

Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Christian Speer

**Beeinflussung der Aktivität von NF- κ B durch gram-negative Bakterien
- ein Beitrag zur Pathogenese der reaktiven Arthritis**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Sabine Greil
aus Gstadt am Chiemsee

Würzburg, April 2002

REFERENT: Professor Dr. med. Hans-Iko Huppertz

KORREFERENT: Professor Dr. Edgar Serfling

DEKAN: Professor Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Dezember 2002

Die Promovendin ist Ärztin im Praktikum

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Definition und Klinik der reaktiven Arthritis	1
1.2. Theorien über die Pathogenese der reaktiven Arthritis	2
1.3. Intrazelluläre Prozesse in infizierten Fibroblasten	3
1.3.1. Zytokine	3
1.3.2. Die Proteine NF- κ B und I κ B	4
1.4. Fragestellung	5
2. Material und Methoden	6
2.1. Zellkultur	6
2.1.1. Wachstumsbedingungen	6
2.1.2. Passagieren der Zellen	6
2.1.3. Bestimmung der Zellzahl	6
2.1.4. Einfrieren der Zellen	7
2.1.5. Auftauen der Zellen	7
2.2. Synovialzellen	8
2.3. HeLa-Zellen	8
2.4. Bakterienkultur	8
2.4.1. Konservierung von Bakterien	9
2.4.2. Kulturbedingungen	9
2.4.3. Bestimmung der Bakterienanzahl	9
2.5. Infektion der kultivierten Zellen	10
2.5.1. Vorbereitung der Zellen und Bakterien	10
2.5.2. UV-Inaktivierung der Bakterien	10
2.5.3. Herstellen des sterilen Überstandes einer Bakteriensuspension	10
2.5.4. Infektionsvorgang	11
2.6. Herstellung von Proteinextrakten	11

2.7.	Proteinbestimmung nach Bradford	12
2.8.	Immunoblot-Analyse	13
2.8.1.	Vorbereitung der Proteinextrakte	13
2.8.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	13
2.8.3.	Westernblot	15
2.8.4.	Antigen-Detektion durch "Enhanced Chemiluminescence" (Amersham)	16
2.8.5.	Regeneration von Nitrozellulosemembranen	17
2.9.	"Electro-Mobility-Shift-Assay" (EMSA)	17
2.9.1.	Supershift-Assay	20
2.9.2.	Versuchsaufbau	20
2.10.	Materialien	21
2.11.	Geräte	24
3.	Ergebnisse	25
3.1.	Aktivierung von NF- κ B in HeLa-Zellen durch bakterielle Stimuli	25
3.2.	Aktivierung von NF- κ B in Synovialzellen durch bakterielle Stimuli	29
3.2.1.	<i>Yersinia enterocolitica</i> O.3 aktiviert NF- κ B in Synovialzellen	29
3.2.2.	<i>Salmonella enteritidis</i> aktiviert NF- κ B in Synovialzellen	30
3.2.3.	<i>Escherichia coli</i> und NF- κ B in Synovialzellen	33
3.2.4.	Vergleich der NF- κ B-Aktivierung durch <i>Yersinia enterocolitica</i> O.3, <i>Salmonella enteritidis</i> und <i>Escherichia coli</i>	36
3.2.5.	Vergleich von intakten <i>Yersinia enterocolitica</i> O.3 und UV-Licht inaktivierten <i>Yersinia enterocolitica</i> O.3 in der Wirkung auf die Induktion von NF- κ B in Synovialzellen	38
3.2.6.	Vergleich von intakten <i>Yersinia enterocolitica</i> O.3 und dem Überstand von <i>Yersinia enterocolitica</i> O.3 in der Wirkung auf die Induktion von NF- κ B in Synovialzellen	41
3.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse	44
4.	Diskussion	46

5.	Zusammenfassung	55
6.	Literaturverzeichnis	56

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
B Zellen	B-Lymphozyten
ca.	circa
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute (Zählraten)
°C	Grad Celsius
d.h.	das heißt
dI:dC	desoxyInositol:desoxyCytosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGTA	Äthylen-Glycosyl-bis(β-Aminoethylether)-N'N'N'N'-Tetraessigsäure
EMSA	Electro-Mobility-Shift-Essay
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HLA	Haupthistokompatibilitätskomplex
IκB	„Inhibitor of NFκB“
LPS	Lipopolysaccharide
K	Kontrolle
kDa	Kilodalton
ml	Mililiter
mM	milimolar
mm	Milimeter
min	Minute
MOI	Multiplizität der Infektion (Multiplicity of Infection) [Anzahl der Bakterien pro Zelle bei der Infektion]
NF-κB	„Nuclear Factor of κB“
OD	optische Dichte
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
T Zellen	T-Lymphozyten
Th	T-Helferlymphozyten
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
UV	ultraviolett
V	Volt
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter

1. Einleitung

1.1. Definition und Klinik der reaktiven Arthritis

Der Terminus „reaktive Arthritis“ wurde eingeführt, um die Assoziation zwischen einer Infektion des Darmes oder des Urogenitaltraktes mit gram-negativen Darmkeimen, wie *Yersinia enterocolitica* oder anderen Keimen wie *Chlamydia trachomatis*, und einer Arthritis zu beschreiben. Grund der Definition war die Bemühung, diese Erkrankung, welche sich durch eine sterile Entzündung der Gelenke auszeichnete, von den infektiösen, eitrigen Arthritiden abzugrenzen [4]. Wenige Jahre später, kurz nachdem die Assoziation zwischen HLA B27 und der ankylosierenden Spondylitis entdeckt worden war, wurde die reaktive Arthritis mit diesem genetischen Marker in Verbindung gebracht und nun HLA B27 assoziierte reaktive Arthritis genannt [17]. Diese Benennung wird bis heute beibehalten, was sich als sinnvoll erweist, da neben den Yersinien weitere Erreger, wie Salmonellen, Campylobacter, Shigellen und Chlamydien, zur reaktiven Arthritis führen können [2]. Jedoch bleibt das Bakterium *Yersinia enterocolitica* einer der häufigsten Erreger einer reaktiven Arthritis [75].

Klinisch handelt es sich bei der reaktiven Arthritis um eine entzündliche Gelenkerkrankung, die para- bzw. postinfektiös im Rahmen einer extraartikulären bakteriellen Infektion auftritt. Manifestationen sind Oligoarthritis der unteren Extremität oder Polyarthritiden. Eine Achsenskelettbeteiligung in Form einer Sakroiliitis, Spondylitis oder Spondylarthritis ist selten. Zusätzlich sind zum Teil extraartikuläre Symptome an Haut und Augen zu finden [56]. Die Kombination von Urethritis/Enteritis mit Arthritis und Konjunktivitis/Uveitis bezeichnet man als „Reiter-Syndrom“. Die reaktive Arthritis kann mit leichten Arthralgien bis zu schwerer Polyarthritis nach einer vorangegangenen intestinalen Infektion, mit oder ohne Diarrhö, innerhalb weniger Tage bis Wochen beginnen. Die meisten Patienten zeigen keine Spätmanifestationen, doch entwickeln einzelne eine chronische Arthritis bis hin zur ankylosierenden Spondylitis [49].

1.2. Theorien über die Pathogenese der reaktiven Arthritis

Ursprünglich wurde die Krankheit als eine sterile Gelenkentzündung nach vorangegangener Infektion im Körper definiert, die an unterschiedlichen Stellen, wie Darm oder Urogenitaltrakt, stattfinden konnte, aber nicht im Gelenk zu finden war. Als reaktive Arthritis verursachende Erreger werden allgemein Yersinien, Salmonellen, Shigellen, Campylobacter und Chlamydien akzeptiert [2]. Diese unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht, haben aber auch bedeutende Gemeinsamkeiten. So zum Beispiel sind sie in der Lage, primäre Infektionen innerhalb der Mucosa herbeizuführen, besitzen als Oberflächenmerkmal Lipopolysaccharide (LPS) und sind fakultativ intrazellulär wachsende Keime, außer Chlamydien, welche obligat intrazellulär wachsende Keime sind. Die ausgelöste Krankheit ist HLA B27-assoziiert [2]. Ein neuer Erklärungsansatz zur Pathogenese besagt, dass Bakterien in Folge einer Bakteriämie in Synovialzellen eindringen und diese infizieren [74]. Die Frage nach der Existenz von lebenden Keimen im synovialen Gewebe konnte nicht geklärt werden, da Versuche, die Erreger in den befallenen Gelenken nachzuweisen, bisher außer bei Chlamydien fehlschlagen [51]. Auch wurde in Synovialflüssigkeiten, nach vorausgegangenem Antigenfund, nach DNA gesucht. Diese konnte nicht entdeckt werden [77]. Damit mußte die Vorstellung der Pathogenese der reaktiven Arthritis neu überdacht werden [31]. Weitere Forschungen zeigten, dass Wirtsfaktoren und bakterielle Produkte im Gelenk für die Entstehung der reaktiven Arthritis eine große Rolle zu spielen scheinen [34]. Als erste Entdeckung wurden vor ca. zehn Jahren Chlamydien-Antigene [66] und Lipopolysaccharide von Yersinien innerhalb Zellen der Synovialflüssigkeit gefunden [34; 30]. Vermutlich gelangen auch Yersinien oder andere Keime in der frühen Phase, d.h. in der Zeit vor arthritischen Symptomen, durch die Blutzirkulation in synoviales Gewebe und etablieren dort für einige Tage eine Infektion [32]. Es deutet aber viel darauf hin, dass die Keime durch Makrophagen, nachdem sie von diesen phagozytiert wurden, auf dem Blutweg in das Gelenk transportiert werden und nicht frei dorthin verschleppt werden. Bei Patienten mit Yersinien-induzierter reaktiver Arthritis wurden Bestandteile der Bakterien in Makrophagen und Neutrophilen gefunden, die sich in der Synovialflüssigkeit des befallenen Gelenkes befanden [34]. Im Gelenk werden die Yersinien nach Apoptose der phagozytierenden Zellen wieder frei und haben die

Möglichkeit, in Fibroblasten einzudringen [61]. Dass sie auch wirklich fähig sind, in Fibroblasten hineinzugelangen und dort zu persistieren, wurde eindeutig gezeigt [41]. Jedoch verschlechtert sich die Fähigkeit des eingedrungenen Bakteriums, sich zu vermehren, und letztendlich verschwindet es nach 4 bis 8 Wochen [39]. Seit kurzer Zeit konnte auch bakterielle DNA in Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden, allerdings gelang dies nur von Salmonellen und Chlamydien [72; 55]. Diese Beobachtungen werfen die Frage nach der Rolle der Zytokine auf, und wie die vermutlich intrazellulär ablaufenden Vorgänge des Überlebens und späteren Absterbens von Yersinien in Fibroblasten vor sich gehen.

1.3. Intrazelluläre Prozesse in infizierten Fibroblasten

1.3.1. Zytokine

Bei Patienten mit reaktiver Arthritis wurde gezeigt, dass die entzündete Synovia mit Leukozyten infiltriert ist, welche proinflammatorische Zytokine produzieren, zum Beispiel TNF- α oder Interleukin-1. Im entzündlichen Gelenk wurden viele T-Zellen gefunden, welche nur zum Teil einer spezifischen Immunantwort zuzuordnen sind [37]. Ob es sich hauptsächlich um Th1-Zellen oder auch um Th2-Zellen handelt ist noch nicht geklärt. Beobachtet wurde aber, dass sowohl Th1- als auch Th2-Zellen die Funktion von Fibroblasten modulieren können, so zum Beispiel deren Fähigkeit zur Bildung von Zytokinen oder die Expression von Adhäsionsmolekülen [65]. In experimentellen Versuchen mit Mäusen konnte eine protektive Wirkung von TNF- α , Interferon- γ , Interleukin-12 und Interleukin-18 für den infizierten Fibroblasten beobachtet werden [7; 8]. Durch die Behandlung von infizierten Synovialzellen mit unterschiedlichen Zytokinen konnte Interleukin-1, TNF- α und Interferon- γ die Wirkung zugeschrieben werden, die Bakterienkonzentration zu senken, wobei die intrazelluläre Antigenkonzentration konstant blieb. Interleukin-4 hingegen war für das Bakteriumwachstum förderlich und besaß zusätzlich die Fähigkeit, die Wirkung von TNF- α und Interferon- γ zu antagonisieren. Zytokine beeinflussen damit das Überleben von *Yersinia enterocolitica* in Synovialzellen mit unterschiedlichem Ergebnis [40]. Reguliert werden TNF- α und weitere Zytokine unter anderem durch eine Stimulierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B [6].

1.3.2. Die Proteine NF- κ B und I κ B

1986 wurde NF- κ B zum erstenmal Gegenstand der Forschung. Damals wurde der Transkriptionsfaktor in B-Zellen beschrieben [62]. Kurze Zeit später konnte gezeigt werden, dass NF- κ B auch in anderen Zellen aktiviert wird [63]. Bald darauf wurden funktionelle NF- κ B Bindungsstellen in Promotoren von vielen Genen gefunden. Typisch für das Protein ist, dass die NF- κ B Bindungsstellen als induzierbare, regulatorische Transkriptionselemente dienen, welche auf immunologische Stimuli antworten. Das Erscheinen von NF- κ B im Kern ist abhängig von der Dissoziation des zytoplasmatischen Inhibitorproteins I κ B [11]. Der Abbau des I κ B-Proteins im Zytoplasma bewirkt ein überaus schnelles Auftreten von NF- κ B im Kern. Damit können bestimmte durch NF- κ B regulierte Gene innerhalb von Minuten aktiviert werden [12; 68]. Strukturell handelt es sich bei NF- κ B um einen Transkriptionsfaktor, der sich aus Homo- und Heterodimeren zusammensetzt. Es gibt beim Säugetier fünf verschiedene NF- κ B Proteine, nämlich RelA (p65), c-Rel, RelB, NF- κ B1 (p50) und NF- κ B2 (p52) [9]. Auch vom Inhibitorprotein I κ B gibt es verschiedene Formen. Es konnten sieben unterschiedliche I κ Bs nachgewiesen werden: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , Bcl-3, p100 und p105 [73]. Durch eine Signalkaskade wird I κ B phosphoryliert und im Zytoplasma mit Hilfe des Ubiquitin-Pathways degradiert. Als Folge entsteht freies NF- κ B [13]. Diese NF- κ B-Komplexe werden in den Kern transloziert, wo sie Zielgene aktivieren. Auch I κ B ist das Produkt einer Transkription durch NF- κ B [57]. Damit vollzieht sich ein negatives Feedback, indem neues I κ B gebildet wird, sich mit NF- κ B zu einem neuen Komplex formt und somit die NF- κ B-Aktivierung herunter reguliert wird [5; 29]. Unterschiedliche extrazelluläre Mechanismen können zur Stimulierung von NF- κ B führen: zum Beispiel LPS, proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α oder Interleukin-1, virale Infektionen, UV-Strahlen, B- oder T-Zellaktivierung und weitere physiologische und pathophysiologische Stimuli [13]. Das transkriptionell aktive Heterodimer p65/p50 des Transkriptionsfaktors NF- κ B spielt eine zentrale Rolle innerhalb des immunologischen Prozesses. Es kontrolliert verschiedene Gene, die in den Entzündungsprozeß verwickelt sind [13]. So spielt es eine Schlüsselrolle in der Genexpression innerhalb rheumatischer Erkrankungen [10; 52]. In Monozyten nimmt der Transkriptionsfaktor NF- κ B an der Expression von Interleukin-1 teil [38], und in

Synovialzellen ist dieser für das Auftreten des Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1), TNF- α und Interleukin-6 verantwortlich [80; 28]. Auch reguliert NF- κ B die induzierbare Expression der Zelladhäsionsmoleküle E-selectin, VCAM-1 und ICAM-1 in vaskulären Endothelzellen [20; 21].

1.4. Fragestellung

Die reaktive Arthritis bietet ein humanes Modell der Induktion von Arthritis durch einen bekannten Infektionserreger und für eine komplexe Erreger-Wirt-Interaktion [18; 69]. In den nachfolgenden Experimenten wurde der Versuch unternommen, zur Aufklärung der Pathogenese der reaktiven Arthritis beizutragen und besonders die Rolle von NF- κ B näher zu untersuchen. Dazu sollte die Wirkung von Bakterien auf die Aktivität des NF- κ B innerhalb von Synovialzellen beobachtet werden. Da fibroblastenartige Synovialzellen mit Bakterien *in vitro* infiziert werden können, ohne dass die zelluläre Integrität oder phagozytäre Aktivität verschlechtert wäre [42; 39], scheinen Synovialzellen als Infektionsmodell für Synovia geeignet zu sein. Weil Synovialzellen den dominanten Zelltypus im Gelenkgewebe darstellen, wurden Zellkulturen von Synovialzellen benutzt, um als Modell zur Analyse der Wirkung von Bakterien auf NF- κ B bei der reaktiven Arthritis zu dienen. Dass Zytokine eine große Rolle für das Überleben von Yersinien in Synovialzellen spielen, wurde bereits eindeutig belegt [40]. Auch wurde bei einer anderen chronischen Arthritis, der rheumatoiden Arthritis, NF- κ B als Schlüssel-Transkriptionsfaktor identifiziert, welcher hinsichtlich einer Beeinflussung der Entzündung an der Genregulierung beteiligt ist [27]. Interessant ist die Frage, ob es möglich ist, Parallelen zur reaktiven Arthritis zu ziehen, bei welcher bekannte Bakterien der Auslöser sind. Es gibt Ergebnisse über NF- κ B-Aktivierung durch Bakterien in intestinalen Epithelzellen. Hierbei kommt es sowohl zu einer nukleären Bindung von NF- κ B an die DNA als auch zu einer Degradierung von I κ B im Zytoplasma nach einer Infektion durch *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* und *Yersinia enterocolitica* [25]. Zu der Frage, ob NF- κ B auch in Synovialzellen durch Bakterien aktiviert wird, soll zusätzlich der zeitliche Verlauf der Aktivierung beobachtet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Wachstumsbedingungen

Die Zellen (Synovialzellen und HeLa-Zellen) wurden in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5% Kohlendioxid in einem Zellkulturschrank (Nuair, Plymouth; Minnesota, USA) kultiviert. Dazu wurden 250ml große Zellkulturflaschen (Nunc; Roskilde, Dänemark) und 140 x 20 mm runde Zellkulturschalen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) verwendet.

2.1.2. Passagieren der Zellen

Sobald die Zellen einen konfluenten Monolayer bildeten, wurden sie zur Zellvermehrung passagiert. Sämtliches Arbeiten mit In-vitro-Zellkulturen wurde stets unter der Berücksichtigung von sterilen Bedingungen unter einer Laminar-air-Sicherheitswerkbank (ICN Biomedicals, Costa Mesa, Kalifornien, USA) durchgeführt. Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen flächendeckend mit Trypsin-Äthylendiamintetraessigsäure (ICN Biomedicals) einmal gewaschen und anschließend nach erneutem Hinzugeben von Trypsin-Äthylendiamintetraessigsäure bei 37 °C solange inkubiert (3-5 min), bis sich die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes lösten. Die Trypsin-Zellsuspension wurde mit 2- bis 3-facher Menge an Kulturmedium aufgenommen und auf neue Kulturgefäße verteilt. Daraufhin wurde in die Kulturgefäße frisches Kulturmedium gegeben.

2.1.3. Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl in den verwendeten Zellkulturbehältnissen zu bestimmen, wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin abgelöst und fünf Minuten bei 250 g in der Tischzentrifuge (Hettich, Tuttlingen) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem definierten Volumen resuspendiert. Daraufhin wurden die

Zellen in Trypanblau (Merck, Darmstadt) in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,10 mm) (Superior, Marienfeld) unter einem Invert-Lichtmikroskop (Hund, Wetzlar) bestimmt. Daraus ließ sich die ursprüngliche Zellzahl des gesamten Kulturbehältnisses berechnen.

2.1.4. Einfrieren der Zellen

Einfriermedium I	20 % fetales Kälberserum (FCS) RPMI-1640
Einfriermedium II	20 % FCS 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (Serva) RPMI-1640

Das Ablösen der Zellen wurde wie oben beschrieben mit Hilfe von Trypsin vollzogen. Die dadurch entstandene Zellsuspension wurde in eine etwa 5-fache Menge an Kulturmedium aufgenommen und bei 250 g für 10 min zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde 2-3 mal wiederholt. Nun konnte, wie oben beschrieben die Zellzahl bestimmt werden. Dem Pellet wurde nach Abnahme des Überstandes 0,25 ml gekühltes Einfriermedium I hinzupipettiert und resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Einfrierkryoröhrchen (Nunc; Roskilde, Dänemark) gegeben und auf Eis gestellt. Anschließend wurden 0,25 ml gekühltes Einfriermedium II langsam zugegeben. Ein Einfrieröhrchen mit ca. 10^6 Zellen wurde sofort bei -70°C in einer Einfrierbox mit Ethanol (Nalgene, Rochester, New York, USA) eingefroren und 16 h später bei -180°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.1.5. Auftauen von Zellen

Das aus dem flüssigen Stickstoff entnommene Einfrieröhrchen wurde in ein Wasserbad von 37°C gestellt. Sofort nach Verflüssigung der Zellsuspension wurde diese in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Dies ist rasch notwendig, da das zum Einfrieren verwendete Dimethylsulfoxid bei Wärme eine zytotoxische Wirkung entwickelt. Um

die Zellen von dem Einfriermedium zu trennen, wurden die Zellen dreimal gewaschen. Anschließend wurden die gewaschene Zellen resuspendiert, gezählt und mit Kulturmedium in Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2. Synovialzellen

Humane Synovialzellen waren aus Synovialis gewonnen worden, welche aus Sektionsmaterial entnommen und mit Hilfe von Kollagenase und Trypsin präpariert wurde [38]. Diese dienten als Grundlage für Infektionsversuche, wozu die Zellen mit RPMI-1640-Medium mit L-Glutamin (GIBCO BRL, Life Technologies, Paisley, Schottland) und hinzugefügtem 10%igen inaktivierten (30 min bei 56 °C) fetalen Kälberserums (FCS) (Biochrom, Berlin) in Kultur genommen wurden [42]. Die Synovialzellen wuchsen adhärent am Boden des Kulturgefäßes und bildeten einen einschichtigen Monolayer. Das Kulturmedium wurde alle 4 bis 6 Tage erneuert. Für die nachfolgenden Versuche wurden Zellen der Passagen 3-10 verwendet.

2.3. HeLa-Zellen

Die HeLa-Zelle ist eine Zelllinie von Epithelzellen, welche einem Cervixcarcinom entspringen (der Name stammt von der Patientin Helene Lange). Als Kulturmedium wurde DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium; GIBCO BRL, Schottland) mit zugesetztem 5 %igem L-Glutamin (ICN, Biomedicals, Kalifornien, USA) und 10%igem FCS verwendet. Den Boden des Kulturgefäßes bedeckend traten die Zellen als adhärent wachsender Monolayer auf. Da es sich hierbei um eine sehr schnell proliferierende Zellart handelte, bedurfte es einer großzügigen Passagierung alle 2 bis 3 Tage.

2.4. Bakterienkultur

Es wurden folgende Bakterien verwendet:

Yersinia enterocolitica O.3 mit Plasmid; y-108 p (Patientenisolat, siehe Referenz 42)

Yersinia enterocolitica ohne Plasmid; y-108 c (Mutante)

Salmonella enteritidis (Patientenisolat, Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Dank an Prof. Dr. Frosch, Würzburg)

Escherichia coli (apathogen, Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Dank an Prof. Dr. Frosch, Würzburg)

2.4.1. Konservierung von Bakterien

Zur kurzzeitigen Konservierung wurden 50-200 µl Bakterienflüssigkulturen auf Müller-Hinton Agarplatten ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C für 4-6 Wochen gelagert. Für eine dauerhafte Konservierung wurden Glycerin-Stammkulturen angelegt. Hierzu wurden 50 ml LB-Medium (Luria Broth, Miller; Sigma) mit einer Einzelkolonie angeimpft, bis zu einer optischen Dicht bei 600 nm (OD 600) von 1,5-2,0 inkubiert und bei 1000 g für 10 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 2 ml Medium resuspendiert, mit sterilem Glycerin (87%) (Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt und bei -20 °C gelagert.

2.4.2. Kulturbedingungen

Mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte wurden 20 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht (*Salmonella enteritidis* und *Escherichia coli* bei 37 °C, *Yersinia enterocolitica* O.3 bei Raumtemperatur) auf einem Rüttler bei 100 rpm geschüttelt (IKA-VIBRAX-VXR8, Janke & Kunkel) [80]. Diese Über-Nacht-Kulturen fanden Verwendung bei der Infektion von Synovialzellen und HeLa-Zellen.

2.4.3. Bestimmung der Bakterienanzahl

Durch Bestimmung der optischen Dichte mit Hilfe eines Photometers konnte die Anzahl der Bakterien festgestellt werden. Eine optische Dichte von 0,1 entspricht 10^8 Bakterien, wie in Vorversuchen ermittelt werden konnte. Die Nullprobe wurde mit RPMI bei 600 nm definiert. Dies wurde erreicht, indem in eine Einmalküvette (10 x 4 x 45 mm, Sarstedt) 1 ml RPMI pipettiert und gemessen wurde. Um eine Bakterienlösung von einer optischen Dichte von 0,1 herzustellen, mußte die gemessene Lösung mit RPMI

entsprechend verdünnt werden. Nach diesem Vorgang befanden sich nun in 1 ml Bakterienlösung 10^8 Bakterien

2.5. Infektion der kultivierten Zellen

2.5.1. Vorbereitung der Zellen und Bakterien

Vierundzwanzig Stunden vor Infektion wurde das Kulturmedium der Zellen mit 10 % FCS durch ein Kulturmedium mit 0,5 % FCS ersetzt. Zwei Stunden vor Infektion wurde 1 ml der Über-Nacht-Bakterienkultur (siehe 2.4.2) in 20 ml Kulturmedium ohne FCS gegeben und wiederum auf den Rüttler gestellt.

2.5.2. UV-Inaktivierung der Bakterien

Die Bakteriensuspension (RPMI-1640 und *Yersinia enterocolitica* O.3) wurde in eine geschlossene Kulturschale (Greiner) gegeben und für eine halbe Stunde unter UV-Licht gestellt (Transilluminator UVP). Zur Überprüfung einer stattgefundenen Inaktivierung wurden nach der UV-Bestrahlung aus der Bakteriensuspension der Versuch einer Kultivierung unternommen. Hierbei konnte kein Bakterienwachstum mehr festgestellt werden.

Vor der Inaktivierung durch UV-Licht wurden die Bakterien eine Stunde im Brutschrank inkubiert, um ihnen die Möglichkeit zu geben, sich zu vermehren, und damit den Bakterientiter den Versuchen mit intakten Keimen anzugleichen.

2.5.3. Herstellen des sterilen Überstandes einer Bakteriensuspension

Die Bakteriensuspension wurde bei 1000 g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe eines Einmalfilters (FP 030/3, 0,2 μm ; Schleicher und Schuell) steril filtriert.

Auch hier wurden die Bakterien eine Stunde im Brutschrank inkubiert, um den Bakterientiter anzugleichen.

2.5.4. Infektionsvorgang

Auf einer Zellschale befanden sich 5×10^8 Zellen, je nach Versuch Synovialzellen oder HeLa-Zellen. Die Multiplicity of Infection (MOI) [41] sollte in allen Versuchen 100 betragen. Somit wurden pro Platte 5 ml der Bakterienlösung aufgetragen. Zusätzlich wurden 10 ml RPMI hinzupipettiert. Anschließend wurden die infizierten Zellen eine Stunde im Brutschrank bebrütet. Nach verstrichener Inkubationszeit wurden die infizierten Zellen mit 15 ml sterilem PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH-Wert 7,4; Biochrom) zweimal gewaschen und mit 25 µg/ml Gentamycin (Gentamycin Sulfat; ICN) in 20 ml RPMI wiederum inkubiert [42]. Dies hatte zur Folge, dass nur noch intrazelluläre Bakterien überlebten. Für die Zellen, die länger als 6 Stunden inkubiert werden sollten, mußte die Gentamycinkonzentration nach 4 Stunden herabgesetzt werden. Sie wurden abermals zweimal mit sterilem PBS gewaschen und mit nur noch 4 µg/ml Gentamycin in 20 ml RPMI für die verbleibende Zeit versehen.

2.6. Herstellung von Proteinextrakten

Puffer A	10 mM	HEPES pH 7,9 (ApplChem)
	10 mM	Kaliumchlorid (KCl) (Merck)
	0,1 mM	Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Sigma)
	0,1 mM	Äthylen-Glycosyl-bis(β-Aminoethylether)- N'N'N'N'-Tetraessigsäure (EGTA) (Merck)
	1 mM	Dithiothreitol (DTT) (Merck)
	0,5 mM	Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)
	1 µg/µl	Leupeptin
Puffer C	20 mM	HEPES pH 7,9
	0,4 M	KCl
	1 mM	Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA)
	1 mM	EGTA
	1 mM	Dithiothreitol (DTT)
	1 mM	Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)

Die Zellen wurden zweimal mit 15 ml sterilem PBS gewaschen und anschließend in 5 ml PBS unter zur Hilfenahme eines Zellschabers (TPP, Hartenstein, Würzburg) vom Boden des Gefäßes gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falconröhrchen (Greiner) überführt und bei 210 g 7 min abzentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml PBS-Puffer in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gebracht. Die folgenden Vorgänge wurden gekühlt auf Eis durchgeführt.

Die Zellen wurden kurz pelletiert und mit 100 µl Puffer A gewaschen. Der Puffer A ist ein hypotoner Puffer, d.h. die Zellen, die sich in diesem Puffer befinden, schwellen an und werden labil. Die Zellpellets wurden in 150 µl Puffer A resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Zellsuspension 8 -10 mal mit Hilfe einer 1 ml Einmalspritze durch eine Kanüle (26GA3/8 0.45 x 10, Becton Dickinson) gezogen. Dadurch wurden die Zellmembranen der labilisierten Zellen aufgebrochen. Das Zelllysate wurde nun für genau 1 Minute bei 9000 g abzentrifugiert. Der Überstand war die Zytoplasmafraktion, das Pellet die Kernpräparation. Das Kernpellet wurde einmal mit 100 µl Puffer A gewaschen, wobei es komplett resuspendiert wird. Zu dem gereinigten Kernpellet wurden nun 30 µl Puffer C zugegeben, und die Kernproteine wurden bei 4 °C für 40 min unter kräftigem Schütteln extrahiert. Das Kernpellet wurde 5 min bei 22000 g gekühlt abzentrifugiert. Der Überstand (= Kernprotein) wurde abgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Parallel zur Extraktion der Kernproteine wurde die Zytoplasmafraktion durch Zentrifugation bei 29000 g, maximaler Drehzahl, gekühlt für 15 min gereinigt. Der Überstand (=gereinigte zytoplasmatische Proteine) wurde danach abgenommen und schockgefroren.

2.7. Proteinbestimmung nach Bradford

Zwei µl der Extrakte wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 800 µl H₂O und 200 µl Bradford-Reagenz (Roti-Quant, Roth) pipettiert. Nach kurzem Durchschütteln wurde der Ansatz in eine Einmalplastik-Küvette gegeben. Die Messung erfolgte in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Reagenzienleerwert mit Berücksichtigung der Standardkurve bekannter Proteinkonzentrationen.

2.8. Immunoblot-Analyse

Diese Methode stellt einen wichtigen Nachweis für Proteine und deren Molekulargewichtsbestimmung dar. Sie läßt sich in die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht, und den Transfer auf Nitrozellulose (Westernblot oder Immunoblot), die Fixierung der Proteine am Endpunkt der Wanderung, untergliedern. Weiterhin erfolgt die eigentliche optische Darstellung der Proteine durch die anschließende Immun-Detektion mit Chemilumineszenzreaktion.

2.8.1. Vorbereitung der Proteinextrakte

Laemmli-Puffer (2x)	5 ml	Lösung D (1 M Tris pH 6,8)
	0,8 g	Natriumdodecylsulfat (SDS) (Sigma)
	4,6 ml	Glycerin (87%)
	0,4 ml	Mercaptoethanol (Sigma)
	20 µl	Bromphenolblau (Roth)
	25 ml	aqua destilata (Ampuwa®; Fresenius, Bad Homburg, Deutschland)

Zwischen 5 und 12 µg Proteine wurden mit 10 µl Laemmli-Puffer (2x) in Eppendorf-Caps pipettiert.

2.8.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Makromolekülen in der Reihenfolge ihrer molaren Masse. Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird das Gel in einer radikalischen Polymerisation aus Acrylamid und n,n`-Methylenbisacrylamid hergestellt. Es handelt sich hierbei um ein zweischichtiges Gel.

Trenngel	10 ml	H ₂ O
	6,25 ml	1,5 M Tris pH 8,8 (Sigma)
	8,3 ml	Acrylamid-mix 30 % (rotiphorese® Gel 30, Roth)
	250 µl	SDS (10 %)
	250 µl	Ammoniumpersulfat (APS) (10 %)
	10 µl	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Sammelgel	6,8 ml	H ₂ O
	1,25 ml	1,5 M Tris pH 6,8
	1,7 ml	Acrylamid-mix 30 %
	100 µl	SDS (10%)
	100 µl	APS (10%)
	10 µl	TEMED (Roth)
Laufpuffer	100 ml	SDS (10%)
	144,14 g	Glycin (Roth)
	30,3 g	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)
	ad	1 Liter mit aqua destilata

Zwischen eine gereinigte Glas- und eine Aluminiumplatte, welche durch 1,0 mm dicke Abstandshalter getrennt sind, wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit 500 µl H₂O gesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach erfolgter Auspolymerisation wurde das Isobutanol abgegossen und mit H₂O gewaschen. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und ein 1,0 mm dicker Taschenkamm eingesetzt. Nachdem dieses Gel polymerisiert war, wurde das Gel in eine Gellaufkammer (Höfer-System; Model SE 500) überführt, die Kammer mit Laufpuffer aufgefüllt und die Taschen wurden gespült. Nach Beladen der Taschen mit Protein und Laemmli-Laufpuffer erfolgte die Auftrennung der Proteine elektrophoretisch bei 70 V für ca. eine Stunde.

2.8.3. Western Blot

Im Western Blot werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteingemische vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und fixiert und anschließend auf der Membran durch Antikörper markiert.

Transferpuffer	29 g Tris
	145 g Glycin
	200 ml Methanol (Roth)
	auffüllen mit aqua destilata auf 1000 ml

Schema des Blot-Aufbaus	Schaumstoffmatte	oben
	Whatman-Papier (2x) (Hartenstein, Würzburg, Deutschland)	
	Nitrozellulosemembran (Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland)	
	SDS-Polyacrylamidgel	
	Whatman-Papier (2x)	
	Schaumstoffmatte	unten

Das SDS-Gel wurde zusammen mit der vorher in Transfer-Puffer eingelegten Nitrozellulosemembran nach obigem Schema in die Blotting-Apparatur eingespannt und in die mit ca. 700 ml Transfer-Puffer gefüllte Blotting-Kammer eingesetzt (Mini-V 8.10 Apparatur, BRL). Der Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte für 3h bei 150 V.

2.8.4. Antigen-Detektion durch verstärkte Chemilumineszenz (Enhanced Chemiluminescence (Amersham, Arlington Heights, England))

Waschpuffer	10 mM Tris pH 8,0 150 mM NaCl (Fresenius) 0,5 % Tween (Roth)
Blockierpuffer	Waschpuffer mit 6 % Magermilchpulver (Saliter)
Detektionslösung	“Enhanced Chemiluminescence“ (Amersham)
Primäre Antikörper	(Polyklonale Kannichenantikörper; Santa Cruz Biotechnology, USA)
Zytoplasma	I κ B-alpha (C-21)
Nukleus	NF- κ B p65 (A)x NF- κ B p50 (NLS)x
Sekundärer Antikörper	Schwein-Anti-Kaninchen Immunglobuline (DAKO A/S, Dänemark)

Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Transfer mindestens 1 h in Blockier-Puffer geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran eine Stunde mit primärem Antikörper, der an das Zielmolekül bindet, bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer (5, 10, 20, 25 min) schloß sich eine einstündige Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper an, der gegen den Erst-Antikörper gerichtet war. Über Chemilumineszenz konnte der gebundene Zweitantikörper nachgewiesen werden, indem die viermal in Waschpuffer gewaschene Membran für eine Minute in der Detektionslösung inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran zwischen Whatman-Papier getrocknet, in Folie eingeschlagen und in einer Autoradiographie-Kassette für eine Minute bis vierundzwanzig Stunden auf Röntgenfilmen (Kodak, Biomax MR, Rochester, New York) exponiert.

2.8.5. Regeneration von Nitrozellulosemembranen

“Stripping-Puffer“	62,5 mM	Tris pH 6,7
	2 %	SDS
	0,1 M	Mercaptoethanol

Die Antikörper wurden mit “Stripping-Puffer“ innerhalb von 25 min bei 55°C in einem Wasserbad abgelöst. Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend gut mit Waschpuffer gewaschen. Die Membran konnte nun einer erneuten Detektion mit einem anderen Erst-Antikörper unterzogen werden.

2.9. “Electro-Mobility-Shift-Assay“ (EMSA)

Der EMSA wird zu den DNA-Bindungsstudien gezählt und dient der Analyse von Transkriptionsfaktoren. Hierbei werden nicht nur Konzentrationen von Proteinen im Nukleus untersucht, sondern auch die Fähigkeit dieser Proteine, spezifisch an DNA zu binden und damit die Transkription zu beeinflussen. Das Prinzip dieser Methode ist die Mischung von Nukleoplasmaextrakten mit radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotiden, welche mit Hilfe eines Polyacrylamidgeles elektrophoretisch aufgetrennt werden. Dabei führt die Bindung des Oligonukleotides zur verlangsamten Wanderung wegen des erhöhten Molekulargewichts, so dass die Bindung dargestellt werden kann.

Herstellung von radioaktiv markierten Oligonukleotiden

Für die zur Verfügung gestellten radioaktiv markierten Oligonukleotiden möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Serfling, Labor der Pathologie der Universität Würzburg, besonders bedanken. Hierbei erwähne ich auch dankend Dr. Ralf Marienfeld für seine freundliche Unterstützung und die Beantwortung vieler Fragen.

Oligonukleotide für EMSA (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland)

TCE _{dA>C}	sense	5`-AGCTTGACCAAGAGGGATTCCCTAAATC-3`
TCE _{dA>C}	antisense	5`-AGCTTGATTTAGGGGAAATCCCTCTTGGTCA-3`

Die vorliegenden Oligonukleotide leiten sich von einer Enhancersequenz des Interleukin-2 Promoters ab. Sie stellen eine Mutante dar, die durch das Ersetzen des Nukleotids Adenosin durch Zytosin eine ideale Sequenz für die Bindung von NF-κB ergeben. Diese Bindestelle interagiert mit den Rel/NFκB Transkriptionsfaktoren und eignet sich damit für Bindungsversuche im vorliegenden Experiment.

Bearbeitung der Oligonukleotide für den Gebrauch im EMSA

Die Herstellung der Oligonukleotide vollzog sich in drei Schritten. Das erste Verfahren war die Hybridisierung ("annealing") von einzelsträngigen Oligonukleotiden. Da diese einzelsträngig angeliefert wurden, mußte zuerst der Sinn-Strang mit dem Gegensinn-Strang in H₂O gelöst und hybridisiert werden. Anschließend wurden die Oligonukleotide mit ³²P radioaktiv markiert. Dazu wurden die Klenow-Polymerase, die den vier Nukleotide langen 3`-Überhang auffüllte, und die DNA-Kinase des Phagen T4, der eine Phosphatgruppe auf die nicht phosphorylierten 5`-Enden der Oligonukleotiden transferierte, verwendet. Zum Abschluß wurden die ³²P-markierten Oligonukleotide in einem Polyacrylamidgel aufgereinigt und standen für die Durchführung eines EMSAs zur Verfügung.

Gießen eines Polyacrylgels

Polyacrylamidgel	8,3 ml	Acrylamidmix Gel 30
	4 ml	Tris-Borat/EDTA Electrophorese Puffer (5x TBE)
	300 µl	APS
	50 µl	TEMED
	mit aqua destilata auf 50 ml auffüllen	

TBE-Puffer (5x)	54 g Trisbase
	27,5 g Borsäure
	20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Der Ansatz für das Gel wurde gemischt und zwischen zwei vorbereitete Glasplatten (Abstand 1 mm) gegossen. Danach wurde ein Taschenkamm von identischer Dicke in das flüssige Gel eingesetzt. Nach erfolgter Auspolymerisierung wurde das Gel in eine Gelkammer (vertikale Elektrophorese-Kammer A106.1, Roth) plaziert und mit 0,4 x TBE-Puffer aufgefüllt.

Präparation der Kernproteine

Für die EMSA-Versuche wurden Kernproteinextrakte von unterschiedlich behandelten Zellen verwendet.

Ein Ansatz sah wie folgt aus:	2-4 µg Proteinextrakt
	3x Bindungspuffer
	0,5 µl polyIdC (1 µg/µl)
	ca. 8000 Counts/Minute der markierten Oligonukleotide
	mit H ₂ O auf 20 µl auffüllen

Bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen war es wichtig, die Volumina durch Zugabe von entsprechenden Mengen Puffer C anzugleichen. Somit wurden identische Ionenkonzentrationen erreicht. Mit Hilfe des polyIdC-Oligonukleotids sollten unspezifische Protein/DNA-Bindungen reduziert werden. Die Menge der markierten Oligonukleotidprobe (TCE_{dA>C}) richtete sich nach der spezifischen Aktivität. Bei diesen Versuchen wurden 8000 cpm pro Minute pro Ansatz eingesetzt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die Ansätze auf das Gel aufgetragen.

2.9.1. Der Supershift-Assay

Bei Supershift-Assays wurde zu den Ansätzen noch jeweils 1 µl Antikörperlösung (anti-p50 und anti-p65; polyklonaler Antikörper IgG, Santa Cruz Biotechnology, USA) hinzugegeben und die Inkubationszeit auf 20 bis 30 min verlängert. Mit dem Gel wurde zunächst ein Vorlauf bei 230 V für 1-2 h durchgeführt bis eine Stromstärke von maximal 11 mA erreicht war. In einer separaten Spur wurden 10 µl Bromphenolblau zur Kontrolle des Gellaufes aufgetragen. Nach Probenauftrag erfolgte der Gellauf bei 230 V für ca. 3 h. Abschließend wurde das Gel mit Hilfe eines Vakuumtrockners (Model 583; Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA) 7 Stunden bei 80 °C getrocknet und darauf über Nacht mit einem Röntgenfilm (Kodak, Biomax MR, Rochester, New York) autoradiographisch detektiert.

2.9.2. Versuchsaufbau

Die Versuche waren stets so aufgebaut, dass sich durch Kinetiken ein zeitlicher Verlauf ablesen ließ. Die einzelnen Zeitwerte geben die jeweilige Situation post infectionem an. Ein Versuch bzw. eine Kinetik, auch wenn diese mit verschiedenen Bakterien durchgeführt wurden, bedeutet immer, dass es sich um Zellen handelt, die der gleichen Passage entstammen und zeitgleich infiziert wurden. Die Werte sind damit immer aus Parallelversuchen hervorgegangen, welche unter den gleichen Standardbedingungen durchgeführt wurden. Werte innerhalb eines Westernblots oder EMSAs können so miteinander verglichen werden.

2.10. Materialien

250 ml große Zellkulturflaschen (Nunc, Roskilde, Dänemark)

140 x 20 mm runde Zellkulturschalen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (ICN Biomedicals, Kalifornien, USA)

Trypanblau (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Serva, Heidelberg/New York)

Einfriercryoröhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark)

RPMI-1640-Medium mit L-Glutamin (GIBCO BRL, Live Technologies, Paisley, Schottland)

fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin, Deutschland)

DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium; GIBCO BRL, Paisley, Schottland)

L-Glutamin (ICN, Biomedicals, Kalifornien, USA)

Glycerin (Merck, Darmstadt, Deutschland)

LB-Medium (Luria Broth, Miller; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Einmalküvette (10 x 4 x 45 mm, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Kulturschale (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

Einmalfilter (FP 030/3, 0,2 µm; Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland)

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH-Wert 7,4; Biochrom, Berlin, Deutschland)

Gentamycin (Gentamycin sulfat; ICN Biomedicals, Kalifornien, USA)

HEPES pH 7,9 (ApplChem, Darmstadt, Deutschland)

Kaliumchlorid (KCl) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

EDTA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

EGTA (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Dithiothreitol (DTT) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) (Serva, Heidelberg/New York, USA)

Leupeptin (Roche)

Zellschaber (TPP, Hartenstein, Würzburg, Deutschland)

Falconröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Kanüle (26GA3/8 0.45 x 10) (Becton Dickinson, San Jose, Kalifornien, USA)

Bradford-Reagenz (Roti-Quant, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Natriumdodecylsulfat (SDS) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Bromphenolblau (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

aqua destilata (Ampuwa®; Fresenius, Bad Homburg, Deutschland)

Tris pH 8.8 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Acrylamid-mix 30 % (rotiphorese® Gel 30, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

SDS (10 %) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Ammoniumpersulfat (APS) (10 %) (Serva, Heidelberg/New York, USA)

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Glycin (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Isobutanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Methanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Whatman-Papier (Hartenstein, Würzburg, Deutschland)

Nitrozellulosemembran (Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland)

Detektionslösung ECL (Amersham, Arlington Heights, England)

Primäre Antikörper (polyklonales Kaninchen IgG; Santa Cruz Biotechnology, USA)

Sekundärer Antikörper (Schwein gegen Kaninchen Immunglobuline (DAKO A/S, Dänemark))

Röntgenfilmen (Kodak, Biomax MR, Rochester, New York)

Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

polydIdC (Roche)

Multicolored Protein Marker, Wide Range (NEN Boston, USA)

Oligonukleotide (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland)

2.11. Geräte

Einfrierbox (Nalgene, Rochester, New York, USA)

Zellkulturschrank (Nuair, Plymouth; Minnesota, USA)

Laminar-air-Sicherheitswerkbank (ICN Biomedicals, Costa Mesa, Kalifornien, USA)

Tischzentrifuge (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

Zentrifuge (202 MK; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,10 mm) (Superior, Marienfeld, Deutschland)

Invert-Lichtmikroskop (Hund, Wetzlar)

Schüttler IKA-VIBRAX-VXR8 (Janke & Kunkel)

Photometer (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

UV-Lampe (Transilluminator UVP).

Gellaufkammer (Höfer-System; Model SE 500)

Blotting-Kammer (Mini-V 8.10 Apparatur, BRL)

Gelkammer (vertikale Elektrophorese-Kammer A106.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Vakuumtrockner (Model 583; Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA)

Power-Supply (EPS 600; Pharmacia Biotech)

Wasserbad (Köttermann)

3. Ergebnisse

Vorbemerkung:

Bereits vorliegende Ergebnisse konnten zeigen, dass Yersinien in der Lage sind, in HeLa-Zellen einzudringen [22]. Innerhalb eines Vergleiches von Synovialzellen und HeLa-Zellen wurde festgestellt, dass der Bakterientiter nach einer Infektion in HeLa-Zellen deutlich höher ist als in Synovialzellen [40]. Die Persistenz der Bakterien ist somit in beiden Zellarten nicht identisch. Es galt nun zu untersuchen, ob auch ein Verhalten der NF- κ B-Aktivität Unterschiede erkennen läßt. HeLa-Zellen stellen eine Laborzelllinie dar und dienen in den folgenden Versuchen als Vergleichszelllinie.

3.1. Aktivierung von NF- κ B in HeLa-Zellen durch bakterielle Stimuli

Yersinia enterocolitica O.3 aktiviert NF- κ B in HeLa-Zellen

Die Zellen wurden mit dem virulenten Yersinienstamm *Yersinia enterocolitica* O.3 infiziert und nach den angegebenen Zeiten untersucht.

In der Westernblot-Analyse war zu erkennen, dass *Yersinia enterocolitica* O.3 sowohl eine Degradierung von I κ B α im Zytoplasma der HeLa-Zelle bewirkte als auch ein Auftreten von p65 im Kern zur Folge hatte. NF- κ B wurde somit durch *Yersinia enterocolitica* O.3 induziert. Die Kinetik der zytoplasmatischen Veränderungen (s. Abb.1) zeigte, dass I κ B α bereits nach 1/2 Stunde degradiert wurde und sich kontinuierlich bis zu dem gemessenen Wert von 6 Stunden wieder aufbaute.

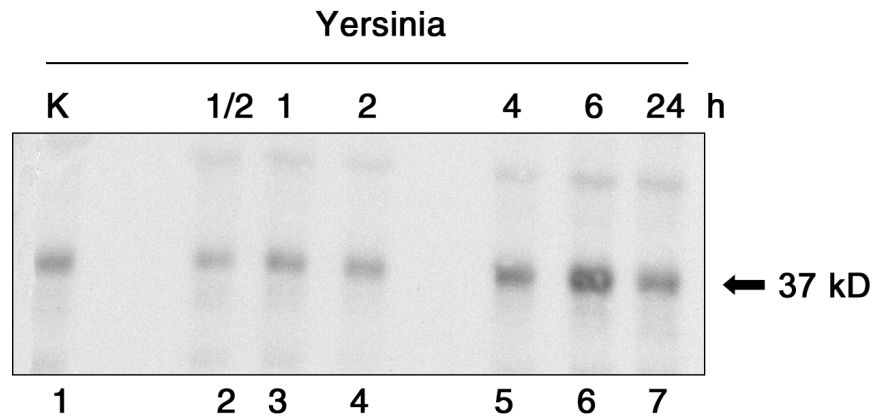


Abb. 1: Westernblot zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Degradierung von $I\kappa B\alpha$ im Zytoplasma von HeLa-Zellen durch Infektion mit *Yersinia enterocolitica* O.3. HeLa-Zellen wurden zeitgleich und mit gleicher Bakterienkonzentration infiziert. $I\kappa B\alpha$ - mit einem Molekulargewicht von etwa 37 kD - wurde durch einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper anti- $I\kappa B\alpha$ im Immunoblot detektiert. In Spur 1 wurde die Kontrolle (K), Zellen ohne Infektion, aufgetragen. Spur 2 stellt das Ergebnis nach 1/2 h, Spur 3 nach 1 h, Spur 4 nach 2 h, Spur 5 nach 4 h, Spur 6 nach 6 h und Spur 7 nach 24 h dar. $I\kappa B\alpha$ wurde nach 1/2 h degradiert, erkenntlich an der deutlich verminderten Stärke der Bande, und baute sich bis zu dem Wert von 6 h kontinuierlich wieder auf.

Im Kern zeigte die kinetische Untersuchung (s. Abb.2) ein Auftreten der Untereinheit p65 des NF- κ B ab einer 1/2 Stunde, welches ein Maximum zwischen 1/2 und 2 Stunden erreichte und von einem kontinuierlichen Abfallen der Konzentration gefolgt wurde.

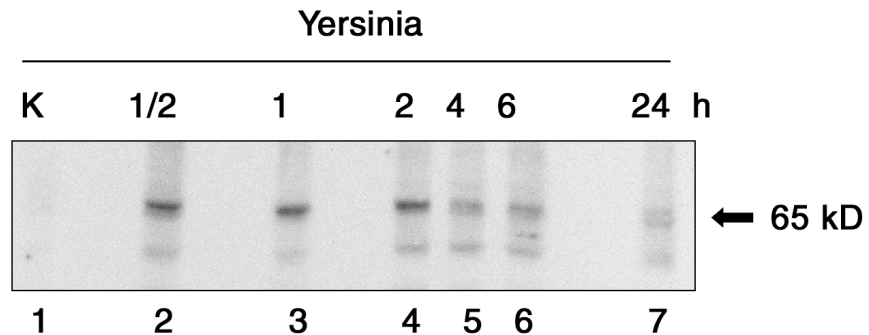


Abb. 2: Westernblot zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Aktivierung von NF- κ B im Kern von HeLa-Zellen durch Infektion mit *Yersinia enterocolitica* O.3. HeLa-Zellen wurden zeitgleich und mit gleicher Bakterienkonzentration infiziert. NF- κ B wurde mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper, der an die Untereinheit p65 bindet, detektiert. In Spur 1 wurde die Kontrolle (K), Zellen ohne Infektion, aufgetragen. Spur 2 stellt das Ergebnis nach 1/2 h, Spur 3 nach 1 h, Spur 4 nach 2 h, Spur 5 nach 4 h, Spur 6 nach 6 h und Spur 7 nach 24 h dar. Das Maximum der Aktivierung erfolgte zwischen 1/2 h und 2 h.

Im Electro-Mobility-Shift-Assay (EMSA) wurde dargestellt, dass die Untereinheiten p65 und p50 direkt an die Oligonukleotide des Kernes der HeLa-Zellen binden (s. Abb.3). Nach 1/2 Stunde ließ sich bereits ein Komplex von p65/p50 erkennen, dessen Konzentration ab dem Zweistundenwert wieder absank. Die Banden in der Höhe von p50 erschienen ebenfalls bereits nach 1/2 Stunde, wurden bis zur 6. Stunde noch deutlicher und fielen bei 24 Stunden wieder ab. Anhand der Supershifts mit gegen p65 und p50 gerichteten Antikörpern wurde eine Beteiligung dieser beiden Untereinheiten bestätigt. Dazu wurde die Probe des 1/2 Stundenwertes verwendet. Sowohl der Antikörper gegen p65 als auch der Antikörper gegen p50 schiftete fast das gesamte Signal von NF- κ B. Damit entstanden neue Banden mit höherem Molekulargewicht in der betreffenden Spur. Um die Spezifität der Bindung des Protein-Oligonukleotids darzustellen, wurden nicht markierte NF- κ B-Oligonukleotide im Überschuss zur Konkurrenz hinzugefügt. Damit wurde die Bildung eines radioaktiven DNA-Komplexes verhindert (s. Abb.3, Spur 10).

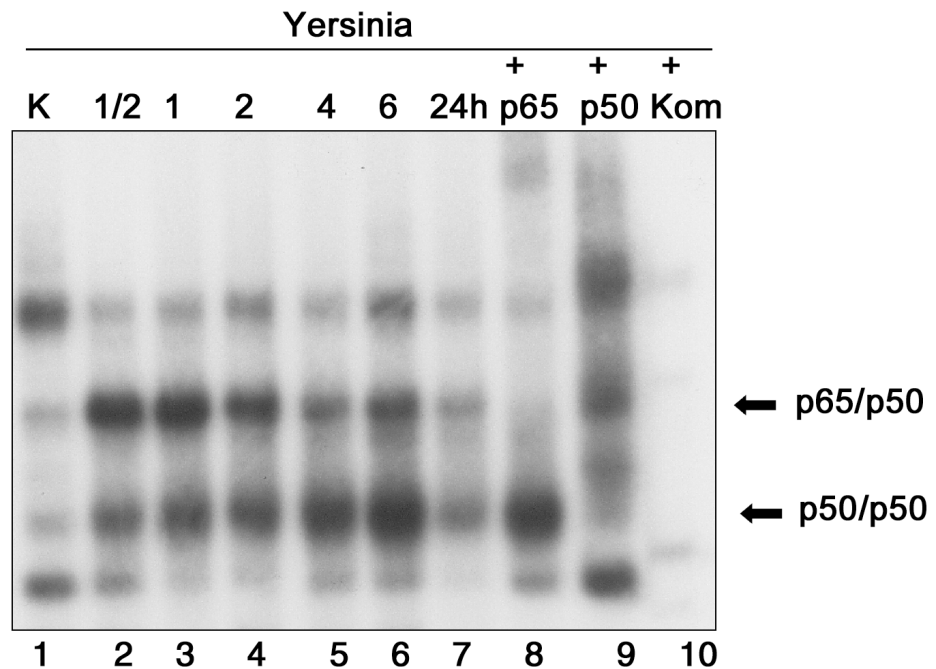


Abb. 3: Identifikation von spezifischen NF- κ B Proteinen, die im Electro-Mobility-Shift-Assay an Oligonukleotide mit der Sequenz des Interleukin-2-Promoters binden. Zeitlicher Verlauf der Aktivierung von NF- κ B durch *Yersinia enterocolitica* O.3. HeLa-Zellen wurden zeitgleich und mit gleicher Bakterienkonzentration infiziert. In Spur 1 wurde die Kontrolle (K), Zellen ohne Infektion, aufgetragen. Spur 2 stellt das Ergebnis nach 1/2 h, Spur 3 nach 1 h, Spur 4 nach 2 h, Spur 5 nach 4 h, Spur 6 nach 6 h und Spur 7 nach 24 h dar. Bei einem Wert von 1/2 h war eine Fraktion von p65/p50 zu erkennen, die ab dem Wert von 6 h wieder absank. Die Banden in der Höhe von p50/p50 erschienen nach 1/2 h, wurden bis zu 6 h deutlicher und fielen bei 24 h ab. Der Supershift wurde mit einem Antikörper gegen die Untereinheiten p65 (Spur 8) und p50 (Spur 9) durchgeführt. Fast das gesamte NF- κ B Signal wurde nach oben geschifft und stellte sich aufgrund des höheren Molekulargewichtes in einer neuen Bande dar. In Spur 10 wurde eine Konkurrenz mit nicht markierten Oligonukleotiden im Überschuss aufgetragen. Das Signal entfiel, da kein radioaktiver Oligonukleotid-Proteinkomplex entstand.

Aus diesen Versuche kann geschlossen werden, dass *Yersinia enterocolitica* O.3 in der Lage war, NF- κ B in HeLa-Zellen zu induzieren. Ein Maximum der Induktionsstärke wurde zwischen 1/2 und 1 Stunde deutlich.

3.2. Aktivierung von NF- κ B in Synovialzellen durch bakterielle Stimuli

Auf die gleiche Weise wie HeLa-Zellen wurden auch Synovialzellen mit *Yersinia enterocolitica* O.3 infiziert und auf die Aktivierung von NF- κ B hin untersucht. Zu

diesen Versuchen wurden Synovialzellen zusätzlich mit anderen Bakterienarten infiziert und hinsichtlich der Aktivierung von NF- κ B untersucht. Die Bakterienstämme *Salmonella enteritidis* und *Yersinia enterocolitica* O.3 stellen für die Ätiologie der reaktiven Arthritis pathogene Keime dar. *Escherichia coli* ist ebenfalls ein gram-negatives Bakterium, aber apathogen und kein Auslöser dieser Erkrankung. Aus diesem Grund wurde versucht, Unterschiede und Gemeinsamkeiten dieser Bakterien in ihrer Wirkung auf NF- κ B hin zu untersuchen.

3.2.1. *Yersinia enterocolitica* O.3 aktiviert NF- κ B in Synovialzellen

Durch die Infektion von Synovialzellen mit dem pathogenen Yersinienstamm *Yersinia enterocolitica* O.3 kam es zu einer Aktivierung von NF- κ B. Das im Zytoplasma befindliche I κ B α (s. Abb.4) wurde nach einer Stunde degradiert und bis zu einem Wert von 6 Stunden wieder neu gebildet. Nach 24 Stunden degradierte es erneut.

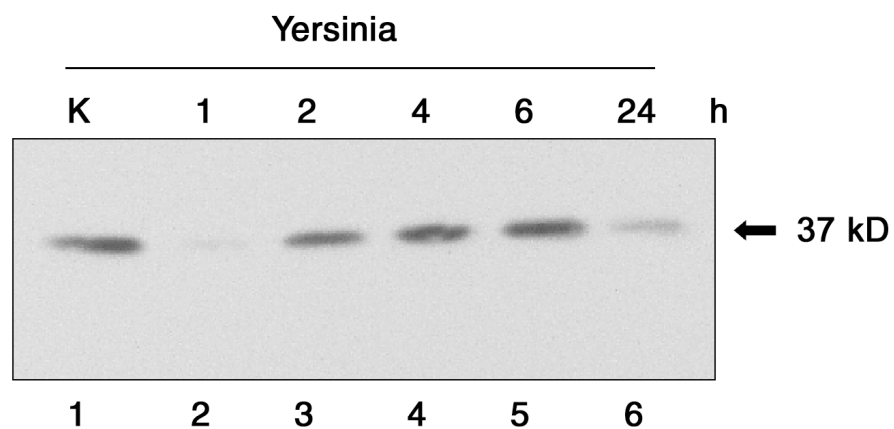


Abb. 4: Westernblot zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Degradierung von I κ B α im Zytoplasma von Synovialzellen durch Infektion mit *Yersinia enterocolitica* O.3. Synovialzellen wurden zeitgleich und mit gleicher Bakterienkonzentration infiziert. I κ B α - mit einem Molekulargewicht von etwa 37 kD - wurde durch einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper anti-I κ B α im Immunoblot detektiert. In Spur 1 wurde die Kontrolle (K), Zellen ohne Infektion, aufgetragen. Spur 2 stellt das Ergebnis nach 1 h, Spur 3 nach 2 h, Spur 4 nach 4 h, Spur 5 nach 6 h und Spur 6 nach 24 h dar. I κ B α degradierte nach 1 h und wurde bis zu einem Wert von 6 h neu gebildet. Nach 24 h war die Konzentration erneut abgefallen.

Im Kern (s. Abb.5) wurde die Untereinheit p65 des NF- κ B nach einer Stunde nachweisbar und akkumulierte bis zu einem Maximum von 4 bis 6 Stunden. Nach 24 Stunden wurde das Signal wieder schwächer.

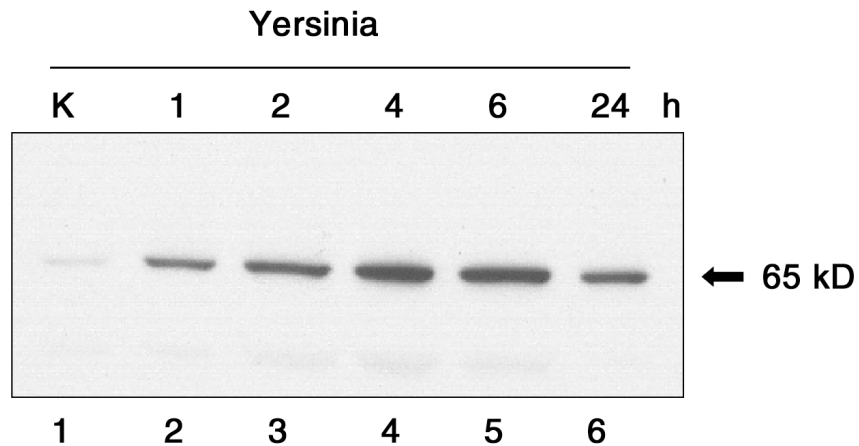


Abb. 5: Westernblot zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Aktivierung von NF- κ B im Kern von Synovialzellen durch Infektion mit *Yersinia enterocolitica* O.3. Synovialzellen wurden zeitgleich und mit gleicher Bakterienkonzentration infiziert. NF- κ B wurde mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper, der an die Untereinheit p65 bindet, detektiert. In Spur 1 wurde die Kontrolle (K), Zellen ohne Infektion, aufgetragen. Spur 2 stellt das Ergebnis nach 1 h, Spur 3 nach 2 h, Spur 4 nach 4 h, Spur 5 nach 6 h und Spur 6 nach 24 h dar. Nach 1 h wurde NF- κ B aktiviert mit einem Maximum bei 4 h bis 6 h. Bei 24 h fiel das Signal ab.

Als Ergebnis dieser Versuche war festzuhalten, dass *Yersinia enterocolitica* O.3 auch in Synovialzellen NF- κ B aktiviert. Im Vergleich zu den Beobachtungen mit HeLa-Zellen lag das Maximum der Induktion in Synovialzellen zwischen 4 und 6 Stunden, wohingegen die Aktivierung von NF- κ B in HeLa-Zellen ihren Höhepunkt bereits zwischen 1/2 und 1 Stunde erreichte. *Yersinia enterocolitica* O.3 aktiviert damit den Transkriptionsfaktor in HeLa-Zellen früher als in Synovialzellen.

3.2.2. *Salmonella enteritidis* aktiviert NF- κ B in Synovialzellen

Interessant ist nun, ob die Induktion von NF- κ B nur durch Yersinien induziert wird, oder ob auch andere Keime dazu in der Lage sind, den Transkriptionsfaktor zu induzieren. Die mögliche Induktion von NF- κ B durch den Erreger *Salmonella*

enteritidis wurde untersucht, da dieser Keim, wie auch *Yersinia enterocolitica*, zu einer reaktiven Arthritis führen kann.

Aus diesem Grund wurden in weiteren Versuchen Synovialzellen mit *Salmonella enteritidis* infiziert und das Auftreten von NF- κ B beobachtet. Aus früheren Untersuchungen unseres Labors ist bekannt, dass diese Keime die Fähigkeit besitzen, in Synovialzellen einzudringen und dort zu persistieren [41].

I κ B α im Zytoplasma der Zelle (s. Abb.6) degradierte nach einer Stunde und bildete sich nach 4 bis 24 Stunden wieder neu.

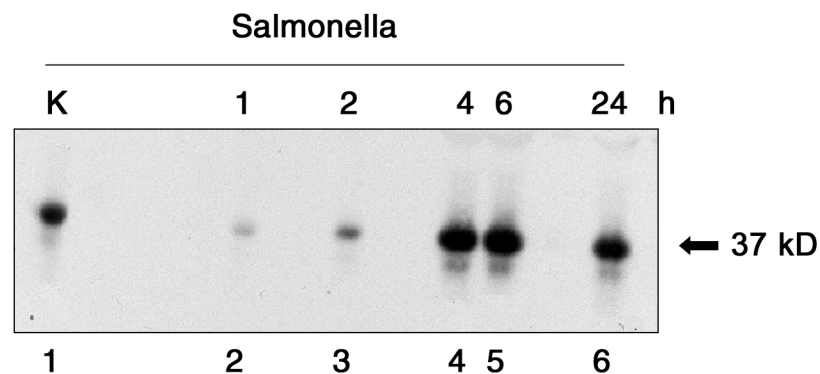


Abb. 6: Westernblot zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Degradierung von I κ B α im Zytoplasma von Synovialzellen durch Infektion mit *Salmonella enteritidis*. Synovialzellen wurden zeitgleich und mit gleicher Bakterienkonzentration infiziert. I κ B α - mit einem Molekulargewicht von etwa 37 kD - wurde durch einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper anti-I κ B α im Immunoblot detektiert. In Spur 1 wurde die Kontrolle (K), Zellen ohne Infektion, aufgetragen. Spur 2 stellt das Ergebnis nach 1 h, Spur 3 nach 2 h, Spur 4 nach 4 h, Spur 5 nach 6 h und Spur 6 nach 24 h dar. I κ B α degradierte nach 1 h und bildete sich nach 4 h bis 24 h neu.

Die Untereinheit p65 des NF- κ B wurde nach einer Stunde im Kern sichtbar (s. Abb.7). Seine Konzentration nahm nach 2 Stunden noch zu und fiel dann wieder ab. Auch nach 4 bis 6 Stunden war noch eine geringe Aktivierung zu erkennen, nicht mehr jedoch nach 24 Stunden.

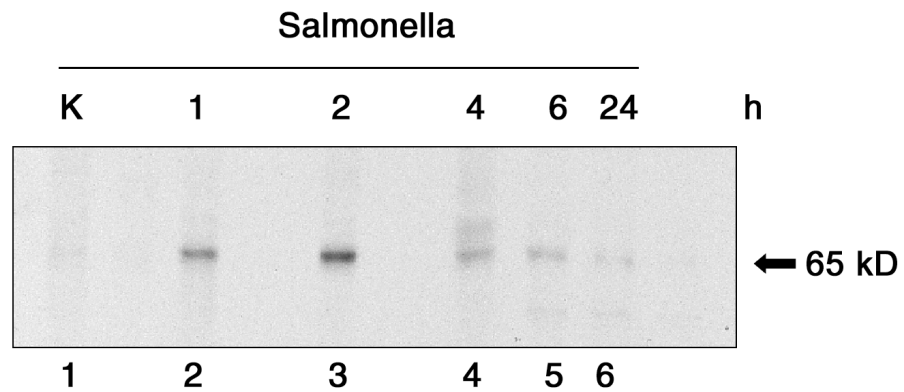


Abb. 7: Westernblot zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Aktivierung von NF- κ B im Kern von Synovialzellen durch Infektion mit *Salmonella enteritidis*. Synovialzellen wurden zeitgleich und mit gleicher Bakterienkonzentration infiziert. NF- κ B wurde mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper, der an die Untereinheit p65 bindet, detektiert. In Spur 1 wurde die Kontrolle (K), Zellen ohne Infektion, aufgetragen. Spur 2 stellt das Ergebnis nach 1 h, Spur 3 nach 2 h, Spur 4 nach 4 h, Spur 5 nach 6 h und Spur 6 nach 24 h dar. NF- κ B wurde nach 1 h aktiviert, stieg bis zu dem Wert von 2 h an und fiel wieder ab. Nach 4 h und 6 h war eine weitere leichte Aktivierung zu erkennen.

Eine genauere Analyse des Verhaltens im Kern mit Hilfe des Electro-Mobility-Shift-Assay zeigte eine Bindung an die Oligonukleotide mit Sequenzen des Interleukin-2-Promoters mit den Untereinheiten p65 und p50 des NF- κ B (s. Abb.8). Durch einen Supershift wurde deren Beteiligung bestätigt und näher aufgeschlüsselt, so dass die einzelnen Fraktionen zu identifizieren waren. Dazu wurde die Probe des 1 Stundenwertes verwendet. Um die Spezifität der Bindung des Protein-Oligonukleotids zu bestätigen, wurden kalte, nicht markierte NF- κ B-Oligonukleotide zur Competition hinzugefügt (s. Abb.8, Spur 9). Innerhalb dieses radioaktiven Versuches zeigte sich eine Aktivierung von NF- κ B durch *Salmonella enteritidis* in Synovialzellen zwischen einer 1/2 und einer Stunde sowie zwischen 4 und 6 Stunden.

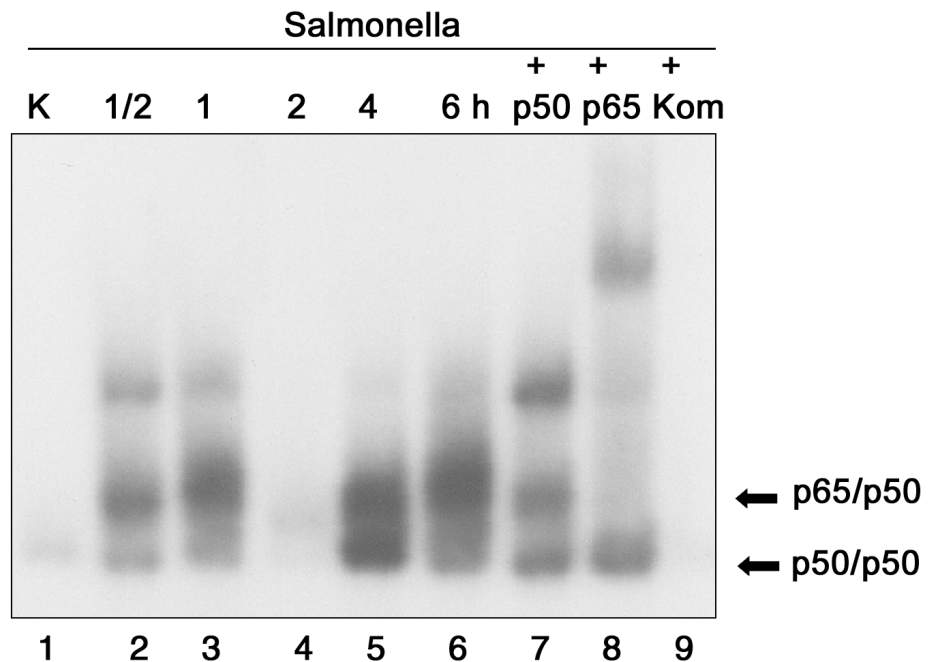


Abb. 8: Identifikation von spezifischen NF- κ B Proteinen, die im Electro-Mobility-Shift-Assay an Oligonukleotide mit der Sequenz des Interleukin-2-Promoters binden. Zeitlicher Verlauf der Aktivierung von NF- κ B durch *Salmonella enteritidis*. Synovialzellen wurden zeitgleich und mit gleicher Bakterienkonzentration infiziert. In Spur 1 wurde die Kontrolle (K), Zellen ohne Infektion, aufgetragen. Spur 2 stellt das Ergebnis nach 1/2 h, Spur 3 nach 1 h, Spur 4 nach 2 h, Spur 5 nach 4 h und Spur 6 nach 6 h dar. Bei einem Wert von 1/2 h war eine Fraktion von p65/p50 zu erkennen, die ab dem Wert von 1 h wieder absank. Zwischen den Werten 4 h und 6 h erschien eine neue Fraktion. Der Supershift wurde mit einem Antikörper gegen die Untereinheiten p50 (Spur 7) und p65 (Spur 8) durchgeführt. Fast das gesamte NF- κ B Signal wurde nach oben geschifft und stellte sich aufgrund des höheren Molekulargewichtes in einer neuen Bande dar. In Spur 9 wurde eine Konkurrenz mit nicht markierten Oligonukleotiden aufgetragen. Das Signal entfiel, da kein radioaktiver Oligonukleotid-Proteinkomplex entstand.

Die NF- κ B-Aktivierung verlief bei den Bakterien *Salmonella enteritidis* und *Yersinia enterocolitica* O.3 sehr ähnlich. Beide zeigten ein Auftreten von NF- κ B im Kern der Zelle zwischen 4 und 6 Stunden.

3.2.3. *Escherichia coli* und NF- κ B in Synovialzellen

Eine interessante Frage ist, ob *Escherichia coli* in der Lage ist, NF- κ B in Synovialzellen zu induzieren, da dieser Erreger zwar ebenfalls ein gram-negatives Darmbakterium ist,

aber keine reaktive Arthritis verursacht. Aus diesem Grund wurde eine vierundzwanzig Stunden Kinetik von NF- κ B nach einer Stimulierung durch *Escherichia coli* beobachtet. I κ B α degradierte bei einer Infektion nach einer Stunde und stieg ab der 4. Stunde wieder an. Nach 24 Stunden fand eine erneute Degradierung im Zytoplasma statt (s. Abb.9).

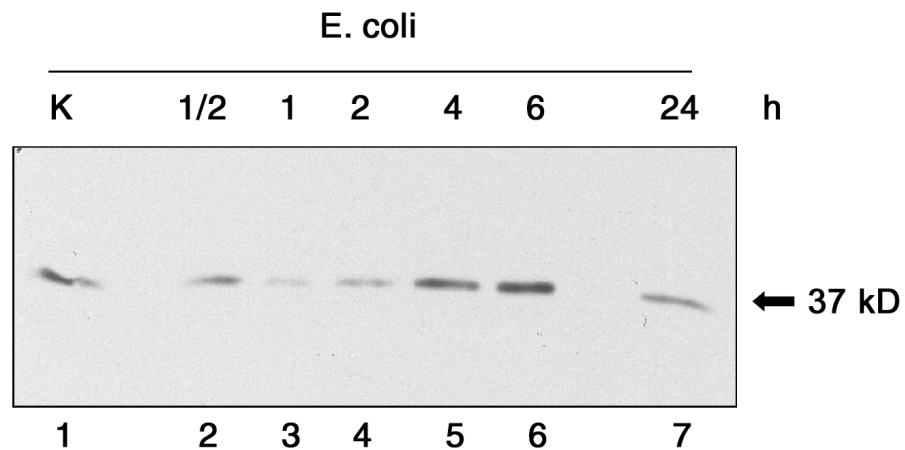


Abb. 9: Westernblot zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Degradierung von I κ B α im Zytoplasma von Synovialzellen durch Infektion mit *Escherichia coli*. Synovialzellen wurden zeitgleich und mit gleicher Bakterienkonzentration infiziert. I κ B α - mit einem Molekulargewicht von etwa 37 kD - wurde durch einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper anti-I κ B α im Immunoblot detektiert. In Spur 1 wurde die Kontrolle (K), Zellen ohne Infektion, aufgetragen. Spur 2 stellt das Ergebnis nach 1/2 h, Spur 3 nach 1 h, Spur 4 nach 2 h, Spur 5 nach 4 h, Spur 6 nach 6 h und Spur 7 nach 24 h dar. I κ B α degradierte nach 1 h und stieg bei 4 h und 6 h wieder an. Nach 24 h fand eine erneute Degradierung statt.

Im Kern erschien die Untereinheit p65 des NF- κ B nach einer Stunde und fiel bei 4 Stunden wieder ab (s. Abb.10). Nach insgesamt 24 Stunden war eine weitere Aktivierung von NF- κ B erkennbar.

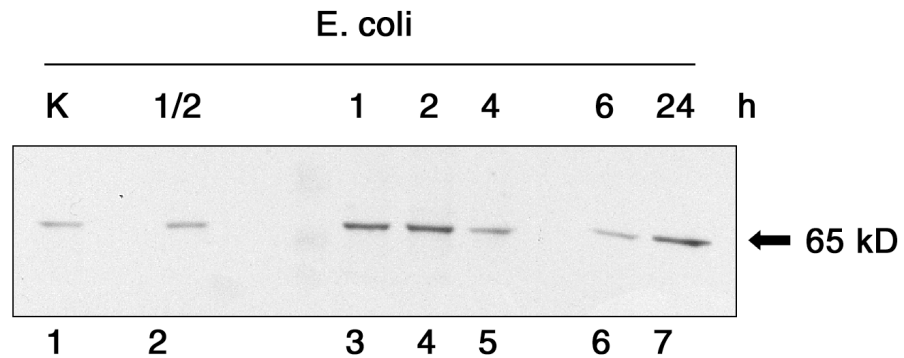


Abb. 10: Westernblot zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Aktivierung von NF- κ B im Kern von Synovialzellen durch Infektion mit *Escherichia coli*. Synovialzellen wurden zeitgleich und mit gleicher Bakterienkonzentration infiziert. NF- κ B wurde mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper, der an die Untereinheit p65 bindet, detektiert. In Spur 1 wurde die Kontrolle (K), Zellen ohne Infektion, aufgetragen. Spur 2 stellt das Ergebnis nach 1/2 h, Spur 3 nach 1 h, Spur 4 nach 2 h, Spur 5 nach 4 h, Spur 6 nach 6 h und Spur 7 nach 24 h dar. NF- κ B wurde nach 1 h aktiviert und fiel bei 4 h wieder ab. Nach 24 h wurde NF- κ B erneut sichtbar.

Die direkte Bindung der Untereinheiten an die Oligonukleotide war im Electromobility-Shift-Assay sichtbar. Wiederum war das Auftreten von p50/p65 zwischen 1/2 und 2 Stunden zu sehen (s. Abb.11). Durch die Anwendung des Supershifts ist die Identifizierung der bindenden Untereinheiten möglich. Hier waren p65 und p50 als beteiligte Fraktionen von NF- κ B nachweisbar. Als Probe diente hierbei der 24-Stundenwert.

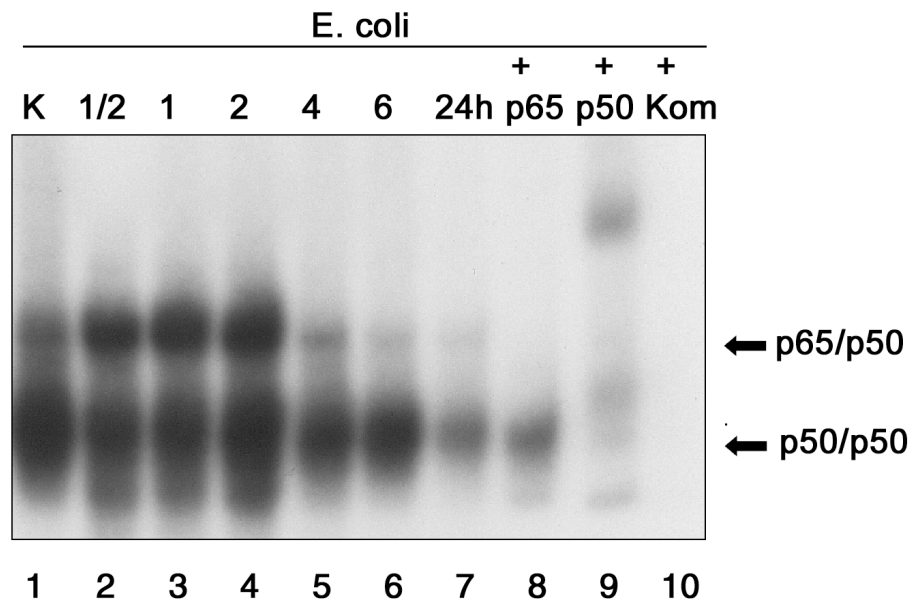


Abb.11: Identifikation von spezifischen NF- κ B Proteinen, die im Electro-Mobility-Shift-Assay an Oligonukleotide mit der Sequenz des Interleukin-2-Promoters binden. Zeitlicher Verlauf der Aktivierung von NF- κ B durch *Escherichia coli*. Synovialzellen wurden zeitgleich und mit gleicher Bakterienkonzentration infiziert. In Spur 1 wurde die Kontrolle (K), Zellen ohne Infektion, aufgetragen. Spur 2 stellt das Ergebnis nach 1/2 h, Spur 3 nach 1 h, Spur 4 nach 2, Spur 5 nach 4 h, Spur 6 nach 6 h und Spur 7 nach 24 h dar. Bei einem Wert von 1/2 h bis zu 2 h war eine Fraktion von p65/p50 zu erkennen. Der Supershift wurde mit einem Antikörper gegen die Untereinheiten p65 (Spur 8) und p50 (Spur 9) durchgeführt. Fast das gesamte NF- κ B-Signal wurde nach oben geschifft und stellte sich aufgrund des höheren Molekulargewichtes in einer neuen Bande dar. In Spur 10 wurde eine Konkurrenz mit nicht markierten Oligonukleotiden aufgetragen. Das Signal entfiel, da kein radioaktiver Oligonukleotid-Proteinkomplex entstand.

Auch *Escherichia coli* ist damit in der Lage, NF- κ B in Synovialzellen zu aktivieren, was sich mit einem Maximum zwischen 1/2 und 2 Stunden zeigte.

3.2.4. Vergleich der NF- κ B-Aktivierung durch *Yersinia enterocolitica* O.3, *Salmonella enteritidis*, und *Escherichia coli*

Den pathogenen Keimen, *Salmonella enteritidis* und *Yersinia enterocolitica* O.3, sollte nun das apathogene Bakterium *Escherichia coli* im direkten Vergleich gegenübergestellt werden. Es stellte sich die Frage, ob *Escherichia coli* in gleicher Weise Einfluß auf die Aktivierung von NF- κ B in Synovialzellen nimmt.

Im Westernblot wurden jeweils die Werte 4 und 6 Stunden betrachtet, da diese für die Bakterienstämme *Yersinia enterocolitica* O.3 und *Salmonella enteritidis* ein Maximum darstellen. Die drei Bakterienarten wurden zeitgleich durch die Infektion von Synovialzellen untersucht.

I κ B α degradierte in den mit *Yersinia enterocolitica* O.3 und *Salmonella enteritidis* infizierten Zellen nach 4 Stunden und war bei 6 Stunden bereits wieder nachproduziert. *Escherichia coli* hingegen bewirkte zu diesen Zeitpunkten keine Degradierung von I κ B α (s. Abb.12).

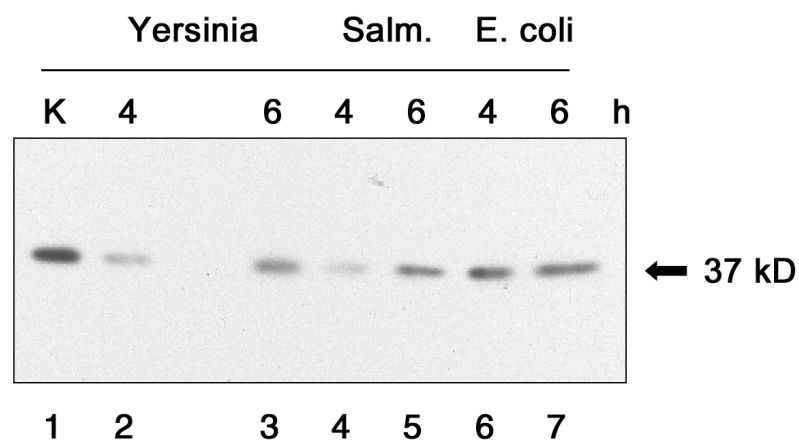


Abb. 12: Westernblot zur vergleichenden Darstellung der Degradierung von I κ B α im Zytoplasma von Synovialzellen durch Infektion mit *Yersinia enterocolitica* O.3, *Salmonella enteritidis* und *Escherichia coli*. Die Zellen wurden zeitgleich und mit gleicher Bakterienkonzentration infiziert. I κ B α - mit einem Molekulargewicht von etwa 37 kD - wurde durch einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper anti-I κ B α im Immunoblot detektiert. In Spur 1 wurde die Kontrolle (K), Zellen ohne Infektion, aufgetragen. Spur 2 und 3 stellt das Ergebnis einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica* O.3 nach 4 h und 6 h, Spur 4 und 5 die Infektion mit *Salmonella enteritidis* nach 4 h und 6 h und Spur 6 und 7 einer Infektion mit *Escherichia coli* nach 4 h und 6 h dar. I κ B α degradierte durch *Yersinia enterocolitica* O.3 nach 4 h und bildete sich nach 6 h neu. Durch *Salmonella enteritidis* degradierte I κ B α nach 4 h und erschien erneut nach 6 h. *Escherichia coli* ließ I κ B α weder nach 4 h noch nach 6 h degradieren.

Im Kern war eine Aktivierung der Untereinheit p65 des NF- κ B durch *Salmonella enteritidis* und *Yersinia enterocolitica* O.3 bei einem Wert von 4 Stunden zu erkennen (s. Abb.13). Es folgte ein Nachlassen der Aktivität von NF- κ B bei 6 Stunden. Eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch *Escherichia coli* konnte zwischen 4 und 6 Stunden nicht beobachtet werden.

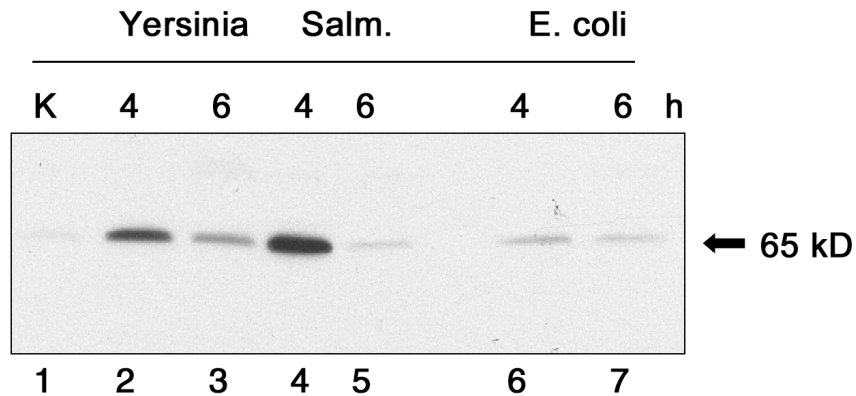


Abb. 13: Westernblot zur vergleichenden Darstellung der Aktivierung von NF- κ B im Kern von Synovialzellen durch Infektion mit *Yersinia enterocolitica* O.3, *Salmonella enteritidis* und *Escherichia coli*. Synovialzellen wurden zeitgleich und mit gleicher Bakterienkonzentration infiziert. NF- κ B wurde mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper, der an die Untereinheit p65 bindet, detektiert. In Spur 1 wurde die Kontrolle (K), Zellen ohne Infektion, aufgetragen. Spur 2 und 3 stellen das Ergebnis einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica* O.3 nach 4 h und 6 h, Spur 4 und 5 die Infektion mit *Salmonella enteritidis* nach 4 h und 6 h und Spur 6 und 7 einer Infektion mit *Escherichia coli* nach 4 h und 6 h dar. *Yersinia enterocolitica* O.3 aktivierte NF- κ B nach 4 h und *Salmonella enteritidis* führte ebenfalls nach 4 h zu einer Aktivierung. Eine Aktivierung durch *Escherichia coli* war nach 4 h und 6 h nicht zu erkennen.

Diese Ergebnisse zeigten, dass *Escherichia coli*, wie auch *Yersinia enterocolitica* O.3 und *Salmonella enteritidis*, in der Lage waren, NF- κ B in Synovialzellen zu induzieren. Allerdings unterschied sich dieses Bakterium in der zeitlichen Abfolge der Induktion von den bei *Salmonella enteritidis* und *Yersinia enterocolitica* gefundenen Resultaten. Diese bewirkten eine Induktion von NF- κ B zwischen 4 und 6 Stunden, im Gegensatz zu dazu führte eine Infektion mit *Escherichia coli* zu einer Aktivierung von NF- κ B mit einem Höhepunkt bis zu 2 Stunden post infectionem, d.h., dass *Salmonella enteritidis* - und *Yersinia enterocolitica* O.3-Infektionen eine länger andauernde NF- κ B-Induktion bewirken als *Escherichia coli*-Induktionen.

3.2.5. Vergleich von intakten *Yersinia enterocolitica* O.3 und UV-Licht inaktivierten *Yersinia enterocolitica* O.3

Um der Frage nachzugehen, welcher Bestandteil der Bakterien für die Induktion von NF- κ B verantwortlich gemacht werden kann, wurden Synovialzellen nicht nur mit

intakten Bakterien infiziert. So sollte die Bedeutung lebender Erreger von Effekten einzelner Komponenten der Erreger abgegrenzt werden. Durch eine Bestrahlung mit UV-Licht wurden die Bakterien inaktiviert, die DNA dadurch zerstört und die Zellwand intakt gelassen, damit diese auf ihre Wirkung hin untersucht werden konnte. Ob Bakterien im Ganzen zur NF- κ B-Induktion notwendig sind, wurde untersucht, indem eine Bakteriensuspension (*Yersinia enterocolitica* O.3 in RPMI 1640) abzentrifugiert und steril filtriert wurde. Auf diese Weise konnten sich nur kleine Bestandteile oder bakterielle Produkte im Filtrat befinden, mit welchen Synovialzellen inkubiert wurden. Wie bereits in vorangegangenen Versuchen wurde die Aktivität von NF- κ B im Kern beobachtet, wobei hier nur die Werte 4 und 6 Stunden der Kinetik betrachtet wurden. Diese Stundenwerte stellten das Maximum der NF- κ B-Aktivität nach einer Stimulierung durch *Yersinia enterocolitica* O.3 in Synovialzellen dar.

Werden unbehandelte *Yersinia enterocolitica* O.3 mit UV-inaktivierten *Yersinia enterocolitica* O.3 verglichen (s. Abb.14), so zeigt sich, dass I κ B α bei 4 Stunden degradierte und bei 6 Stunden das Inhibitorprotein wieder erneuert war. Im Gegensatz dazu ist bei den Zellen, die mit UV- inaktivierten *Yersinia enterocolitica* O.3 infiziert wurden, keine Degradierung von I κ B α im Zytoplasma sowohl bei 4 als auch bei 6 Stunden zu erkennen.

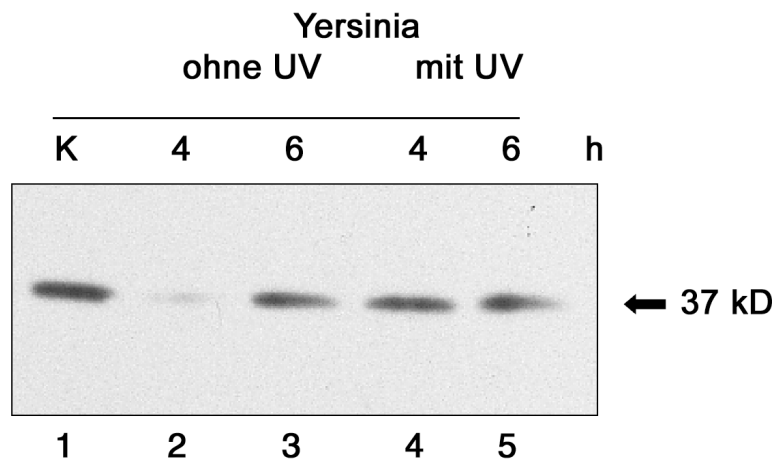


Abb. 14: Westernblot zur vergleichenden Darstellung der Degradierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ im Zytoplasma von Synovialzellen durch Infektion mit unbehandelten *Yersinia enterocolitica* O.3 und UV-inaktivierten *Yersinia enterocolitica* O.3. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ - mit einem Molekulargewicht von etwa 37 kD - wurde durch einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper anti- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ im Immunoblot detektiert. In Spur 1 wurde die Kontrolle (K), Zellen ohne Infektion, aufgetragen. Spur 2 und 3 stellen das Ergebnis nach einer Infektion mit unbehandelten *Yersinia enterocolitica* O.3 nach 4 h und 6 h dar. Spur 4 und 5 zeigen das Ergebnis nach der Infektion mit UV-inaktivierten *Yersinia enterocolitica* O.3 nach 4 h und 6 h. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ degradierte durch unbehandelte *Yersinia enterocolitica* O.3 nach 4 h und bildete sich bei 6 h neu. UV-inaktivierte *Yersinia enterocolitica* O.3 führten nach 4 und 6 h nicht zum Abbau von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$.

Im Kern erschien die Untereinheit p65 des NF- κB in Synovialzellen, die mit unbehandelten *Yersinia enterocolitica* O.3 infiziert wurden, nach 4 und 6 Stunden. Durch UV-inaktivierte *Yersinia enterocolitica* O.3 kam es somit bei 4 und 6 Stunden zu einer leichten Aktivierung von NF- κB (s. Abb.15).

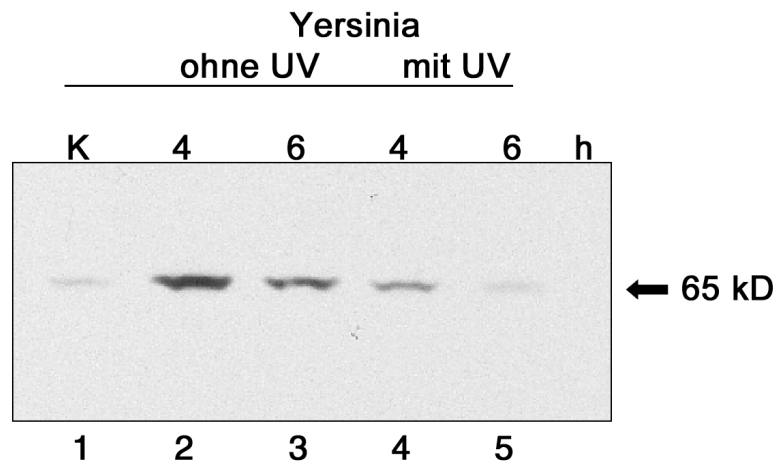


Abb. 15: Westernblot zur vergleichenden Darstellung der Aktivierung von NF- κ B im Kern von Synovialzellen durch Infektion mit unbehandelten *Yersinia enterocolitica* O.3 und UV-inaktivierte *Yersinia enterocolitica* O.3. Synovialzellen wurden zeitgleich und mit gleicher Bakterienkonzentration infiziert. NF- κ B wurde mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper, der an die Untereinheit p65 bindet, detektiert. In Spur 1 wurde die Kontrolle (K), Zellen ohne Infektion, aufgetragen. Spur 2 und 3 stellen das Ergebnis nach einer Infektion mit unbehandelten *Yersinia enterocolitica* O.3 nach 4 h und 6 h dar. Spur 4 und 5 zeigen das Ergebnis nach der Infektion mit UV-inaktivierten *Yersinia enterocolitica* O.3 nach 4 h und 6 h. NF- κ B wurde durch unbehandelte *Yersinia enterocolitica* O.3 nach 4 h aktiviert und ließ nach 6 h etwas nach. UV-inaktivierte *Yersinia enterocolitica* O.3 bewirkten nach 4 h eine schwache Induktion von NF- κ B, nach 6 h war keine Aktivierung zu erkennen.

Als Ergebnis war festzuhalten, dass UV-inaktivierte Bakterien wie auch unbehandelte Bakterien zu einer Aktivierung von NF- κ B in Synovialzellen führten, mit UV-Licht behandelte Bakterien allerdings eine Aktivierung deutlich schwächerer Art induzierten.

3.2.6. Vergleich von intakten *Yersinia enterocolitica* O.3 mit dem Überstand von *Yersinia enterocolitica* O.3 und UV-Licht inaktivierten *Yersinia enterocolitica* O.3

Um zusätzlich zu lebenden Bakterien auch die Rolle bakterieller Produkte zu untersuchen, wurde der Überstand bakterieller Kulturen in den Vergleich miteinbezogen.

Dabei war bei Hinzuziehung des Ergebnisses der Degradierung von I κ B α in Synovialzellen deutlich zu erkennen, dass der Überstand in der Lage ist, sowohl I κ B α als auch NF- κ B zu aktivieren. Wurden die Induktionsstärken miteinander verglichen

zeigte sich, dass der Überstand I κ B α in einem viel geringeren Ausmaß degradiert als unbehandelte *Yersinia enterocolitica* O.3 und ebenso eine eindeutig schwächere Degradierung zeigte als UV-Licht inaktivierte Bakterien (s. Abb.16). Unbehandelte *Yersinia enterocolitica* O.3 zeigten eine Degradierung von I κ B α nach 4 und 6 Stunden, der Überstand der Bakterienkultur ließ nur einen geringen Rückgang des Signals erkennen und die mit UV-Licht behandelten Erreger degradierten I κ B α nach 4 Stunden, wobei bei 6 Stunden I κ B α erneut sichtbar wurde.

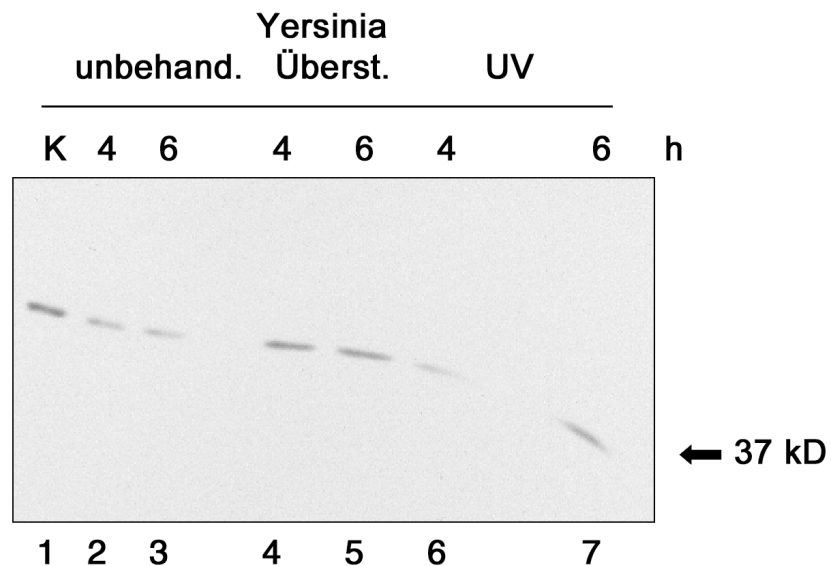


Abb. 16: Westernblot zur vergleichenden Darstellung der Degradierung von I κ B α im Zytoplasma von Synovialzellen durch Infektion mit unbehandelten *Yersinia enterocolitica* O.3, Überstand von *Yersinia enterocolitica* O.3 und UV-inaktivierten *Yersinia enterocolitica* O.3. I κ B α - mit einem Molekulargewicht von 37 kD - wurde durch einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper anti-I κ B α im Immunoblot detektiert. In Spur 1 wurde die Kontrolle (K), Zellen ohne Infektion, aufgetragen. Spur 2 und 3 stellen das Ergebnis nach einer Infektion mit intakten *Yersinia enterocolitica* O.3 nach 4 h und 6 h dar. Spur 4 und 5 zeigen das Ergebnis nach der Infektion mit dem Überstand von *Yersinia enterocolitica* O.3 nach 4 h und 6 h. In Spur 6 und 7 ist das Ergebnis der Infektion mit UV-inaktivierten *Yersinia enterocolitica* O.3 nach 4 h und 6 h zu erkennen. I κ B α degradiert durch unbehandelte *Yersinia enterocolitica* O.3 nach 4 h und hielt bis zu 6 h an. Der Überstand von *Yersinia enterocolitica* O.3 lies I κ B α nach 6 h schwach degradieren. UV-inaktivierte *Yersinia enterocolitica* O.3 machten eine Degradierung nach 4 h sichtbar, nach 6 h bildete sich I κ B α erneut. Die abfallende Linie der Signale ist auf eine Verziehung des Geles beim Trocknen zurückzuführen.

Durch die Beobachtung der Aktivierung von NF- κ B im Kern von Synovialzellen wurde sichtbar, dass der Überstand in der Lage war, auch NF- κ B nach 6 Stunden zu aktivieren, allerdings in viel geringerem Ausmaß als intakte *Yersinia enterocolitica* O.3 (s.

Abb.17). *Yersinia enterocolitica* O.3 ließ NF- κ B im Kern nach 4 Stunden erkennen und verstärkte sich bis zu einem Maximum bei 6 Stunden. UV-Licht inaktivierte Erreger zeigten eine Aktivierung von NF- κ B nach 4 Stunden.

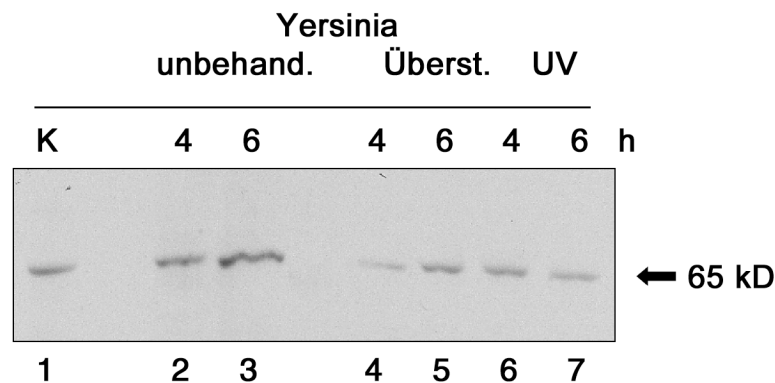


Abb. 17: Westernblot zur vergleichenden Darstellung der Aktivierung von NF- κ B im Kern von Synovialzellen durch Infektion mit unbehandelten *Yersinia enterocolitica* O.3, Überstand von *Yersinia enterocolitica* O.3 und UV-inaktivierte *Yersinia enterocolitica* O.3. Synovialzellen wurden zeitgleich und mit gleicher Bakterienkonzentration infiziert. NF- κ B wurde mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper, der an die Untereinheit p65 bindet, detektiert. In Spur 1 wurde die Kontrolle (K), Zellen ohne Infektion, aufgetragen. Spur 2 und 3 stellen das Ergebnis nach einer Infektion mit unbehandelten *Yersinia enterocolitica* O.3 nach 4 h und 6 h dar. Spur 4 und 5 zeigen das Ergebnis nach der Infektion mit Überstand von *Yersinia enterocolitica* O.3 nach 4 h und 6 h Spur 6 und 7 sind das Ergebnis einer Infektion mit UV-inaktivierten *Yersinia enterocolitica* O.3 nach 4 h und 6 h. NF- κ B wurde durch unbehandelte *Yersinia enterocolitica* O.3 bereits nach 4 h aktiviert und steigert sich bis zum 6 h Wert. UV-inaktivierte *Yersinia enterocolitica* O.3 bewirken eine leichte Aktivierung nach 6 h und der Überstand von *Yersinia enterocolitica* O.3 aktiviert NF- κ B nach 4 h und 6 h nicht.

Die Konklusion dieser Versuche zeigte, dass auch der Überstand eine Induktion von NF- κ B hervorrief. Der Überstand von *Yersinia enterocolitica* O.3 führte aber zu einer geringeren Reaktion als UV-inaktivierte Bakterien. Die absteigende Reihenfolge der Induktionsstärke ist damit wie folgt: *Yersinia enterocolitica* O.3 unbehandelt – *Yersinia enterocolitica* O.3 UV-inaktiviert – *Yersinia enterocolitica* O.3 Überstand.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Durchführung und Auswertung der Versuche verlief unter folgenden Gesichtspunkten. Zum einen wurde beobachtet, ob eine Aktivierung von NF- κ B und Degradierung von I κ B α durch Infektion mit unterschiedlichen Bakterien stattfand. Zum anderen wurden beide Prozesse in ihrem zeitlichen Verlauf betrachtet. Weiterhin wurde die Induktionsstärke des Transkriptionsfaktors innerhalb eines Westernblotes verglichen. Zur Analyse der Bindung von NF- κ B mit seinen Untereinheiten p65 und p50 an DNA wurde ein EMSA durchgeführt.

Als Gemeinsamkeiten waren in allen vorliegenden Versuchen 3 Punkte festzuhalten. Erstens wurde innerhalb aller Infektionen NF- κ B aktiviert, zweitens kam es dabei stets zu einer Degradierung von I κ B α und drittens führten sämtliche Infektionen der untersuchten Bakterien zu einer Bindung von NF- κ B-Untereinheiten p65 und p50 an das NF- κ B Bindemotiv.

Unterschiede waren hinsichtlich des zeitlichen Auftretens der Degradierung von I κ B α und Aktivierung von NF κ B zu verzeichnen.

Yersinia enterocolitica O.3 induzierte NF- κ B in HeLa-Zellen mit einem Maximum zwischen 1/2 und 2 Stunden. Hingegen stellte sich die Aktivierung des Transkriptionsfaktor in Synovialzellen erst mit einem Maximum zwischen 4 und 6 Stunden ein.

Im Vergleich zu Yersinien bewirkte *Escherichia coli* ein Auftreten von NF- κ B bereits nach 1- und 2 Stunden. Nach 4 bis 6 Stunden war kein Signal mehr zu erkennen. *Escherichia coli* hob sich damit durch eine deutlich frühere Aktivierung des Transkriptionsfaktors von *Yersinia enterocolitica O.3* ab und verhielt sich so wie *Yersinia enterocolitica O.3* in HeLa-Zellen.

Salmonella enteritidis hingegen zeigte eine vergleichbare Kinetik wie *Yersinia enterocolitica O.3* mit einer Aktivierung von NF- κ B zwischen 4 und 6 Stunden.

Im Vergleich von unbehandelten lebenden *Yersinia enterocolitica O.3* zu inaktivierten Yersinien oder zu Produkten der Bakterien fanden sich unterschiedliche Ergebnisse bei

der Induktion von NF- κ B. UV-Licht inaktivierte Yersinien bewirkten eine deutlich schwächere Induktion als intakte Bakterien. Weiterhin zeigte der Überstand von *Yersinia enterocolitica* O.3 eine noch geringere Aktivierung von NF- κ B als die mit UV-Licht behandelten Yersinien.

4. Diskussion

Spondylarthropathien stellen eine Gruppe von Erkrankungen dar, zu welchen die ankylosierende Spondylarthritis, die mit einer entzündlichen Darmerkrankung assoziierten Arthritiden, die reaktive Arthritis und die undifferenzierten Spondylarthropathien zählen [24]. Primär lassen sich zwei wichtige Theorien zu deren Ätiologie unterscheiden:

Kreuzreaktion zwischen Bakterien und HLA B27

Eine Gemeinsamkeit dieser Erkrankungen ist neben den klinischen Ähnlichkeiten die Assoziation mit dem Auftreten des MCH-I Moleküls HLA B27 [16; 3]. Das Vorhandensein dieses Oberflächenmoleküls wurde mit dem Vorliegen einer Autoimmunkrankheit assoziiert [69]. Eine Hypothese besagt, dass molekulares Mimikry zwischen Bakterien und HLA B27 eine Rolle bei der Pathogenese der HLA B27 assoziierten Spondylarthropathien spielt. Damit würden Antikörper, deren Produktion von Bakterien induziert wird, mit HLA B27 Molekülen kreuzreagieren und eine Autoimmunantwort auslösen. Dies könnte die Entstehung der genannten Krankheiten erklären. Es wurden Antikörper gegen *Klebsiella pneumoniae* gefunden, die einen homologen Abschnitt mit HLA B27 aufwiesen [67]. Einzelne Studien weisen in diese Richtung, allerdings konnte bei Kontrolluntersuchungen keine eindeutige Bestätigung dieser Vermutung gefunden werden. Obwohl HLA B27 Moleküle immunologische Determinanten mit bakteriellen Bestandteilen teilen, kann nicht gefolgert werden, dass HLA B27 assoziierte Krankheiten unabdingbare Autoimmunkrankheiten sind, ausgelöst durch eine autoimmune Reaktion [58]. Es liegen keine Beweise vor, dass diese gemeinsamen Determinanten für die Pathogenese der Spondylarthritiden wichtig sind. Vielleicht könnte aber dieses MCH-Molekül als Bakterienrezeptor dienen, der das Eindringen in die Zelle erleichtert oder in irgendeiner Weise die Bakterien begünstigt. Hinsichtlich der Bedeutung von HLA B27 für das Eindringen und das Überleben von Bakterien in Synovialzellen konnte in Versuchen mit *Yersinia enterocolitica* und *Salmonella enteritidis* kein Einfluß des Oberflächenmoleküls gezeigt werden [39; 41].

Theorie der direkten Infektion

Die reaktive Arthritis wird als sterile Gelenkentzündung beschrieben, die als Folge einer extraartikulär aufgetretenen Infektion auftritt [4]. Zu den bekannten Erregern zählen Yersinien, Salmonellen, Shigellen, Campylobacter und Chlamydien [79]. Es stellt sich die Frage, wie diese Keime fern von ihrem Infektionsort in der Lage sein können, derartige Gelenkläsionen zu verursachen. Entsprechend der Theorie, dass es sich um eine direkte Infektion handeln könnte, wurden Synovialflüssigkeit und Synovialzellen untersucht. Hierbei konnte DNA von Chlamydien und Salmonellen gefunden werden [72; 55]. Bestandteile von Shigellen und Yersinien konnten ebenfalls entdeckt werden, allerdings beschränkt sich hierbei der Fund auf LPS [18]. Dass Bakterien im Ganzen ins Gelenk gelangen, konnte bis jetzt nur bei Chlamydien bestätigt werden.

Die Fähigkeit der Yersinien, Zellen zu infizieren und darin zu persistieren

Bisher konnten Antigene und DNA von Chlamydien und Salmonellen in Synovialflüssigkeit gefunden werden, nicht aber bei Yersinien. Auch waren Versuche erfolglos, Yersinien aus Synovialgewebe anzuzüchten [34]. Eine interessante Beobachtung stellt die Entdeckung von ovalen Partikeln in synovialen Gewebe dar, die eine sehr große Ähnlichkeit mit dem Aussehen eines Stäbchenbakteriums haben. Bei näheren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass es sich um die Membranstruktur von Yersinien handelt, welche allerdings keine DNA enthält. Es gelang außerdem zu zeigen, dass Yersinien die Fähigkeit besitzen, in das synoviale Gewebe einzudringen und dort zu persistieren [42]. Durch eine intrazelluläre Interaktion mit der Wirtszelle könnten Yersinien im Gewebe überleben und Prozesse aktivieren, die dem Wirt schaden, wie zum Beispiel die reaktive Arthritis. Es bleibt die Frage, mit welchen Mechanismen Yersinien ausgestattet sind oder welche Zellreaktion sie auszulösen vermögen, um diese krankheitserzeugende Reaktion hervorzurufen.

Zytokine spielen eine Rolle für intrazelluläre Persistenz von Bakterien

Interleukin-1 und TNF- α sind proinflammatorisch wirksame Zytokine. Hinsichtlich der Bedeutung für das intrazelluläre Überleben von Yersinien in Synovialzellen konnte gezeigt werden, dass Interleukin-1, TNF- α und Interferon- γ (ein multifunktionelles Zytokin, das auch Th1-Reaktionen unterstützt) den Bakterientiter in Synovialzellen zu verringern vermögen, wohingegen Interleukin-4 die Bakterien in ihrer intrazellulären Persistenz unterstützt [40]. Damit werden weitere Überlegungen gerechtfertigt, die sich mit dem Ablauf der intrazellulären Zytokinproduktion beschäftigen und es stellt sich die Frage, wodurch diese gesteuert wird.

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B und sein Wirken im Zusammenhang mit Infektionen

Bereits 1986, bei der Erstbeschreibung von NF- κ B, wurde der bakterielle Zellwandbestandteil LPS als wichtiger Induktor von NF- κ B beschrieben. Daneben können auch virale Infektionen oder andere bakteriellen Substanzen eine aktivierende Rolle spielen [13]. Das Verhalten von NF- κ B bei gram-negativen Infektionen wurde bereits für intestinale Epithelzellen beschrieben, die mit enteroinvasiven Bakterien infiziert wurden. Dabei wird NF- κ B als zentraler Regulator der zellulären Abwehr beschrieben [25]. Obwohl *Salmonella enteritidis* und *Yersinia enterocolitica* verschiedene Strategien benutzen und unterschiedliche Signalwege aktivieren [47], verstärken die intestinalen Epithelzellen, vom Typ des Erregers unabhängig, die Expression von Genen, die eine entzündungsfördernde Antwort zur Folge haben [45]. Für diese Immunantwort auf eine Infektion mit enteroinvasiven Bakterien wird NF- κ B als zentraler Faktor verantwortlich gemacht. NF- κ B spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Entzündungsmolekülen [51]. Intestinale Zellen aktivieren NF- κ B sehr schnell nach Eintreten einer Infektion. [12].

NF- κ B und gram-negative Bakterien in Synovialzellen

Da die Erreger der reaktiven Arthritis primär den Gastrointestinaltrakt infizieren, stellt sich die Frage, ob und wie sie ins Gelenk gelangen und welche Folgen eine

intraartikuläre Infektion hat. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob eine Yersinien- oder Salmonelleninfektion in Synovialzellen eine NF- κ B-Aktivierung hervorruft.

Innerhalb einer Versuchsreihe, in welcher Synovialzellen mit Yersinien und Salmonellen infiziert und anschließend lysiert wurden, konnte mit Hilfe von Westernblot und Antigen-detektion eine deutliche Aktivierung von NF- κ B im Zellkern gezeigt werden. Das im Zytoplasma vorhandene I κ B α , der NF- κ B-Inhibitor, wird gleichzeitig degradiert.

Es wurde gezeigt, dass NF- κ B bei einer Infektion von Synovialzellen sowohl durch Yersinien als auch durch Salmonellen beteiligt ist. Es besteht somit die Möglichkeit einer Beteiligung des Transkriptionsfaktor an der Pathogenese der reaktiven Arthritis.

Die Bedeutung von bakteriellen Bestandteilen an der NF- κ B-Aktivierung

Da allerdings bis zu diesem Zeitpunkt keine vollständigen Bakterien in Synovialflüssigkeit und -gewebe bei Patienten mit reaktiver Arthritis entdeckt werden konnten, sondern nur Teile dieser Bakterien oder antigenes Material, bleibt die Frage, ob auch diese bakteriellen Bestandteile allein es vermögen, eine NF- κ B-Aktivierung hervorzurufen.

Dazu wurden Yersinien in zweifacher Weise präpariert. Zum einen wurden sie mit Hilfe von UV-Strahlen inaktiviert, was bedeutet, dass die Zellwand intakt blieb, die DNA aber zerstört wurde. Zum anderen wurde eine Bakteriensuspension abzentrifugiert und der Überstand steril filtriert, um bakterielle Produkte oder einzelne Bestandteile zu isolieren. Mit inaktivierten Bakterien oder dem Überstand wurden Synovialzellen infiziert, lysiert und durch einen Westernblot mit Antigen-detektion das Verhalten von NF- κ B dargestellt. Auch bei diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass NF- κ B im Zellkern aktiviert wird.

Wurden die Induktionsstärken von intakten, durch UV inaktivierten Bakterien und der Überstand miteinander verglichen, war zu erkennen, dass das größte Potential der NF- κ B-Aktivierung bei unbehandelten Yersinien lag. In absteigender Reihenfolge folgten UV behandelte Bakterien und der filtrierte Überstand.

Daraus konnten zwei Schlussfolgerungen gezogen werden. Einmal könnte die stärkere Induktion durch UV-inaktivierte Yersinien, verglichen zum filtrierten Überstand, für die Zellwand als pathogenen Faktor sprechen. Dies würde die Ergebnisse unterstützen, dass LPS ein bedeutender Induktor von NF- κ B ist [13]. Ein Konzentrationsunterschied von LPS wäre damit von Bedeutung, denn bei intakten Bakterien und UV-inaktivierten Keimen ist eine höhere Konzentration des Zellwandbestandteiles vorhanden als bei dem verwendeten Überstand. Somit aktivieren intakte Bakterien und durch UV-inaktivierte Keime NF- κ B stärker als der Überstand.

Zum anderen ergeben die Versuche, dass lebende Yersinien NF- κ B stärker aktivieren als abgetötete Bakterien. Dies könnte damit zusammenhängen, dass diese noch in der Lage sind, sich zu vermehren oder zusätzliche Pathogenitätsfaktoren zu exprimieren. Infolgedessen ließe sich erstens die MOI nicht mehr mit den Versuchen der intakten Bakterien vergleichen. Und zweitens könnten lebende Yersinien möglicherweise neue Oberflächenproteine nach der Invasion in die Zelle exprimieren, was zu einer stärkeren NF- κ B-Aktivierung führen würde.

Des weitern darf man annehmen, dass auch Folgeprodukte der NF- κ B-Aktivierung eine wesentliche Rolle spielen könnten. Ein starker Induktor von NF- κ B in Synovialzellen ist TNF- α [6]. Dieses Zytokin könnte erneut, als Produkt einer NF- κ B-Aktivierung, zur Induktion des Transkriptionsfaktors führen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass NF- κ B nach bakterieller Infektion von Synovialzellen induziert wird, soll nun die Bedeutung von TNF- α für eine Immunantwort diskutiert werden. Das wirft die Frage auf, was für eine Rolle TNF- α innerhalb der Interaktion zwischen Wirt und Bakterium spielt.

Die Bedeutung von TNF- α in Verbindung mit NF- κ B

TNF- α ist ein Zytokin, das in verschiedene intrazelluläre Prozesse eingreift. So wirkt TNF- α zum einen zytotoxisch [71; 64], und zum anderen wurde in Fibroblasten eine Zellproliferation durch den Stimulus dieses Zytokins beobachtet [71]. Welcher Vorgang ausgelöst wird, ist unter anderem vom Zelltypus abhängig. Die Besonderheit der Verknüpfung von TNF- α mit NF- κ B ist die Tatsache, dass TNF- α die Fähigkeit besitzt,

NF- κ B zu aktivieren und gleichzeitig auch ein Produkt dieser Stimulierung sein kann [6]. Das wirft die Frage auf, was die Aufgabe von TNF- α innerhalb der Interaktion zwischen Wirt und Bakterium ist.

Einerseits zeigen Versuche mit Makrophagen und HeLa-Zellen, die mit *Yersinia enterocolitica* infiziert wurden, innerhalb von 60-90 Minuten keine Aktivierung von NF- κ B. Auch die TNF- α -Produktion war supprimiert [60]. Da Zytokine - wie TNF- α - entscheidende Faktoren für die Eindämmung einer Yersinieninfektion sind, könnte sich durch eine TNF- α -Supprimierung die Möglichkeit der Yersinien erhöhen, sich in der Wirtszelle zu vermehren [7; 12]. Das würde bedeuten, dass eine NF- κ B-Aktivierung dazubeitragen könnte, durch die Produktion von TNF- α die Verteidigung des Wirtes gegen eine Yersinieninfektion zu stärken. Der Pathomechanismus, TNF- α zu blockieren, wäre damit für das Pathogen von Nutzen. Dem Zytokin würde damit eine protektive Aufgabe zukommen. Eine Studie bei Patienten mit chronischer reaktiver Arthritis zeigte niedrige Titer von TNF- α [15]. Das Zytokin könnte somit an dem Verlauf der Erkrankung beteiligt sein, indem eine zu geringe TNF- α -Konzentration die Krankheit nicht eindämmen kann. Auch liegen Ergebnisse vor, dass TNF- α eine wichtige Rolle bei der Limitierung der Schwere von bakteriellen Infektionen spielt [59]. Andererseits wäre es möglich, dass TNF- α durch den Kreislauf von Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der nachfolgenden Produktion von TNF- α zu einem außer Kontrolle geratenen Circulus viciosus kommt, der in eine Entzündung mündet [7]. Dies paßt zu der Beobachtung, dass TNF- α ein proinflammatorisch wirkendes Zytokin ist [23]. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis konnte festgestellt werden, dass Zellen aus befallenen Gelenken fähig waren, spontan TNF- α zu produzieren und damit den Titer dieses Zytokins zu erhöhen [26].

TNF- α kann den Verlauf einer Infektion in zwei verschiedene Richtungen lenken. Welcher Weg eingeschlagen wird, muß mit verschiedenen Zell- und Erregertypen einzeln untersucht werden. Eindeutig bleibt nur, dass TNF- α in direkter Verbindung mit NF- κ B steht und sowohl die Expression des Zytokins als auch des Transkriptionsfaktors eng miteinander verknüpft sind.

Für die Erforschung der reaktiven Arthritis ist nach unseren Ergebnissen wichtig, die einzelnen Bakterienarten hinsichtlich ihrer Wirkung in Synovialzellen auf NF- κ B hin zu

untersuchen. Deshalb wurde auch *Escherichia coli* als apathogener, die Entstehung der reaktiven Arthritis nicht beeinflussender Keim, im Vergleich zu Yersinien und Salmonellen betrachtet.

Infektion von Synovialzellen mit *Escherichia coli*: Wie verhält sich NF- κ B?

Escherichia coli gehört zu den wichtigen Bakterien der physiologischen Darmflora und verursacht im Vergleich zu *Salmonella enteritidis* und *Yersinia enterocolitica* keine reaktive Arthritis als Sekundärmanifestation.

Werden Synovialzellen mit *Escherichia coli* infiziert, lysiert und nach einem Westernblot mit Antikörper gegen NF- κ B detektiert, so zeigt sich auch hierbei eine Degradierung von I κ B α im Zytoplasma und eine Aktivierung von NF- κ B im Zellkern. Wird nun aber der Gesichtspunkt des zeitlichen Verlaufes der Aktivierung, also die Kinetik, in die Beobachtungen miteinbezogen, so ist folgender Unterschied festzustellen: *Escherichia coli* induziert NF- κ B bei einer bis zwei Stunden post infectionem, im Gegensatz zu *Salmonella enteritidis* und *Yersinia enterocolitica*, die ein Maximum bei vier bis sechs Stunden verzeichnen.

Pathogene Keime aktivieren NF- κ B also erst zu einem späteren Zeitpunkt, was nachfolgend zu einer verspäteten Zytokinproduktion führt und damit die frühzeitige Abtötung der Keime nicht gelingt. Durch einen Mangel an TNF- α könnte es den Erregern gelingen, in der Zelle zu persistieren. Auch wenn die Zeitdifferenz nur vier Stunden beträgt, könnte bei einer Generationszeit von 20-30 Minuten eine große Menge an virulenten Erregern entstanden sein, die nicht mehr durch TNF- α abzutöten ist. Es könnten deshalb bakterielle Substanzen innerhalb dieser Zeitspanne vermehrt gebildet werden und damit die notwendige Menge an bakteriellen Toxinen, die für die Arthritis notwendig ist, bereitstehen.

Ein Ausblick hinsichtlich der Entwicklung einer medikamentösen Therapie

Vielleicht kann der strittigen Frage nach Nutzen oder Schaden von TNF- α innerhalb von Infektionen näher gekommen werden, wenn dessen Mitwirken bei der Pathogenese berücksichtigt wird. Auch die Behandlung der rheumatoiden Arthritis hat ihr

Augenmerk auf das Zytokin TNF- α gerichtet. Für die Pathogenese spielt es eine Rolle im Entzündungsprozeß, in der Neoangiogenese und der fortschreitenden Gelenkdestruktion. Damit entwickelte sich TNF- α zur Zielscheibe der Therapieentwicklung. Es wurden monoklonale TNF- α -Antagonisten entwickelt, die in der Therapie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt wurden, und mit deren Hilfe es gelang, die Ausbreitung und den Schweregrad der Erkrankung positiv zu beeinflussen [19]. Als kurzfristige Therapeutika zeigten die TNF- α -Antikörper einen Rückgang des Entzündungsprozesses [44]. Auch konnten klinische Studien eine gute Wirkung von TNF- α -Antikörpern zeigen bei Patienten, die bereits unter immunsuppressiver Therapie mit Methotrexat standen [46]. Innerhalb der Pädiatrie wurde bei Patienten mit juveniler rheumatoider Arthritis beobachtet, dass unter TNF- α -Antikörper-Therapie eine deutliche Besserung der Krankheitszeichen und Symptome auftrat [50].

Mit diesen Ergebnissen wird die bedeutende Rolle von TNF- α unterstrichen. Die Therapie mit TNF- α -Antikörpern zeigt die Wichtigkeit von proinflammatorischen Zytokinen als Mediatoren in Gelenkentzündungen. Da damit innerhalb der Therapie der rheumatoiden Arthritis große Fortschritte erzielt wurden, bietet dies eine Basis für neue Einsatzmöglichkeiten, was das therapeutische Handeln bei Krankheiten mit vergleichbarer Aktivität, wie der reaktiven Arthritis, betrifft [33]. Allerdings konnte die Pathogenese der reaktiven Arthritis noch nicht endgültig und damit auch nicht die Aufgabe von TNF- α geklärt werde. Es bleibt offen, ob dieses Zytokin den Entzündungsprozeß erhöht oder ob es bei dieser Krankheit von Nutzen ist. Könnte diese Frage geklärt werden, wäre der Weg frei für die Anwendung eines entsprechenden Medikamentes. Die Beobachtung des Verhaltens des Transkriptionsfaktors NF- κ B wurde aus diesem Grunde als wichtig betrachtet, denn dieser steht bekanntlich mit der Produktion von TNF- α in enger Verbindung.

Gibt es weitere Mechanismen der Pathogenese der reaktiven Arthritis?

Da die reaktive Arthritis als Folge von Infektionen verschiedener Erreger auftritt, kann nicht ein Konzept auf alle übertragen werden. Einen Hinweis dafür, dass nicht NF- κ B alleine die Pathogenese kontrolliert, sind Versuche mit dem apathogenen Yersinienstamm y-108c, der mit dem Modell nicht vollständig zu vereinbaren ist, da

auch dieser NF- κ B in Synovialzellen, dem pathogenen Stamm y-108p (*Yersinia enterocolitica* O.3) zeitlich vergleichbar, aktiviert, aber in vivo nicht die Virulenzfaktoren besitzt, eine reaktive Arthritis hervorzurufen.

Es werden mit unterschiedlichen für die reaktive Arthritis pathogenen Bakterien verschiedene krankheitsauslösende Mechanismen diskutiert, die alle als Ergebnis die selbe Krankheit auslösen. Vermutlich hat jedes dieser Bakterien spezielle Pathogenitätsfaktoren, die alle in die gemeinsame Endstrecke der klinischen Manifestation der reaktiven Arthritis einmünden [70].

5. Zusammenfassung

Als Beitrag zur Pathogenese der reaktiven Arthritis wurde die Aktivierung von NF- κ B durch gram-negative Bakterien untersucht. Mittelpunkt dieser Arbeit war die Beobachtung, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Synovialzellen nach Infektion stimuliert wird. Die Erkrankung steht im klinischen Zusammenhang mit einer Infektion durch gram-negative Darmbakterien und weiteren Erregern. TNF- α spielt eine wichtige Rolle bei der Erregerantwort der infizierten Zellen, in welchen erhöhte TNF- α -Titer gemessen wurden. Das bekannte Mitwirken von NF- κ B in immunologischen Prozessen ließ vermuten, dass dieser Transkriptionsfaktor an der Pathogenese der reaktiven Arthritis beteiligt ist. Dies steht in engem Zusammenhang mit der Induktion von TNF- α , ein Zytokin, das gleichzeitig ein wichtiger Induktor von NF- κ B darstellt. In unseren Experimenten wurde ein Unterschied zwischen apathogenen und pathogenen Keimen in der zeitlichen Aktivierung von NF- κ B beobachtet. Die Vertreter pathogener Erreger waren *Yersinia enterocolitica* O.3 und *Salmonella enteritidis*. Diese induzierten NF- κ B zwischen 4 und 6 Stunden post infectionem, im Unterschied zu dem apathogenen Bakterium *Escherichia coli*, das den Transkriptionsfaktor schon nach 1 - 2 Stunden induzierte. Als Folge dieser Differenz könnte die Immunantwort der Zelle zu unterschiedlichen Reaktionen in der Lage sein und die Erreger abtöten oder eine Persistenz zulassen. Zusätzlich wurde das Augenmerk auf die einzelnen Zellbestandteile oder –produkte gelenkt. Im Vergleich zu intakten Bakterien wurde die Wirkung des Überstandes und die von UV-inaktivierten Keimen untersucht. Die Induktionsstärke war bei unbehandelten Erregern am größten und fiel dann bei UV-inaktivierten Bakterien deutlich ab. Ein weiteres Abfallen der Aktivierung war bei der Infektion mit dem bloßen Überstand zu verzeichnen.

Mit diesen Ergebnissen wurde deutlich, dass NF- κ B bei der Etablierung der reaktiven Arthritis eine Rolle spielen könnte. Noch bleibt offen, in welcher Art der Transkriptionsfaktor in die intrazellulären Prozesse eingreift und welche medikamentösen Behandlungsmöglichkeiten sich daraus ergeben könnten.

6. Literaturverzeichnis

1. Abreu-Martin M.T., Vidrich A., Lynch M.T., Targan S.R. Divergent induction of apoptosis and IL 8 secretion in HT 29 cells in response to TNF- α and ligation of Fas antigen. *J Immunol* 1995; 155:4147-4154
2. Aho K., Ahvonen P., Lassus A., Sievers K., Tillikainen A. HLA antigen 27 and reactive arthritis. *Lancet* 1973;ii:57-61
3. Aho K., Ahoven P., Lassus A., Sievers K., Tiilikainen A. HLA B27 in reactive arthritis. A study of Yersinia arthritis and Reiter`s disease. *Arthritis Rheum* 1974; 17:521-526
4. Ahvonen P., Sievers K., Aho K. Arthritis associated with Yersinia enterocolitica infection. *Acta Rheum Scand* 1969;15:232-53
5. Albertella M., Campbell R.D. Characterization of a novel gene in the human major histocompatibility complex that encodes potential new member of the I κ B family of proteins. *Human Mol Gen* 1994; 3:793-799
6. Aupperle K.R., Brydon L., Bennett D.L., Boyle P.P., Tak A.M., Mannig G.S., Firestein. NF- κ B Regulation by I κ B Kinase in Primary Fibroblast-Like Synoviocytes. *J Immunol* 1999; 163:427-433
7. Autenrieth I.B., Heesemann J. In vivo neutralization of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma abrogates resistance to Yersinia enterocolitica infection in mice. *Med Microbiol Immunol* 1992; 181:333-338
8. Autenrieth I.B., Tingle A., Reske-Kunz A., Heesemann J. T-lymphocytes mediate protection against Yersinia enterocolitica in mice: characterisation of murine T-cell clones specific for Yersinia enterocolitica. *Infect Immun* 1992; 60:1140-1149

9. Baeuerle P.A. 1991. The inducible transcription activator NF κ B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim. Biophys. Acta* 1991; 1072(1):63-80
10. Baeurle P.A., Baichwal V.R. NF κ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol* 1997; 65:111-137
11. Baeuerle P., Baltimore D. I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science* 1988; 242:540-546
12. Baeuerle P., Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:141-179
13. Baldwin A.S. Jr. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev Immunol* 1996; 14:649-681
14. Beg A.A., Baltimore D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* 1996; 274:782-784
15. Braun J., Yin Z., Spiller S., Siegert S., Rudwaleit M., Liu L., et al. Low secretion of tumor necrosis factors α , but no other Th1 or Th2 cytokines, by peripheral blood mononuclear cells correlates with chronicity in reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42:2039-2044
16. Brewerton D.A., Caffrey M.F.P., Nicholls A., Walters D., Oates J.K., James D.C. Reiter`s disease and HL-A 27. *Lancet* 1973; ii:996-998
17. Brewerton D.A., Hart F.D., Nicholls A., Chaffrey M., James D.C., Sturrock R.D. Ankylosing spondylitis and HL-A 27 . *Lancet* 1973; i:904-907
18. Burmester G.R., Daser A., Kamradt T., Krause A., Mitchison N.A., Sieper J., Wolf N. Immunology of reactive arthritis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:229-250

19. Camussi G., Lupia E. The future role of anti-tumour necrosis factor (TNF) products in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drugs* 1998; 55 (5):613-620
20. Chen C.C., Rosenbloom C.L., Anderson D.C., Manning A.M. Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I κ B- α phosphorylation. *J Immunol* 1995;155:3538-3545
21. Collins T., Read M.A., Neish A.S., Whitley M.Z., Thanos D., Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules : NF- κ B and Zytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995;9:899-909
22. Devenish J.A. Schiemann D.A. HeLa cell infection by *Yersinia enterocolitica*: evidence for lack of intracellular multiplication and development of a new procedure for quantitative expression of infectivity. *Infect Immun* 1981; 32(1):48-55
23. Dinarello C.A. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118(2):503-508
24. Dougados M., van der Linden S., Juhlin R., Huitfeldt B., Amor B., Calin A., et al. The European spondyloarthritis study group preliminary criteria for the classification of spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 1991; 34:1218-1227
25. Elewaut D., DiDonato J.A., Jung Mogg Kim Truong F., Eckmann L., Kagnoff M.F. NF- κ B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immun response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J Immun* 1999; 163:1457-1466
26. Feldmann M., Brennan F.M., Maini R.N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 1999; 38 Suppl 2:2-7
27. Firestein G.S., Manning A.M. Signal transduction and transcription factors in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1999; 42:609-621

28. Fujisawa K., Aono H., Hasunuma T., Yamamoto K., Mita S., Nishioka K. Activation of transcription factor NF- κ B in human synovial cells in response to tumor necrosis factor α . *Arthritis Rheum* 1996; 39:197-203
29. Gosh G., Van Duyne G., Gosh S., Sigler P. Structure of NF- κ B p50 homodimer bound to a κ Bsite. *Nature* 1995; 373:303-310
30. Granfors K., Jalkanen S., Heino R., Merilahti-Palo R., Saario R., Isomaki H., Toivanen A. Yersinia antigens in synovial fluid cells from patients with reactive arthritis. *N Engl J Med* 1989; 320:216-221
31. Granfors K., Merilahti-Palo R., Luukkainen R., Möttönen T., Lahesmaa R., Probst B., Märker-Hermann E., Toivanen P. Persistence of Yersinia antigens in peripheral blood cells from patients of Yersinia enterocolitica 0:3 infection with or without reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41:855-862
32. Gripenberg-Lerche C., Skurnik M., Zhang L., Söderström K.O., Toivanen P. Role of YadA in arthritogenicity of Yersinia enterocolitica serotype O:8: experimental studies with rats. *Infect Immun* 1994; 62:5568-5575
33. Hamilton K., Clair E.W. Tumor necrosis factor-alpha blockade: a new era for effective management of rheumatoid arthritis. *Expert Opin Pharmacother* 2000; 1(5): 1041-1052
34. Hammer M., Zeidler H., Klimsa S., Heesemann J. Yersinia enterocolitica in the synovial membrane of patients with yersinia-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33:1795-1800
35. Heesemann J., Laufs R. Double immunofluorescence microscopic technique for accurate differentiation of extracellular and intracellular located bacteria in cell culture. *J Clin Microbiol* 1985; 22:168-175

36. Heesemann J., Gaede K., Autenrieth, I.B. Experimental yersinia enterocolitica infection in rodents: a model for human yersiniosis. *APMIS* 1993; 101(6):417-429
37. Hermann E., Yu D.T.Y., Meyer zum Büschenfelde K.H., Fleischer B. HLA B27-restricted T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet* 1993; 342:646-650
38. Hiscott J., Marois J., Garoufalos J., D'Addario M., Roulston A., Kwan I., et al. Characterization of a functional NF- κ B site in the human Interleukin-1 β promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol* 1993; 13:6231-6240
39. Huppertz H.I., Heesemann J. The influence of HLA B27 and interferon-gamma on the invasion and persistence of yersinia in primary human fibroblasts. *Med Microbiol Immunol* 1996; 185:163-170
40. Huppertz H.I., Heesemann J. Effect of Zytokines on invasion and survival of Yersinia in primary human fibroblasts. *Med Microbiol Immunol* 1999; 187:157-164
41. Huppertz H.I., Heesemann J. Invasion and persistence of Salmonella in human fibroblasts positive or negative for endogenous HLA B27. *Ann Rheum Dis* 1997; 56(11):671-676
42. Huppertz H.I., Heesemann J. Experimental Yersinia infection of human synovial cells: persistence of live bacteria and generation of bacterial antigen deposits including „ghosts“, nucleic acid-free bacterial rods. *Infect Immun* 1996; 64:1484-1487
43. Huppertz H.I., Chantler J.K. Restricted mumps virus infection of cells derived from normal human joint tissue. *J Gen Virol* 1991; 72:339-347
44. Jones R.E., Moreland L.W. Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis. *Bull Rheum Dis* 1999; 48 (3):1-4

45. Jung H.C., Eckmann L., Yang S.K., Panja A., Fierer J., Morzycka-Wroblewska E., Kagnoff M.F. A distinct array of proinflammatory Zytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *Infect Immun* 1993; 61:4569-4574
46. Kavanaugh A., St Clair E.W., McCune W.J., Braakman T., Lipsky P. Chimeric anti-tumor necrosis factor- α monoclonal antibody treatment of patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate therapy. *J Rheumatol* 2000; 27 (4):841-850
47. Kim J. M., Eckmann L., Savidge T. C., Loure D. C., Witthof T., Kagnoff M. F. Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacteria invasion. *J Clin Invest* 1998; 102: 1815-1823
48. Laster S.M., Wood J.G., Gooding C.R. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol* 1988; 141:2629-2635
49. Leirisalo-Repo M., Suoranta H. Ten years follow-up study of patients with yersinia arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31:533-537
50. Lovell D.J., Giannini E.H., Reiff A., Cawkwell G.D., Silverman E.D., Nocton J.J., Stein L.D., Gedalia A., Ilowite N.T., Wallace C.A., Whitmore J., Finck B.K. Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000; 342(11):810-811
51. Makarov S.S., Johnston W.N., Olsen J.C., Watson J.M., Mondal K., Rinehart C., Haskill. NF- κ B as a target for anti-inflammatory gene therapy: suppression of inflammatory responses in monocytic and stromal cells by stable gene transfer of I κ B α cDNA. *Gene Ther* 1997; 4 (8):846-852
52. Manning A.M., Anderson D.C. Transcription factor NF- κ B: an emerging regulator of inflammation. *Ann Rev Med Chem* 1994; 29:235-244

53. Merilahti-Palo R., Söderström K.O., Lahesmaa-Rantala R., Granfors K., Toivanen A. Bacterial antigens in synovial biopsy specimens in yersinia triggered reactive arthritis. *Ann Rheum Dis* 1991; 50:87-90
54. Neumann M., Marienfeld R., Serfling E. Rel/NF- κ B transcription factors and cancer: Oncogenesis by dysregulated transcription (Review). *International J Oncology* 1997; 11:1335-1347
55. Nikkari S., Möltönen T., Saario R., et al. Detection of Salmonella DNA in synovial fluid in reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 1996; Suppl 39:S18
56. Priem S., Franz J., Krause A. Ätiologie und Pathogenese bakteriell bedingter Arthritiden. *Internist (Berl)* 1999; 42(9):1889-93
57. Ray P., Zhang D.H., Elias J., Ray A. Cloning a differentially expressed I κ B-related protein. *J Biol Chem* 1995; 270:10,680-685
58. Ringrose J.H. HLA B27 associated spondyloarthritis, an autoimmune disease based on crossreactivity between bacteria and HLA B27? *Ann Rheum Dis* 1999; 58(10):598-610
59. Rook G.A., Taverne W., Playfair J.H.L. Evaluation of TNF as antiviral, antibacterial and anti-parasitic agent. *Biotherapy (Dordrecht)* 1991; 3:167-175
60. Ruckdeschel K., Harb S., Roggenkamp A., Hornef M., Zumbühl R., Köhler S., Heesemann J., Rouot B. *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF- κ B: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor α production. *J Exp Med* 1998; 7 (6):1069-1079

61. Ruckdeschel K., Roggenkamp A., Lafont V., Mangeat P., Heesemann J., Rouot B. Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophages cell death through apoptosis. *Infect Immun* 1997; 65:4813-4821
62. Ruggiero V., Latham K., Baghioni C. Cytostatic and cytotoxic activity of tumor necrosis factor on human cancer cells. *J Immunol* 1987; 138:2711-2717
63. Sen R., Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 46:705-716
64. Sen R., Baltimore D. Inducibility of immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a post translational mechanism. *Cell* 1986; 47:921-928
65. Schlaak J.F., Schwaring A., Knolle P., Meyer zum Büschenfelde K.H., Mayet W. Effects of Th1 and Th2 Zytokine on production and ICAM-1 expression on synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 1995; 54:560-565
66. Schumacher H.R. Jr., Magge S., Cherian P.V., Sleckman J., Rothfuss S., Clayburne G., Sieck M. Light and electron microscopic studies on the synovial membrane in Reiter's syndrome: immunocytochemical identification of chlamydial antigen in patients with early disease. *Arthritis Rheum* 1988; 31:937-946
67. Schwimmbeck P.L., Oldstone M.B. Autoimmune pathogenesis for ankylosing spondylitis (AS) and Reiter's syndrome (RS): autoantibodies against an epitope shared by HLA B27 and *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase in sera of HLA B27 patients with AS and RS. *Trans Assoc Am Phys* 1987;100:28-39
68. Siebenlist U., Franzoso G., Brown K. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10:405-455

69. Sieper J., Braun J. Pathogenesis of spondyloarthropathies. Persistent bacterial antigen, autoimmunity, or both? *Arthritis Rheum* 1995; 35:1547-1554
70. Sieper J., Braun J., Kingsley G.H. Report on the fourth international workshop on reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(4): 720-734
71. Sugeran B.J., Aggarwal B.B., Hass P.E., Figary I.E. Palladino M.A., Shepard H.M. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 1985; 230:943-945
72. Taylor-Robinson D., Gilroy C.B., Thomas B.J., et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* DNA in the joints of reactive arthritis patients by polymerase chain reaction. *Lancet* 1992;340:81-82
73. Thanos D., Maniatis T. NF- κ B: a lesson in family values. *Cell* 1995; 80:529-532
74. Toivanen A, Toivanen P. Reactive Arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1997; 9:321-327
75. Valtonen V.V., Leirisalo M., Pentikainen P.J., Rasanen T., Seppala I., Larinkari U., Ranki M., Koskimies S., Malkamaki M., Makela P.H. Triggering infections in reactive arthritis. *Ann Rheum Dis* 1985; 44(6):399-405
76. Van Antwerp D.J., Martin S.J., Kafri T., Green D.R., Verma I.M. Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 1996; 274:787-789
77. Viitanen A. M., Arstila P., Sahesmaa R., Granfors K., Skurnik M., Toivanen P. Application of the polymerase chain reaction and immunofluorescence techniques to the detection of bacteria in yersinia-triggered reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 1991; 34:89-96
78. Wang C.Y., Mayo M.W., Baldwin A.S. Jr. TNF- α and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science* 1996; 274:784-787

79. Wuorela M., Granfors K. Infectious agents as trigger of reactive arthritis. *Am J Med Sci* 1998; 316(4):264-270
80. Ziegler-Heitbrock H.W.L, Sternsdorf T., Liese T., Belohradsky B., Weber C., Wedel A., et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits NF- κ B mobilization and TNF production in human monocytes. *J Immunol* 1993;151:6986-6993
81. Zychlinsky A., Sansonetti P. Apoptosis in Bacterial Pathogenesis. *J Clin Invest* 1997; 100 (3):493-496

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Hans-Iko Huppertz möchte ich nicht nur dafür danken, dass er mir die Arbeit in seinem Labor überhaupt erst ermöglichte, sondern vor allem dafür, dass er auch trotz der Entfernung Würzburg-Bremen noch die Zeit und das Interesse fand, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Almut Meyer-Bahlburg, die in mir die Begeisterung für die Arbeit im Labor weckte und die auch in schwierigen Zeiten der Methodendurchführung nie den Glauben an dieses Projekt und vor allem nicht an mich verlor.

Herrn Prof. Dr. Edgar Serfling sowie Herrn Dr. Ralf Marienfeld und den Mitarbeitern ihrer Arbeitsgruppe gebührt mein ausdrücklicher Dank für die freundliche Aufnahme in ihr Labor, die fachkräftige Unterstützung beim Erlernen einer neuen Methode und damit das Bieten der Möglichkeit, die Arbeit fertig stellen zu können. Herrn Prof. Dr. Edgar Serfling möchte ich weiterhin meinen Dank bekunden für eine ausführliche und lehrreiche Korrektur der Arbeit.

Frau Martina Stocker danke ich für ein stets offenes Ohr für Fragen was das Technische im Labor betraf, auch noch nach ihrem Wechsel in die Nachbarsarbeitsgruppe.

Des weiteren möchte ich mich bei Frau Christine Basler in Paris bedanken, die es schaffte, aus dem großen Wirrwarr an „Schwarzen Punkten“ wie sie es nannte, ordentliche Abbildungen von Westernblots einzuscannen und mich in die Kunst der Bildbearbeitung am Computer einführte.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, die stets daran glaubten, dass die experimentellen Versuche ihrer Tochter im Labor zu einem Ergebnis führen würden.

Meine Freunde nicht zu vergessen, die sich geduldig und höflich immer wieder die Tücken der Materie erzählen lassen mussten und gerade durch ihr Nicht-Beteiligt-Sein meinen Horizont für die Sache zu erweitern wussten.

CURRICULUM VITAE

Name, Vorname: Greil Sabine

Geburtsdatum: 22.10.1973 in Kaufbeuren

Schulbildung

1980 – 1984 Grundschule Bernau am Chiemsee

1984 – 1993 Ludwig-Thoma-Gymnasium in Prien am Chiemsee

Hochschulausbildung

1993 – 1995 Studium der Kommunikationswissenschaften mit BWL und Spanisch

1995 - 2001 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität in
Würzburg

Examina

1997 Ärztliche Vorprüfung

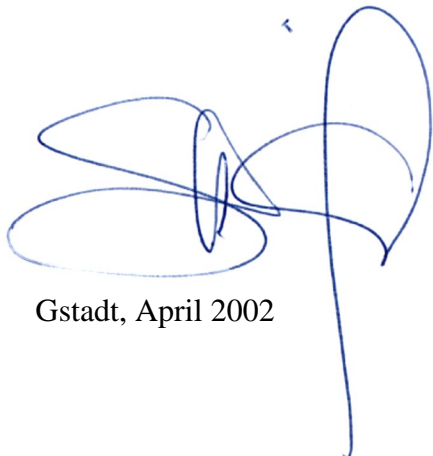
1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufspraxis

Seit Dezember 2001 Tätigkeit als Ärztin im Praktikum in der Kinderklinik Rosenheim,
Lehrkrankenhaus der LMU München

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a long vertical stroke extending downwards.

Gstadt, April 2002

