

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
1 Einleitung	6
1.1 Die Gattung <i>Yersinia</i>	6
1.1.1 <i>Yersinia pestis</i>	7
1.1.2 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	7
1.1.3 <i>Yersinia enterocolitica</i>	8
1.2 Virulenzfaktoren	8
1.2.1 Zelladhärenz	9
1.2.2 Eisenaufnahmesystem	9
1.2.3 Das Typ III-Sekretionssystem	9
1.2.4 Effektorproteine – <i>Yersinia</i> outer proteins (Yop)	10
1.2.4.1 YopT	11
1.2.4.2 YopH	12
1.2.4.3 YopE	12
1.2.4.4 YopO / YpkA	12
1.2.4.5 YopM	12
1.2.5 YopP / YopJ	13
1.2.5.1 Apoptose	13
1.2.5.2 Bekannte Funktionsweise von YopP	14
1.2.5.3 YopP, eine Cysteinprotease ?	14
1.2.6 Low calcium response	15
1.3 Die angeborene Immunität	15
1.3.1 Toll-like-Rezeptoren	16
1.3.1.1 TLR-vermittelte NF κ B- und MAPK-Aktivierung	17
1.3.1.2 TLR-vermittelte Interferon- β -Antwort	18
1.3.2 Makrophagen	18
1.3.3 Signale in Makrophagen bei einer bakteriellen Infektion	19
1.3.4 Signale in Makrophagen bei einer Yersinieninfektion	19
1.4 Zielsetzung	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Bakterien	21

2.1.1.1	<i>Escherichia coli</i>	21
2.1.1.2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	21
2.1.1.3	Nährmedien und Zusätze für die Bakterienanzucht	21
2.1.2	Mäuse	22
2.1.3	Zellkulturlinien	23
2.1.3.1	Nährmedien und Zusätze für die Zellkultur	23
2.1.4	Vektoren	23
2.1.5	Konstrukte	23
2.1.6	Primer	27
2.1.7	Antikörper	28
2.1.7.1	Primäre Antikörper	28
2.1.7.2	Sekundäre Antikörper	29
2.1.8	Chemikalien, Enzyme und Kits	29
2.1.8.1	Chemikalien	29
2.1.8.2	Enzyme	30
2.1.8.3	Kits	30
2.1.9	Puffer und Lösungen	31
2.1.9.1	Puffer und Lösungen zur DNA-Aufreinigung	31
2.1.9.2	Puffer und Lösungen zur Agarosegelelektrophorese	31
2.1.9.3	Puffer und Lösungen zur Transfektion	31
2.1.9.4	Puffer und Lösungen zur Zellyse	31
2.1.9.5	Puffer und Lösungen zur SDS-PAGE	32
2.1.9.6	Puffer und Lösungen zum Protein-Transfer (Western-Blot)	32
2.1.9.7	Puffer und Lösungen für chemokompetente <i>E. coli</i>	33
2.1.9.8	Puffer und Lösungen zur Zellstimulation / - inhibition	33
2.1.9.9	Puffer und Lösungen für den Dual-Luciferase-Report	33
2.1.9.10	Puffer und Lösungen für verschiedene Färbungen	34
2.1.9.11	Puffer zur rekombinanten Proteinaufreinigung	34
2.1.9.12	Puffer für den Kinase-Assay	34
2.1.10	Geräte	34
2.2	Methoden	35
2.2.1	Kultur von Zellen und Bakterien	35
2.2.1.1	Versorgung der Zellreihen	35
2.2.1.2	Vorbereitung der Zelllinien für Versuche	36

2.2.1.3	Gewinnung und Kultur von Peritonealmakrophagen	36
2.2.1.4	Kultur von Bakterien	36
2.2.2	Molekularbiologische Methoden der DNA-Isolierung	37
2.2.2.1	DNA-Isolierung von Kulturplatten	37
2.2.2.2	DNA-Isolierung aus kleinen Volumina	37
2.2.2.3	DNA-Isolierung aus großen Volumina	38
2.2.2.4	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	38
2.2.2.5	DNA-Messungen	39
2.2.3	Erstellung neuer Vektorkonstrukte	39
2.2.3.1	Polymerase-Ketten-Reaktion	39
2.2.3.2	Restriktionsverdau	40
2.2.3.3	Aufreinigung des Verdaus	40
2.2.3.4	Agarosegelelektrophorese	41
2.2.3.5	Ligation	41
2.2.3.6	Zielgerichtete Mutation vorhandener Konstrukte	41
2.2.3.7	Transformation von Bakterien	42
2.2.3.7.1	Herstellung chemokompetenter <i>Escherichia coli</i>	42
2.2.3.7.2	Transformation chemokompetenter <i>Escherichia coli</i>	42
2.2.3.8	Sequenzierung der Konstrukte	43
2.2.4	Rekombinante Proteinherstellung	43
2.2.4.1	Proteinaufreinigung	43
2.2.4.2	Proteinmessung nach Bradford	44
2.2.5	Transfektion von Zellen	44
2.2.5.1	Transfektion von J774 / RAW264	44
2.2.5.2	Transfektion von 293-Zellen	44
2.2.6	Proteinuntersuchungen	45
2.2.6.1	Zellyse	45
2.2.6.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.2.6.3	Protein-Transfer (Western-Blot)	46
2.2.6.4	Immunoblot	46
2.2.6.5	Immunfällungen	47
2.2.7	Kinase-Assay	47
2.2.8	in vitro-Dephosphorylierung	48
2.2.9	Dual-Luciferase-Report	48

2.2.9.1	Theoretischer Hintergrund des Dual-Luciferase-Reports	48
2.2.9.2	Praktische Nutzung des Dual-Luciferase-Reports	49
2.2.10	siRNA – small interfering RNA	50
2.2.10.1	Theoretischer Hintergrund der siRNA-Methode	50
2.2.10.2	Praktische Nutzung der siRNA	50
2.2.10.3	siRNA-Transfektion	50
2.2.10.4	psiStrike-Konstrukte	51
2.2.11	Zellfärbungen	51
2.2.11.1	GFP-Lokalisation	51
2.2.11.2	β -Galaktosidase-Färbung	51
2.2.11.3	Annexin- und Propidiumiodid-Färbungen	51
2.2.11.4	Antikörper-basierte Immunfluoreszenzfärbung	52
3	Ergebnisse	53
3.1	TLR-4 signalisiert Apoptose	53
3.1.1	TLR-4-Aktivierung erzeugt Apoptose in <i>Y. enterocolitica</i> -infizierten Peritonealmakrophagen	53
3.1.2	TLR-4-Aktivierung erzeugt Apoptose	54
3.1.2.1	LPS erzeugt bei Anwesenheit eines Proteasom-inhibitors über TLR-4 Apoptose von Makrophagen	54
3.1.2.2	TLR-4 führt bei Überexpression in 293-Zellen zur Apoptose	56
3.2	<i>Yersinia enterocolitica</i> aktiviert NF κ B über TLR-2 und TLR-4	56
3.2.1	Erstellung eines NF κ B-Dual-Luciferase-Assays	57
3.2.2	Untersuchung der Aktivierung der verschiedenen TLRs bei 293-Nierenepithelzellen	57
3.2.2.1	Zusammensetzung des TLR-2- und TLR-4-Komplexes	57
3.2.2.2	Untersuchung der Toll-like-Rezeptoren 1-10	58
3.2.2.2.1	Stimulationen von TLR-2 und TLR-4 durch Yersinien im Vergleich zu ihren bekannten Aktivatoren	59
3.2.2.2.2	Untersuchung der Kooperation von TLR-2 mit TLR-1 und TLR-6 bei der NF κ B-Aktivierung	60
3.2.2.3	Charakterisierung des Einflusses dominant-negativer Signalmoleküle auf die TLR-2- und TLR-4-Signalkaskade	61
3.3	Die Rolle von FADD in der TLR-4-abhängigen proapoptotischen Signalkaskade	62

3.4	Die Rolle von TRIF in der TLR-4-abhängigen proapoptotischen Signalkaskade	65
3.4.1	TRIF leitet das proapoptotische TLR-4-Signal bei der Yersinien-induzierten Apoptose weiter	65
3.4.2	TRIF überträgt das TLR-4-abhängige Apoptosesignal zu FADD	66
3.5	TRIF induziert Apoptose über RIP1	68
3.6	Während der Apoptose wird MyD88 degradiert	72
3.6.1	Identifizierung der Caspaseschnittstelle in der MyD88-Sequenz	72
3.6.2	Charakterisierung der entstehenden MyD88-Fragmente	73
3.7	YopP hemmt die Aktivität von TAK1	76
3.7.1	YopP supprimiert das NF κ B-Signal oberhalb von IKK β	76
3.7.2	YopP unterdrückt die TAK1-Phosphorylierungsaktivität	77
3.7.3	Die TAK1-Aktivität vermittelt NF κ B- und AP-1-Induktion bei Yersinien-infizierten J774-Makrophagen	79
3.7.4	YopP hemmt die Induktion von TAK1	82
3.7.5	YopP-Überexpression beeinflusst die Polyubiquitinierung von TRAF6	84
4	Diskussion	86
4.1	Funktionen der TLR-Rezeptoren bei der Yersinieninfektion	86
4.2	Die TLR-4-abhängige apoptotische Signalkaskade	87
4.3	Die TRIF-abhängige Caspasenaktivierung führt zu einer Spaltung von MyD88	89
4.4	YopP inhibiert die TAK1-Aktivität in <i>Y. enterocolitica</i> -infizierten Zellen	90
4.5	Der Einfluß von YopP auf die Ubiquitinierung von TRAF-6	91
5	Zusammenfassung	92
6	Abkürzungen	94
7	Literaturverzeichnis	96
8	Publikationen	114
9	Danksagung	115
10	Lebenslauf	116