestellt, was einer Bakterienzahl von 1×10^7 pro well entspricht. Die Bakterien verbleiben entsprechend den Versuchsbedingungen auf den Zellen. Nach 1.5 bzw. 6 Stunden werden die Bakterien mit Gentamicin abgetötet (100 µg/ml). Die Zellen werden entweder ohne Stimulus oder mit TNF-α (15 ng/ml) stimuliert und für weitere 4 Stunden inkubiert, damit ausreichend detektierbare Luciferase gebildet werden kann.

3.8.2 Zell-Lyse

Die Zell-Lyse erfolgt nach Herstelleranleitung mit dem Passive Lysis Buffer aus dem Dual-Luciferase® Reporter Assay Kit (Promega GmbH, Mannheim). Dazu werden die Zellen zweimal mit PBS für den Luciferase Assay (2.9.6) gewaschen und pro well 100 µl 1x Passive Lysis Buffer auf die Zellen gegeben. Die 24-well Platten werden dann für 15 bis 30 Minuten bei RT auf einem Plattenschüttler geschüttelt bis die Zellen lysiert sind.

3.8.3 Messung der Luciferase-Aktivität mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay

Die Messung der Luciferase erfolgt mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega GmbH, Mannheim) im Luminometer (Lmax, Molecular Devices Corporation, California, USA) nach Herstellerangaben. Dazu wird das lyophilisierte Luciferase Assay Substrat in 10 ml Luciferase Assay Buffer II und das Stop & Glo® Substrat in 10 ml Stop & Glo® Buffer gelöst. Beide Reagenzien müssen dunkel und kühl gelagert werden.

20 µl der Extrakte aus den Zell-Lysaten werden in eine weiße 96-well Platte überführt und ebenfalls dunkel und kühl gelagert.

Das Luminometer wird zur Messung vorbereitet, indem die "integrate time" auf 10 Sekunden und die "delay time" auf 2 Sekunden eingestellt wird. Sowohl vom Luciferase Assay Reagenz II, welches die Firefly Luciferase misst, als auch vom Stop & Glo® Reagenz, welches zur Messung der Renilla Luciferase dient, werden 100 µl pro well injiziert. Dazu wird die Platte in das Luminometer eingesetzt und zuerst in allen Proben die Firefly Luciferase und in einer zweiten Messung die Renilla Luciferase gemessen.

3.8.4 Berechnung der Relativen Licht Einheiten (Relative Light Units, RLU)

Die Luciferase-Aktivität wird in Relativen Licht Einheiten (RLU) angegeben. Sie werden wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{LU}_{\text{Firefly Luciferase}}}{\text{LU}_{\text{Renilla Luciferase}}} = \text{RLU}$$

3 METHODEN

Durch diese Formel werden die gemessenen Licht Einheiten normalisiert und die Werte der einzelnen Proben vergleichbar.

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Luciferase Assays wurden pro Bedingung 12 unabhängige Einzelproben erstellt, aus denen nach Berechnung der "relativen Light Units" (RLU) die Mittelwerte und die jeweils dazu gehörigen Standardabweichungen ermittelt wurden.

4 ERGEBNISSE

Das primäre Zielprotein der Untersuchungen dieser Arbeit ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B. Daher gilt in erster Linie ihm besondere Aufmerksamkeit. Alle nachfolgenden Experimente entspringen aus den anfangs erhaltenen Ergebnissen der NF- κ B-Untersuchungen.

Die ersten Studien zur NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität in STEC-infizierten HeLa-Zellen (4.1, Abb. 4-1 A; 4.9, Abb. 4-9 A, 4-10 A, 4-11 A) wurden bereits 2003 von Hauf und Chakraborty publiziert [100]. Diese Ergebnisse stellten den ersten Ausgangspunkt für die Untersuchungen und Ergebnisse dieser Arbeit dar. Sie wurden zur Vollständigkeit im Rahmen dieser Arbeit wiederholt und hier dargestellt, um die neuen Ergebnisse in ihrem Zusammenhang besser betrachten zu können.

4.1 NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit in mit STEC 413/89-1 Wildtyp infizierten HeLa-Zellen und P388D₁-Makrophagen

Die meisten Untersuchungen, welche den Infektionsmechanismen enteropathogener Keime galten, wurden mit Darm- oder Epithelzellen durchgeführt, da diese Zellen die primären Zielzellen der Erreger sind. So entstanden die ersten Resultate von *in vitro* Infektionen mit dem Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli* 413/89-1 anhand von Versuchen mit Caco2- und/oder HeLa-Zellen. Dabei wurde im Verlauf der Infektion eine Suppression des Transkriptionsfaktors NF- κ B festgestellt. Diese geht einher mit einer Abnahme der pro-inflammatorischen Zytokinexpression von IL-6 und IL-8 [100].

Es ist unbestreitbar, dass NF- κ B ein wichtiger Faktor der unspezifischen Immunität ist. Daher stellte sich die Frage, ob der STEC-Stamm 413/89-1 auch in Zellen des angeborenen Immunsystems in der Lage ist, NF- κ B zu supprimieren. Daher wurden neben Epithelzellen nun Makrophagen in die Untersuchungen einbezogen.

Dazu wurden Infektionskinetiken mit P388D₁-Makrophagen und HeLa-Zellen unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Infektion der Makrophagen mit dem STEC 413/89-1 Wildtypstamm dauerte 15 bis 120 Minuten, die der HeLa-Zellen 1 bis 6 Stunden. Da das bakterielle Lipopolysaccharid in Epithelzellen, wegen Fehlens eines entsprechenden Rezeptors (TLR4), keine NF- κ B-Aktivierung hervorrufen kann, dies aber mit TNF- α

möglich ist, wurden als Positivkontrolle nicht infizierte HeLa-Zellen außerdem für 20 Minuten mit TNF- α (15 ng/ml) stimuliert.

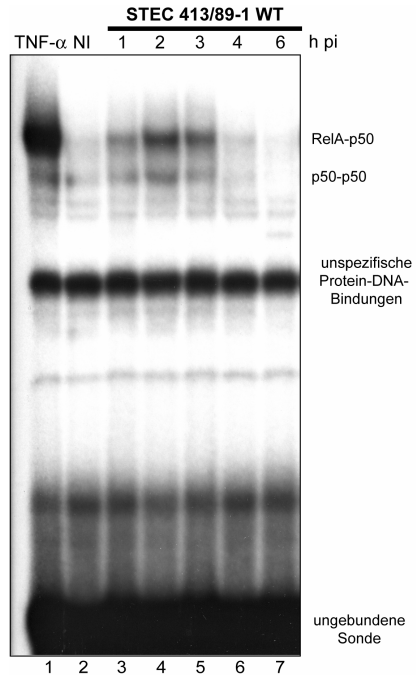
Aus den infizierten und stimulierten Zellen, sowie nicht infizierten Zellen, die als Negativkontrolle fungierten, wurden anschließend die Kernproteine in ihrer nativen Form extrahiert. Um die Einzelproben miteinander vergleichen zu können, erfolgten Konzentrationsbestimmungen der Gesamtproteinmenge je Probe. Die Analyse der Proteinextrakte auf NF- κ B fand mit Hilfe des EMSA statt, welcher hier eingesetzt wurde, um das Vorhandensein des DNA-bindungsfähigen Proteins zu eruieren. In Titrationsexperimenten (Daten nicht gezeigt) konnte festgestellt werden, dass die optimale Gesamtproteinmenge für Makrophagen-Kernextrakte in diesem Assay bei 2.6 μ g liegt, wohingegen die für HeLa-Kernextrakte 3.8 μ g beträgt. Um unspezifische Protein-DNA-Bindungen aus den spezifischen NF- κ B-DNA-Banden zu eliminieren, wurde jeder Makrophagen-Probe 1.6 μ g Poly[d(I-C)] und jeder HeLa-Probe je 1.6 μ g Poly[d(I-C)] sowie 6 ng unmarkiertes NF-IL6-Oligonukleotid zugesetzt. Unabhängig vom Zelltyp, aber abhängig vom nachzuweisenden Protein, lag das Optimum für die mit p³²-dNTPs markierten κ B-Sonde bei 20500 cpm.

Abbildung 4-1 (A: HeLa-Kernextrakte; B: P388D₁-Makrophagen-Kernextrakte) zeigt die entwickelten Röntgenfilme, die zur Exposition bei -80°C drei Tage auf den getrockneten Gelen lagen. In A sind die RelA-p50- und p50-p50-Komplexe im oberen Teil, die unspezifischen Protein-DNA-Bindungen im mittleren Teil sowie die ungebundene Sonde, welche sich als schwarze Fläche darstellt, gekennzeichnet. In B sind nur die spezifischen NF- κ B-Banden (Verifizierung der Komplexe wird unter 4.3 beschrieben) gezeigt und ebenfalls gekennzeichnet.

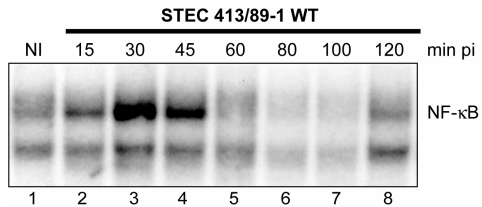
Nicht infizierte Zellen zeigen keine bis eine ganz schwache NF- κ B-Bande (Abb. 4-1 A: Spur 2; Abb. 4-1 B: Spur 1). Diese Bande stellt das Basalniveau des Transkriptionsfaktors in unbehandelten Zellen dar. Jede stärkere Schwärzung der Banden wird als NF- κ B-Aktivierung angesehen. So zeigt sich im Verlauf der STEC-Infektion von HeLa-Zellen (Abb. 4-1 A), dass bis zwei Stunden nach Infektionsbeginn die NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit zunimmt und danach im Laufe der nächsten vier Stunden auf das Basalniveau zurückgeht. Einen ähnlichen Verlauf zeigt die Infektionskinetik von P388D₁-Makrophagen, mit dem Unterschied, dass die Zu- und Abnahme der Protein-DNA-Bindungsfähigkeit wesentlich schneller vonstatten geht als bei HeLa-Zellen.

A

EMSA mit 1,6 µg Poly[d(I-C)],
6 ng unmarkiertes NF-IL6-
Oligonukleotid, 20500 cpm κB-
Sonde und je 3,8 µg Kernpro-
teinen aus **HeLa-Zellen**.
Die RelA-p50- und p50-p50-
Komplexe sind gekennzeichnet.

**B**

EMSA mit 1,6 µg Poly[d(I-C)],
20500 cpm κB-Sonde und je
2,6 µg Kernproteinen aus
P388D₁-Makrophagen.
Der spezifische NF-κB-
Komplex ist mit NF-κB ge-
kennzeichnet.

**Abb. 4-1:**

Zeitlicher Verlauf der initialen NF-κB-Aktivierung mit anschließender NF-κB-Suppression nach Infektion mit dem STEC Wildtypstamm 413/89-1 in **HeLa-Zellen** (A) und **P388D₁-Makrophagen** (B).

Die dargestellten EMSAs wurden mit Kernproteinen generiert, welche nach unterschiedlichen Infektionszeitpunkten aus den oben genannten Zellen isoliert wurden. Als Negativkontrolle dienen Zellen aus unbehandelten, nicht infizierten (NI) Zellen. Als Positivkontrolle wurden Kernextrakte aus mit TNF-α stimulierten (15 ng/ml für 20') HeLa-Zellen mitgetestet.

Expositionsdauer: 3 Tage.

Bereits nach 30 Minuten Infektionsdauer zeigt sich eine maximale Bandenstärke (Abb. 4-1 B). Eine Stunde später (1½ Stunden pi) ist sie wieder auf das anfängliche Basalniveau gesunken (vergleiche Spur 1 mit Spur 6/7).

4.2 NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit in mit STEC 413/89-1 Wildtyp und STEC 413/89-1 "in frame"-Deletionsmutante *ΔespB* infizierten ausdifferenzierten murinen Knochenmarksmakrophagen

Nachdem feststand, dass im Verlauf der Infektion mit STEC 413/89-1 eine initiale Zu- und anschließende Abnahme der NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit nicht nur in HeLa-Zellen sondern auch in P388D₁-Makrophagen erfolgt, stellte sich die Frage, in welcher Art und Weise dies auch in murinen Primärzellen geschieht.

Dazu wurden aus 6 Wochen alten weiblichen Balb/C-Mäusen Knochenmarkszellen isoliert, die dann mit Hilfe des Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) innerhalb einer Woche zu Makrophagen ausdifferenzierten. Die anschließende Infektion dieser nunmehr ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen erfolgte mit dem STEC 413/89-1 Wildtyp und der "in frame"-Deletionsmutante STEC 413/89-1 *Δesp* für jeweils 45 Minuten bis 4 Stunden. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist das bakterielle Protein EspB Bestandteil der in der eukaryontischen Zellwand formierten Pore, durch die Tir und andere bakterielle Effektorproteine aus dem Zytoplasma des Bakteriums in das Zytoplasma der Wirtszelle transloziert werden. Danach wurden die Kernproteine aus den infizierten und zusätzlich aus nicht infizierten Zellen, die als Negativkontrolle fungierten, extrahiert. Um auch diese Proben miteinander vergleichen zu können, wurde die Gesamtproteinmenge jedes Infektionszeitpunktes bestimmt. Die NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit wurde wiederum im EMSA analysiert, wobei pro Probe 2.6 μ g Kernproteinextrakt, sowie 1.6 μ g Poly[d(I-C)] und 20500 cpm κ B-Sonde zum Einsatz kamen. Auch hier betrug die Expositionsdauer des Röntgenfilms drei Tage (bei -80°C).

Abb. 4-2 gibt das Shiftbild dieses Experimentes wieder. Nicht infizierte Zellen zeigen eine sehr schwache Bande (Spur 1: NI), die das Basalniveau der unbehandelten Knochenmarksmakrophagen darstellt. Während der Infektionsdauer mit dem STEC Wildtypstamm zeigt sich nach 45 Minuten eine sehr starke Bande, die für eine große Menge NF- κ B-DNA-Komplexe steht, wohingegen nach weiteren 45 Minuten (also 1½ Stunden Infektionsdauer) die Stärke dieser Bande abnimmt, um dann nach 2 Stunden völlig zu verschwinden. Im Gegensatz dazu zeigen alle Proben der mit der *espB*-Deletionsmutante infizierten Makrophagen eine sehr starke NF- κ B-DNA-Bindungsbande (Spur 6 bis 9).

Es ist daher anzunehmen, dass EspB eine Schlüsselrolle bei der Suppression von NF- κ B einnimmt.

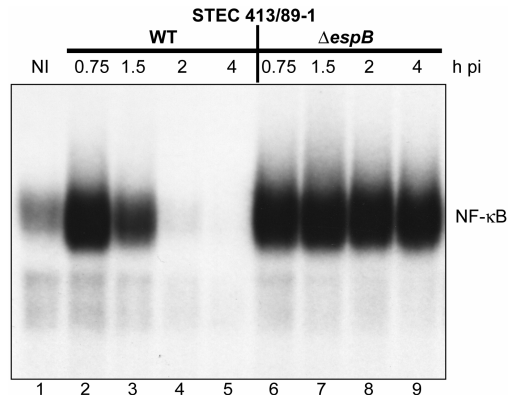


Abb. 4-2:

Vergleich des zeitlichen Verlaufs von initialer NF-κB-Aktivierung hin zur NF-κB-Suppression in ausdifferenzierten **Knochenmarksmakrophagen**, welche mit STEC 413/89-1 Wildtyp und der "in-frame"-Deletionsmutante $\Delta espB$ infiziert wurden.

Der EMSA wurde mit Kernproteinen generiert, welche nach unterschiedlichen Infektionszeitpunkten mit STEC 413/89-1 WT bzw. STEC 413/89-1 $\Delta espB$ aus ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen isoliert wurden. Als Negativkontrolle dienten Zellen aus unbehandelten, nicht infizierten (NI) Zellen. Die (unter 4.3 identifizierten) RelA-p50-Komplexe sind mit 'NF-κB' gekennzeichnet.

Expositionsdauer: 3 Tage.

EMSA mit 1,6 µg Poly[d(I-C)], 20500 cpm κB-Sonde und je 2,6 µg Kernproteinen aus ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen.

Bei den NF-κB-DNA-Banden des Knochenmarksmakrophagen-Shifts fällt außerdem auf, dass sie anscheinend aus einer Komplex-Bande bestehen und extrem groß und stark sind.

4.3 Determinierung der spezifischen NF-κB-Dimere in STEC-infizierten ausdifferenzierten murinen Knochenmarksmakrophagen

Es fiel bei den ersten EMSA-Analysen STEC-infizierter ausdifferenzierter Knochenmarksmakrophagen auf, dass anscheinend nur eine starke NF-κB-DNA-Bindungs-Bande vorhanden ist. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist die Zusammensetzung der NF-κB-Dimere zellspezifisch. Daher war der nächste Schritt, diese Komplexe näher zu charakterisieren.

Dazu wurden die aus 6 Wochen alten weiblichen Balb/C-Mäusen isolierten und anschließend ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen mit dem hitzeinaktivierten Überstand einer Kultur des STEC 413/89-1 Wildtypstammes, welche in DMEM_{HEPES} erfolgte, für 45 Minuten inkubiert. Auch hier wurden die Kernproteine aus den Zellen

extrahiert und die Gesamtproteinmenge des Extraktes bestimmt. Der Extrakt nicht infizierter Makrophagen dient wiederum als Negativkontrolle.

Die Analyse der dimeren NF- κ B-Komplexe erfolgte mit der Methodik des Gel-Supershifts. Hierbei werden 2.6 μ g Kernproteine mit 1.6 μ g Poly[d(I-C)] und Antikörpern gegen verschiedene Rel/NF- κ B-Familien-Mitglieder vor Zugabe von 20500 cpm κ B-Sonde inkubiert, damit Protein und Antikörper miteinander assoziieren können. Zum einen wurden 2 μ g Antikörper gegen p52, p50, RelA, RelB und c-Rel einzeln dem Proteinextrakt zugesetzt, zum anderen in Kombination als RelA/p50, RelA/RelB und RelA/c-Rel.

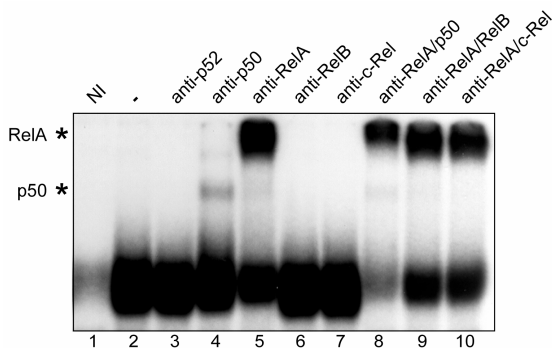


Abb. 4-3:

Charakterisierung der Proteinkomponenten der STEC-induzierten NF- κ B-Komplexe in ausdifferenzierten **Knochenmarksmakrophagen** als RelA-p50 durch Verwendung spezifischer Antikörper.

Gel-Supershift mit 1,6 μ g Poly[d(I-C)], 20500 cpm κ B-Sonde und je 2,6 μ g Kernproteinen aus ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen, welche 45 Minuten mit einem hitzeinaktivierten Überstand aus einer STEC 413/89-1-Kultur (guter NF- κ B-Aktivator) inkubiert wurden. Die Proteinextrakte wurden vor Sondenzugabe mit je 2 μ g der entsprechenden Antikörper (Santa Cruz Biotechnology für Gel Supershift) für 25 Minuten vorinkubiert:

- Spur 3: anti-p52 – 2 μ g 'NF- κ B p52 (K-27) X'
- Spur 4: anti-p50 – 2 μ g 'NF- κ B p50 (NLS) X'
- Spur 5: anti-RelA – 2 μ g 'NF- κ B p65 (A) X'
- Spur 6: anti-RelB – 2 μ g 'RelB (C-19) X'
- Spur 7: anti-c-Rel – 2 μ g 'c-Rel (B-6) X'
- Spur 8: anti-RelA/p50 – je 2 μ g 'NF- κ B p65 (A) X' und 'NF- κ B p50 (NLS) X'
- Spur 9: anti-RelA/RelB – je 2 μ g 'NF- κ B p65 (A) X' und 'RelB (C-19) X'
- Spur 10: anti-RelA/c-Rel – je 2 μ g 'NF- κ B p65 (A) X' und 'c-Rel (B-6) X'

Zur Kontrolle wurden Kernextrakte aus unbehandelten, nicht infizierten Zellen (NI) und aktivierten Zellen ohne spezifische Antikörper (-) mitgetestet.

Die geschifteten RelA- und p50-Banden sind mit * gekennzeichnet.

Expositionsdauer: 3 Tage.

Die nicht infizierten und unbehandelten Zellen zeigen mit einer sehr schwachen Bande das NF- κ B-Basalniveau (Spur 1) an. Die durch den hitzeinaktivierten Bakterienkulturüberstand NF- κ B-induzierten, aber nicht mit Antikörpern inkubierten Zellen weisen eine starke

NF- κ B-DNA-Bindung auf, was durch eine starke Bande sichtbar wird (Spur 2). Antikörper-Protein-DNA-Komplexe sind schwerer als reine Protein-DNA-Komplexe, so dass sich ihre Mobilität während der elektrophoretischen Auftrennung verlangsamt und sie 'super-shiften' (engl. sich über etwas verlagern), was zum Auftreten einer weiteren Bande führt. Dieses 'super-shiften' trat nach Zugabe von anti-p52, anti-RelB und anti-c-Rel nicht auf (Spur 3, 6 und 7), wohingegen bei der mit einem p50-Antikörper (Spur 4) inkubierten Probe eine schwache Bande oberhalb der spezifischen NF- κ B-Bande zu sehen ist. Die starken schwarzen Banden am oberen Bildrand der mit einem RelA-Antikörper (Spur 5) allein oder in Kombination mit p50, RelB und c-Rel (Spur 8, 9 und 10) inkubierten Extrakte entstanden durch Komplexbildung von RelA mit seinem Antikörper. Die Kombination von anti-RelA/p50 bewirkt eine fast völlige Abnahme der normal gelagerten NF- κ B-DNA-Komplex-Bande (Spur 8), so dass man sagen kann, dass die NF- κ B-Komplexe in aus-differenzierten murinen Knochenmarksmakrophagen aus RelA-p50-Heterodimeren bestehen.

4.4 Infektion/Stimulation von ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen mit STEC 413/89-1 WT und dessen Kulturüberstand unbehandelt und hitze-inaktiviert

Bisher konnte wiederholt gezeigt werden, dass eine Infektion mit dem STEC Wildtyp, unabhängig vom eukaryontischen Zelltyp, eine initiale NF- κ B-Aktivierung bewirkt, welche im späteren Verlauf der Infektion zurückgeht, wohingegen Infektionen mit der Deletionsmutante STEC *ΔespB* diesen Effekt nicht zeigen. Die Identifizierung des prokaryontischen Faktors, der hierfür verantwortlich ist, stellt keinen Bestandteil dieser Arbeit dar. Dennoch sollte zumindest geklärt werden, ob das Bakterium selbst oder ein von ihm in das Medium sezernierter Faktor die Veränderung der NF- κ B-Aktivität verursacht. Dazu wurden die aus 6 Wochen alten weiblichen Balb/C-Mäusen isolierten und anschließend ausdifferenzierte Knochenmarksmakrophagen zum einen mit einem Teil einer in DMEM_{HEPES} gewachsenen STEC-Kultur, dem bakterienfreien Überstand dieser Kultur und gewaschenen Bakterien, so dass keine Überreste etwaiger sezernierter Moleküle verbleiben, für 45 Minuten und 3 Stunden inkubiert. Zum anderen wurden Knochenmarksmakrophagen für die gleiche Zeitdauer mit den gleichen Fraktionen einer für 30 Minuten bei 72°C hitzeinaktivierten STEC-Kultur inkubiert. Anschließend erfolgte

die Extraktion der Kernproteine aus diesen und unbehandelten, nicht infizierten Zellen, welche als Negativkontrolle dienten, sowie die Bestimmung der Gesamtproteinmenge jeder einzelnen Probe.

Die NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit wurde im EMSA analysiert, wobei pro Probe 2.6 μ g Kernproteinextrakt, sowie 1.6 μ g Poly[d(I-C)] und 20500 cpm κ B-Sonde zum Einsatz kamen. Die Expositionszeit des Röntgenfilms betrug drei Tage (bei -80°C).

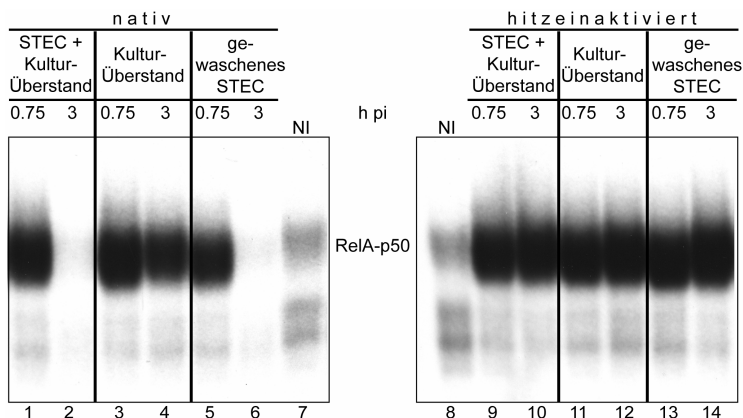


Abb. 4-4:

Verifizierung, dass der NF- κ B-supprimierende Effekt in eukaryontischen Zellen durch ein vitales STEC 413/89-1 Wildtyp Bakterium hervorgerufen wird.

Der EMSA wurde mit Kernproteinen generiert, welche nach Infektion bzw. Stimulation für 45 Minuten und 3 Stunden mit folgenden Fraktionen einer in DMEM_{HEPES} gewachsenen STEC 413/89-1 Bakterienkultur aus ausdifferenzierten **Knochenmarksmakrophagen** isoliert wurden:

- Spur 1 und 2: Bakterien + Kulturüberstand
- Spur 3 und 4: Kulturüberstand ohne Bakterien
- Spur 5 und 6: gewaschene Bakterien ohne Überstandsreste
- Spur 9 und 10: Bakterien + Kulturüberstand hitzeinaktiviert
- Spur 11 und 12: Kulturüberstand ohne Bakterien hitzeinaktiviert
- Spur 13 und 14: Gewaschene Bakterien ohne Überstandsreste hitzeinaktiviert

Als Negativkontrolle dienten Zellen aus unbehandelten, nicht infizierten (NI) Zellen. Die RelA-p50- κ B-Komplexe sind gekennzeichnet.

Expositionszeit: 3 Tage.

EMSA mit 1,6 μ g Poly[d(I-C)], 20500 cpm κ B-Sonde und je 2,6 μ g Kernproteinen aus ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen.

Die Extrakte der nicht infizierten Zellen ergeben auch in diesem Experiment eine schwache RelA-p50- κ B-Bande, die das Basalniveau der Zelle widerspiegelt (Spur 7 und 8). Infiziert man die Zellen für 45 Minuten mit dem STEC 413/89-1 WT inklusive seinem Kulturüberstand, so wird NF- κ B in der Zelle aktiviert, erkennbar an der starken schwarzen Bande (Spur 1). Nach 3 Stunden Infektionsdauer ist keine Bande mehr sichtbar (Spur 2),

also kein aktives NF- κ B im Zellkern nachweisbar. Im Gegensatz dazu bewirkt die Behandlung der Zellen mit dem reinen bakteriellen Kulturüberstand sowohl nach 45 Minuten als auch nach 3 Stunden eine NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit (Spur 3 und 4). Infiziert man die eukaryontischen Zellen mit gewaschenen STEC-Bakterien, erhält man das gleiche Ergebnis, wie wenn die komplette Bakterienkultur verwendet wird – die initiale NF- κ B-Aktivierung nach 45 Minuten verschwindet nach 3 Stunden (Spur 5 und 6). Im zweiten Teil dieses Experimentes wurde die Bakterienkultur vor Infektion/Stimulation der Makrophagen hitzeinaktiviert. Alle Bedingungen lassen eine NF- κ B-DNA-Bindung nachweisen, so dass die RelA-p50- κ B-Komplexe als starke schwarze Banden sichtbar werden (Spur 9 -14).

Dieses Ergebnis lässt den Schluß zu, dass das vitale STEC 413/89-1 WT Bakterium für die NF- κ B-Supprimierung im späten Verlauf der Infektion verantwortlich ist.

4.5 Untersuchung der induzierbaren NF- κ B-Aktivierung 23 Stunden nach Infektion mit STEC 413/89-1 Wildtyp in Makrophagen

Die Supprimierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B stellt eine große Beeinträchtigung der angeborenen Immunität dar. Von daher erschien es sehr wichtig, zu eruieren, ob diese Supprimierung zeitlich begrenzt und somit reversibel oder gar irreversibel und somit nicht umkehrbar ist.

Dies wurde mit einem über zwei Tage andauernden Infektionsversuch eruiert. Dazu wurden 4 Zellkulturschalen mit P388D₁-Makrophagen mit STEC 413/89-1 WT infiziert. Bei der einen Hälfte der Zellen (2 Zellkulturschalen) wurden nach 1,5, bei der anderen Hälfte (ebenfalls 2 Zellkulturschalen) nach 2 Stunden die Bakterien mit Gentamicin abgetötet, um den Effekt der NF- κ B-Supprimierung durch die STEC-Infektion 'einzufrieren' und die Schädigung der Zellen durch bakterielle Stoffwechselprodukte oder Toxine zu minimieren. Am ersten Tag wurden jeweils bei einem 1,5- bzw. 2-Stunden-Wert die Zellen 3 Stunden nach der Gentamicin-Behandlung für 50 Minuten mit LPS stimuliert und anschließend die Kernproteine extrahiert. Die restlichen Zellen wurden bis zum nächsten Tag weiter kultiviert und 23 Stunden nach der initialen Gentamicin-Behandlung ebenfalls für 50 Minuten mit LPS stimuliert und die Kernproteine extrahiert. Der aus den Kernextrakten generierte EMSA (1,6 μ g Poly[d(I-C)], 20500 cpm κ B-Sonde und je 2,6 μ g Kernproteinen aus P388D₁-Makrophagen) ist in Abbildung 4-5 dargestellt. Als Negativ-

kontrolle dienten Kernextrakte aus unbehandelten, nicht infizierten Zellen. Als NF- κ B-Aktivierungs-Kontrolle fungierten Kernextrakte aus LPS-stimulierten Zellen.

Die das NF- κ B-Basalniveau der Zellen anzeigenden Kernextrakte aus unbehandelten, nicht infizierten Zellen (Spur 1, 5, 6 und 10) zeigen eine schwache Protein-DNA-Bindungs-Bande, wohingegen die mit LPS stimulierten Zellen eine starke NF- κ B-Aktivität aufweisen, erkennbar an der starken schwarzen Bande (Spur 2 und 7). 1.5 bzw. 2 Stunden nach der Infektion mit STEC lässt sich NF- κ B in Makrophagen nicht mehr mit LPS stimulieren. Es konnte keine NF- κ B-DNA-Bindung detektiert werden (Spur 3 und 4). Es schien möglich, dass die Suppression, vor allem aber die Blockierung der Aktivierungsfähigkeit des Transkriptionsfaktors zwar über einige Stunden nach der Infektion bestehen bleibt, jedoch später wieder verschwindet. Daher wurde der Versuch unternommen, die infizierten Makrophagen 23 Stunden nach der Gentamicin-Abtötung der Bakterien mit LPS zu stimulieren. Das Ergebnis ist eindeutig: es konnte kein aktiviertes NF- κ B im Kern nachgewiesen werden (Spur 8 und 9: keine NF- κ B-DNA-Bindungs-Bande). Im Vergleich dazu war es allerdings möglich, unbehandelte Zellen mit LPS zu stimulieren, so dass die NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit nachweisbar ist (Spur 7).

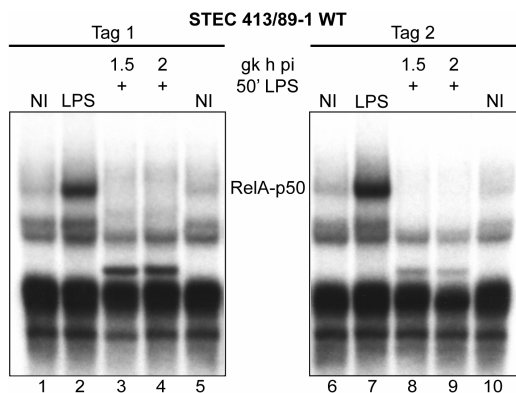


Abb. 4-5:

2-Tages-Infektionsversuch zur Verifizierung der irreversiblen NF- κ B-Suppression nach STEC-Infektion. **P388D₁-Makrophagen** wurden für 1.5 bzw. 2 Stunden mit STEC 413/89-1 WT infiziert und dann mit Gentamicin abgetötet. 3 bzw. 23 Stunden danach wurden die Zellen für 50 Minuten mit LPS (1 μ g/ml) stimuliert. Als Negativkontrolle dienten Kernproteinextrakte aus unbehandelten, nicht infizierten (NI) P388D₁-Makrophagen. Als Positivkontrolle kamen Kernproteinextrakte aus LPS-stimulierten P388D₁-Makrophagen zum Einsatz. Die RelA-p50- κ B-Komplexe sind gekennzeichnet.

Expositionsdauer: 3 Tage.

EMSA mit 1,6 μ g Poly[d(I-C)], 20500 cpm κ B-Sonde und je 2,6 μ g Kernproteinen aus P388D₁-Makrophagen.

Somit konnte gezeigt werden, dass die NF- κ B-Suppression durch STEC-Infektion zum einen irreversibel ist und zum anderen die LPS-induzierbare NF- κ B-Aktivierung nicht mehr möglich ist.

4.6 Untersuchung der NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit in mit STEC 413/89-1 Wildtyp, *E. coli* HB101 (pMAR7/pCVD462) und *E. coli* DH5 α (pMAR7) infizierten HeLa-Zellen (ohne und mit TNF- α -Stimulation)

Wie bereits in 4.2 festgestellt, scheint das bakterielle Protein EspB, welches durch die STEC-Pathogenitätsinsel LEE kodiert wird, in die Fähigkeit des Bakteriums NF- κ B aktiv zu supprimieren, involviert zu sein. Es stellte sich daher die Frage, ob der Effekt der NF- κ B-Suppression streng LEE-abhängig ist oder weitere, derzeit noch unbekannte Faktoren, daran Anteil haben. Die Gruppe um James B. Kaper hatte bereits 1997 den vollständigen LEE des prototypischen EPEC Stammes E2348/69 isoliert und in apathogene *E. coli* K-12 Stämme kloniert. Sie fand heraus, dass diese Konstrukte in Epithelzellen (Caco2-Zellen) ebenfalls A/E-Läsionen verursachen [93]. Auf Anfrage stellte uns James B. Kaper zwei Stämme für unsere Untersuchungen zur Verfügung. Dabei handelt es sich um den apathogenen *E. coli* HB101, welcher das klonierte EAF-Plasmid (pMAR7) und den klonierten LEE (pCVD462) des originären EPEC E2348/69 enthält, sowie den apathogenen *E. coli* DH5 α , der nur das klonierte EAF-Plasmid (pMAR7) beinhaltet [93]. Dazu wurden HeLa-Zellen für jeweils 6 Stunden zum einen mit dem STEC 413/89-1 Wildtypstamm, dem *E. coli* HB101 (pMAR7/pCVD462) und *E. coli* DH5 α (pMAR7) infiziert. Zum anderen wurden auf diese Art und Weise infizierte HeLa-Zellen nach der 6-stündigen Infektionszeit für 20 Minuten mit TNF- α (15 ng/ml) stimuliert. Während des Infektionsverlaufes konnte unter dem Mikroskop für alle drei eingesetzten Stämme die Adhärenz der Keime zusammen mit der Bildung von Mikrokolonien beobachtet werden. Anschließend erfolgten die Isolierung der Kernproteine sowie die Bestimmung der Gesamtproteinmenge jeder einzelnen Probe. Diese Proben wurden sodann im EMSA analysiert, wobei Kernextrakte aus unbehandelten, nicht infizierten HeLa-Zellen als Negativkontrolle und Kernextrakte aus TNF- α -stimulierten (15 ng/ml für 20') HeLa-Zellen als NF- κ B-Positivkontrolle mitgetestet wurden. Der EMSA wurde mit 1,6 μ g Poly[d(I-C)],

6 ng unmarkiertem NF-IL6-Oligonukleotid, 20500 cpm κ B-Sonde und je 3,8 μ g Kernproteinen aus HeLa-Zellen generiert.

Die unbehandelten, nicht infizierten Zellen zeigen ein sehr geringes NF- κ B-Basisniveau an, erkennbar an den sehr schwachen RelA-p50- und p50-p50-Banden (Abb. 4-6, Spur 1 und 10), wohingegen die alleinige Stimulation mit TNF- α eine starke NF- κ B-Aktivierung hervorruft (Spur 2 und 9). Unter 4.5 konnte bereits gezeigt werden, dass NF- κ B nicht mehr durch LPS-Stimulation in STEC-infizierten P388D₁-Makrophagen aktivierbar ist. Gleiches konnte in der Vergangenheit auch für STEC-infizierte HeLa-Zellen gezeigt werden (Spur 3 und 4 sowie [100]). Im Gegensatz dazu zeigt die Infektion mit dem Konstrukt, welches sowohl den LEE als auch das EAF-Plasmid enthält (pCVD462+pMAR7) (Spur 5 und 6) nach 6 Stunden Infektionsdauer eine deutliche NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität (Spur 5), die durch anschließende TNF- α -Stimulation sogar noch ein wenig gesteigert werden konnte (Spur 6).

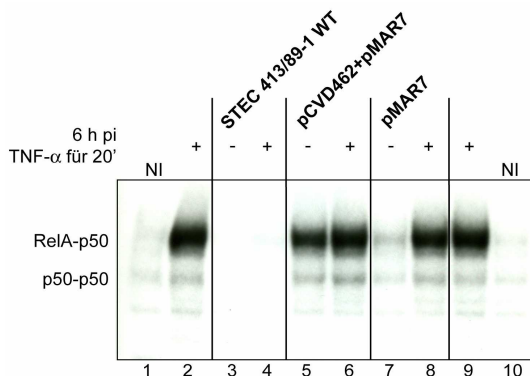


Abb. 4-6:

Vergleichende Darstellung der NF- κ B-Supprimierung und Aktivierbarkeit nach Infektion mit STEC 413/89-1 WT, *E. coli* HB101 (pMAR7/pCVD462) und *E. coli* DH5 α (pMAR7).

HeLa-Zellen wurden zum einen für 6 Stunden mit den o.g. Stämmen infiziert und zum anderen nach der Infektion für 20 Minuten mit TNF- α (15 ng/ml), einem guten NF- κ B-Aktivator in Epithelzellen, stimuliert. Als Negativkontrolle wurden Kernproteinextrakte aus unbehandelten, nicht infizierten (NI) HeLa-Zellen, als NF- κ B-Positivkontrolle Kernproteinextrakte aus für 20 Minuten mit 15 ng/ml TNF- α -stimulierten HeLa-Zellen im EMSA mitgetestet.

Expositionsdauer: 3 Tage.

EMSA mit 1,6 μ g Poly[d(I-C)], 6 ng unmarkiertes NF-IL6-Oligonukleotid, 20500 cpm κ B-Sonde und je 3,8 μ g Kernproteinen aus HeLa-Zellen.

Die RelA-p50- und p50-p50-Komplexe sind gekennzeichnet.

Beim apathogenen, nur das EAF-Plasmid enthaltenden *E. coli* DH5 α konnte nach der 6-stündigen Infektionsdauer im EMSA ein schwache NF- κ B-DNA-Bande detektiert werden

(Spur 7). Stimuliert man jedoch die Zellen nach der Infektionszeit mit diesem Keim mit TNF- α , so ist eine starke NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit feststellbar (Spur 8).

4.7 NF- κ B-Reportergen-Assay in STEC infizierten HeLa-Zellen

Die Detektion von aktivem, an DNA-gebundenem NF- κ B, wie es der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) zulässt, ist ein finales Ereignis im NF- κ B-Signaltransduktionsweg. Bei der Suche nach der Ebene, die im NF- κ B-Signaltransduktionsweg durch die STEC-Infektion augenscheinlich gehemmt wird, so dass letztendlich keine NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit mehr nachweisbar ist, erschien es am besten, diesen Weg von unten nach oben daraufhin zu untersuchen. Das finale Ereignis stellt dabei die Bindung von aktivem NF- κ B an das κ B-Motiv und die Genregulation desselben durch den Transkriptionsfaktor dar.

Für die Untersuchung des κ B-Motives wurde ein Luciferase-Reportergen-Assay auf NF- κ B in HeLa-Zellen etabliert. Dazu wurden HeLa-Zellen mit einem Luciferase-Reportergen gekoppelten NF- κ B-Promotor transfiziert. Um eine verlässliche Interpretation der experimentellen Daten zu bekommen, wurde ebenfalls, neben dem experimentellen Reporter, ein konstitutiv gebildeter Kontroll-Reporter, TK-Renilla, in die Zellen transfiziert. In der Datenanalyse wird dann der Quotient aus den gemessenen Luciferase- und Renilla-Werten gebildet, so dass man als Enddaten normalisierte "Relative Light Units" (RLU, Relative Licht Einheiten) erhält. Ca. 40 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen jeweils für 1.5 und 6 Stunden mit STEC 413/89-1 WT und STEC 413/89-1 *ΔespB* infiziert und darauf folgend für 4 Stunden mit Gentamicin (100 μ g/ml) behandelt, so dass der Infektionsstatus in der eukaryontischen Zelle 'eingefroren' wird und Luciferase gegebenenfalls gebildet werden kann. Parallel zu diesen Ansätzen wurden Zellen nach der gleichen Infektionsdauer mit Gentamicin (100 μ g/ml) und TNF- α (15 ng/ml) behandelt und ebenfalls für 4 Stunden, zur Luciferase-Bildung, weiter inkubiert. Danach wurden die Zellen mit dem Passive Lysis Buffer (PLB, Promega GmbH, Mannheim) lysiert. Anschließend erfolgte, unter Verwendung des Dual-Luciferase® Reporter Assay Kit (Promega GmbH, Mannheim), im Luminometer die Messung der Luciferase und Renilla in den Lysaten. Um statistisch auswertbare Ergebnisse zu bekommen, wurde jede Versuchsbedingung in 12 unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Die korrespondierenden Luciferase- und Renilla-Werte wurden sodann normalisiert ($LU_{\text{Firefly Luciferase}} : LU_{\text{Renilla}}$

Luciferase), aus den 12 normalisierten Werten der Mittelwert gebildet und von diesem Mittelwert die Standardabweichung ermittelt. Die Standardabweichung war bei allen Ansätzen nicht größer als 10%. Die Darstellung der erhaltenen Zahlenwerte erfolgt im Säulendiagramm (Abb. 4-7). Als Negativkontrolle fungierten transfizierte, unbehandelte, nicht infizierte HeLa-Zellen (Säule 1). Als NF- κ B-Aktivitätskontrolle wurden transfizierte HeLa-Zellen für 4 Stunden mit 15 ng/ml TNF- α stimuliert (Säule 2). Zur Kontrolle des gesamten Versuchsaufbaus und der Reagenzien wurden ebenfalls sowohl Luciferase als auch Renilla in nicht transfizierten, unbehandelten, nicht infizierten Zellen sowie dem puren PLB gemessen. Als Quotient ergaben diese Werte (alle < 0.067), wie zu erwarten war, 1. Die 4-stündige 'Wartezeit' zur Bildung der Luciferase wurde in Vorversuchen mit transfizierten und anschließend TNF- α stimulierten HeLa-Zellen ermittelt (Daten nicht gezeigt).

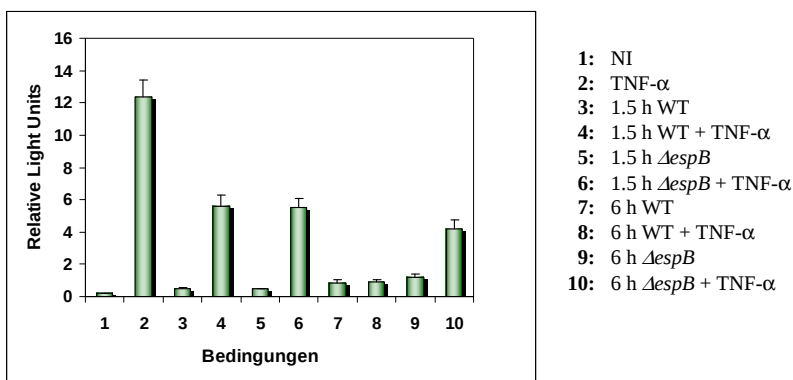


Abb. 4-7:

NF- κ B-Reporter-Gen-Assay.

HeLa-Zellen wurden mit einem Luciferase-Reporter-Gen gekoppelten NF- κ B-Promotor sowie TK-Renilla transfiziert. Die Infektion erfolgte mit STEC 413/89-1 WT und STEC 413/89-1 *ΔespB* für 1.5 und 6 Stunden. Danach wurden die Bakterien mit Gentamicin (100 μ g/ml) abgetötet und so der Infektionsstatus der eukaryontischen Zellen fixiert. Parallel dazu wurden gleichermaßen infizierte Zellen zusätzlich mit TNF- α (15 ng/ml) stimuliert. Die mit Gentamicin alleine oder mit Gentamicin + TNF- α behandelten Zellen wurden für 4 Stunden weiter inkubiert, damit sich Luciferase in detektierbaren Mengen bilden kann. Darauf folgte die Lyse der Zellen mit anschließender Messung der Luciferase und Renilla, in Form von Light Units (LU, Licht Einheiten) im Luminometer. Abschließend wurden die Quotienten aus Luciferase und Renilla, die Mittelwerte dieser Quotienten sowie die Standardabweichungen ($< 10\%$) ermittelt. Die Daten resultieren aus 12 unabhängig durchgeführten Experimenten.

Abbildung 4-7 gibt die Darstellung der Ergebnisse im Säulendiagramm wieder. Die unbehandelten, nicht infizierten Zellen (Säule 1) zeigen eine geringe Luciferase-Aktivität, wohingegen mit TNF- α stimulierte Zellen (Säule 2) eine hohe Luciferase-Aktivität

aufweisen. Zusammen mit den Kontrollwerten (nicht transfizierte Zellen und purer PLB) belegen diese Werte die korrekte Durchführung des Assays.

So zeigte sich, dass nach 1.5-stündiger Infektion mit den beiden oben genannten STEC-Stämmen (Säule 3 und 5) eine in etwa gleich hohe, aber dennoch sehr niedrige Luciferase-Aktivität detektierbar ist. Werden so infizierte Zellen jedoch nach dieser kurzen Infektionszeit zusätzlich mit TNF- α stimuliert (Säule 4 und 6), steigt die Luciferase-Aktivität um mehr als das 10-fache an. Nach 6-stündiger Infektionszeit verdoppelte sich die Menge an messbarer Luciferase im Vergleich zu den 1.5-Stunden-Werten (Säule 7 und 9) und liegt damit näher an der Aktivität unbehandelter, nicht infizierter Zellen (Säule 1) als an der von TNF- α -stimulierten Kontrollzellen (Säule 2). Stimuliert man jedoch infizierte Zellen nach 6 Stunden mit TNF- α (Säule 8 und 10), so ist bei den *AespB*-infizierten Zellen ein deutlicher Anstieg der Luciferase detektierbar (Säule 10), was bei WT-infizierten Zellen nicht der Fall ist (Säule 8).

4.8 Untersuchung des nukleo-zytoplasmatischen Shuttlings von NF- κ B durch CRM1/Exportin1

Ein weiteres wichtiges Moment im NF- κ B-Signaltransduktionsweg stellt das Pendeln (Shuttling) des Transkriptionsfaktors zwischen Zytoplasma und Kern dar. Dabei fungiert die Kerntranslokationssequenz (NLS) von RelA (p65) als Signal für den Transport aus dem Zytoplasma in den Zellkern, wohingegen die Nuclear Export Signals (NES) von I κ B- α und RelA, zusammen mit CRM1/Exportin1, den Rücktransport ins Zytoplasma forcieren [101]. Demnach müsste sich, wenn durch die Infektion mit dem STEC 413/89-1 Wildtypstamm dieser Weg gehemmt oder modifiziert würde, NF- κ B im Kern anreichern.

Daher fand für die Untersuchung des CRM1-Exportin1-Weges der spezifische CRM1/Exportin1-Inhibitor Leptomycin B (LMB) Verwendung. LMB ist in der Lage, durch kovalente Modifikation eines Cystein-Restes in der zentralen konservierten Region von CRM1/Exportin1 dieses zu inhibieren [102].

Dazu wurden HeLa-Zellen für eine Stunde mit Leptomycin B (40 μ M) vorinkubiert, um den CRM1/Exportin1-Weg zu inhibieren, und anschließend für 6 Stunden mit dem STEC 413/89-1 Wildtypstamm, unter fortlaufender LMB-Behandlung, infiziert (Spur 9). In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen nach der Infektionszeit für 20 Minuten mit TNF- α (15 ng/ml) stimuliert (Spur 10). Parallel dazu wurden Zellen ohne LMB-Behandlung mit

dem gleichen Keim für 6 Stunden infiziert (Spur 7) bzw. anschließend mit dem NF- κ B-Aktivator TNF- α (15 ng/ml) für 20 Minuten stimuliert (Spur 8). Alle weiteren Ansätze (Spur 1 bis 6) dienen der Kontrolle des Experimentes. Zur Kontrolle der NF- κ B-Aktivierung wurden unbehandelte, nicht infizierte Zellen (Negativkontrolle) und TNF- α -stimulierte (15 ng/ml für 20') Zellen (Positivkontrolle) generiert. Zur Kontrolle des LMB-Einflusses auf die Zellen wurden diese zum einen nur für eine Stunde und zum anderen für eine Stunde und zusätzlich 6 Stunden (entsprechend der Infektionsdauer) mit LMB (40 μ M) inkubiert (Spur 3 und 5). Parallel dazu wurden zwei weitere Ansätze dementsprechend behandelt und anschließend für 20 Minuten mit TNF- α (15 ng/ml) stimuliert (Spur 4 und 6). Nach den verschiedenen Behandlungs-Prozederen wurden sowohl die Zytoplasma- als auch Kernproteine aus den Zellen extrahiert sowie die Gesamtproteinmenge jedes Ansatzes bestimmt. Aus den Kernproteinextrakten wurden sodann ein EMSA zur Bestimmung der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität und ein Western Blot zur Verifizierung des RelA/p65-Pools des Zellkerns generiert. Zusätzlich wurde auch mit Hilfe des Western Blots der RelA/p65-Pool im Zytoplasma dargestellt.

In den EMSA wurden 1.6 μ g Poly[d(I-C)], 6 ng unmarkiertes NF-IL6-Oligonukleotid, 20500 cpm κ B-Sonde und je 3.8 μ g Kernproteine aus HeLa-Zellen eingesetzt. Zur Analyse im Western Blot wurden die nuklearen und zytoplasmatischen Proteine in 10%-igen SDS-Polyacrylamid-Minigelen elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran gebロットet und mit einer 1:500 Verdünnung des spezifischen Primärantikörpers "NF- κ B p65 (F-6)" (Santa Cruz Biotechnology) getestet. Die Detektion der immunreaktiven Bande erfolgte nach Entwicklung der Western Blots mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Nachweisantikörper sc-2005 (1:1000 verdünnt) von Santa Cruz Biotechnology mit Hilfe des "ECLTM Western blotting detection reagents"-Kits (GE Healthcare Europe GmbH). Für den Nachweis in den Kernproteinen wurden 8 μ g Proteinextrakt eingesetzt, für den Nachweis in den zytoplasmatischen Proteinen wurden 4 μ g benötigt.

Auch in diesem Experiment zeigt die sehr schwache NF- κ B-DNA-Bindungsaktivitäts-Bande unbehandelter, nicht infizierter Zellen (A, Spur 1) das NF- κ B-Basalniveau dieser Zellen an, wohingegen eine Stimulation mit TNF- α (A, Spur 2) eine starke Bande aufweist, was für das Vorhandensein von aktivem DNA-bindungsfähigem NF- κ B spricht. Werden unbehandelte, nicht infizierte Zellen für eine Stunde mit LMB behandelt, so ändert sich nichts am Basalniveau-Level der Zellen (A, Spur 3). Erfolgt nach der LMB-Behandlung die Stimulation mit TNF- α , so ist eine NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität

detektierbar, die jedoch etwas geringer ausfällt als die der nur mit TNF- α -behandelten Zellen (A, Spur 4). Nach der Behandlung der HeLa-Zellen für insgesamt 7 (1 + 6) Stunden mit LMB (A, Spur 5) ist keine NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität nachweisbar. Eine an die LMB-Behandlung anschließende TNF- α -Stimulation (15 ng/ml) für 20 Minuten bewirkt die Translokation von NF- κ B aus dem Zytoplasma in den Zellkern und die dortige DNA-Bindung (A, Spur 6). Wie bereits unter 4.6 gezeigt, ist nach 6-stündiger STEC-Infektion keine NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität feststellbar (A, Spur 7). Diese ist auch nach TNF- α -Stimulation (15 ng/ml für 20') nicht mehr induzierbar (A, Spur 8). Ebenso ist keine NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität nach einer einstündigen Präinkubation und fortgeführter Weiterbehandlung der Zellen mit LMB nach 6-stündiger Infektion mit STEC 413/89-1 WT (A, Spur 9) sowie abschließender Stimulation mit TNF- α (15 ng/ml) für 20 Minuten (A, Spur 10) nachweisbar.

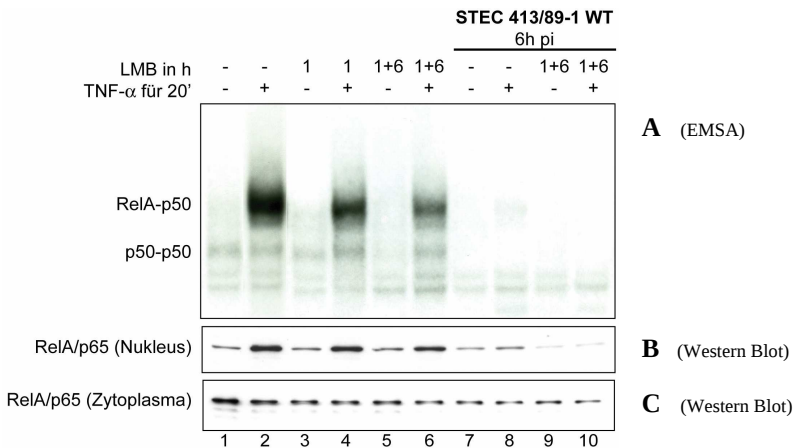


Abb. 4-8:

Untersuchung des CRM1/Exportin1-Weges während der Infektion mit STEC 413/89-1 WT.

HeLa-Zellen wurden für 1 Stunde mit dem CRM1/Exportin1-Inhibitor Leptomycin B (LMB, 40 μ M) vorinkubiert, um den CRM1/Exportin1-Weg zu inhibieren, und anschließend für 6 Stunden mit dem STEC 413/89-1 Wildtypstamm, unter fortlaufender LMB-Behandlung, infiziert. In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen nach der Infektionszeit für 20 Minuten mit TNF- α (15 ng/ml) stimuliert. Parallel dazu wurden Zellen ohne LMB-Behandlung mit dem gleichen Keim für 6 Stunden infiziert bzw. anschließend mit dem NF- κ B-Aktivator TNF- α (15 ng/ml) für 20 Minuten stimuliert. Alle weiteren Ansätze dienen der Kontrolle des Experimentes. Zur Kontrolle der NF- κ B-Aktivierung wurden unbehandelte, nicht infizierte Zellen (Negativkontrolle) und TNF- α -stimulierte (15 ng/ml für 20') Zellen (Positivkontrolle) generiert. Zur Kontrolle des LMB-Einflusses auf die Zellen wurden diese zum einen nur für eine Stunde und zum anderen für eine Stunde und zusätzlich 6 Stunden (entsprechend der Infektionsdauer) mit LMB (40 μ M) inkubiert. Parallel dazu wurden zwei weitere Ansätze dementsprechend behandelt und anschließend für 20 Minuten mit TNF- α (15 ng/ml) stimuliert (Spur 4 und 6).

Nach Extraktion der nuklearen und zytoplasmatischen Proteine aus diesen Zellen wurde die Gesamtproteinmenge je Probe ermittelt.

A: EMSA mit 1,6 µg Poly[d(I-C)], 6 ng unmarkiertes NF-IL6-Oligonukleotid, 20500 cpm κ B-Sonde und je 3,8 µg Kernproteinen aus HeLa-Zellen.

Die RelA-p50- und p50-p50-Komplexe sind gekennzeichnet.

Expositionsdauer: 3 Tage.

B und C: Die zu den angegebenen Zeitpunkten aus HeLa-Zellen hergestellten zytoplasmatischen und nuklearen Proteinextrakte wurden in 10%-igen SDS-Polyacrylamid-Minigelen elektrophoretisch getrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit einer 1:500 Verdünnung des spezifischen Primärantikörpers "NF- κ B p65 (F-6)" (Santa Cruz Biotechnology) getestet. Die Detektion der immunreaktiven Bande erfolgte nach Entwicklung der Western Blots mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Nachweisantikörper sc-2005 (1:1000 verdünnt) von Santa Cruz Biotechnology mit Hilfe des "ECLTM Western blotting detection reagents"-Kits (GE Healthcare Europe GmbH). Für den Nachweis in den Kernproteinen wurden 8 µg Proteinextrakt eingesetzt, für den Nachweis in den zytoplasmatischen Proteinen wurden 4 µg benötigt.

Da mit der Methodik des EMSA nur DNA-bindungsfähiges NF- κ B nachweisbar ist, wurde zusätzlich ein Western Blot mit denselben Kernextrakten durchgeführt, um die Gesamtmenge des im Kern vorhandenen RelA/p65 zu erfassen. Es zeigte sich, dass mit dem Blot gleich starke Banden unbehandelter, nicht infizierter (B, Spur 1), für eine (B, Spur 3) sowie für insgesamt 7 Stunden (B, Spur 5) mit LMB behandelte nicht infizierte Zellen darstellbar sind. Die nicht infizierten, aber TNF- α -stimulierten Ansätze (B, Spur 2, 4 und 6) zeigen im Western Blot annähernd gleich starke kräftige spezifische Banden. Es ist kein Unterschied in der Stärke der Banden STEC-infizierter (B, Spur 7) und STEC-infizierter, TNF- α -stimulierter (B, Spur 8) HeLa-Zellen zu sehen. Auffallend ist jedoch, dass diese Banden schwächer sind als die unbehandelter, nicht infizierter Zellen (B, Spur 1). Der detektierbare RelA/p65-Level fällt nach LMB-Behandlung und Infektion der Zellen mit STEC WT sowohl ohne (B, Spur 9) als auch mit TNF- α -Stimulation post infectionem (B, Spur 10) unter das Basalniveau der Zellen (B, Spur 1).

Die Analyse des zytoplasmatischen RelA/p65-Pools im Western Blot ergab keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen: RelA/p65 ist in allen Ansätzen nachweisbar (C, Spur 1 bis 10). Auffallend ist nur, dass die Zellen, welche nicht mit LMB behandelt wurden (C, Spur 1 und 2), stärkere Banden aufweisen als die mit LMB behandelten Zellen (C, Spur 3 bis 10).

4.9 Untersuchung der I κ B- α -Degradation in STEC-infizierten HeLa-Zellen

4.9.1 Darstellung der I κ B- α -Degradation in STEC-infizierten HeLa-Zellen

Nach den Untersuchungen der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität, des κ B-Motives selbst und des CRM1/Exportin1-Weges wurde das Augenmerk nun auf den NF- κ B-Inhibitor I κ B- α

gerichtet. Dieser muss, damit NF- κ B seine DNA-Bindungsfähigkeit erhält, durch den I κ B Kinase Komplex phosphoryliert, sodann durch die Ubiquitin-Ligase SCF^{BT_{RC}P} polyubiquitiniert und schlussendlich durch das 26S Proteasom degradiert werden. So wurde zunächst der I κ B- α -Level in STEC 413/89-1 Wildtyp und STEC 413/89-1 *ΔespB* infizierten HeLa-Zellen angeschaut.

Dazu wurden HeLa-Zellen für eine bis sechs Stunden zum einen mit dem Wildtypstamm und zum anderen mit der "in frame"-Deletionsmutante *ΔespB* infiziert. Danach erfolgte die Extraktion der zytoplasmatischen und nuklearen Proteine mit anschließender Bestimmung der Gesamtproteinmenge je Ansatz und Extrakt. Parallel dazu wurden die Proteine unbehandelter, nicht infizierter HeLa-Zellen sowie TNF- α -stimulierter (15 ng/ml für 20') HeLa-Zellen auf die gleiche Art und Weise gewonnen. Die Kernproteine wurden im EMSA auf ihre NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit hin untersucht, wobei pro Probe 3.8 μ g Kernproteinextrakt, 1.6 μ g Poly[d(I-C)], 6 ng unmarkiertes NF-IL6-Oligonukleotid und 20500 cpm κ B-Sonde zum Einsatz kamen. Die Analyse der zytoplasmatischen Extrakte erfolgte im Western Blot. Dazu wurden die zytoplasmatischen Proteine in 12%-igen SDS-Polyacrylamid-Minigelen elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran gebロットet und mit einer 1:1000 Verdünnung des spezifischen Primärantikörpers "I κ B- α (C-21)" (Santa Cruz Biotechnology) getestet. Die Detektion der immunreaktiven Bande erfolgte nach Entwicklung der Western Blots mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Nachweisantikörper sc-2004 (1:3000 verdünnt) von Santa Cruz Biotechnology mit Hilfe des "ECLTM Western blotting detection reagents"-Kits (GE Healthcare Europe GmbH). Für den Nachweis von I κ B- α wurden 4 μ g des zu testenden zytoplasmatischen Extraktes eingesetzt.

Wie bereits unter 4.1 beschrieben, kann im anfänglichen Verlauf der Infektion mit dem STEC-Wildtypstamm eine NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität detektiert werden (A, Spur 3 bis 5). Nach 4 bis 6 Stunden (A, Spur 6 und 7) Infektionsdauer kann diese nicht mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ist die NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit während der gesamten Infektionszeit mit der Deletionsmutante *ΔespB* gleich hoch (A, Spur 10 bis 14; vgl. auch 4.2). Die unbehandelten, nicht infizierten Zellen (A, Spur 2 und 9) zeigen eine sehr schwache NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität, die das NF- κ B-Basalniveau anzeigt. Die NF- κ B-Positivkontrolle, TNF- α -stimulierte HeLa-Zellen, zeigt eine sehr starke schwarze RelA-p50-Bande und somit eine starke NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität.

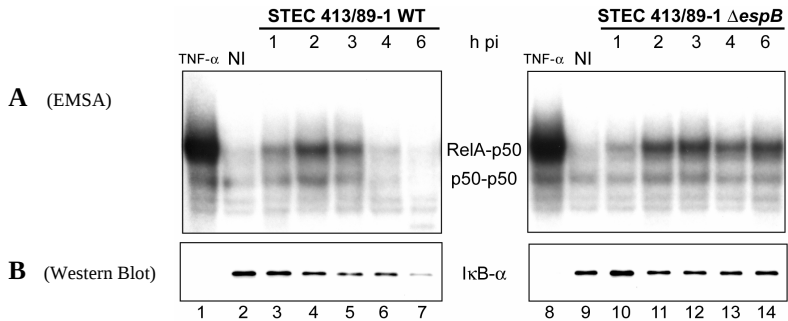


Abb. 4-9.1:

Darstellung der I κ B- α -Degradation in **HeLa-Zellen** während der Infektion mit STEC 413/89-1 Wildtypstamm oder STEC 413/89-1 *AespB* im Vergleich zur NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität.

HeLa-Zellen wurden für ein bis 6 Stunden mit dem STEC Wildtypstamm oder der "in frame"-Deletionsmutante *AespB* infiziert. Anschließend erfolgte die Extraktion der zytoplasmatischen und nuklearen Proteine aus diesen Zellen. Als Negativkontrolle dienten die Extrakte unbehandelter, nicht infizierter, als Positivkontrolle die Extrakte TNF- α -stimulierter (15 ng/ml für 20') HeLa-Zellen.

A: EMSA mit 1,6 µg Poly[d(I-C)], 6 ng unmarkiertes NF-IL6-Oligonukleotid, 20500 cpm κB-Sonde und je 3,8 µg Kernproteinen aus HeLa-Zellen.

Die RelA-p50- und p50-p50-Komplexe sind gekennzeichnet.

Expositionsdauer: 3 Tage.

B: Die zu den angegebenen Zeitpunkten aus HeLa-Zellen hergestellten zytoplasmatischen Proteinextrakte wurden in 12%-igen SDS-Polyacrylamid-Minigelen elektrophoretisch getrennt, auf eine PVDF-Membran gebettet und mit einer 1:1000 Verdünnung des spezifischen Primärantikörpers "IκB-α (C-21)" (Santa Cruz Biotechnology) getestet. Die Detektion der immunreaktiven Bande erfolgte nach Entwicklung der Western Blots mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Nachweisantikörper sc-2004 (1:3000 verdünnt) von Santa Cruz Biotechnology mit Hilfe des "ECL™ Western blotting detection reagents"-Kits (GE Healthcare Europe GmbH). Für den Nachweis von IκB-α wurden 4 µg des zu testenden zytoplasmatischen Extraktes eingesetzt.

Teil B der Abbildung 4-9.1 zeigt den Western Blot der zytoplasmatischen Proteine, die auf IκB-α untersucht wurden. Stimuliert man HeLa-Zellen mit TNF-α, so wird der NF-κB-Signaltransduktionsweg über den TNF-Rezeptor aktiviert, was zur Phosphorylierung und anschließenden Degradation von IκB-α führt (B, Spur 1 und 8), so dass keine Bande detektierbar ist. In unbehandelten, nicht infizierten Zellen liegt IκB-α an NF-κB gebunden vor und lässt sich daher im Western Blot nachweisen (B, Spur 2 und 9). Im Verlauf der Infektion mit dem STEC Wildtypstamm (B, Spur 3 bis 7) nimmt der Anteil von IκB-α in den Zellen sukzessive ab – die Banden werden immer schwächer. Im Gegensatz dazu bleibt der IκB-α-Pool in *AespB*-infizierten HeLa-Zellen während der gesamten Infektionsdauer von bis zu 6 Stunden (B, Spur 10 bis 14) auf dem gleichen Level wie unbehandelte, nicht infizierte Zellen (B, Spur 9).

4.9.2 Darstellung der I κ B- α -Degradation in STEC-infizierten und anschließend TNF- α -stimulierten HeLa-Zellen

Die Ergebnisse unter 4.9.1 zeigten eindeutig, dass es einen Unterschied in der I κ B- α -Degradation zwischen Wildtyp- und *ΔespB*-infizierten HeLa-Zellen gibt. Da das STEC-Bakterium für HeLa-Zellen einen eher schlechten NF- κ B-Aktivator darstellt, wurde der Versuchsansatz folgendermaßen erweitert: HeLa-Zellen wurden zunächst, wie eingangs beschrieben, mit den beiden in dieser Arbeit verwendeten STEC-Stämmen infiziert und nach den einzelnen Zeitpunkten (1, 2, 3, 4 und 6 Stunden) jeweils für 20 Minuten mit TNF- α (15 ng/ml) stimuliert. Auch aus diesen Zellen wurden die zytoplasmatischen und nuklearen Proteine extrahiert und ihre Gesamtproteinmenge bestimmt. Die nuklearen Proteine wurden im EMSA, die zytoplasmatischen Proteine im Western Blot getestet – ebenfalls wie eingangs beschrieben. Die Extrakte unbehandelter, nicht infizierter HeLa-Zellen fungierten als Negativkontrolle, die Extrakte TNF- α -stimulierter HeLa-Zellen dienten als Positivkontrolle.

Die Abbildung 4-9.2 stellt die Ergebnisse dieser Versuche dar. Die mit TNF- α stimulierten HeLa-Zellen weisen im EMSA eine hohe NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität auf (A, Spur 1 und 8) wohingegen die unbehandelten, nicht infizierten Zellen das sehr schwache NF- κ B-Basalniveau aufweisen (A, Spur 2 und 9). Die nach der Infektion mit dem STEC Wildtypstamm mit TNF- α behandelten Zellen zeigen nach einer Stunde Infektionsdauer eine starke NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität (A, Spur 3). Im Verlauf der nächsten 5 Stunden nimmt diese, trotz TNF- α -Behandlung sukzessive ab (A, Spur 4 bis 7). Im Gegensatz dazu bewegen sich die nachgewiesenen NF- κ B-DNA-Bindungsbanden der auf die gleiche Art und Weise behandelten, aber mit der *ΔespB*-Mutante infizierten HeLa-Zellen auf einem gleich bleibenden hohen Level (A, Spur 10 bis 14), das dem der nur mit TNF- α stimulierten Zellen (A, Spur 8) entspricht.

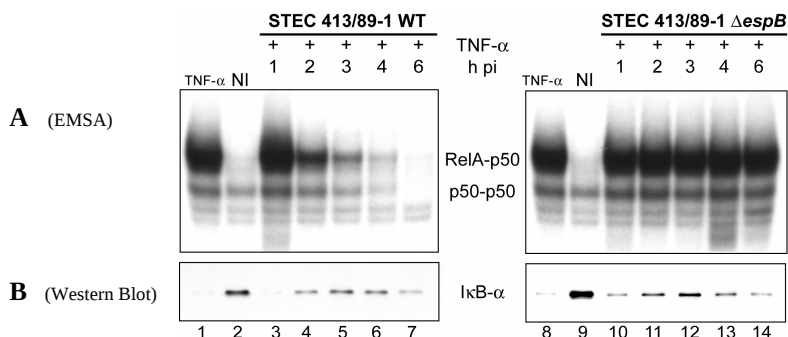


Abb. 4-9.2:

Immunoblot-Analysen des zeitlichen Verlaufes der IκB-α-Degradation in **HeLa-Zellen** während der Infektion mit STEC 413/89-1 WT oder STEC 413/89-1 Δ*espB* mit anschließender TNF-α-Stimulation im Vergleich zur NF-κB-DNA-Bindungsaktivität.

HeLa-Zellen wurden für ein bis 6 Stunden mit dem STEC 413/89-1 Wildtypstamm oder der "in frame"-Deletionsmutante Δ*espB* infiziert und am Ende jedes Infektionszeitpunktes mit 15 ng/ml TNF-α für 20 Minuten stimuliert. Anschließend erfolgte die Extraktion der zytoplasmatischen und nuklearen Proteine aus diesen Zellen. Als Negativkontrolle dienten die Extrakte unbehandelter, nicht infizierter, als Positivkontrolle die Extrakte TNF-α-stimulierter (15 ng/ml für 20') HeLa-Zellen.

A: EMSA mit 1,6 µg Poly[d(I-C)], 6 ng unmarkiertes NF-IL6-Oligonukleotid, 20500 cpm κB-Sonde und je 3,8 µg Kernproteinen aus HeLa-Zellen.

Die RelA-p50- und p50-p50-Komplexe sind gekennzeichnet.

Expositionsdauer: 3 Tage.

B: Die zu den angegebenen Zeitpunkten aus HeLa-Zellen hergestellten zytoplasmatischen Proteinextrakte wurden in 12%-igen SDS-Polyacrylamid-Minigelen elektrophoretisch getrennt, auf eine PVDF-Membran gebettet und mit einer 1:1000 Verdünnung des spezifischen Primärantikörpers "IκB-α (C-21)" (Santa Cruz Biotechnology) getestet. Die Detektion der immunreaktiven Bande erfolgte nach Entwicklung der Western Blots mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Nachweisantikörper sc-2004 (1:3000 verdünnt) von Santa Cruz Biotechnology mit Hilfe des "ECL™ Western blotting detection reagents"-Kits (GE Healthcare Europe GmbH). Für den Nachweis von IκB-α wurden 4 µg des zu testenden zytoplasmatischen Extraktes eingesetzt.

Wie bereits in Abbildung 4-9.1 B gezeigt, bewirkt die Aktivierung des NF-κB-Signaltransduktionsweges mit TNF-α die IκB-α-Degradation, so dass im Western Blot dieser zytoplasmatischen Proteinextrakte kein IκB-α detektierbar ist (B, Spur 1 und 8), wohingegen es in unbehandelten, nicht stimulierten Zellen nachzuweisen ist (B, Spur 2 und 9). Während des Verlaufes der Infektion mit dem Wildtypstamm und anschließender Stimulation mit TNF-α (B, Spur 3 bis 7), ist nach dem ein-Stunden-Wert eine schwache IκB-α-Bande sichtbar (B, Spur 3), die im Lauf der Infektionsdauer bis 4 Stunden (B, Spur 4 bis 6) zu- und nach 6 Stunden (B, Spur 7) wieder abnimmt. Das gleiche Ergebnis zeigt sich auch für die Zellen, die erst mit der Δ*espB*-Deletionsmutante infiziert und nach den verschiedenen Zeitpunkten mit TNF-α behandelt wurden (B, Spur 10 bis 14).

4.9.3 Darstellung von I κ B- α und phospho-I κ B- α -Ser32/36 in STEC-infizierten und anschließend TNF- α -stimulierten HeLa-Zellen

Ausgehend von diesen Ergebnissen stellte sich die Frage, ob die unterschiedliche Ausprägung der I κ B- α -Degradation in STEC-infizierten HeLa-Zellen durch eine verminderte Phosphorylierung, Ubiquitinierung oder proteasomale Degradation von I κ B- α geschieht.

Daher wurde mit den Extrakten aus den mit STEC Wildtyp infizierten HeLa-Zellen aus 4.9.2 wie dort beschrieben ein Western Blot generiert, bei dem aber die zytoplasmatischen Proteine neben dem spezifischen Primärantikörper gegen I κ B- α gleichzeitig mit einem weiteren spezifischen Primärantikörper gegen die an den beiden Serin-Resten 32 und 36 phosphorylierte Form von I κ B- α getestet wurden (Abb. 4-9.3 B). Zur besseren Übersicht wurde parallel dazu aus den korrespondierenden Kernproteinen ein EMSA, ebenfalls wie unter 4.9.2 beschrieben, angefertigt (Abb. 4-9.3 A).

Das Ergebnis des EMSA (Abb. 4-9.3 A) entspricht dem des unter 4.9.2 Abb. 4-9.2 A beschriebenen EMSA.

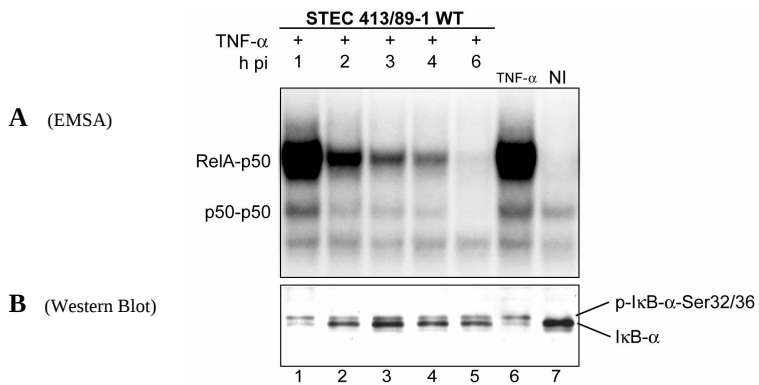


Abb. 4-9.3:

Darstellung von I κ B- α und phospho-I κ B- α -Ser32/36 in **HeLa-Zellen** während der Infektion mit STEC 413/89-1 WT mit anschließender TNF- α -Stimulation im Vergleich zur NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität.

HeLa-Zellen wurden für ein bis 6 Stunden mit dem STEC 413/89-1 Wildtypstamm infiziert und am Ende jedes Infektionszeitpunktes mit 15 ng/ml TNF- α für 20 Minuten stimuliert. Anschließend erfolgte die Extraktion der zytoplasmatischen und nuklearen Proteine aus diesen Zellen. Als Negativkontrolle dienten die Extrakte unbehandelter, nicht infizierter, als Positivkontrolle die Extrakte TNF- α -stimulierter (15 ng/ml für 20') HeLa-Zellen.

A: EMSA mit 1,6 μ g Poly[d(I-C)], 6 ng unmarkiertes NF-IL6-Oligonukleotid, 20500 cpm κ B-Sonde und je 3,8 μ g Kernproteinen aus HeLa-Zellen.

Die RelA-p50- und p50-p50-Komplexe sind gekennzeichnet.

Expositionsdauer: 3 Tage.

B: Die zu den angegebenen Zeitpunkten aus HeLa-Zellen hergestellten zytoplasmatischen Proteinextrakte wurden in 12%-igen SDS-Polyacrylamid-Minigelen elektrophoretisch getrennt, auf eine PVDF-Membran gebロットet und mit einer 1:1000 Verdünnung des spezifischen Primärantikörpers "IκB-α (C-21)" (Santa Cruz Biotechnology) zusammen mit einer 1:1000 Verdünnung des spezifischen Primärantikörpers "phospho-IκB-α-Ser32/36 (5A5)" (Cell Signaling) getestet. Die Detektion der immunreaktiven Banden erfolgte nach Entwicklung der Western Blots mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Nachweisantikörper sc-2004 (1:3000 verdünnt) und sc-2005 (1:1000 verdünnt) von Santa Cruz Biotechnology mit Hilfe des "ECL™ Western blotting detection reagents"-Kits (GE Healthcare Europe GmbH). Für den Nachweis von IκB-α und p-IκB-α-Ser32/36 wurden 4 µg des zu testenden zytoplasmatischen Extraktes eingesetzt.

Die unteren Banden des in Abb. 4.9-3 B gezeigten Western Blots sind spezifische IκB-α-Banden, wohingegen die oberen Banden dieses Blots die an den beiden Serin-Resten 32 und 36 phosphorylierte Form von IκB-α darstellen (vgl. auch Beschriftung in Abb. 4.9.3 B).

Für die zytoplasmatischen Level von IκB-α gilt hier dasselbe wie unter 2.9.2 beschrieben. In unbehandelten, nicht infizierten HeLa-Zellen (B, Spur 7) ist eine starke IκB-α-Bande detektierbar, wohingegen in TNF-α-stimulierten Zellen (B, Spur 6) nur eine sehr schwache IκB-α-Bande darstellbar ist. Im Verlauf der STEC-Infektion mit anschließender Stimulation der infizierten Zellen mit TNF-α (15 ng/ml für 20') (B, Spur 1 bis 5) sind nach einer Stunde (B, Spur 1) ebenfalls geringe Mengen IκB-α nachweisbar, die im Verlauf der Infektion zunehmen (B, Spur 2 bis 4) und nach 6 Stunden absinken (B, Spur 5).

Dem entgegen finden sich in den infizierten sowie nicht infizierten, TNF-α-stimulierten Zellen nahezu gleich hohe Level des phosphorylierten IκB-α (B, Spur 1 bis 6). Lediglich in den unbehandelten, nicht infizierten Zellen ist kein phosphoryliertes IκB-α detektierbar (B, Spur 7).

4.9.4 Darstellung von IκB-α und phospho-IκB-α-Ser32/36 in STEC 413/89-1 Wildtyp und STEC 413/89-1 *ΔespB* infizierten HeLa-Zellen mit anschließender TNF-α-Stimulation nach vorheriger Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor MG132

Die unter 4.9.3 beschriebenen Ergebnisse ließen die Vermutung zu, dass während der Infektion mit dem STEC 413/89-1 Wildtyp die Phosphorylierung des NF-κB Inhibitors IκB-α in irgendeiner Weise beeinflusst wird.

An den beiden Serin-Resten 32 und 36 phosphoryliertes IκB-α wird schnell ubiquitiniert und stellt sodann ein potentielles Substrat für das 26S Proteasom dar. Die Degradation des phosphorylierten und polyubiquitinierten IκB-α durch das 26S Proteasom geschieht

ebenfalls sehr schnell. Um nun eindeutig die Level von I κ B- α und vor allem von phospho-I κ B- α -Ser32/36 in STEC infizierten Zellen nachweisen zu können, wurde der Proteasom-Inhibitor MG132, welcher, durch Hemmung der Proteasom-Aktivität, phosphoryliertes I κ B- α stabilisiert und seine Proteasom-vermittelte Degradation blockiert, benutzt [103, 104].

Dazu wurden HeLa-Zellen zunächst für 30 Minuten mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 (10 μ M) vorbehandelt. Danach erfolgten, ebenfalls unter MG132-Behandlung, die Infektionen zum einen mit dem STEC 312/89-1 Wildtyp und zum anderen mit der "in frame"-Deletionsmutante *AespB* für 1 bis 6 Stunden. Abschließend wurden die Zellen nach den einzelnen Zeitpunkten der Kinetik (1, 2, 3, 4 und 6 Stunden) jeweils für 20 Minuten mit TNF- α (15 ng/ml) stimuliert. Aus diesen Zellen wurden die zytoplasmatischen Proteine extrahiert und die Gesamtproteinmenge je Probe bestimmt. Die Analyse dieser Extrakte fand mit der Methodik des Western Blots statt. Zur Kontrolle wurden ebenfalls die zytoplasmatischen Proteine unbehandelter, nicht infizierter (NI), TNF- α stimulierter (15 ng/ml für 20') sowie nur mit MG132 behandelten, nicht infizierten (10 μ M) und MG132 behandelten (10 μ M) TNF- α stimulierten (15 ng/ml für 20') HeLa-Zellen mitgetestet.

Die zytoplasmatischen Proteinextrakte wurden in 12%-igen SDS-Polyacrylamid-Minigelen elektrophoretisch getrennt, auf eine PVDF-Membran gebロットet und mit einer 1:1000 Verdünnung des spezifischen Primärantikörpers "I κ B- α (C-21)" (Santa Cruz Biotechnology) oder einer 1:1000 Verdünnung des spezifischen Primärantikörpers "phospho-I κ B- α -Ser32/36 (5A5)" (Cell Signaling) getestet. Die Detektion der immunreaktiven Bande erfolgte nach Entwicklung der Western Blots mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Nachweisantikörper sc-2004 (1:3000 verdünnt) oder Ziege-anti-Maus-Nachweisantikörper sc-2005 (1:1000 verdünnt) von Santa Cruz Biotechnology mit Hilfe des "ECLTM Western blotting detection reagents"-Kits (GE Healthcare Europe GmbH). Für den Nachweis von I κ B- α sowie seiner phosphorylierten Form wurden 4 μ g des zu testenden zytoplasmatischen Extraktes eingesetzt.

Abbildung 4-9.4 zeigt die entwickelten Western Blots. In Teil A der Abbildung ist das detektierte I κ B- α dargestellt. In Teil B zeigt sich oberhalb der spezifischen Banden des phospho-I κ B- α -Ser32/36 auch polyubiquitiniertes phosphoryliertes I κ B- α als schwarzer Schmier (siehe auch die Beschriftungen in Abb. 4-9.4 A).

In unbehandelten, nicht infizierten (A, Spur 1 und 10) sowie in MG132 behandelten, nicht infizierten (A, Spur 3 und 12) HeLa-Zellen ist ein hoher I κ B- α Level nachweisbar, was an

den starken schwarzen Banden zu erkennen ist. Nach der alleinigen Behandlung mit TNF- α ist kein I κ B- α mehr detektierbar (A, Spur 2 und 11). Werden die Zellen jedoch der Wirkung von MG132 und TNF- α ausgesetzt (A, Spur 4 und 13), so ist eine geringe Menge I κ B- α im Zytoplasma der Zellen nachzuweisen. Zellen, die dem Einfluss von MG132 ausgesetzt sind, mit dem STEC 413/89-1 Wildtypstamm infiziert und abschließend noch mit TNF- α stimuliert werden (A, Spur 5 bis 9), weisen im Verlauf der Infektion eine Zunahme des I κ B- α Levels auf. Im Gegensatz dazu bleibt der I κ B- α Level in den ebenso behandelten, aber mit der STEC 413/89-1 Δ espB-Mutante infizierten Zellen (A, Spur 14 bis 18) auf einem gleich bleibenden mittleren Niveau (mittelstarke Banden).

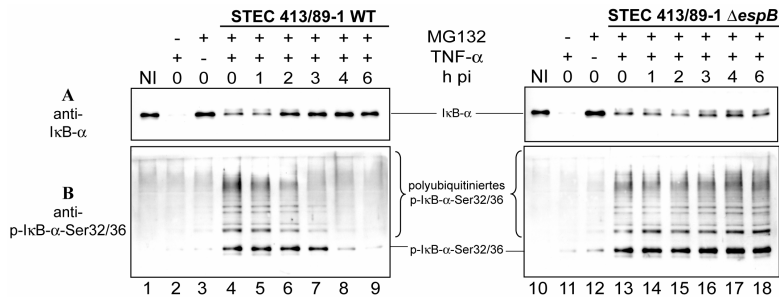


Abb. 4-9.4:

Darstellung von I κ B- α und phospho-I κ B- α -Ser32/36 in **HeLa-Zellen** während der Infektion mit STEC 413/89-1 WT und Δ espB mit anschließender TNF- α -Stimulation nach Behandlung mit MG132. HeLa-Zellen wurden für 30 Minuten mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt und anschließend für ein bis 6 Stunden mit dem STEC 413/89-1 Wildtypstamm oder der "in frame"-Deletionsmutante Δ espB unter fortlaufender MG132-Behandlung infiziert. Am Ende jedes Infektionszeitpunktes erfolgte die Stimulation mit 15 ng/ml TNF- α für 20 Minuten. Nach Extraktion der zytoplasmatischen Proteine aus diesen Zellen wurde die Gesamtproteinmenge je Probe ermittelt. Zur Kontrolle wurden die Extrakte unbehandelter, nicht infizierter (NI, Spur 1 und 10), TNF- α stimulierter (15 ng/ml für 20') (Spur 2 und 11), nur MG132 behandelte (10 μ M) (Spur 3 und 12) und MG132 behandelte (10 μ M) TNF- α stimulierter (15 ng/ml für 20') (Spur 4 und 13) HeLa-Zellen mitgetestet.

Die zu den angegebenen Zeitpunkten aus HeLa-Zellen hergestellten zytoplasmatischen Proteinextrakte wurden in 12%-igen SDS-Polyacrylamid-Minigelen elektrophoretisch getrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit einer 1:1000 Verdünnung des spezifischen Primärantikörpers "I κ B- α (C-21)" (Santa Cruz Biotechnology) oder einer 1:1000 Verdünnung des spezifischen Primärantikörpers "phospho-I κ B- α -Ser32/36 (5A5)" (Cell Signaling) getestet. Die Detektion der immunreaktiven Bande erfolgte nach Entwicklung der Western Blots mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Nachweisantikörper sc-2004 (1:3000 verdünnt) oder sc-2005 (1:1000 verdünnt) von Santa Cruz Biotechnology mit Hilfe des "ECLTM Western blotting detection reagents"-Kits (GE Healthcare Europe GmbH). Für den Nachweis von I κ B- α und p-I κ B- α wurden 4 μ g des zu testenden zytoplasmatischen Extraktes eingesetzt.

Sowohl in unbehandelten, nicht infizierten (B, Spur 1 und 10) als auch in TNF- α stimulierten, nicht infizierten (B, Spur 2 und 11) HeLa-Zellen ist kein an den beiden Serin-Resten 32 und 36 phosphoryliertes I κ B- α detektierbar. In nicht infizierten, MG132

behandelten Zellen (B, Spur 3 und 12) sind geringe Mengen p-IkB- α -Ser32/36 nachweisbar (schwache Bande). Werden HeLa-Zellen mit MG132 behandelt und mit TNF- α stimuliert (B, Spur 4 und 13), können recht starke Level des phosphorylierten NF- κ B-Inhibitors IkB- α im Western Blot dargestellt werden. Im Verlauf der Infektion mit dem STEC 413/89-1 Wildtypstamm in MG132 vorbehandelten HeLa-Zellen, die anschließend noch mit TNF- α stimuliert wurden, steigt die nachzuweisende Menge phosphorylierten IkB- α bis 3 Stunden Infektionszeit an (B, Spur 5 bis 7) und fällt nach 4 bis 6 Stunden (B, Spur 8 und 9) auf ein sehr schwaches Niveau ab. Im Gegensatz dazu verstärkt sich das detektierbare p-IkB- α -Ser32/36 Signal in ebenso behandelten, jedoch mit der STEC 413/89-1 *ΔespB*-Mutante infizierten Zellen bis zum Infektionszeitpunkt von 6 Stunden.

Die Stärke der polyubiquitinierten phospho-IkB- α -Ser32/36 Banden (B, schwarzer Schmier oberhalb der spezifischen phospho-IkB- α -Ser32/36 Banden) verläuft parallel zum Anstieg und Abfall (B, Spur 4 bis 9) bzw. nur zum Anstieg (B, Spur 13 bis 18) zu der Stärke der spezifischen phospho-IkB- α -Ser32/36 Banden.

4.10 Nachweis des Transkriptionsfaktors PPAR- β nach STEC-Infektion in P388D₁-Makrophagen

Durch eine Veröffentlichung von Denise Kelly [105] wurde der Liganden-induzierte Transkriptionsfaktor "Peroxisome proliferator-activated receptor β " (PPAR- β) in die Untersuchungen mit einbezogen. Die Gruppe um Denise Kelly fand heraus, dass unter der Infektion von Epithelzellen mit dem apathogenen Bakterium *Bacteroides thetaiotaomicron* PPAR- γ und RelA (p65) miteinander Komplexe bilden. Des Weiteren induziert dieser Keim den nuklearen Export von transkriptionell aktivem RelA (p65) und PPAR- γ .

Daher lag die Vermutung nahe, dass dieser für *B. thetaiotaomicron* beschriebene anti-inflammatorische Mechanismus ebenfalls für STEC zutreffen könnte.

Dazu wurden P388D₁-Makrophagen mit STEC 413/89-1 Wildtyp, STEC 413/89-1 *ΔespB* und dem apathogenen *E. coli* K-12 MG1655 infiziert. Nach 30 Minuten bis zu 4 Stunden wurden die Zellen geerntet, die zytoplasmatischen sowie die nuklearen Proteine extrahiert und die Gesamtproteinmenge je Probe ermittelt. Diese Proteinextrakte wurden in 10%-igen SDS-Polyacrylamid-Minigelen elektrophoretisch getrennt, auf eine PVDF-Membran gebロットet und mit einer 1:1000 Verdünnung des spezifischen Primärantikörpers "PPAR- β

(H-74)" (Santa Cruz Biotechnology) getestet. Die Detektion der immunreaktiven Bande erfolgte nach Entwicklung der Western Blots mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Nachweisantikörper sc-2004 (1:3000 verdünnt) von Santa Cruz Biotechnology mit Hilfe des "ECL™ Western blotting detection reagents"-Kits (GE Healthcare Europe GmbH). Für den Nachweis der Kernproteine wurden 4 µg Proteinextrakt eingesetzt, für den Nachweis in den zytoplasmatischen Proteinen wurden 8 µg benötigt. Zur Kontrolle wurden zytoplasmatische und nukleare Proteinextrakte unbehandelter, nicht infizierter P388D₁-Makrophagen mitgetestet. Als PPAR-β-Positivkontrolle dienten 20 µg Jurkat-Kernextrakt (sc-2132), die von Santa Cruz Biotechnology bezogen wurden.

Zu Beginn wurde vor allem versucht, PPAR-γ nachzuweisen. Trotz des Einsatzes von zwei verschiedenen PPAR-γ-Antikörpern unterschiedlicher Firmen (Santa Cruz Biotechnology und Cell Signaling), hohen Gesamtproteinmengen (20 µg/Probe) und gering verdünnten Antikörpern (1:100 bis 1:200) gelang es nicht, PPAR-γ mit der Methodik des Western Blots in P388D₁-Makrophagen zu detektieren. Dasselbe Problem stellte sich auch für RXR-α (Daten nicht gezeigt). Schließlich gelang der Nachweis von PPAR-β. Aber auch hier verlief die Analyse der Proteinextrakte im Western Blot nicht problemlos. Der Einsatz von hohen Mengen Gesamtprotein resultierte in extrem vielen unspezifischen Banden und völlig überstrahlten Blots, so dass keine PPAR-β-spezifische Bande ausgemacht werden konnte. Erst die radikale Reduzierung der Gesamtproteinmenge brachte auswertbare Blots. Der Einsatz des Jurkat-Kernextrakts, welches Santa Cruz Biotechnology zu der Zeit zum Nachweis und zur Darstellung von PPAR-β in den Datenblättern verwandte, ermöglichte es letztendlich, die spezifische PPAR-β-Bande in den zu testenden Proben eindeutig zu identifizieren.

Aus den entwickelten Western Blots, die zum Nachweis von PPAR-β durchgeführt wurden, geht hervor, dass in den Kernproteinen und zytoplasmatischen Proteinen unbehandelter, nicht infizierter Makrophagen kein PPAR-β detektierbar ist (Spur 2 und 8). Die PPAR-β-Positivkontrolle diente zur Verifizierung der spezifischen immunreaktiven PPAR-β-Bande (Spur 1).

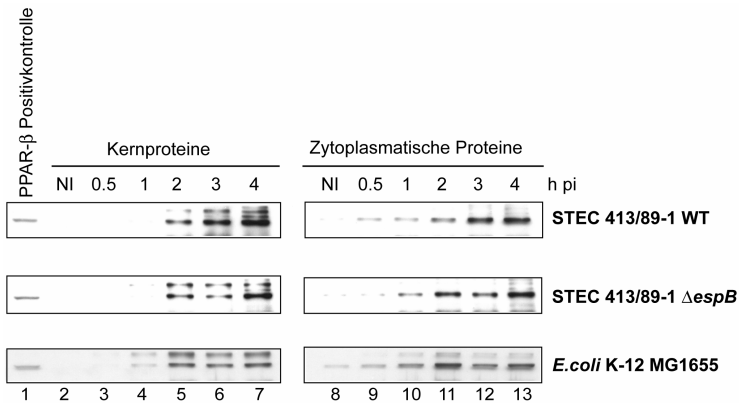


Abb. 4-10:

Immunoblot-Analysen des zeitlichen Verlaufes der PPAR- β -Aktivierung in **P388D₁-Makrophagen**, die mit folgenden Stämmen infiziert wurden: STEC 413/89-1 WT, STEC 413/89-1 $\Delta espB$ und *E.coli* K-12 MG1655. Die zu den angegebenen Zeitpunkten aus den Zellen hergestellten zytoplasmatischen und nuklearen Proteinextrakte wurden in 10%-igen SDS-Polyacrylamid-Minigelen elektrophoretisch getrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit einer 1:1000 Verdünnung des spezifischen Primärantikörpers "PPAR- β (H-74)" (Santa Cruz Biotechnology) getestet. Die Detektion der immunreaktiven Bande erfolgte nach Entwicklung der Western Blots mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Nachweisantikörper sc-2004 (1:3000 verdünnt) von Santa Cruz Biotechnology mit Hilfe des "ECLTM Western blotting detection reagents"-Kits (GE Healthcare Europe GmbH). Für den Nachweis der Kernproteine wurden 4 μ g Proteinextrakt eingesetzt, für den Nachweis in den zytoplasmatischen Proteinen wurden 8 μ g benötigt.

Als PPAR- β -Positivkontrolle dienten 20 μ g Jurkat-Kernextrakt (sc-2132), die von Santa Cruz Biotechnology bezogen wurden.

Betrachtet man die Kernproteine der mit STEC 413/89-1 WT, STEC 413/89-1 $\Delta espB$ sowie *E. coli* K-12 MG1655 infizierten Zellen, so ist ebenfalls in der ersten Stunde der Infektion kein PPAR- β nachweisbar (Spur 3 und 4). Im weiteren Verlauf aller drei durchgeführten Infektionskinetiken (Spur 5 bis 7) ist PPAR- β in allen Ansätzen vorhanden und steigt zum 4-Stunden-Infektionszeitpunkt deutlich an. Dabei zeigen die immunreaktiven Banden der beiden eingesetzten STEC-Stämme ein wesentlich stärkeres Signal als die des apathogenen *E. coli* K-12 MG1655 (Spur 7 oben und mitte im Vergleich zu unten). In den zytoplasmatischen Proteinextrakten sind geringe Mengen PPAR- β in allen 30-Minuten-Infektionszeitpunkten (Spur 9) nachweisbar. Der PPAR- β Level steigt sukzessive im weiteren Verlauf der drei verschiedenen Infektionskinetiken an (Spur 10 bis 13). Auch in den zytoplasmatischen Proteinen erbrachte die Analyse von PPAR- β weitaus höhere Mengen in den mit STEC infizierten Makrophagen im Vergleich zu den Zellen, die mit dem apathogenen *E. coli* K-12 MG1655 infiziert wurden (vor allem Spur 13 oben und mitte im Vergleich zu unten).

4.11 Untersuchung der T-Zell-Proliferationsfähigkeit *in vitro* nach STEC-Infektion im 2-Tages-Mausmodell *in vivo*

Aufgrund der Ergebnisse aus den Infektionen mit STEC 413/89-1 Wildtyp und STEC 413/89-1 *ΔespB* in P388D₁-Makrophagen und ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen sollte ein Maus-Infektionsmodell aufgebaut werden, um die biologische Bedeutung der NF-κB-Suppression für die Makrophagenfunktion im Sinne der Signalweitergabe an T-Zellen zu untersuchen.

Dazu wurden in den zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in etwa 6 Wochen alte weibliche Balb/C-Mäuse mit STEC 413/89-1 Wildtyp und STEC 413/89-1 *ΔespB* in die Schwanzvene infiziert. Den nicht infizierten Kontrollmäusen wurde steriles Medium (DMEM) injiziert. Nach 24 und 48 Stunden Infektionszeit wurden pro Erreger jeweils drei Mäuse sowie eine Kontrollmaus getötet und die Milzen entnommen. Die Milzzellen wurden isoliert, auf eine Dichte von 3×10^6 Zellen/ml eingestellt und im 96-well-Format zweimal im Triplet pro Maus ausgesät. Nach 4-stündiger Inkubation wird die Hälfte der, mit Milzzellen bestückten, Wells mit Concanavalin A ($1 \mu\text{g/ml}$) versehen. Nach 24 Stunden erfolgte die WST-1 Zugabe. Nach weiteren drei Stunden Inkubation im Zellkulturbrutschrank erfolgte die Detektion im ELISA-Reader bei 450/620 nm.

Bereits nach 24 Stunden Infektionsdauer fiel vor allem bei den mit STEC 413/89-1 WT infizierten Mäusen, im Gegensatz zu den Kontrollmäusen, welche ein ungestörtes Allgemeinbefinden zeigten (Abb. 4-11.1 A), ein mittelgradig gestörtes Allgemeinbefinden auf (Abb. 4-11.1 B). Sie liefen nicht mehr herum und suchten die Nähe der anderen Mäuse. Ihr Fell war gestäubt und ihre Augen matt oder zugekniffen. Bewegten sie sich doch, so war eine Parese der Hintergliedmaßen sichtbar. Es konnte nur eine geringe Futteraufnahme beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war das Allgemeinbefinden der mit STEC 413/89-1 *ΔespB* infizierten Mäuse ungestört (Abb. 4-11.1 C). Sie zeigten ein normales Verhalten, liefen umher und nahmen Futter auf. Lediglich ein leicht gestäubtes Fell war erkennbar.

Nach 48 Stunden Infektion verschlechterte sich das Allgemeinbefinden der STEC 413/89-1 WT infizierten Mäuse weiter. Beim Hochnehmen der Tiere am Schwanz zeigten sie keine Abwehrbewegungen und ließen den Kopf nach unten hängen. Neben dem gestäubten Fell fiel ein äußerst ungepflegtes Äußeres der Tiere ins Auge (Abb. 4-11.1 B). Dagegen erschien das Allgemeinbefinden und Verhalten der STEC 413/89-1 *ΔespB* infizierten Mäuse (Abb. 4-11.1 C) gleich dem der nicht infizierten Kontrollmäuse (Abb. 4-11.1 A).

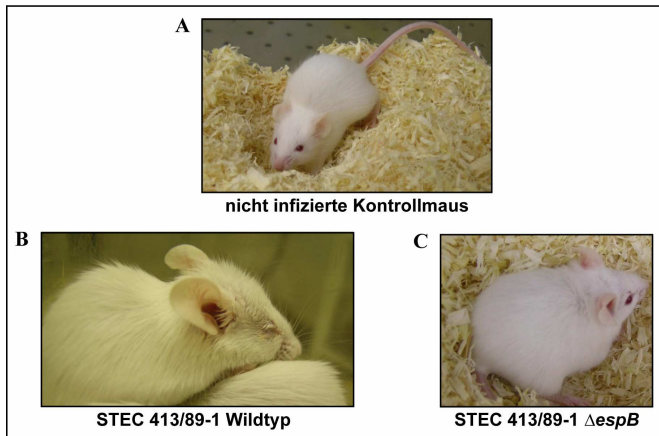


Abb. 4-11.1:

Bilder der in den Infektionsversuchen eingesetzten Mäuse nach 48 Stunden Infektionsdauer.

6 Wochen alten weiblichen Balb/C-Mäusen wurde zur Kontrolle steriles Medium (DMEM) injiziert (A). Die Infektion erfolgte mit STEC 413/89-1 WT (B) bzw. STEC 413/89-1 $\Delta espB$ (C) in die Schwanzvene.

A: nicht infizierte Kontrollmaus

B: STEC 413/89-1 WT infizierte Maus

C: STEC 413/89-1 $\Delta espB$ infizierte Maus

Bei der Entnahme der Milzen und in Augenscheinnahme der Bauchhöhle fielen gleich mehrere Dinge auf. Während die mit der $\Delta espB$ -Mutante infizierten Mäuse schon im Allgemeinbefinden den nicht infizierten Kontrollmäusen glichen, so gab es nur einen Unterschied im Bauchhöhlensitus: die Milzen der STEC 413/89-1 $\Delta espB$ infizierten Mäuse waren nach 24 Stunden Infektionsdauer in etwa 1.5-mal, nach 48 Stunden Infektionsdauer in etwa 2-mal größer als die der nicht infizierten Kontrollmäuse (Abb. 4-11.2, vergleiche A mit C). Im Gegensatz dazu waren bei den STEC 413/89-1 WT infizierten Mäuse starke Veränderungen feststellbar. Das Bauchfell und die, die inneren Organe überziehenden, serösen Häute wirkten vor allem nach 48 Stunden Infektionszeit trocken und das intraperitoneale Fettgewebe nahm im Verlauf der Infektion ab. Die Milzen waren nach 24 Stunden in etwa so groß wie die der nicht infizierten Kontrollmäuse, nach 48 Stunden nur noch 0.75-mal so groß (Abb. 4-11.2, vergleiche A mit B).

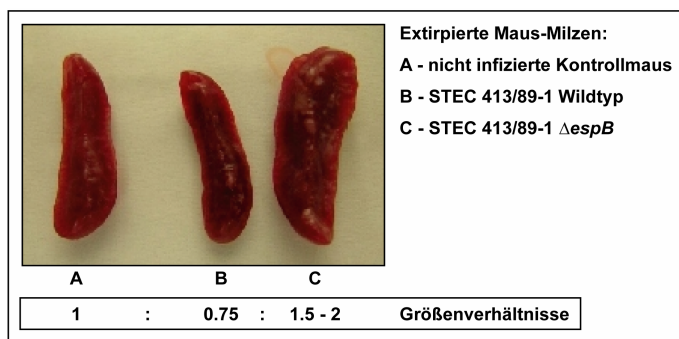


Abb. 4-11.2:

Nach 48 Stunden Infektionsdauer extirpierten Milzen im Größenvergleich.

6 Wochen alten weiblichen Balb/C-Mäusen wurde zur Kontrolle steriles Medium (DMEM) injiziert (A). Die Infektion erfolgte mit STEC 413/89-1 WT (B) bzw. STEC 413/89-1 $\Delta espB$ (C) in die Schwanzvene. Nach 24 und 48 Stunden Infektionsdauer wurden die Mäuse getötet und die Milzen entnommen.

A: nicht infizierte Kontrollmaus

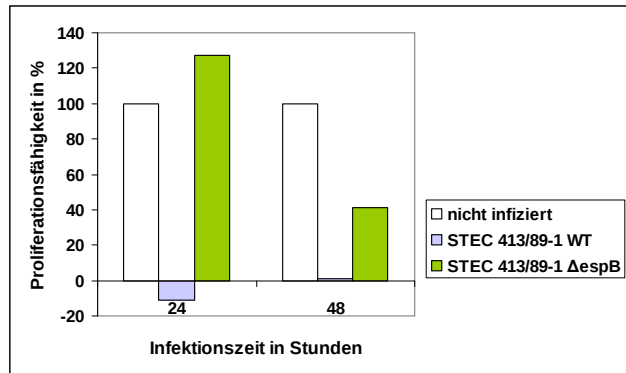
B: STEC 413/89-1 WT infizierte Maus

C: STEC 413/89-1 $\Delta espB$ infizierte Maus

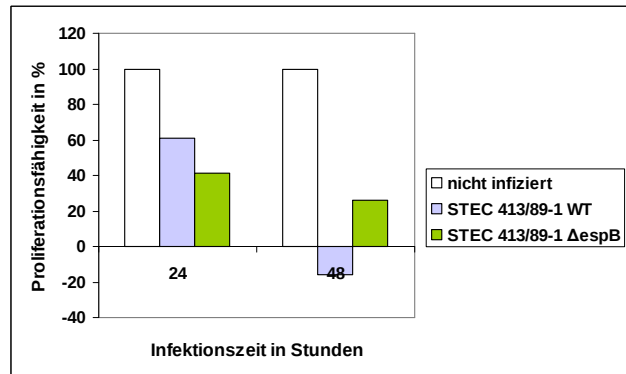
Die graphische Darstellung der Ergebnisse der zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche wird in Abbildung 4-11.3 (I und II) gezeigt.

Dabei wurden die ermittelten Werte der nicht infizierten Kontrollmäuse jeweils als 100% Proliferationsfähigkeit gesetzt, da anzunehmen war, dass die Funktion der Makrophagen und T-Zellen dieser Tiere nicht beeinträchtigt war (Abb. 4-11.3 I und II, weiße Säulen). So zeigte sich in dem ersten Experiment (Abb. 4-11.3 I, blaue Säulen), dass keine Proliferationsfähigkeit der T-Zellen in STEC 413/89-1 WT infizierten Mäusen nach 24 Stunden (-11%) und 48 Stunden (1%) feststellbar ist. Im zweiten Experiment betrug die Proliferationsfähigkeit nach 24 Stunden, im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen, 61%, nach 48 Stunden nahm sie sogar negative Ausmaße (-16%) an (Abb. 4-11.3 II, blaue Säulen). Im Gegensatz dazu konnte im ersten Experiment (Abb. 4-11.3 I, grüne Säulen), nach der Infektion mit STEC 413/89-1 $\Delta espB$, nach 24 Stunden eine Proliferationsfähigkeit der T-Zellen von 127% ermittelt werden, die nach 48 Stunden Infektionsdauer auf 41% abfiel. Im zweiten Experiment betrug die Proliferationsfähigkeit nach 24 Stunden Infektionsdauer 41% und nach 48 Stunden 26% (Abb. 4-11.3 II, grüne Säulen).

I



II

**Abb. 4-11.3:**

Graphische Darstellung der T-Zell-Proliferationsfähigkeit *in vitro* nach Infektion von Balb/C-Mäusen *in vivo*. 6 Wochen alten weiblichen Balb/C-Mäusen wurde zur Kontrolle steriles Medium (DMEM) injiziert (A). Die Infektion erfolgte mit STEC 413/89-1 WT (B) bzw. STEC 413/89-1 $\Delta espB$ (C) in die Schwanzvene. Nach 24 und 48 Stunden Infektionsdauer wurden die Mäuse getötet und die Milzen entnommen. Die Milzzellen wurden isoliert, im 96-well-Format ausgesät und mit Concanavalin A stimuliert. Die Detektion erfolgte 24 Stunden nach Concanavalin A Gabe mit WST-1 im ELISA-Reader bei 450/620 nm.

Es werden die Ergebnisse von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Infektionsversuchen gezeigt:

I: graphische Darstellung der Ergebnisse des ersten Experiments

II: graphische Darstellung der Ergebnisse des zweiten Experiments

5 DISKUSSION

Die Kenntnis über den Infektionsmechanismus von pathogenen Darmbakterien stellt eine wesentliche Grundlage für die Bekämpfung der Infektionen mit diesen Erregern dar. Im Gegensatz zu apathogenen *E. coli*, die als Kommensalen den Darm besiedeln, haben sie Pathogenitätsinseln, die Pathogenitätsfaktoren kodieren, in ihr Genom inseriert. Dies ist als besondere Überlebensstrategie anzusehen. Erst dadurch können sie spezifische Krankheiten im Organismus auslösen.

Vor fast 20 Jahren begann die Wissenschaft mit der Erforschung von enteropathogenen *Escherichia coli*. Der anfängliche Fokus zielte dabei auf die Identifizierung des Genoms und der darin enthaltenen Virulenzfaktoren, die meist auf speziellen Pathogenitätsinseln lokalisiert sind, sowie Erreger-spezifischen Plasmiden. Parallel dazu wurden die verschiedensten potentiellen Virulenzfaktoren in den Erregern deletiert. Diese Deletionsmutanten wurden anschließend in Infektionsassays analysiert. Dabei stellte man die unterschiedlichsten, Erreger-spezifischen Adhärenz-Mechanismen an den Wirtszellen fest (vgl. z.B. EPEC/EHEC mit EIEC und EAEC). Die Analyse der einzelnen Infektionsmechanismen stellt ein weites Feld für die Forschung dar, da es unzählige Signaltransduktionswege in den eukaryontischen Zellen gibt, mit denen bakterielle Proteine interferieren können.

Dabei sind die Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führen nur einige von vielen. In der Vergangenheit konnte bereits für pathogene *Yersinia* spp. sowie apathogene *Salmonella* spp. die Inhibierung der NF- κ B-Aktivierung nachgewiesen werden. Die Gruppe um Kurt Schesser fand 1998 heraus, dass der *yopJ* Lokus des enteropathogenen Erregers *Yersinia pseudotuberculosis* ein Protein kodiert, welches die Aktivierung von NF- κ B, durch Inhibierung der Phosphorylierung mit anschließender Degradation des Inhibitors I κ B, hemmt [106]. Die Gruppe um Kim Orth verifizierte diese Inhibierung und stellte fest, dass YopJ direkt an die Superfamilie der MAPK Kinasen binden kann und deren Phosphorylierung sowie spätere Aktivierung blockiert. Dies führt im weiteren Verlauf des NF- κ B-Signaltransduktionsweges zu dessen Inhibierung [107]. Drei Jahre später konnte die Gruppe um Klaus Ruckdeschel nachweisen, dass das "Yersinia outer protein" YopP (ein Homolog zu YopJ in *Y. pseudotuberculosis*) von *Yersinia enterocolitica* effizient die Aktivität der I κ B Kinase IKK- β inhibiert und so die NF- κ B-Aktivierung in J774A.1 Makrophagen supprimiert

[108]. Auch für das enteropathogene Bakterium *Salmonella typhimurium* konnte eine Blockade des NF- κ B-Signaltransduktionsweges nachgewiesen werden. Dabei lag die Inhibierung auf der Stufe der Ubiquitinierung, welche nach Infektion nicht mehr stattfand. Das hierfür verantwortliche bakterielle Protein scheint AvrA zu sein [109, 110].

Untersuchungen zur NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität nach Infektion von T84-Darmepithelzellen mit EPEC ergaben eine Erhöhung derselben nach einer Stunde Infektionsdauer, die drei Stunden nach Infektionsbeginn jedoch abfiel [111]. Die Gruppe um Suzana D. Savkovic interpretierte dies als Beendigung der NF- κ B-Aktivierung und lenkte den Schwerpunkt ihrer weiteren Untersuchungen auf den Zeitpunkt eine Stunde nach Infektionsbeginn. Für Genexpressionsanalysen des späteren Infektionsverlaufes wurden daher die adhärenenten Bakterien durch Gentamicin abgetötet, um die Infektion auf diesem Stand einzufrieren [111, 112]. Die ersten Ergebnisse zur Untersuchung der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität in STEC-infizierten Epithelzellen unterschieden sich stark von den Untersuchungen, die Hecht und Savkovic veröffentlichten. So konnte Hauf zeigen, dass die NF- κ B-Aktivierung in STEC-infizierten HeLa-Zellen nur transient ist und EspB benötigt wird, um eine Inhibierung der persistenten NF- κ B-Aktivierung hervorzurufen. Außerdem konnte demonstriert werden, dass die, durch STEC, induzierte NF- κ B-Suppression auch durch EPEC E2348/69 und EHEC EDL933 verursacht wird [100].

Neben Gelretardationsexperimenten (EMSA) wurden in dieser Arbeit hauptsächlich Western Blots und Luciferase-Assays durchgeführt. Jede dieser Methoden hat, je nach Fragestellung, gegenüber den anderen beiden entscheidende Vor- und Nachteile. Der EMSA erlaubt die Untersuchung der DNA-Bindungsfähigkeit von im Kern vorliegenden Proteinen. Würden solche Proteine im Kern vorliegen, aber nicht an die DNA binden können, so kann man sie mit Hilfe des EMSAs nicht nachweisen. Die Detektion von Proteinen erfolgt mit dem Western Blot. Durch die Fraktionierung der Zellproteine in zytoplasmatische und nukleare Proteine, kann damit eine gezielte Aussage über das Vorliegen und die Verteilung der Proteine innerhalb der Zelle getroffen werden. Mit Hilfe des Luciferase-Assays hingegen wird die Aktivität bestimmter Genmotive untersucht. Dies geschieht streng genommen indirekt, da das 'Genprodukt Luciferase' des gezielt in die Zelle gebrachten Reporter-Gens gemessen wird. Üblicherweise erfolgt diese Messung in Ganzzellextrakten.

5.1 Die Suppression der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität durch Infektion mit STEC 413/89-1 wird auch in Makrophagen hervorgerufen

5.1.1 STEC 413/89-1 Wildtyp supprimiert die initiale NF- κ B-Aktivierung in P388D₁-Makrophagen schneller und effizienter als in HeLa-Zellen

Zu Beginn der Untersuchungen des Shiga Toxin-produzierenden *E. coli* 413/89-1 WT auf seine Fähigkeit NF- κ B zu supprimieren, wurden vornehmlich Epithelzellen verwendet. Das liegt in der Tatsache begründet, dass die primären Zielzellen des Erregers – Darmzellen – Epithelzellen sind. Für Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass nach einer Infektionsdauer von 4 Stunden mit dem STEC-Erreger die initiale NF- κ B-Aktivierung abnahm und nach 6 Stunden nahezu vollständig unterdrückt wurde [100]. Dieses Ergebnis konnte von mir bestätigt werden (vgl. Abb. 4-1 A).

Außerdem vermag STEC die Sekretion des Interleukins IL-8 und des Zytokins IL-6 zu inhibieren [100]. IL-6 wird von T-Zellen und Makrophagen gebildet. Es ist an Wachstum und Differenzierung von T- und B-Zellen sowie der Immunantwort der akuten Phase beteiligt. IL-8 wird von Makrophagen, Lymphozyten und Hepatozyten sezerniert und fungiert als chemotaktisches Molekül für neutrophile Zellen und T-Zellen. Basierend auf diesen Resultaten stellte sich die Frage, in wie weit sich die Suppression des Transkriptionsfaktors NF- κ B auch in Makrophagen feststellen lässt. Daher wurde zunächst die makrophagenähnliche murine Zelllinie P388D₁ in die Versuche mit einbezogen. Diese wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen wie die HeLa-Zellen behandelt und die Kernproteine auf DNA-bindungsfähiges NF- κ B hin im EMSA untersucht (vgl. Abb. 4-1 B). Auch hier war eine initiale NF- κ B-Aktivierung, die ihren Höhepunkt 45 Minuten nach Infektionsbeginn erreicht, nachweisbar. Ein deutlicher Abfall der NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit konnte bereits eine Stunde nach Infektionsbeginn detektiert werden (Abb. 4-1 B, Spur 5). Somit stand eindeutig fest, dass die durch STEC 413/89-1 WT hervorgerufene NF- κ B-Suppression auch in Makrophagen stattfindet.

Ein großer Unterschied zwischen den Infektionen der beiden Zelllinien fiel jedoch sofort ins Auge: der Zeitraum, den das Bakterium benötigt, um die anfängliche NF- κ B-Aktivierung manifest zu machen und die abschließende Suppression des Transkriptionsfaktors herbeizuführen. Während in STEC 413/89-1 WT infizierten HeLa-Zellen erst nach ca. zwei Stunden die stärkste NF- κ B-DNA-Bindungsaktivitäts-Bande zu sehen ist, ist diese bei STEC 413/89-1 WT infizierten P388D₁-Makrophagen bereits nach 30 Minuten

erkennbar (vgl. Abb. 4-1 A Spur 4 mit Abb. 4-1 B Spur 3). Die Ursache für dieses Phänomen liegt vermutlich in der Unfähigkeit des Bakteriums, NF- κ B in den verschiedenen Zellarten gleich stark aktivieren zu können. So besitzen HeLa-Zellen, also Epithelzellen, keinen TLR4. Dessen Ligand ist das bakterielle LPS, welches Hauptbestandteil der äußeren Membran Gram negativer Bakterien, zu denen auch der STEC zählt, ist. Damit kann der STEC über diesen Weg keine NF- κ B-Aktivierung in Epithelzellen hervorrufen. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass der TLR5 die NF- κ B-Aktivierung in Epithelzellen durch bakterielles Flagellin vermittelt [113-115], was insofern bemerkenswert ist, da Flagellin im Gegensatz zu anderen bakteriellen Zellwandbestandteilen, wie LPS oder Peptidoglykane, ein Protein ist. Normalerweise erkennen PRR keine Proteine, da dies der spezifischen Immunität vorbehalten ist. Eine wirklich gute Aktivierung des Transkriptionsfaktors geschieht jedoch nur, wenn das Flagellin an TLR5 der basolateralen Seite der Epithelzellen binden kann [116]. Im Gegensatz dazu weisen Makrophagen den TLR4 auf, so dass die NF- κ B-Aktivierung über die TLR4/LPS-Bindung an der apikalen Zellseite wesentlich schneller und vor allem direkter vonstatten gehen kann. Demnach stellt der STEC 413/89-1 in Epithelzellen einen schlechten NF- κ B-Induktor dar.

Diese doch wesentlichen Unterschiede in der Rezeptor/Liganden-übermittelten NF- κ B-Aktivierung scheinen der ausschlaggebende Grund für a) die Geschwindigkeit der initialen Aktivierung und b) die Stärke des im EMSA detektierbaren Signals zu sein. Die TLR4/LPS-vermittelte NF- κ B-Aktivierung in Makrophagen ist schneller und effizienter als die durch TLR5/Flagellin-vermittelte in Epithelzellen.

5.1.2 Die durch STEC 413/89-1 WT vermittelte NF- κ B-Suppression sinkt während der Infektion in ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen unter das Basalniveau unbehandelter, nicht infizierter Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die durch STEC 413/89-1 WT hervorgerufene NF- κ B-Suppression im späteren Verlauf der Infektion nicht zellspezifisch ist (vgl. 5.1.1), wurden der Wildtyp und die "in frame"-Deletionsmutate *AespB* in Primärzellen getestet, um etwas Abstand vom klassischen *in vitro* Zellkulturversuch zu nehmen und den *in vivo* Bedingungen näher zu kommen. Die dafür aus Balb/C-Mäusen isolierten Knochenmarkszellen wurden unter Einfluss des Wachstumsfaktors M-CSF (Macrophage-colony stimulating factor) zu Knochenmarksmakrophagen ausdifferenziert. Diese ausdifferen-

zierten Makrophagen unterschieden sich bereits beim Handling in der Zellkultur erheblich von der etablierten Zelllinie P388D₁. Ihre Haftung an der Oberfläche der Zellkulturschalen war wesentlich fester als die der Zelllinie; die Ausbeute der Kernproteine bei der Extraktion war geringer als die der etablierten Zellen.

Der aus den Kernproteinen der ausdifferenzierten Knochenmarksmakrophagen generierte EMSA, nach Infektion der Zellen mit den beiden oben genannten Stämmen, weist, im Vergleich zum EMSA der P388D₁-Makrophagen (vgl. Abb. 4-1 B), gleich mehrere Auffälligkeiten auf: a) die NF- κ B-DNA-Bindungsaktivitäts-Bande der Knochenmarksmakrophagen erscheint, bei gleichem Gesamteinsatz, wesentlich stärker als die der Zellkulturmakrophagenlinie P388D₁; b) die Zeit bis zur NF- κ B-Suppression ist bei den Knochenmarksmakrophagen in etwa doppelt so lang wie bei den P388D₁-Makrophagen; c) der detektierbare NF- κ B-Level sinkt nach 2-stündiger Infektionsdauer mit dem STEC 413/89-1 Wildtypstamm weit unter das NF- κ B-Basalniveau unbehandelter, nicht infizierter Knochenmarksmakrophagen (vgl. Abb. 4-1 A und B mit Abb. 4-2).

Aus diesen Beobachtungen lassen sich gleich mehrere Schlüsse und Hypothesen herleiten. Es scheint, dass Primärzellen, wie die in dieser Arbeit verwendeten ausdifferenzierten murinen Knochenmarksmakrophagen, in Infektionsversuchen mit Gram negativen Erregern, welche durch den Aufbau ihrer Zellwand reichlich Lipopolysaccharid mitbringen, eine viel stärkere Immunantwort liefern können als die etablierte makrophagenähnliche Zelllinie P388D₁. Das liegt vermutlich daran, dass Zelllinien unter sterilen Bedingungen (ohne jeglichen Kontakt zu anderen Zelllinien oder das Immunsystem-stimulierende Pathogene) kultiviert werden, um ihr Überleben und ihre Reinheit zu sichern. Mit der Zeit verlieren Zelllinien gewisse Eigenschaften, wie z.B. die Expression von Genen oder auch ganze Signaltransduktionswege, da diese vermutlich nicht gebraucht werden, und können somit nur noch begrenzt auf Noxen von außen reagieren. Primärzellen weisen die Defizite hingegen nicht auf – sie sind vollständig intakt – und können damit effektiver als Zelllinien gegen eindringende Noxen reagieren.

Betrachtet man die Ergebnisse der mit den drei unterschiedlichen Zellarten (HeLa, P388D₁-Makrophagen, Knochenmarksmakrophagen) generierten EMSAs zusammen, so fällt auf, dass je stärker der Transkriptionsfaktor NF- κ B zu Beginn der Infektion aktiviert wurde, desto schneller und durchgreifender die Suppression desselben erfolgt. Das will heißen: die Ausprägung der initialen NF- κ B-Aktivierung in HeLa-Zellen benötigt verhältnismäßig lang im Gegensatz zu der Ausprägung in Makrophagen. Die Zeit bis zur fast vollständigen Suppression des Transkriptionsfaktors in HeLa-Zellen dauert ebenfalls

(mit 6 Stunden) wesentlich länger als in Makrophagen (ein bis zwei Stunden). Diese Beobachtungen lassen für mich den Schluss zu, dass es ein Strategie des STEC 413/89-1 Wildtyp zu sein scheint, NF- κ B zuerst initial zu aktivieren, so dass der bestehende zytoplasmatische Pool erschöpft ist. Die anschließende Blockierung des Signaltransduktionsweges wäre für das Bakterium dann in zweierlei Hinsicht äußerst effektiv: Zum einen wird es der Wirtszelle unmöglich gemacht, eine wirksame Immunantwort gegen das Pathogen zu setzen. Da transkriptionell aktives NF- κ B nach Bindung an das κ B-Motiv auch die Transkription seines eigenen Gens anschaltet (und somit ein positives 'Feedback' liefert), wird nach Suppression dieses Transkriptionsfaktors im Endeffekt auch seine Neusynthese gestoppt, womit zum anderen die NF- κ B-Aktivierung, sowie die anschließend durch sie verursachte Proinflammation, vollständig ausgeschaltet zu sein scheint.

5.2 Wird der NF- κ B-supprimierende Faktor von STEC 413/89-1 in den Überstand einer Bakterienkultur sezerniert? Ist die NF- κ B-Suppression irreversibel?

5.2.1 Nur ein vitales STEC 413/89-1 Wildtyp Bakterium kann NF- κ B supprimieren

Um sicherzustellen, dass der NF- κ B-supprimierende Faktor im Bakterium selbst liegt und nicht etwa ein, in den Überstand der Bakterienkultur, sezernierter Virulenzfaktor dafür verantwortlich zu machen ist, wurden ausdifferenzierte murine Knochenmarksmakrophagen den einzelnen Fraktionen einer STEC 413/89-1 Wildtyp Kultur ausgesetzt (vgl. 4.4). Die gewählten Infektions-/Stimulationsdauer-Zeitpunkte 45 Minuten und drei Stunden resultierten aus den vorhergehenden Infektionsversuchen mit Knochenmarksmakrophagen (vgl. 4.2). Die Ergebnisse belegen eindeutig, dass nur ein vitales STEC-Bakterium in der Lage ist, NF- κ B im Verlauf der Infektion zu supprimieren.

Dieses Ergebnis ist in der Hinsicht wichtig, da Savkovic *et al.* die Bakterien zu einem viel zu frühen Zeitpunkt durch Gentamicin-Behandlung abtötete und somit den entscheidenden Effekt der Bakterien, eben die NF- κ B-Suppression und den damit verbundenen Beeinträchtigungen, überhaupt nicht mehr untersuchen konnte. So entstanden gleich zwei Fehlinterpretationen der von dieser Gruppe produzierten Ergebnisse: 1) EPEC aktiviert

NF- κ B in intestinalen Epithelzellen und 2) EPEC ist verantwortlich für die durch NF- κ B-Aktivität ausgelöste IL-8-Transkription [111]. Die durch EPEC und STEC ausgelöste initiale NF- κ B-Aktivierung wird definitiv durch keinen EPEC- oder STEC-spezifischen LEE-kodierten Pathogenitätsfaktor ausgelöst. Sie ist vielmehr ein Resultat der Stimulation der Wirtszelle mit Komponenten der Zellwand Gram negativer Bakterien.

(Infektionskinetiken mit dem apathogenen *E. coli* K-12 MG1655, welcher vor der Infektion ebenfalls hitze-inaktiviert wurde, zeigten, dass auch dieser Keim in der Lage ist, in HeLa-Zellen NF- κ B zu aktivieren (Daten nicht gezeigt).)

5.2.2 Die Hemmung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges ist irreversibel

Es war für mich äußerst wichtig, zu wissen, ob die durch STEC 413/89-1 WT hervorgerufene NF- κ B-Suppression zeitlich begrenzt, also reversibel, oder endgültig und somit irreversibel ist. In einem über 23 Stunden andauernden Infektionsversuch, in dem P388D₁-Makrophagen mit STEC 413/89-1 Wildtyp infiziert wurden, konnte ich diese Frage beantworten: Die Hemmung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges ist irreversibel. Die Beeinträchtigung dieses Weges geht sogar soweit, dass in den infizierten Makrophagen, 25 Stunden nach Infektionsbeginn, keine NF- κ B-Aktivität nach LPS-Stimulation induziert werden kann.

NF- κ B ist, wie bereits in der Einleitung erläutert, ein wichtiger Faktor der angeborenen Immunität. Seine transkriptionelle Aktivität, nach durch Pathogene induzierte Aktivierung und DNA-Bindung, führt zur Expression proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-8). Die so ablaufende Entzündungsreaktion der Wirtszelle dient der Mobilmachung des angeborenen Immunsystems, um eingedrungene Erreger zu bekämpfen, zu eliminieren und sie dem spezifischen Immunsystem zu präsentieren. STEC ist in der Lage, diese erste Barriere der Abwehr im Menschen unwiederbringlich zu hemmen. Für Darmpathogene kommt erschwerlich hinzu, dass ihr Hauptinfektionsort das Darmlumen ist. Um nicht automatisch durch die Darmperistaltik und den Weitertransport des Darminhalts aus dem Wirtsorganismus eliminiert zu werden, haben STEC/EHEC (und auch EPEC) im Laufe der Evolution die Fähigkeit erworben mit Hilfe des Typ-III-Sekretions-Systems "attaching and effacing"-Läsionen hervorzubringen [117]. Dadurch heften sie fest am Darmepithel, können sich ungehindert vermehren und Effektoren in die Wirtszellen bringen.

Die Hauptwirte des Erregers – Rinder – sind meistens symptomlose Träger des Erregers. STEC scheint lediglich bei Durchfallerkrankungen von Kälbern eine Rolle zu spielen, da

der Keim im Kot an Diarrhö erkrankter Kälber wesentlich häufiger nachgewiesen werden kann als bei Kälbern ohne Diarrhö. Das Bakterium konnte aber auch in anderen Haustieren (Pferd, Hund, Katze) nachgewiesen werden. STEC-assoziierte Erkrankungen in diesen Tierarten sind jedoch nicht bekannt. Eine STEC-assoziierte Erkrankung ist in der Schweinehaltung, und hier besonders bei Absatzferkeln, bekannt: die Ödemkrankheit. Nach Resorption des Shiga Toxins aus dem Darmlumen erfolgt eine Toxämie, die zur Schädigung des Endothels führt, was die Ödembildung und zentralnervösen Symptome bedingt. Für keine Tierart werden hämorrhagische Diarrhöen oder das hämolytisch-urämische Syndrom beschrieben. Diese Krankheitsbilder scheinen nur beim Menschen aufzutreten. Dies lässt den Schluss zu, dass der Mensch ein sogenannter 'Fehlwirt' für STEC ist und somit mehr durch das Bakterium und seine Toxine geschädigt wird als sein Hauptwirt, das Rind.

Die Unterdrückung der humanen angeborenen (und im Folgenden auch der spezifischen) Abwehr durch STEC scheint somit eher ein Nebenprodukt als ein eigenständiger Pathomechanismus des Erregers im 'Fehlwirt Mensch' zu sein.

5.2.3 Der Locus of Enterocyte Effacement (LEE) ist nicht allein verantwortlich für die NF- κ B-Inhibition durch STEC/EPEC

Seit nunmehr mehreren Jahren wird an der Entschlüsselung der Infektionsmechanismen enteropathogener *Escherichia coli* geforscht. Neben diesen Mechanismen, die vornehmlich in den eukaryontischen Wirtszellen untersucht werden, liegt der zweite Forschungsschwerpunkt in der Identifizierung des dafür verantwortlich zu machenden prokaryontischen Faktors.

Grundvoraussetzungen für eine Translokation bakterieller Proteine extrazellulärer Bakterien in das Zytoplasma der eukaryontischen Wirtszellen ist die Adhärenz dieser Pathogene mit anschließender Ausbildung eines Typ-III-Sekretions-Systems. Dies ermöglicht den Keimen sowohl Translokatoren als auch Effektoren in die Wirtszelle zu übertragen. Alle Proteine, die Teil dieses Sekretions-System sind, werden bei STEC/EHEC (und auch EPEC) von einer Pathogenitätsinsel, dem "Locus of enterocyte effacement" (LEE), kodiert (vgl. Einleitung 1.3.2). Ursprünglich nahm man an, dass neben diesen Proteinen mit Translokations-Funktion auch die Effektorproteine, welche für die NF- κ B-Suppression verantwortlich sind, auf dieser Pathogenitätsinsel liegen. Die bisherigen eigenen Untersuchungen und die zu diesem Thema publizierten Ergebnisse ließen die

Vermutung zu, dass EspB dieses Effektorprotein ist, da ihm eine gut dokumentierte duale Funktion als Effektor und Translokator zugeschrieben wird. Und in der Tat ist die Suppression der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität sowohl in HeLa-Zellen als auch in Makrophagen zumindest EspB-abhängig (vgl. 4.2). So konnte Hauf *et al.* zeigen, dass eine EspB-Komplementante (STEC 413/89-1 $\Delta espB$ + pBAD::*espB*) im Gegensatz zur EspB-Deletionsmutante wieder die Fähigkeit aufwies, NF- κ B zu supprimieren [100]. Bislang wurden, neben EspB, noch fünf weitere LEE-kodierte Effektorproteine identifiziert: EspE/Tir, EspF, EspG, EspH und Map. Weiterhin wurde von Olivier Marchès im Jahr 2003 Cif (Cycle inhibiting factor) als erstes nicht durch den LEE kodiertes, jedoch durch das Typ-III-Sekretions-System transloziertes, Effektorprotein beschrieben [118]. Nach seiner eigenen Aussage und aufgrund der im gleichen Jahr publizierten Arbeit von Xuanlin Tu [119] ist die Existenz weiterer LEE-kodierter Effektorproteine mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Hauf konstruierte von allen oben genannten (mit Ausnahme von Cif) Effektorproteinen Deletionsmutanten und untersuchte diese in Infektionsassays auf ihre Fähigkeit die NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität in Epithelzellen zu supprimieren. Alle Deletionsmutanten bewirkten eine vollständige Hemmung der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität (persönliche Korrespondenz). So belegen auch diese Untersuchungen eindeutig, dass keines der oben genannten Effektorproteine für die STEC-vermittelte NF- κ B-Inhibition verantwortlich ist.

Selbst wenn irgendwann bewiesen werden kann, dass EspB eines der gesuchten supprimierenden Effektorproteine ist, scheint es dennoch äußerst unwahrscheinlich, dass das zweite postulierte Effektorprotein auch durch die LEE-Region kodiert wird. Es ist durchaus denkbar, dass beide gesuchten Faktoren zwar das LEE-kodierte Typ-III-Sekretions-System zur Translokation in das Wirtszell-Zytoplasma benötigen, aber selbst von Genen außerhalb der LEE-Region, also dem restlichen STEC/EHEC- bzw. EPEC-Genom, kodiert werden.

Die von mir durchgeführten Untersuchungen mit den beiden Konstrukten, die von der Gruppe um James B. Kaper erzeugt wurden [93, 120], sollten diese These überprüfen (vgl. 4.6). Der Stamm *E. coli* HB101 (pMAR7/pCVD462) kann A/E-Läsionen hervorrufen, wohingegen der Stamm *E. coli* DH5 α (pMAR7) dies nicht vermag [120]. Es zeigte sich eindeutig, dass die beiden Cosmid-tragenden (apathogenen) *E. coli*-Stämme *E. coli* HB101 (pMAR7/pCVD462) und *E. coli* DH5 α (pMAR7) nicht in der Lage sind, NF- κ B nach 6-stündiger Infektionsdauer zu supprimieren. Außerdem konnte die TNF- α -Behandlung nach der 6-stündigen Infektionsdauer die NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität weiter erhöhen. Das

heißt, dass die in diesem Versuch verwendeten HeLa-Zellen auch nach der Infektion mit den beiden oben genannten Stämmen durch TNF- α stimulierbar sind. Diese Resultate stehen ganz im Gegensatz zu den Ergebnissen, die ich nach der Infektion mit STEC 413/89-1 WT erhalten habe.

Es fiel jedoch im EMSA auf (Abb. 4-6, vgl. Spur 7 mit Spur 5), dass der *E. coli* DH5 α (pMAR7) eine geringere NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität auslöst als der *E. coli* HB101 (pMAR7/pCVD462). Dies ist nicht zwangsläufig ein Effekt, der dem Cosmid pMAR7 zuzuschreiben ist – zumal der *E. coli* DH5 α (pMAR7) nachweislich keine A/E-Läsionen hervorrufen und kein TTSS ausbilden kann. Auch in den von Berin durchgeführten Untersuchungen zeigte der apathogene *E. coli* DH5 α im Electrophoretic Mobility Shift Assay eine eher geringe NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität [114].

Schlussendlich kann nun mit absoluter Gewissheit die alleinige Beteiligung der LEE-Region an der beobachteten NF- κ B-Suppression ausgeschlossen und der noch unbekannte entscheidende prokaryontische Faktor im übrigen STEC-Genom gesucht werden.

5.3 Auf welcher Stufe hemmt STEC 413/89-1 Wildtyp den NF- κ B-Signaltransduktionsweg in eukaryontischen Zellen?

Die durch STEC 413/89-1 Wildtyp hervorgerufene, im EMSA detektierbare NF- κ B-Suppression ist streng genommen das finale Ergebnis der Inhibierung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges. Die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors stellt somit den vorletzten entscheidenden Schritt dieses Weges dar. Der letzte Schritt ist die NF- κ B-abhängige Expression von proinflammatorischen Zielgenen, welche jedoch (IL-6- und IL-8-Expression) in STEC 413/89-1 WT infizierten HeLa-Zellen reduziert ist [100].

5.3.1 STEC 413/89-1 beeinträchtigt nicht die Genregulierung des κ B-Motivs am Gen selbst

Die Untersuchung des κ B-Motives erfolgte mit der Methodik eines NF- κ B-Reporterergen-Assays. Hierbei wurden HeLa-Zellen mit einem Luciferase-Reporterergen gekoppelten NF- κ B-Promotor transfiziert. Um später die einzelnen Ansätze miteinander vergleichen zu können, wurden die Zellen parallel dazu mit einem konstitutiv gebildeten Kontroll-

Reporter, TK-Renilla, transfiziert. Der Quotient aus den gemessenen Luciferase- und Renilla-Werten ergab dann einen Wert, der die Relativen Licht Einheiten (RLU, Relative Light Units) darstellte.

Zu Beginn der Untersuchungen mit diesem System wurden die transfizierten HeLa-Zellen mit STEC 413/89-1 Wildtyp und STEC 413/89-1 *ΔespB* für 1.5 und 6 Stunden infiziert. Für den frühen Zeitpunkt (1.5 Stunden Infektionsdauer) wurden für beide Stämme Werte erwartet, die signifikant höher als die Werte transfizierter unbehandelter, nicht infizierter und geringer als die Werte transfizierter TNF- α stimulierter, nicht infizierter Kontrollzellen waren (vgl. 4.7, Abb. 4-7 Säule 1 und 2 mit 3 und 5). Für den späten Zeitpunkt (6 Stunden Infektionsdauer) wurden für STEC 413/89-1 WT niedrige und für STEC 413/89-1 *ΔespB* in etwa so hohe Werte wie zum frühen Infektionszeitpunkt erwartet (vgl. 4.7, Abb. 4-7 Säule 7 und 9). Dem war nicht so. All diese Ansätze wiesen nur geringfügig höhere Werte als die unbehandelten, nicht infizierten Kontrollzellen auf. Es stellte sich die Frage, wie das sein kann. Nun, es trafen bei diesem ersten Versuchsansatz gleich mehrere Faktoren aufeinander, die sich gegenseitig, und somit eine aussagekräftige Auswertung, ausschlossen (und in den späteren Ansätzen durch eine Umstellung der Bedingungen eliminiert werden konnten):

- 1) Der Gram negative STEC ist in Epithelzellen ein schlechter NF- κ B-Induktor (vgl. auch die Ausführungen unter 5.1.1).
- 2) Der Reporter-Gen-Assay ist für ein eher schwaches NF- κ B-Induktionssignal nicht sensitiv genug.
- 3) Es ist nur möglich, einen Anstieg von gebildeter Luciferase zu messen; der später zu erwartende Abfall (entsprechend der NF- κ B-Suppression) des Enzyms wird durch die Halbwertszeit von 3 bis 5 Stunden von der früh gebildeten Luciferase 'überdeckt'.

Es war bekannt, dass STEC 413/89-1 WT infizierte HeLa-Zellen nach 4 bis 6 Stunden nicht mehr in der Lage sind, die NF- κ B-Aktivierung durch TNF- α -Stimulation auszuführen, wohingegen die mit der *EspB*-Deletionsmutante infizierten HeLa-Zellen durch die Stimulation mit TNF- α eine noch höhere NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit hervorbringen konnten [100]. Daher wurden die transfizierten HeLa-Zellen nach der Infektion mit den beiden STEC-Stämmen zusätzlich mit TNF- α stimuliert. Dies brachte, wenn die Zellen noch fähig waren, die NF- κ B-Aktivierung vollständig auszuführen, ein genügend starkes NF- κ B-Induktionssignal. Damit wurde gleichzeitig die Hürde der Sensitivität des Reporter-Gen-Assays unter den gegebenen und einzuhaltenden

Infektionsbedingungen genommen. Es wurde ausreichend Luciferase gebildet. Die Tatsache, dass nur ein Luciferase-Anstieg, jedoch kein Abfall innerhalb der Versuchszeit detektiert werden kann, entpuppte sich letztendlich als positiv anzusehender Faktor. Die nach 1.5 bzw. 6 Stunden Infektionsdauer durchgeführte Stimulation mit TNF- α ist somit ein absolut definierter Stimulus. Die so erhaltenen Ergebnisse (vgl. 4.7, Abb. 4-7) spiegeln die Ergebnisse der EMSA-Versuche (vgl. 4.1, Abb. 4-1) wieder. Zu einem frühen Zeitpunkt in der Infektion mit STEC 413/89-1 WT und *AespB* ist sowohl der NF- κ B-Signaltransduktionsweg als auch das κ B-Motiv selbst durch diese Keime noch nicht beeinträchtigt. Obwohl die detektierten Luciferase-Mengen der nicht mit TNF- α stimulierten Zellen (Abb. 4-7 Säule 3, 5, 7 und 9) gering sind, so sind sie dennoch höher als die der unbehandelten, nicht infizierten Kontrollzellen (Abb. 4-7 Säule 1). Das bedeutet, dass das κ B-Motiv nach wie vor in der Lage ist durch ankommende NF- κ B-Dimere gebunden und transkriptionell aktiv zu werden. Demnach muss die Stufe der Inhibierung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges oberhalb des κ B-Motives liegen.

5.3.2 Der nukleare Export von NF- κ B während der Infektion mit STEC 413/891 geschieht unabhängig vom CRM1/Exportin1-Weg

Die nächst höhere Stufe im NF- κ B-Signaltransduktionsweg stellt der nukleozytoplasmatische Ortswechsel von RelA-haltigen NF- κ B-Dimeren dar. RelA kann, wegen des Vorhandenseins eines Nuclear Export Signal (NES, nukleares Exportsignal), aus dem Kern in das Zytoplasma translozieren. Normalerweise geschieht dies via CRM1/Exportin1 [66]. Leptomycin B (LMB) wurde bereits 1999 als Inhibitor von CRM1/Exportin1 beschrieben und wurde in den Untersuchungen dieses Weges verwendet [102]. Die vor den Untersuchungen aufgestellte Hypothese lautet wie folgt: Wenn Leptomycin B CRM1/Exportin1 derart inhibiert, dass kein NF- κ B mehr in das Zytoplasma zurücktransportiert werden kann, muss sich sämtliches, während der Infektion in den Kern transloziertes NF- κ B, im Kern anreichern. Seine transkriptionell aktive Form kann dann im EMSA, seine inaktive Form im Western Blot nachgewiesen werden.

So zeigte sich jedoch im EMSA eine sukzessive Abnahme von DNA-bindungsfähigem NF- κ B unter Leptomycin B-Einfluss in TNF- α stimulierten HeLa-Zellen. Je länger die Zellen der Behandlung mit LMB ausgesetzt waren, desto weniger NF- κ B konnte detektiert werden (vgl. Abb. 4-8 A Spur 2 mit Spur 4 und 6). In dem dazugehörigen Blot zeigte sich

das gleiche Bild, obwohl hier sämtliches RelA detektiert wurde – unabhängig davon, ob es nun aktiv oder inaktiv vorlag (vgl. Abb. 4-8 B Spur 2 mit Spur 4 und 6). In der frühen Phase der Infektion mit STEC 413/89-1 Wildtyp wird NF- κ B aktiviert und kann dann mit der Methodik des EMSA im Kern nachgewiesen werden (vgl. 4.1, Abb. 4-1 A und B). Unter LMB-Einfluss müsste dieses NF- κ B im Kern akkumulieren und nach 6 Stunden Infektionsdauer dort nachweisbar sein. Umso erstaunlicher war das Ergebnis in der Realität: nach 6-stündiger Infektionsdauer mit STEC 413/89-1 WT und insgesamt 7-stündiger LMB-Behandlung (1 Stunde Vorinkubation und 6 Stunden Inkubation unter der Infektion) konnte in den Kernproteinen kein aktives NF- κ B im EMSA detektiert werden (vgl. 4.8, Abb. 4-8 A Spur 9 und 10). Die RelA-Gesamtmenge, welche mittels Western Blot dargestellt wurde (vgl. 4.8, Abb. 4-8 B Spur 9 und 10) war sogar noch geringer als die von STEC infizierten sowie STEC infizierten und TNF- α stimulierten HeLa-Zellen ohne LMB-Behandlung (vgl. 4.8, Abb. 4-8 B Spur 7 und 8).

Kelly *et al.* konnten, nach Infektion mit *Bacteroides thetaiotaomicron*, einen CRM1/Exportin1-unabhängigen nukleo-zytoplasmatischen Transports von NF- κ B nachweisen [105]. Dieser CRM1/Exportin1-unabhängige nukleo-zytoplasmatische Transport von NF- κ B konnte nun von mir auch für STEC 413/89-1 infizierte HeLa-Zellen nachgewiesen werden.

5.3.3 STEC 413/89-1 Wildtyp verhindert die Phosphorylierung von I κ B- α

Die Suppression der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität muss als Resultat einer Inhibierung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges durch STEC 413/89-1 Wildtyp angesehen werden. Bei den Untersuchungen zur Verifizierung der Stufe, auf der dieser Weg gehemmt wird, konnte gezeigt werden, dass dies weder am κ B-Motiv (vgl. 4.7, 5.3.1) noch auf dem CRM1/Exportin1-Weg (vgl. 4.8, 5.3.2) geschieht.

Daher wurde als nächstes der Verlauf der Degradation des NF- κ B-Inhibitors I κ B- α während der Infektion mit STEC untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass das zytoplasmatische I κ B- α in STEC 413/89-1 Wildtyp infizierten HeLa-Zellen während der Infektion sukzessive abnimmt und nach 6 Stunden kaum mehr detektiert werden kann. Im Gegensatz dazu ist es, nach der Infektion mit der EspB-Deletionsmutante, während der gesamten Infektionszeit, und somit auch nach 6 Stunden, in annähernd gleich hohen Mengen nachweisbar (vgl. 4.9.1, Abb. 4-9.1).

Die Aufgabe von I κ B- α ist es, im Zytoplasma an NF- κ B gebunden, den Transkriptionsfaktor im Zytoplasma zurückzuhalten und somit seine Translokation in den Kern zu unterbinden. Erst durch die Phosphorylierung an seinen beiden Serin-Resten 32 und 36 kann I κ B- α durch die E3 Ligase SCF^{BT_{RC}P} polyubiquitiniert werden. Phosphoryliert und polyubiquitiniert stellt I κ B- α dann ein Substrat für das 26S Proteasom dar, durch das es proteolytisch abgebaut werden kann. Dadurch sinkt die Menge des zytoplasmatischen I κ B- α und aktives NF- κ B ist im EMSA an DNA gebunden detektierbar.

Der Vergleich der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität in Kernproteinen sowie der I κ B- α -Detektion in zytoplasmatischen Proteinen von unbehandelten, nicht infizierten und mit TNF- α stimulierten HeLa-Zellen macht diesen Ablauf deutlich (Abb. 4-9.1 A und B, Spur 1 und 2). Ist der klassische NF- κ B-Signaltransduktionsweg nicht aktiviert, wie dies in unbehandelten, nicht infizierten Zellen der Fall ist, sind hohe Mengen I κ B- α und eine basale NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität nachweisbar. Wird hingegen der NF- κ B-Signaltransduktionsweg aktiviert, z.B. durch das pleiotrope, proinflammatorische Zytokin TNF- α , so wird I κ B- α vollständig degradiert und das dadurch aktive, an sein κ B-Motiv gebundene NF- κ B, detektierbar.

Der STEC 413/89-1 ist offensichtlich alleine nicht in der Lage, die vollständige I κ B- α -Degradation herbeizuführen (vgl. Abb. 4-9.1 und Abb. 4-9.2). Vermutlich liegt das in seinem Unvermögen, die NF- κ B-Signaltransduktionskaskade über den klassischen Weg so potent wie TNF- α in Epithelzellen oder LPS in Makrophagen zu aktivieren.

Es fällt jedoch auf, dass es einen Unterschied zwischen den I κ B- α -Leveln in STEC 413/89-1 Wildtyp und STEC 413/89-1 *ΔespB* infizierten HeLa-Zellen gibt (vgl. 4-9.1 B). Um diesen Unterschied genauer darstellen zu können, wurde der ursprüngliche Versuchsansatz erweitert und die infizierten Zellen zusätzlich mit TNF- α stimuliert. Daraus versprach man sich Folgendes: Es war durch die bereits mit diesem Versuchsansatz durchgeführten Analysen auf NF- κ B im EMSA bekannt, dass das Signal, welches durch die NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität entsteht, durch TNF- α Stimulation verstärkt werden konnte und der STEC 413/89-1 Wildtyp in der Lage ist, die NF- κ B-Signaltransduktionskaskade irreversibel derart zu inhibieren, dass auch durch eine spätere Stimulation die Freisetzung und Kerntranslokation von NF- κ B nicht mehr initiiert werden kann. Demnach lag die Vermutung nahe, dass sich diese Gegebenheiten in irgendeiner Art und Weise auch auf der I κ B- α -Ebene widerspiegeln.

Erstaunlicherweise ist dies nicht der Fall. Die Untersuchungen mit diesem Versuchsansatz zeigen gleiche Verläufe der I κ B- α -Degradation sowohl in mit dem Wildtyp als auch der *ΔespB*-Mutante infizierten HeLa-Zellen bis drei Stunden Infektionsdauer einen Anstieg und bis 6 Stunden Infektionsdauer einen Abfall von I κ B- α (Abb. 4-9.2).

Auch die Detektion des phosphorylierten I κ B- α in STEC 413/89-1 Wildtyp infizierten und anschließend mit TNF- α stimulierten HeLa-Zellen erbrachte kein aussagekräftiges Resultat, da dessen Level in stimulierten sowie infizierten und stimulierten Zellen gleich hoch sind (Abb. 4-9.3).

Es ist bekannt, dass phosphoryliertes I κ B- α absolut instabil ist, da es direkt nach der Polyubiquitinierung degradiert wird. Um diese I κ B- α -Form genauer untersuchen zu können, muss es stabilisiert werden, indem es der Degradation durch das 26S Proteasom entzogen wird. Dies gelang durch den Einsatz des Proteasom-Inhibitors MG132, wodurch phosphoryliertes, polyubiquitiniertes I κ B- α nicht degradiert wird und im Zytoplasma akkumuliert.

Das mit diesem Versuchsaufbau erhaltene Ergebnis ist eindeutig: Im Verlauf der Infektion mit STEC 413/89-1 WT wird die Phosphorylierung von I κ B- α inhibiert.

Es stellt sich nun die Frage, ob das Bakterium, mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit über ein prokaryontisches Effektorprotein, direkt mit I κ B- α assoziiert oder ein übergeordnetes Protein (hierbei vornehmlich eine Kinase) des Signaltransduktionsweges derart in seiner Funktion beeinträchtigt, so dass I κ B- α nicht mehr phosphoryliert werden kann. Für die Phosphorylierung von I κ B- α ist der trimere I κ B-Kinase Komplex, bestehend aus IKK- α , IKK- β und IKK- γ /NEMO, zuständig. Dabei stellen IKK- α und IKK- β die katalytischen Untereinheiten und IKK- γ /NEMO die regulatorische Untereinheit dar. Damit IKK- α und IKK- β Kinaseaktivität erlangen, müssen sie, durch im Signaltransduktionsweg übergeordnete Kinasen, an jeweils zwei Serin-Resten phosphoryliert werden. Für IKK- α sind dies die Serin-Reste 176 und 180, für IKK- β 177 und 181 [53]. Auf dieser Stufe im NF- κ B-Signaltransduktionsweg könnte das Bakterium, durch Inhibition der Kinase-Aktivität oder der Kinasen selbst, die Phosphorylierung von I κ B- α und somit die spätere Aktivierung von NF- κ B unterbinden. Dafür müsste es jedoch zumindest die Fähigkeit aufweisen, mit den beiden katalytischen Untereinheiten oder den dem IKK-Komplex übergeordneten Kinasen gleichermaßen zu interagieren, da unterschiedliche Faktoren für die IKK-Phosphorylierung, je nachdem über welche Rezeptor-Liganden-Bindungen die Aktivierung von NF- κ B initiiert wird, verant-

wortlich sind. In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung von HeLa-Zellen und TNF- α nur der Weg über den TNF-Rezeptor 1 untersucht. Dennoch gehe ich davon aus, dass der Mechanismus der STEC-Infektion, welcher die Suppression von NF- κ B zur Folge hat, auf dieselbe Art und Weise auch in Makrophagen, und somit über die Aktivierung durch den TLR4, abläuft. Folglich müsste der vom Bakterium in seiner Funktion beeinträchtigte eukaryontische Faktor sowohl im NF- κ B-aktivierenden TNF- α /TNFR1-Signaltransduktionsweg als auch im NF- κ B-aktivierenden LPS/TLR4-Signaltransduktionsweg vorhanden sein. Als potentieller Faktor käme NIK dafür in Betracht. NIK wurde in der Vergangenheit von verschiedensten Autoren in Assoziation mit IKK- α und/oder IKK- β beschrieben [60], interagiert mit TRAF2 [60, 61] und kann durch den TAK1/TAB2/TAB1-Komplex phosphoryliert und somit aktiviert werden. Außerdem kann NIK an IKB- α direkt binden, wodurch dieses an Ser32/36 phosphoryliert wird [59]. Die Gruppe um Li Yin konnte 2001 jedoch eindeutig nachweisen, dass in NIK-defizienten Mäusen trotzdem eine volle NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit TNF- α , LPS und IL-1 erfolgt, gleich wie in NIK Wildtyp Mäusen. Demnach wird NIK nicht zur Förderung der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität im klassischen NF- κ B-Aktivierungsweg benötigt. Ebenso konnte diese Gruppe zeigen, dass NIK auf jeden Fall für die Aktivierung des alternativen (p100) Signaltransduktionsweges über den LT β -Rezeptor verantwortlich ist und somit die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B in einer Rezeptor beschränkenden Art und Weise reguliert [62]. Dennoch bleibt die Funktion von NIK in diesen Signaltransduktionswegen, unter Einbeziehung der vielen Untersuchungen dieser Kinase, kontrovers.

Als weitere, in Frage kommende Faktoren, sind die TRAF Proteine zu nennen, da sie sowohl im TNFR1- als auch im IL1R/TLR4-Weg benötigt werden (vgl. Abb. 1-8). Im Ablauf der Signaltransduktionswege befinden sie sich oberhalb von NIK bzw. IKK und unterhalb/an der Liganden/Rezeptor-Stufe. Es konnte jedoch in der Vergangenheit noch kein Pathogen gefunden werden, welches einen Signaltransduktionsweg so nah und spezifisch an Rezeptoren inhibieren kann.

Am wahrscheinlichsten erscheint die generelle Interaktion eines prokaryonten Effektors mit Kinasen, die zur Familie der MAP3-Kinasen zählen (z.B. TAK1, TAB1, TAB2, NIK und MEKK1-3), ähnlich dem Effektorprotein YopJ von *Yersinia pseudotuberculosis*, welches in der Lage ist, direkt an Mitglieder der MAPK Kinasen zu binden und somit den weiteren Ablauf des Signaltransduktionsweges zu unterbinden [107]. Diese Vorgehensweise brächte dem Pathogen den entscheidenden Vorteil, mit einem Effektor die Funktion und Aktivität mehrerer Kinasen zu inhibieren.

Die eingangs aufgestellte Frage kann mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nur teilweise beantwortet werden. Mit Sicherheit kann gesagt werden, dass die Inhibierung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges mit der resultierenden NF- κ B-Suppression durch die Infektion mit STEC 413/89-1 Wildtyp vor der Phosphorylierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B- α geschieht. Letztendlich sollen die Untersuchungen dazu zukünftig fortgesetzt werden, um den Mechanismus der STEC-induzierten NF- κ B-Suppression in Säugerzellen vollständig zu entschlüsseln.

5.4 STEC 413/89-1 induziert den Transkriptionsfaktor PPAR- β stärker als der apathogene *E. coli* K-12 MG1655

Um die Abläufe, die während der STEC-induzierten NF- κ B-Suppression in der eukaryontischen Zellen ablaufen, besser verstehen zu können, wurde die Induzierbarkeit des Peroxisome proliferator-activated receptor- β (PPAR- β) durch STEC untersucht. PPAR sind Mitglieder der Superfamilie der Liganden-induzierten Transkriptionsfaktoren, welche auch als Nuclear receptors bezeichnet werden. Ihre Liganden sind meist Hormone. Die derzeit bekannten drei Isotypen PPAR- α (NR1C1), PPAR- β / δ (NR1C2) und PPAR- γ (NR1C3) kontrollieren viele zelluläre und metabolische Prozesse. Sie bilden Heterodimere mit Retinoid-X-Receptors (RXR) und binden so an PPAR-response Elements (PPRE). Von allen drei Isotypen ist bekannt, dass sie eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Haut spielen. Während die Funktionen, Lipidhomöostase und Inflammation, von PPAR- α und PPAR- γ schon recht gut untersucht sind, bleiben die des PPAR- β noch weitestgehend ein Rätsel. Heute weiß man, dass Fettsäuren in der Lage sind, an ihn zu binden und ihn zu aktivieren. Des Weiteren ist PPAR- β am reversen Cholesterol-Transport [121], Oligodendrozyten-Reifung sowie Membranflächen-Formation involviert [122]. Es wurde festgestellt, dass TNF- α und IFN- γ über die Aktivierung der Stress-assoziierten Signaltransduktionskaskade die Expression von PPAR- β steigern können und dessen Aktivierung ein Stress-assoziiierter Event ist [123].

Die Aufmerksamkeit auf diese Transkriptionsfaktoren liegt der Veröffentlichung von Denise Kelly zu Grunde [105]. Sie konnte, interessanterweise, Komplexbildungen zwischen PPAR- γ und transkriptionell aktivem RelA, welche unabhängig durch

CRM1/Exportin1 einem nukleo-zytoplasmatischen Shuttling unterliegen, nach Infektion mit *Bacteroides thetaiotaomicron*, einem Keim mit anti-inflammatorischer Aktivität, in HeLa-Zellen nachweisen. *B. thetaiotaomicron* ist in der Lage, sowohl NF- κ B als auch PPAR- γ zu supprimieren [105].

Trotz des Einsatzes verschiedener PPAR- γ -Antikörper und hoher Proteinkonzentrationen konnte ich mit der Methodik des Western Blots weder PPAR- γ noch seinen heterodimeren Partner RXR- α nachweisen. Stattdessen gelang der Nachweis von PPAR- β . Die Ergebnisse weichen von den Resultaten Denise Kellys erheblich ab. Demnach war zu erwarten, dass, wie dies bei der NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit der Fall ist, zunächst ein Anstieg und zum Ende der Infektionszeit ein Abfall von PPAR- β zu detektieren ist. Tatsächlich konnte genau das Gegenteil nachgewiesen werden. Es dauerte bis zu zwei Stunden ehe PPAR- β in den nuklearen Proteinen im Blot sichtbar wurde (vgl. Abb. 4-10). Im Vergleich dazu ist zu diesem Zeitpunkt in STEC 413/89-1 Wildtyp infizierten P388D₁-Makrophagen keine NF- κ B-DNA-Bindungsfähigkeit mehr vorhanden (vgl. Abb. 4-1 B). Am auffälligsten ist jedoch, dass die PPAR- β -Level sowohl in STEC 413/89-1 Wildtyp als auch in mit der *AespB*-Mutante infizierten Makrophagen, unabhängig vom Zellkompartiment (Zytoplasma oder Kern), gleich sind. Und damit schied auch die, meines Erachtens, letzte plausible Erklärung für diese Ergebnisse aus. Eine Forschergruppe von der Stanford University (USA) untersuchte die Zusammenhänge zwischen PPAR- β (Synonym: PPAR- δ) und der Entstehung von arteriosklerotischen Veränderungen, die durch so genannte "foam cells" ("Schaumzellen", Lipid-geladene Makrophagen) vermittelt werden [124]. Dabei kontrolliert PPAR- β den inflammatorischen Status dieser Makrophagen. Die Deletion von PPAR- β in diesen "foam cells" lies die Verfügbarkeit von inflammatorischen Suppressoren steigen, was wiederum arteriosklerotische Veränderungen zu mehr als 50% reduzierte. Die Gruppe stellte nach ihren Untersuchungen folgenden Liganden-abhängigen transkriptionellen Signalweg auf: Bcl-6 ist ein transkriptioneller Repressor der Inflammation und an PPAR- β gebunden. Die Bindung eines Liganden an PPAR- β führt zur Freisetzung von Bcl-6. Bcl-6 kann nun antiinflammatorisch wirksam sein, indem er eine Reduzierung der Transkription von Zytokinen bewirkt. Der Ligand-PPAR- β -Komplex hat ebenfalls antiinflammatorisches Potential und kann, indem er an die PPRE in den Promotor Regionen spezifischer Zielgene bindet, ihre Expression kontrollieren. Aktivierte PPAR können aber auch unabhängig von ihrer Bindung an PRR die Expression von einigen inflammatorischen Zielgenen beschränken. Hier sei die veränderte Expression von

Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1 genannt. Die Folge ist eine verminderte Inflammation. Bcl-6 kann aber auch wieder an PPAR- β binden, was zu einer proinflammatorischen Antwort führt [125].

Die von mir durchgeführten Untersuchungen beschränkten sich jedoch lediglich auf den Nachweis einer gesteigerten Expression von PPAR- β in STEC infizierten Makrophagen, im Gegensatz zur geringeren Expression nach Infektion mit dem apathogenen *E. coli* K-12 MG1655, die aber keinen Unterschied zwischen den beiden eingesetzten pathogenen Stämmen zeigt. Dieses Ergebnis kann nun zweierlei bedeuten:

1. Die Expression von PPAR- β ist ein durch STEC verursachtes Ereignis, welches zeitverzögert zur NF- κ B-Suppression auftritt, um die Antiinflammation, die durch diese NF- κ B-Suppression angezeigt wird, zu unterstützen. Dann müsste es im Folgenden auch eine PPAR- β -Liganden-Bindung geben, da diese zur Antiinflammation führen würde.
2. Die gesteigerte PPAR- β -Expression ist kein durch STEC initiiertes Ereignis, sondern eine unter der STEC-Infektion auftretende proinflammatorische Reaktion der Zelle, welche der Infektion als solcher entgegenwirken soll. Demnach wäre davon auszugehen, dass es keine Liganden-Bindung an PPAR- β gab.

Welche der beiden Theorien nun wirklich gilt, kann an dieser Stelle nicht eindeutig gesagt werden, da die Ergebnisse nicht mehr Interpretationen zulassen. Meines Erachtens stellt die gesteigerte PPAR- β -Expression unter der Infektion mit STEC 413/89-1 eine Abwehrreaktion der Wirtszelle auf die Infektion mit einem Pathogen dar (Theorie 2).

5.5 Die STEC 413/89-1 Infektion im eukaryontischen Organismus (Balb/C-Maus) – Die Inhibierung der T-Zell-Proliferationsfähigkeit ist nach 48 Stunden Infektion manifest

Das Immunsystem besteht aus der unspezifischen (angeborenen) und der spezifischen (erworbenen) Immunität. Die volle Funktionsleistung des angeborenen Teils steht uns von Geburt an zu Verfügung. Im Laufe der Zeit, nach Kontakt mit Antigenen jedweder Art, bildet sich, in Abhängigkeit der Antigene, der spezifische Teil aus. Das immunologische Abwehrsystem besteht zudem aus einer zellulären und einer humoralen (lat. *umor*, Feuchtigkeit, das Nass, Flüssigkeit) Abwehrkomponente. Darunter versteht man Abwehr-

reaktionen, die zum einen in oder durch Zellen und zum anderen in oder durch Körperflüssigkeiten geschehen. Daher wird das Immunsystem von verschiedenen Organen und Zellen gebildet und ist über den gesamten Organismus verteilt. Beispielhaft seien das Knochenmark als Produktionsstätte der weißen Blutkörperchen, die Lymphknoten als Kontrollposten und Orte der Vernichtung von Antigenen (z.B. Bakterien) sowie Thymus, Milz, Tonsillen und der Darm als Stellen, an denen Abwehrzellen auf ihre Abwehrfunktion vorbereitet werden, genannt.

Zu den Abwehrzellen der angeborenen Immunität zählen Makrophagen, Monozyten, Granulozyten (neutrophile, eosinophile und basophile), dendritische Zellen und natürliche Killerzellen, wohingegen T- und B-Zellen (Lymphozyten) sowie Gedächtniszellen der erworbenen Immunität angehören. Der wichtigste Faktor der humoralen unspezifischen Abwehr ist, neben dem Komplementsystem, den Akute-Phase-Proteinen, antimikrobiellen Peptiden (Defensine), Lipiden und Enzymen, die große Familie der Zytokine (Interleukine). Dem gegenüber stehen die Immunglobuline (IgM, IgD, IgG, IgE und IgA), die den humoralen Anteil der spezifischen Abwehr darstellen.

Von besonderem Interesse für die Mausinfektionsversuche sind vor allem die Zytokine. Zytokine (Interleukine) sind lösliche, biologisch aktive Hormone, meistens Glykoproteine, die von Immunzellen, aber auch anderen Zellen, in kleinsten Mengen freigesetzt werden und auf andere Zellen, die sich meist in ihrer Nähe befinden, einwirken. Zusammen mit den Adhäsionsmolekülen (Ig-Superfamilie, Integrine, Selektine, Cadherine) sichern sie die Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen. Je nach Bildungsort des Zytokins werden zum Teil auch folgende Begriffe verwendet: 'Monokine' für Interleukine, die von Makrophagen/Monozyten gebildet werden, 'Lymphokine' für solche, die von Lymphozyten gebildet werden. Der Begriff 'Interleukine' wird für Zytokine verwendet, die hauptsächlich Zellinteraktionen beeinflussen. Zytokine haben meist pleiotrope Wirkung, das heißt sie entfalten mehrere gleiche oder unterschiedliche Wirkungen auf eine oder mehrere Zellarten. Bezüglich ihrer Funktion können sie wie folgt zusammengefasst werden:

- entzündungsfördernd: IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β
- entzündungshemmend: IL-10, IL-13, TGF- β
- hämatopoiesefördernd: G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-5, IL-7
- immunregulatorisch: IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IFN- γ , TGF- β
- antiinfektiös: IFN- α , - β , - γ (Viren), TNF- α (Bakterien)
- antiproliferativ: IFN- γ , TNF- α , TGF- β

Für die Diskussion der, zur Untersuchung der T-Zell-Proliferation, durchgeführten Maus-infektionsversuche sind vor allem die Funktionen der Zytokine von Bedeutung, die von Makrophagen gebildet werden und auf T-Zellen wirken:

Zytokin	Funktion	Rezeptor
IL-6	Wachstum und Differenzierung von T- und B-Zellen, Immunantwort der akuten Phase	CD126, CD _W 130
IL-7	Wachstum von Prä-B- und Prä-T-Zellen	CD _W 127
B7.1 (CD80)	Kostimulierung von T-Zell-Antworten	CD28 (Promotor) CTLA-4 (Repressor)
B7.2 (B70)	Kostimulierung von T-Zell-Antworten	CD28 CTLA-4
TNF- α	lokale Entzündungen, Endothelaktivierung	CD120a, CD120b
IL-8	chemotaktisches Molekül für neutrophile Zellen und T-Zellen	IL-8RA, IL-8RB
IL-1 α	Fieber, T-Zell-Aktivierung, Makrophagen-aktivierung	CD _W 121a
IL-1 β	Fieber, T-Zell-Aktivierung, Makrophagen-aktivierung	CD _W 121a
IL-12	aktiviert natürliche Killerzellen, induziert die Differenzierung von CD4-T-Zellen zu T _{H1} -ähnlichen Zellen, fördert IFN- γ -Produktion	

An erster Stelle der Antigen-Abwehr steht die Aktivierung von T-Zellen. Durch mehrere Stufen der Signalübertragung sowie eine meist notwendige Kostimulation wird eine differenzierte Regulation der T-Zell-Aktivierung ermöglicht. Das erste Signal ist die Stimulation der T-Zelle über den T-Zell-Rezeptor (TZR), was zum Ablauf eines Signaltransduktionsweges führt, welcher in der Transkription von IL-2, welches die Proliferation der T-Zellen fördert, endet. Erfolgt die Aktivierung nur über den TZR, wird nur wenig IL-2 produziert. Damit eine ausreichende IL-2-Synthese stattfinden kann, sind oft zusätzliche Signale im Sinne der Kostimulation, z.B. über CD28, notwendig.

Reife, CD4 exprimierende T-Zellen werden als T-Helferzellen (T_H-Zellen) bezeichnet und kooperieren mit B-Zellen. Nachdem eine antigenpräsentierende Zelle (APZ; zirkulierende

Monozyten, sessile Makrophagen im Gewebe, wanderungsfähige dendritische Zellen aus dem Knochenmark, follikulär-dendritische Zellen, B-Lymphozyten) oder ein Makrophage unspezifisch ein Antigen aufgenommen hat, wird es über den exogenen Weg prozessiert und auf MHC-Klasse-II-Molekülen (Major histocompatibility complex) präsentiert, so dass sie von T-Helferzellen erkannt werden. Diese Erkennung aktiviert die APZ, die daraufhin Interleukine produzieren, die ihrerseits wiederum die T-Zelle zur Proliferation (IL-1 vermittelt) anregen und die Sekretion weiterer Botenstoffe (IL-2, IL-4, IFN- γ , usw.) anregen. Erst eine direkte Interaktion zwischen T-Helferzelle und spezifischer, ebenfalls antigenpräsentierender B-Zelle führt wiederum zu Proliferation sowie Differenzierung und Umschalten der B-Zelle von IgM zu anderen Ig-Klassen. Diese entwickelt sich dann zu einem antikörperbildenden Plasmazellklon. Die daraufhin gebildeten Antikörper können dann spezifisch das Antigen eliminieren.

Der Grundgedanke des in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuches mit STEC 413/89-1 in der Maus mit anschließender Untersuchung der T-Zell-Proliferationsfähigkeit war, die Inhibierung des oben beschriebenen Ablaufs der T-Zell-Aktivierung durch STEC 413/89-1 Wildtyp zu zeigen. Die dazu aufgestellte Hypothese besagt, dass, wenn STEC 413/89-1 die Makrophagenfunktion, und wahrscheinlich auch die Funktion anderer antigenpräsentierender Zellen, vollständig inhibiert, sowohl die T-Zell-Aktivierung als auch die Interaktionen zwischen T-Helferzellen und B-Zellen nicht stattfinden können. Dies würde direkt eine Unterdrückung der unspezifischen und indirekt eine Unterdrückung der spezifischen Immunantwort zur Folge haben, was letztendlich die Funktion des gesamten Immunsystems beeinträchtigt.

Vergleicht man nun das unter 4.11 beschriebene Allgemeinverhalten, das die nicht infizierte Kontrollmaus, die STEC 413/89-1 Wildtyp infizierten Mäuse und die STEC 413/89-1 *ΔespB* infizierten Mäuse zeigten, miteinander, so scheint sich in diesem Aspekt die aufgestellte Hypothese zu bewahrheiten. Das hochgradig gestörte Allgemeinbefinden der Wildtyp infizierten Tiere kann nicht durch das bakterielle Lipopolysaccharid hervorgerufen werden, da dann auch die *ΔespB* infizierten Tiere davon betroffen wären. Demnach wären die Auswirkungen der Infektion mit dem Wildtyp-Pathogen, einschließlich der durch ihn produzierten Stoffwechselprodukte, zusammen mit der fehlenden Reaktion des Immunsystems der Grund für die erheblichen Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens. Das kaum eingeschränkte Allgemeinbefinden der mit der *EspB*-

Deletionsmutante infizierten Tiere ist somit das Resultat einer voll funktionsfähigen Immunantwort.

Die festgestellten Größenveränderungen der Milzen (WT kleiner als NI, *ΔespB* größer als NI) bestätigen die Hypothese ebenfalls. Da die Wildtyp infizierten Mäuse keine T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation erfahren haben, der Körper sich aber wahrscheinlich mit den ihm noch zur Verfügung stehenden Zellen zur Wehr setzen wollte, sind sämtliche 'Speicher' (hier die Milz) erschöpft, was zu einer Verkleinerung des Organs durch Zellabnahme führte. Im Gegensatz dazu fand in den *ΔespB* infizierten Mäusen sowohl eine gute T-Zell-Aktivierung als auch eine gute T-Zell-Proliferation statt, was sich in der vergrößerten, zellreichen Milz widerspiegelt.

Die Auswertungen der Zellproliferationen bestätigen die Hypothese nur bedingt. Das erste durchgeführte Experiment (Abb. 4-11.3 I) bestätigt sämtliche Überlegungen zum möglichen Ablauf der inhibierten Signalweitergabe von Makrophagen auf T-Zellen. Bereits nach 24-stündiger Infektion mit dem Wildtyp zeigen diese isolierten T-Zellen keine Proliferation mehr. Die Signalweitergabe ist augenscheinlich inhibiert und hält auch bis 48 Stunden nach Infektionsbeginn an. Dagegen zeigen die mit der EspB-Deletionsmutante infizierten und isolierten T-Zellen nach 24 Stunden eine höhere Proliferationsrate als die der nicht infizierten Kontrollmaus, was als Zeichen einer guten unspezifischen als auch spezifischen Immunantwort gedeutet werden kann. Der Abfall der Proliferationsfähigkeit der T-Zellen nach 48 Stunden könnte auf eine erste Erschöpfungsphase nach heftiger initialer Immunantwort hindeuten, aber nicht durch den Erreger begründet sein. Es ist meines Erachtens entscheidend, dass überhaupt eine T-Zell-Aktivierung und somit auch T-Zell-Proliferationsfähigkeit unter der Infektion mit STEC 413/89-1 *ΔespB* nach wie vor möglich ist.

Leider fiel das Ergebnis des zweiten Versuches nicht so klar und eindeutig aus, wie das des ersten. Zwar traten hierbei die gleichen Verschlechterungen im Allgemeinbefinden der Wildtyp infizierten Mäuse und auch die Größenunterschiede der Milzen auf, die T-Zell-Proliferationsfähigkeit zeigte jedoch streckenweise stark differierende Resultate. So war die Proliferationsfähigkeit der Wildtyp infizierten Mäuse nach 24 Stunden mit 61% höher als die mit der EspB-Deletionsmutante infizierten Tiere, die diesmal nur bei 41% lag. Erst nach 48 Stunden Infektionsdauer verloren die T-Zellen der Wildtyp infizierten Mäuse ihre Fähigkeit zur Proliferation. Auch die Proliferationsfähigkeit der *ΔespB* infizierten Tiere sank nach 48 Stunden, ähnlich wie im ersten Versuch. Relativ gesehen schwächer, absolut jedoch auf ein geringeres Niveau.

Bei diesen Ergebnissen stellt sich unweigerlich die Frage, wie diese doch großen Unterschiede nach der 24-stündigen Infektionszeit in der T-Zell-Proliferationsfähigkeit auftreten können – vor allem aber, was das für die Aussagekraft der durchgeführten Versuche bedeutet. Meines Erachtens ist das 'Modell' Maus der entscheidende Faktor. Selbst wenn gleichgeschlechtliche und gleich alte Tiere derselben Maus-Inzucht-Linie in die Versuche eingesetzt werden, haben die einzelnen Tiere, wenn man das Individuum für sich betrachtet, nicht alle denselben Immunstatus. Allein die Zusammensetzung der Tiergruppe kann schon bei einigen, wenn nicht gar allen Tieren, ein Stress auslösender Faktor sein, der das Immunsystem beeinträchtigt ('Gruppenstreß'). Bereits Unverträglichkeiten zwischen einzelnen Individuen kann sich auf das (Wohl-)Befinden der ganzen Gruppe auswirken. Demnach wirkt sich eine gesetzte Infektion unterschiedlich auf den Gesamtorganismus aus (siehe verminderte T-Zell-Proliferationsfähigkeit nach 24 Stunden in STEC 413/89-1 *ΔespB* infizierten Mäusen). Die Maus ist und bleibt ein kompletter, und somit komplizierter, lebender Organismus, der sich mit vielen verschiedensten Noxen und Einflüssen, die auf ihn einwirken, auseinandersetzen und diese auch verarbeiten muss. Das 'Modell' Maus ist daher nicht standardisierbar und kann sich somit keinen strengen experimentellen Vorgaben beugen.

Trotz der differierenden Ergebnisse in den beiden Experimenten zur Untersuchung der T-Zell-Proliferationsfähigkeit in der Maus lässt sich abschließend sagen, dass durch die systemische Infektion mit STEC 413/89-1 Wildtyp das Immunsystem geschädigt wird. Die oben genannte Hypothese scheint mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit korrekt zu sein. Die vollständige Inhibierung der T-Zell-Proliferationsfähigkeit in STEC Wildtyp infizierten Mäusen ist nach 48 Stunden Infektionsdauer manifest.

5.6 Ausblick

Das angestrebte Ziel dieser Arbeit, die Entschlüsselung des molekularen Mechanismus der NF- κ B-Supprimierung in STEC infizierten Säugerzellen, wurde nicht ganz erreicht. Dennoch sind wir einen entscheidenden Schritt in diese Richtung weitergekommen, da ich nachweisen konnte, dass die Phosphorylierung des NF- κ B Inhibitors I κ B- α nicht mehr stattfindet. Demnach muss die Stufe, auf der die Signaltransduktion unterbrochen wird, vor der I κ B- α -Phosphorylierung liegen. Zukünftig sollen die einzelnen Stufen "upstream" von I κ B- α dahingehend untersucht werden. Da es sich vornehmlich um Kinasen handelt,

die aktiviert werden, um die Kaskade weiterlaufen zu lassen, erscheint es am sinnvollsten, ihre Aktivierung zu überprüfen.

Als weiterer Punkt soll das prokaryontische Effektormolekül identifiziert werden. Es ist nicht gesagt, dass es sich dabei zwangsläufig um ein Protein handelt. Vielmehr kommen auch Enzyme in Betracht, die beispielsweise Kinasen in ihrer Aktivität hemmen können. Alle LEE-kodierten Effektoren wurden bereits auf ihre Fähigkeit hin untersucht, NF- κ B zu supprimieren. Leider war keiner davon dazu in der Lage. Daher sollen nun die anderen Pathogenitätsinseln (PAI) im STEC-Genom systematisch daraufhin getestet werden. Dazu muss jede einzelne PAI deletiert und im Infektionsassay analysiert werden.

Abschließend sollte noch die Interaktion von eukaryontem und prokaryontem Faktor auf molekularer Ebene dargestellt werden.

Es gibt bereits viele Bereiche in der Medizin, in denen es wichtig ist, die Immunantwort eines Individuums zu unterbinden, um ihm zu helfen, wie beispielsweise nach Organ-Transplantationen und Bypass-Operationen, bei allergischen Reaktionen oder Autoimmunerkrankheiten. In der Regel werden physikalische Maßnahmen (Bestrahlung) oder pharmakologische Wirkstoffe (sogenannte Immunsuppressiva) angewendet. Dabei bringt eine künstlich herbeigeführte systemische Unterbindung unerwünschter Immunreaktionen nicht nur Vorteile, sondern auch Nebenwirkungen mit sich. Dazu zählt man vor allem toxische Schädigungen und die generelle Unterdrückung immunologischer Reaktionen mit Schwächung der Abwehr gegen Infektionskrankheiten.

In vielen Dingen hat der Mensch bereits von der Natur gelernt. Und in dieser Thematik sollten wir uns das Prinzip der gezielten Immunsuppression, die STEC in menschlichen und tierischen Zellen *in vitro* herbeizuführen vermag, zunutze machen.

Vielleicht ist es uns in der Zukunft möglich, einen Vektor zu konstruieren, der gezielt das für die Immunsuppression verantwortliche Molekül in ausgewählte Körperzellen transportieren kann, damit es dort seine immunsuppressive Wirkung entfaltet.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 **Laemmli, U. K.**, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. **227**: 680-685.
- 2 **Garrity, G. E., Brenner, D. J., Krieg, N. R. and Staley, J. R.**, Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria, Order XIII. "Enterobacteriales", Family I. *Enterobacteriaceae*, Genus I. *Escherichia*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2005: 587-625.
- 3 **Whittam, T. S., Wolfe, M. L., Wachsmuth, I. K., Orskov, F., Orskov, I. and Wilson, R. A.**, Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun* 1993. **61**: 1619-1629.
- 4 **Nataro, J. P. and Kaper, J. B.**, Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998. **11**: 142-201.
- 5 **Nataro, J. P., Maher, K. O., Mackie, P. and Kaper, J. B.**, Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1987. **55**: 2370-2377.
- 6 **Sohel, I., Puente, J. L., Ramer, S. W., Bieber, D., Wu, C. Y. and Schoolnik, G. K.**, Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J Bacteriol* 1996. **178**: 2613-2628.
- 7 **Hales, B. A., Hart, C. A., Batt, R. M. and Saunders, J. R.**, The large plasmids found in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* constitute a related series of transfer-defective Inc F-IIA replicons. *Plasmid* 1992. **28**: 183-193.
- 8 **O'Brien, A. D., Tesh, V. L., Donohue-Rolfe, A., Jackson, M. P., Olsnes, S., Sandvig, K., Lindberg, A. A. and Keusch, G. T.**, Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992. **180**: 65-94.

- 9 **Levine, M. M.**, Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 1987. **155**: 377-389.
- 10 **Sixma, T. K., Kalk, K. H., van Zanten, B. A., Dauter, Z., Kingma, J., Witholt, B. and Hol, W. G.**, Refined structure of Escherichia coli heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *J Mol Biol* 1993. **230**: 890-918.
- 11 **Sears, C. L. and Kaper, J. B.**, Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev* 1996. **60**: 167-215.
- 12 **Crane, J. K., Wehner, M. S., Bolen, E. J., Sando, J. J., Linden, J., Guerrant, R. L. and Sears, C. L.**, Regulation of intestinal guanylate cyclase by the heat-stable enterotoxin of Escherichia coli (STa) and protein kinase C. *Infect Immun* 1992. **60**: 5004-5012.
- 13 **Gaastra, W. and Svennerholm, A. M.**, Colonization factors of human enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). *Trends Microbiol* 1996. **4**: 444-452.
- 14 **Vial, P. A., Mathewson, J. J., DuPont, H. L., Guers, L. and Levine, M. M.**, Comparison of two assay methods for patterns of adherence to HEp-2 cells of Escherichia coli from patients with diarrhea. *J Clin Microbiol* 1990. **28**: 882-885.
- 15 **Nataro, J. P., Deng, Y., Maneval, D. R., German, A. L., Martin, W. C. and Levine, M. M.**, Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative Escherichia coli mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun* 1992. **60**: 2297-2304.
- 16 **Goldberg, M. B. and Sansonetti, P. J.**, Shigella subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. *Infect Immun* 1993. **61**: 4941-4946.
- 17 **Sansonetti, P. J.**, Molecular and cellular biology of Shigella flexneri invasiveness: from cell assay systems to shigellosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992. **180**: 1-19.

- 18 **Sasakawa, C., Buysse, J. M. and Watanabe, H.,** The large virulence plasmid of *Shigella*. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992. **180**: 21-44.
- 19 **Hale, T. L., Oaks, E. V. and Formal, S. B.,** Identification and antigenic characterization of virulence-associated, plasmid-coded proteins of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1985. **50**: 620-629.
- 20 **Frankel, G., Phillips, A. D., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J. B. and Knutton, S.,** Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* 1998. **30**: 911-921.
- 21 **Jerse, A. E., Yu, J., Tall, B. D. and Kaper, J. B.,** A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990. **87**: 7839-7843.
- 22 **Knutton, S., Baldini, M. M., Kaper, J. B. and McNeish, A. S.,** Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Infect Immun* 1987. **55**: 78-85.
- 23 **Moon, H. W., Whipp, S. C., Argenzio, R. A., Levine, M. M. and Giannella, R. A.,** Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* 1983. **41**: 1340-1351.
- 24 **Donnenberg, M. S., Tzipori, S., McKee, M. L., O'Brien, A. D., Alroy, J. and Kaper, J. B.,** The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J Clin Invest* 1993. **92**: 1418-1424.
- 25 **Tzipori, S., Gunzer, F., Donnenberg, M. S., de Montigny, L., Kaper, J. B. and Donohue-Rolfe, A.,** The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 1995. **63**: 3621-3627.

- 26 **Donnenberg, M. S., Tacket, C. O., James, S. P., Losonsky, G., Nataro, J. P., Wasserman, S. S., Kaper, J. B. and Levine, M. M.,** Role of the eaeA gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J Clin Invest* 1993. **92**: 1412-1417.
- 27 **Wieler, L. H., Tigges, M., Ebel, F., Schäferkordt, s., Steinruck, H., Djafari, S., Schlapp, T., Baljer, G. and Chakraborty, T.,** Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* (SLTEC) is encoded by the EHEC-hemolysin gene. *Vet Microbiol* 1996. **52**: 153-164.
- 28 **Paton, J. C. and Paton, A. W.,** Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 1998. **11**: 450-479.
- 29 **McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Sonnenberg, M. S. and Kaper, J. B.,** A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995. **92**: 1664-1668.
- 30 **Sperandio, V., Kaper, J. B., Bortolini, M. R., Neves, B. C., Keller, R. and Trabulsi, L. R.,** Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. *FEMS Microbiol Lett* 1998. **164**: 133-139.
- 31 **Albert, M. J., Faruque, S. M., Ansaruzzaman, M., Islam, M. M., Haider, K., Alam, K., Kabir, I. and Robins-Browne, R.,** Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*. *J Med Microbiol* 1992. **37**: 310-314.
- 32 **Deng, W., Li, Y., Vallance, B. A. and Finlay, B. B.,** Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. *Infect Immun* 2001. **69**: 6323-6335.
- 33 **Elliott, S. J., Wainwright, L. A., McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Deng, Y. K., Lai, L. C., McNamara, B. P., Sonnenberg, M. S. and Kaper, J. B.,** The

- complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* 1998. **28**: 1-4.
- 34 **Benkel, P., Hudel, M. and Chakraborty, T.**, The localization of the LEE-region in the O26:H-Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain 413/89-1. *Abstract in the Kongreß der DGHM in Jena, Germany* 53 1997.
- 35 **Kenny, B. and Jepson, M.**, Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. *Cell Microbiol* 2000. **2**: 579-590.
- 36 **Elliott, S. J., Sperandio, V., Giron, J. A., Shin, S., Mellies, J. L., Wainwright, L., Hutcheson, S. W., McDaniel, T. K. and Kaper, J. B.**, The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2000. **68**: 6115-6126.
- 37 **Boya, P., Roques, B. and Kroemer, G.**, New EMBO members' review: viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level. *Embo J* 2001. **20**: 4325-4331.
- 38 **Wainwright, L. A. and Kaper, J. B.**, EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1998. **27**: 1247-1260.
- 39 **Hueck, C. J.**, Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998. **62**: 379-433.
- 40 **O'Connell, C. B., Creasey, E. A., Knutton, S., Elliott, S., Crowther, L. J., Luo, W., Albert, M. J., Kaper, J. B., Frankel, G. and Sonnenberg, M. S.**, SepL, a protein required for enteropathogenic *Escherichia coli* type III translocation, interacts with secretion component SepD. *Mol Microbiol* 2004. **52**: 1613-1625.
- 41 **Deng, W., Li, Y., Hardwidge, P. R., Frey, E. A., Pfuetschner, R. A., Lee, S., Gruenheid, S., Strynke, N. C., Puente, J. L. and Finlay, B. B.**, Regulation of

- type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. *Infect Immun* 2005. **73**: 2135-2146.
- 42 **Deibel, C., Kramer, S., Chakraborty, T. and Ebel, F.,** EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells, where it appears as a tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein. *Mol Microbiol* 1998. **28**: 463-474.
- 43 **Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D. J., Frey, E. A. and Finlay, B. B.,** Enteropathogenic E. coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 1997. **91**: 511-520.
- 44 **Crane, J. K., McNamara, B. P. and Donnenberg, M. S.,** Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic Escherichia coli. *Cell Microbiol* 2001. **3**: 197-211.
- 45 **Elliott, S. J., Krejany, E. O., Mellies, J. L., Robins-Browne, R. M., Sasakawa, C. and Kaper, J. B.,** EspG, a novel type III system-secreted protein from enteropathogenic Escherichia coli with similarities to VirA of Shigella flexneri. *Infect Immun* 2001. **69**: 4027-4033.
- 46 **Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M. J., Nisan, I., Neves, B. C., Bain, C., Wolff, C., Dougan, G. and Frankel, G.,** A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic Escherichia coli involved in protein translocation into epithelial cells. *Embo J* 1998. **17**: 2166-2176.
- 47 **Wolff, C., Nisan, I., Hanski, E., Frankel, G. and Rosenshine, I.,** Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic Escherichia coli. *Mol Microbiol* 1998. **28**: 143-155.
- 48 **Hartland, E. L., Daniell, S. J., Delahay, R. M., Neves, B. C., Wallis, T., Shaw, R. K., Hale, C., Knutton, S. and Frankel, G.,** The type III protein translocation system of enteropathogenic Escherichia coli involves EspA-EspB protein interactions. *Mol Microbiol* 2000. **35**: 1483-1492.

- 49 **Taylor, K. A., O'Connell, C. B., Luther, P. W. and Donnenberg, M. S.,** The EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is targeted to the cytoplasm of infected HeLa cells. *Infect Immun* 1998. **66**: 5501-5507.
- 50 **Taylor, K. A., Luther, P. W. and Donnenberg, M. S.,** Expression of the EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology. *Infect Immun* 1999. **67**: 120-125.
- 51 **Kodama, T., Akeda, Y., Kono, G., Takahashi, A., Imura, K., Iida, T. and Honda, T.,** The EspB protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* interacts directly with alpha-catenin. *Cell Microbiol* 2002. **4**: 213-222.
- 52 **Sen, R. and Baltimore, D.,** Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986. **46**: 705-716.
- 53 **Hayden, M. S. and Ghosh, S.,** Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004. **18**: 2195-2224.
- 54 **Beinke, S. and Ley, S. C.,** Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* 2004. **382**: 393-409.
- 55 **Ryseck, R. P., Bull, P., Takamiya, M., Bours, V., Siebenlist, U., Dobrzanski, P. and Bravo, R.,** RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 1992. **12**: 674-684.
- 56 **Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R. T., Virelizier, J. L. and Dargemont, C.,** Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* 1997. **110 (Pt 3)**: 369-378.
- 57 **Ghosh, S. and Karin, M.,** Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002. **109 Suppl**: S81-96.
- 58 **Woronicz, J. D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M. and Goeddel, D. V.,** IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science* 1997. **278**: 866-869.

- 59 **Regnier, C. H., Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z. and Rothe, M.,** Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 1997. **90**: 373-383.
- 60 **Malinin, N. L., Boldin, M. P., Kovalenko, A. V. and Wallach, D.,** MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 1997. **385**: 540-544.
- 61 **Stancovski, I. and Baltimore, D.,** NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed? *Cell* 1997. **91**: 299-302.
- 62 **Yin, L., Wu, L., Wesche, H., Arthur, C. D., White, J. M., Goeddel, D. V. and Schreiber, R. D.,** Defective lymphotoxin-beta receptor-induced NF-kappaB transcriptional activity in NIK-deficient mice. *Science* 2001. **291**: 2162-2165.
- 63 **Ducut Sigala, J. L., Bottero, V., Young, D. B., Shevchenko, A., Mercurio, F. and Verma, I. M.,** Activation of transcription factor NF-kappaB requires ELKS, an IkappaB kinase regulatory subunit. *Science* 2004. **304**: 1963-1967.
- 64 **Karin, M. and Ben-Neriah, Y.,** Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000. **18**: 621-663.
- 65 **Tam, W. F. and Sen, R.,** IkappaB family members function by different mechanisms. *J Biol Chem* 2001. **276**: 7701-7704.
- 66 **Birbach, A., Gold, P., Binder, B. R., Hofer, E., de Martin, R. and Schmid, J. A.,** Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* 2002. **277**: 10842-10851.
- 67 **Zhang, S. Q., Kovalenko, A., Cantarella, G. and Wallach, D.,** Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity* 2000. **12**: 301-311.
- 68 **Devin, A., Lin, Y., Yamaoka, S., Li, Z., Karin, M. and Liu, Z.,** The alpha and beta subunits of IkappaB kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF. *Mol Cell Biol* 2001. **21**: 3986-3994.

- 69 **Heine, H. and Lien, E.,** Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int Arch Allergy Immunol* 2003. **130**: 180-192.
- 70 **Akira, S., Takeda, K. and Kaisho, T.,** Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001. **2**: 675-680.
- 71 **Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. and Bauer, S.,** Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004. **303**: 1526-1529.
- 72 **Aderem, A. and Ulevitch, R. J.,** Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000. **406**: 782-787.
- 73 **Martin, M. U. and Wesche, H.,** Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002. **1592**: 265-280.
- 74 **Sun, L., Deng, L., Ea, C. K., Xia, Z. P. and Chen, Z. J.,** The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell* 2004. **14**: 289-301.
- 75 **Kopp, E. B. and Medzhitov, R.,** The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1999. **11**: 13-18.
- 76 **Xiao, C., Shim, J. H., Kluppel, M., Zhang, S. S., Dong, C., Flavell, R. A., Fu, X. Y., Wrana, J. L., Hogan, B. L. and Ghosh, S.,** Ecsit is required for Bmp signaling and mesoderm formation during mouse embryogenesis. *Genes Dev* 2003. **17**: 2933-2949.
- 77 **Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M. and Tschopp, J.,** RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 2004. **5**: 503-507.
- 78 **Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. and Akira, S.,** Role of

- adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003. **301**: 640-643.
- 79 **Ishikawa, H., Claudio, E., Dambach, D., Raventos-Suarez, C., Ryan, C. and Bravo, R.,** Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p)105 precursor (NF-kappaB1) but expressing p50. *J Exp Med* 1998. **187**: 985-996.
- 80 **Salmeron, A., Janzen, J., Soneji, Y., Bump, N., Kamens, J., Allen, H. and Ley, S. C.,** Direct phosphorylation of NF-kappaB1 p105 by the IkappaB kinase complex on serine 927 is essential for signal-induced p105 proteolysis. *J Biol Chem* 2001. **276**: 22215-22222.
- 81 **Lang, V., Janzen, J., Fischer, G. Z., Soneji, Y., Beinke, S., Salmeron, A., Allen, H., Hay, R. T., Ben-Neriah, Y. and Ley, S. C.,** betaTrCP-mediated proteolysis of NF-kappaB1 p105 requires phosphorylation of p105 serines 927 and 932. *Mol Cell Biol* 2003. **23**: 402-413.
- 82 **Heissmeyer, V., Krappmann, D., Hatada, E. N. and Scheidereit, C.,** Shared pathways of IkappaB kinase-induced SCF(betaTrCP)-mediated ubiquitination and degradation for the NF-kappaB precursor p105 and IkappaBalpha. *Mol Cell Biol* 2001. **21**: 1024-1035.
- 83 **Beinke, S., Belich, M. P. and Ley, S. C.,** The death domain of NF-kappa B1 p105 is essential for signal-induced p105 proteolysis. *J Biol Chem* 2002. **277**: 24162-24168.
- 84 **Heissmeyer, V., Krappmann, D., Wulczyn, F. G. and Scheidereit, C.,** NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes. *Embo J* 1999. **18**: 4766-4778.
- 85 **Orian, A., Schwartz, A. L., Israel, A., Whiteside, S., Kahana, C. and Ciechanover, A.,** Structural motifs involved in ubiquitin-mediated processing of the NF-kappaB precursor p105: roles of the glycine-rich region and a downstream ubiquitination domain. *Mol Cell Biol* 1999. **19**: 3664-3673.

- 86 **Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C. and Karin, M.,** Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 2001. **293**: 1495-1499.
- 87 **Dobrzanski, P., Ryseck, R. P. and Bravo, R.,** Specific inhibition of RelB/p52 transcriptional activity by the C-terminal domain of p100. *Oncogene* 1995. **10**: 1003-1007.
- 88 **Solan, N. J., Miyoshi, H., Carmona, E. M., Bren, G. D. and Paya, C. V.,** RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem* 2002. **277**: 1405-1418.
- 89 **Ling, L., Cao, Z. and Goeddel, D. V.,** NF-kappaB-inducing kinase activates IKK- α by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. **95**: 3792-3797.
- 90 **Xiao, G., Harhaj, E. W. and Sun, S. C.,** NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* 2001. **7**: 401-409.
- 91 **Fong, A., Zhang, M., Neely, J. and Sun, S. C.,** S9, a 19 S proteasome subunit interacting with ubiquitinated NF-kappaB2/p100. *J Biol Chem* 2002. **277**: 40697-40702.
- 92 **Podzadel, T.,** Molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung von drei Pathogenitätsfaktoren des Shiga-Toxin produzierenden *Escherichia coli* (STEC) Stammes 413/89-1. *Doktorarbeit* 2001. Gießen.
- 93 **McDaniel, T. K. and Kaper, J. B.,** A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* 1997. **23**: 399-407.
- 94 **Koren, H. S., Handwerger, B. S. and Wunderlich, J. R.,** Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line. *J Immunol* 1975. **114**: 894-897.

- 95 **Schreck, R., Rieber, P. and Baeuerle, P. A.,** Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J* 1991. **10:** 2247-2258.
- 96 **Natsuka, S., Akira, S., Nishio, Y., Hashimoto, S., Sugita, T., Isshiki, H. and Kishimoto, T.,** Macrophage differentiation-specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6. *Blood* 1992. **79:** 460-466.
- 97 **Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. and Roeder, R. G.,** Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 1983. **11:** 1475-1489.
- 98 **Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M. and Schaffner, W.,** Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989. **17:** 6419.
- 99 **Hauf, N.,** Untersuchungen zur Induktion spezifischer Transkriptionsfaktoren in *Listeria monocytogenes*-infizierten Makrophagen. *Diplomarbeit* 1993. Würzburg.
- 100 **Hauf, N. and Chakraborty, T.,** Suppression of NF-kappa B activation and proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Immunol* 2003. **170:** 2074-2082.
- 101 **Huang, T. T., Kudo, N., Yoshida, M. and Miyamoto, S.,** A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalpha complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000. **97:** 1014-1019.
- 102 **Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M. and Horinouchi, S.,** Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. **96:** 9112-9117.

- 103 **Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V. J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D. and Maniatis, T.,** Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1995. **9**: 1586-1597.
- 104 **Roff, M., Thompson, J., Rodriguez, M. S., Jacque, J. M., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F. and Hay, R. T.,** Role of IkappaBalpha ubiquitination in signal-induced activation of NFkappaB in vivo. *J Biol Chem* 1996. **271**: 7844-7850.
- 105 **Kelly, D., Campbell, J. I., King, T. P., Grant, G., Jansson, E. A., Coutts, A. G., Pettersson, S. and Conway, S.,** Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol* 2004. **5**: 104-112.
- 106 **Schesser, K., Spiik, A. K., Dukuzumuremyi, J. M., Neurath, M. F., Pettersson, S. and Wolf-Watz, H.,** The yopJ locus is required for Yersinia-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol Microbiol* 1998. **28**: 1067-1079.
- 107 **Orth, K., Palmer, L. E., Bao, Z. Q., Stewart, S., Rudolph, A. E., Bliska, J. B. and Dixon, J. E.,** Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector. *Science* 1999. **285**: 1920-1923.
- 108 **Ruckdeschel, K., Richter, K., Mannel, O. and Heesemann, J.,** Arginine-143 of Yersinia enterocolitica YopP crucially determines isotype-related NF-kappaB suppression and apoptosis induction in macrophages. *Infect Immun* 2001. **69**: 7652-7662.
- 109 **Neish, A. S., Gewirtz, A. T., Zeng, H., Young, A. N., Hobert, M. E., Karmali, V., Rao, A. S. and Madara, J. L.,** Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science* 2000. **289**: 1560-1563.
- 110 **Collier-Hyams, L. S., Zeng, H., Sun, J., Tomlinson, A. D., Bao, Z. Q., Chen, H., Madara, J. L., Orth, K. and Neish, A. S.,** Cutting edge: Salmonella AvrA effector

- inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway. *J Immunol* 2002. **169**: 2846-2850.
- 111 **Savkovic, S. D., Koutsouris, A. and Hecht, G.,** Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Am J Physiol* 1997. **273**: C1160-1167.
- 112 **Hecht, G., Marrero, J. A., Danilkovich, A., Matkowskyj, K. A., Savkovic, S. D., Koutsouris, A. and Benya, R. V.,** Pathogenic *Escherichia coli* increase Cl-secretion from intestinal epithelia by upregulating galanin-1 receptor expression. *J Clin Invest* 1999. **104**: 253-262.
- 113 **Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. and Aderem, A.,** The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001. **410**: 1099-1103.
- 114 **Berin, M. C., Darfeuille-Michaud, A., Egan, L. J., Miyamoto, Y. and Kagnoff, M. F.,** Role of EHEC O157:H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF-kappaB and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8. *Cell Microbiol* 2002. **4**: 635-648.
- 115 **Goldstein, D. R.,** Toll-like receptors and other links between innate and acquired alloimmunity. *Curr Opin Immunol* 2004. **16**: 538-544.
- 116 **Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J. and Madara, J. L.,** Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 2001. **167**: 1882-1885.
- 117 **Sherman, P., Soni, R. and Karmali, M.,** Attaching and effacing adherence of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* to rabbit intestinal epithelium in vivo. *Infect Immun* 1988. **56**: 756-761.
- 118 **Marches, O., Ledger, T. N., Boury, M., Ohara, M., Tu, X., Goffaux, F., Mainil, J., Rosenshine, I., Sugai, M., De Rycke, J. and Oswald, E.,** Enteropathogenic

- and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol Microbiol* 2003. **50**: 1553-1567.
- 119 **Tu, X., Nisan, I., Yona, C., Hanski, E. and Rosenshine, I.**, EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2003. **47**: 595-606.
- 120 **Elliott, S. J., Yu, J. and Kaper, J. B.**, The cloned locus of enterocyte effacement from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon *E. coli* K-12. *Infect Immun* 1999. **67**: 4260-4263.
- 121 **Oliver, W. R., Jr., Shenk, J. L., Snaith, M. R., Russell, C. S., Plunket, K. D., Bodkin, N. L., Lewis, M. C., Winegar, D. A., Sznaidman, M. L., Lambert, M. H., Xu, H. E., Sternbach, D. D., Kliewer, S. A., Hansen, B. C. and Willson, T. M.**, A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001. **98**: 5306-5311.
- 122 **Saluja, I., Granneman, J. G. and Skoff, R. P.**, PPAR delta agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture. *Glia* 2001. **33**: 191-204.
- 123 **Tan, N. S., Michalik, L., Noy, N., Yasmin, R., Pacot, C., Heim, M., Fluhmann, B., Desvergne, B. and Wahli, W.**, Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Genes Dev* 2001. **15**: 3263-3277.
- 124 **Lee, C. H., Chawla, A., Urbiztondo, N., Liao, D., Boisvert, W. A., Evans, R. M. and Curtiss, L. K.**, Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science* 2003. **302**: 453-457.
- 125 **Plutzky, J.**, Medicine. PPARs as therapeutic targets: reverse cardiology? *Science* 2003. **302**: 406-407.

7 ANHANG

7.1 Dezimale Vielfache und Teile von Einheiten

10^{12}	_____	Tera (T)	10^{-12}	_____	Piko (p)
10^9	_____	Giga (G)	10^{-9}	_____	Nano (n)
10^6	_____	Mega (M)	10^{-6}	_____	Mikro (μ)
10^3	_____	Kilo (k)	10^{-3}	_____	Milli (m)
10^2	_____	Hekto (h)	10^{-2}	_____	Zenti (c)
10^1	_____	Deka (d)	10^{-1}	_____	Dezi (d)

7.2 Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	N	Asn	Asparagin
B	Asx	Asparagin oder Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
C	Cys	Cystein	Q	Gln	Glutamin
D	Asp	Asparaginsäure	R	Arg	Arginin
E	Glu	Glutaminsäure	S	Ser	Serin
F	Phe	Phenylalanin	T	Thr	Threonin
G	Gly	Glycin	V	Val	Valin
H	His	Histidin	W	Trp	Tryptophan
I	Ile	Isoleucin	Y	Tyr	Tyrosin
K	Lys	Lysin	Z	Glx	Glutamin oder Glutaminsäure
M	Met	Methionin			

7.3 Relevante griechische Buchstaben

A	α	(a)	Alpha	Δ	δ	(d)	Delta
B	β	(b)	Beta	K	κ	(k)	Kappa
Γ	γ	(g)	Gamma	M	μ	(m)	My
E	ε	(e)	Epsilon	Σ	σ ς	(s)	Sigma

DANKSAGUNG

Im Folgenden möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die entweder direkt zum Entstehen und Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben oder mich während der letzten Jahre begleitet haben und somit indirekt an diesem Prozess beteiligt waren.

Mein Dank gilt...

... Herrn Prof. Dr. Trinad Chakraborty für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes und der Materialien. Vor allem aber dafür, dass er, trotz überfüllter Terminkalender, immer wieder Zeit für Ergebnisbesprechungen fand, die dann in äußerst fruchtbaren, anregenden, wissenschaftlichen Diskussionen ausarteten, durch die sich mancher Knoten im Kopf löste und die somit das Projekt vorantrieben.

... Frau Dr. Nadja Hauf, die mir in den ersten eineinhalb Jahren die praktischen Grundlagen eines Großteils der Methoden beibrachte und mir bei dem Einstieg in die Thematik half.

... den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie für die Bereitstellung des Luminometers.

... Frau Sylvia Krämer für die unermüdliche Herstellung des M-CSF.

... jenen, die mir die einsamen Stunden im Kühlraum bei der Proteinextraktion durch ihre lachenden Gesichter versüßten. (Es muss schon ziemlich seltsam aussehen, wenn man eingepackt wie ein Eskimo bei 30°C und strahlendem Sonnenschein im Sommer durch die Gänge des Institutes flitzt... warum hat nie jemand ein Bild davon gemacht?)

... dem gesamten Team der Mechanikwerkstatt und Herrn Zimmermann (Elektronikwerkstatt) für die schnelle und geniale Umsetzung meiner "Spezialaufträge" und der Reparaturarbeiten.

... Tanja Langefeld und Silke Machata – für die Beschaffung von Nahrungsmitteln jedweder Art, die mir an vielen Labortagen das Überleben sicherten – für das

Korrekturlesen – für allzeit offene Ohren und Arme, wenn ich das Gefühl hatte, dass gar nichts mehr geht – für die Freundschaft, die über die Arbeit hinaus geht.

Leider verstarb mein Vater kurz nachdem ich mit dieser Arbeit begann. Daher ist sie ihm gewidmet.

Ein besonders dickes und herzliches "Danke" geht an den verbliebenen Rest meiner Familie – an meine Schwester und vor allem an meine Mutter. Ihre Unterstützung in allen Belangen – während des Studiums und der Zeit der Doktorarbeit – haben mir sehr geholfen, dies zu schaffen. Obwohl sie nicht vom Fach ist, hörte sie sich immer wieder die kleinen und vor allem großen Wehwehchen, die unweigerlich mit der Zeit entstehen, geduldig an und stärkte mir unermüdlich den Rücken. Und auch, wenn ihre "Aufmunterungen" im ersten Moment nicht immer auf fruchtbaren Boden fielen, so kamen sie doch irgendwann bei mir an. Danke!

Ein letzter Dank gilt all den Menschen, die mich während der letzten Jahre im Privatleben begleitet haben. Oftmals haben sie lange nichts von mir gehört, da ich keine Zeit für sie fand. Trotzdem waren sie immer für mich da. Danke für Eure Geduld mit mir!

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name:	Krabs
Vorname:	Isabel
Geburtsdatum:	30. April 1975
Geburtsort:	Unna, Westfalen
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch

Schulische Ausbildung

08/1981 – 06/1985	Katholische Grundschule Halingen
08/1985 – 06/1994	Städtisches Walram-Gymnasium Menden
	Abschluss: Abitur

Berufliche Ausbildung

11/1994 – 09/1996	Ausbildung zur Veterinär-Medizinisch-Technischen Assistentin (VMTA) an der Lehranstalt für VMTA in Krefeld
-------------------	--

Studium

09/1996 – 03/2002	Studium der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
	Schwerpunkte des Studiums:
	• Pathologisch-anatomische und histologische Diagnostik • Mikrobiologische und Molekularbiologische Diagnostik (in Lebensmitteln tierischer Herkunft)
03/2002	Abschluss des Staatsexamens
06.05.2002	Erteilung der Approbation zur Tierärztin

Beruflicher Werdegang

04/2002 – 05/2002	Praktikum am Institut für Medizinische Mikro-biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
06/2002 – 08/2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen; Anfertigung der vorliegenden Dissertation mit dem Titel: "Untersuchungen zur Suppression der NF- κ B-Aktivierung in Shiga Toxin-produzierenden <i>Escherichia coli</i> (STEC) infizierten Säugerzellen" am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
01/2003 – 12/2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Sonderforschungsbereich 535 (Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern), Teilprojekt A6 ("Der molekulare Mechanismus der STEC-vermittelten NF- κ B-Suppression und ihre pathobiologische Bedeutung"; Projektgruppenleitung: Dr. Nadja Hauf, Prof. Dr. Trinad Chakraborty)
11.05.2006	Antragstellung auf Promotion und Einreichung der Dissertation beim Dekanat des FB Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
09/2006 – 12/2006	Arbeitsplatzsuche
Seit 01.01.2007	Amtstierärztin im Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt des Landratsamtes Sonneberg, Thüringen; Leiterin des Referats "Lebensmittelüberwachung und Fleischhygiene"
04.04.2007	Tag der Disputation

ISBN 978-3-939902-30-0



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
e-mail: Geschaeftsstelle@dvg.net · Homepage: <http://www.dvg.net>**