

Aus der Klinik für Infektiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Nod1 vermittelt die Endothelzellaktivierung bei Infektion durch
*L. monocytogenes***

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anja Püschel

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. B. Opitz
 2. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. H. Heine
 3. Prof. Dr. rer. nat. C. Kirschning

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	9
1.1. Das Immunsystem	9
1.1.1. Das angeborene Immunsystem	9
1.1.2. Das erworbene Immunsystem	10
1.2. Pathogen-assoziierte molekulare Muster	11
1.3. Mustererkennende Rezeptoren	12
1.3.1. Toll-like Rezeptoren (TLRs)	13
1.3.2. NOD-like Rezeptoren (NLRs)	14
1.3.3. RIG-like Helikasen (RLGs)	17
1.4. Die intrazelluläre Signaltransduktion	17
1.4.1. Der TLR-Signalweg	17
1.4.2. Der Nod1- und Nod2-Signalweg	19
1.4.3. Der NF- κ B-Signalweg	19
1.4.4. Der MAPK-Signalweg	21
1.5. <i>L. monocytogenes</i>	23
1.5.1. Virulenzfaktoren	23
1.5.2. <i>L. monocytogenes</i> und Endothelzellen	26
1.6. Aufgabenstellung	27
2. MATERIAL UND METHODEN	29
2.1. Bakterien	29
2.1.1. Bakterienkultur/Infektion	29
2.1.2. Herstellung hitzeinaktiver Bakterien	29
2.2. DNA-Präparation	30
2.3. HUVEC-Infektionsexperimente	30
2.3.1. Isolation von HUVEC	30
2.3.2. Nucleofektion mit siRNA	31
2.3.3. Infektion von HUVEC	32
2.3.4. Konfokalmikroskopie	33
2.3.5. Invasionsassay	33

2.3.6. Interleukin-8 ELISA	33
2.3.7. Gel-Elektrophorese und Western-Blot	34
2.3.8. Reverse Transkription/Polymerasekettenreaktion	36
2.4. HEK293 – Überexpressionsexperimente	37
2.4.1. Zellkultur und Transfektion der HEK293-Zellen	37
2.4.2. Infektion der HEK293-Zellen	37
2.4.3. β -Galaktosidase- und Luciferase-Bestimmung	37
2.4.4. Versuche mit p38-MAPK-Inhibitor	38
2.4.5. Untersuchung der p38-MAPK-Phosphorylierung mit Western-Blot	38
2.5. Statistische Auswertung und benutzte Software	38
3. ERGEBNISSE	39
3.1. Zytoplasmatische <i>L. monocytogenes</i> induzieren die IL-8-Produktion in humanen Endothelzellen	39
3.2. Die Bedeutung von Nod1, Nod2 und TLR2 für die IL-8-Produktion durch Listerien-infizierte Endothelzellen	41
3.3. Die Aktivierung von NF-κB durch <i>L. monocytogenes</i> in HEK293-Zellen erfolgt abhängig von Nod1	45
3.4. <i>L. monocytogenes</i> aktiviert Nod1-abhängig die p38-MAPK	47
3.5. Die durch <i>L. monocytogenes</i> und Nod1-induzierte IL-8-Produktion wird durch p38 –MAPK vermittelt	49
4. DISKUSSION	51
4.1. <i>L. monocytogenes</i> aktiviert humane Endothelzellen	52
4.2. Die Rolle von Nod1 für die <i>L. monocytogenes</i> abhängige Zellaktivierung	52
4.2.1. NF- κ B- und Zytokinproduktion	53
4.2.2. P38-MAPK-Aktivierung	54
4.3. Die Rolle der Toll-like Rezeptoren	56
4.4. Interaktionen zwischen NLRs und TLRs	58
4.5. Die Rolle von LLO	60
4.6. Schlussfolgerung und Ausblick	62

5. ZUSAMMENFASSUNG	65
6. LITERATURVERZEICHNIS	66
7. ANHANG	83
7.1. Danksagung	83
7.2. Lebenslauf	84
7.3. Eidesstattliche Erklärung	85

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Aktivatorprotein-1
BIR	baclovirus inhibitor of apoptosis repeater
BMDM	„bone-marrow derived macrophages“
CARD	Caspase-aktivierende Rekrutierungsdomäne
CD	cluster of differentiation
CFU	„colony forming units“
COX-2	Cyclooxygenase-2
CREB	„cAMP-response element-binding protein“
CRP	C-reaktives Protein
DAMP	danger-associated molecular pattern
DAP	Diaminopimelinsäure
DC	dendritische Zellen
dn	dominant-negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
ELISA	„enzyme-linked immunosorbend assay
ERBIN	ErbB2-interagierendes Protein
ERK	„extracellular regulated signal-kinase“
FCS	„fetal calf serum“
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	„granulocyte-monocyte colony-stimulating factor“
h	human
HEK293	„human embryonic kidney cells“
Hsp	Hitzeschockprotein
HUVEC	Humane Umbilikalvenenendothelzellen
IFN	Interferon
IκB	„inhibitory κB“
IKK	„inhibitory κB-kinase“
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IPAF	ICE-Protease aktivierender Faktor

IRAK	IL-1R-assozierte Kinase
IRF3	Interferon regulierender Faktor 3
JNK	c-Jun NH ₂ -terminale Kinase
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
MAPK	„mitogen activated protein kinase“
MAPKK	„MAPK-kinase“
MAPKKK	„MAPKK-kinase“
MASP	MBL-assozierte Proteinkinasen
MBL	Mannan-bindendes Lektin
MCP-1	Monocyten chemotaktisches Protein 1
MDA5	Melanom Differenzierung-assoziertes Gen 5
MDP	Muramyldipeptid
MOI	„multiplicity of infection“
MMR	Makrophagen Mannoserezeptor
MSR	Makrophagen Scavengerrezeptor
MyD88	„myeloid differentiation protein 88“
NAIP	NLR-Familie Apoptose-inhibierendes Protein
NBS-LRR	nucleotid binding site leucine rich repeats
NEMO	NF-κB-essentieller Modulator
NOD	nucleotid binding oligomerization domain
NLR	NOD-like receptor
NF-κB	„nuclear factor κB“
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PGN	Peptidoglykan
PI3-kinase	Phosphoinositid-3 kinase
PRR	pattern recognition receptor
RHD	Rel-homologie-Domäne
RIG-I	Retinoidsäure induzierbares Gen
Rip2	Rezeptor-interagierendes Protein2
ROI	reactive oxygen intermediates
RNA	Ribonukleinsäure
SAP	Serum Amyloid P

siRNA	short-interfering RNA
SOCS	suppressor of cytokine signalling protein
Stat1	„signal transducer and activator of transcription 1“
TAK1	TGF β -aktivierte Kinase 1
TIR	Toll/IL-1R-Domäne
TIRAP	Toll/IL-1R-Domäne enthaltendes Adapterprotein
TNF α	Tumor Nekrosefaktor α
TOLLIP	Toll-interaktierendes Protein
TRAF6	„TNF-receptor associated factor“
TRIF	TIR-Domäne enthaltender Interferon β -induzierender Adapter

1. EINLEITUNG

1.1. Das Immunsystem

Mehrzellige Organismen sind einer Vielzahl von Pathogenen, wie Bakterien, Viren und Pilzen ausgesetzt. Sie haben deswegen Mechanismen entwickelt, mikrobielle Eindringlinge frühzeitig zu erkennen und abzuwehren. So haben sich im Lauf der Evolution zwei verschiedene, aber dennoch eng verknüpfte Systeme herausgebildet: die angeborene („innate“) und die erworbene („adaptive“) Immunität (Medzhitov and Janeway, 2000a). Das phylogenetisch ältere angeborene Immunsystem ist in allen vielzelligen Organismen zu finden und stellt dort häufig den einzigen Schutz gegen Infektionen dar. Darüber hinaus hat sich vor 500 Millionen Jahren in Wirbeltieren noch ein zusätzlicher Abwehrmechanismus entwickelt: das adaptive Immunsystem (Medzhitov and Janeway, 2000b). Beide Formen der Abwehr unterscheiden sich in den Mechanismen und Rezeptoren der Pathogenerkennung. Für eine suffiziente erworbene Immunantwort sind immer Signale des angeborenen Immunsystems von Nöten. Es bestehen jedoch z.T. Gemeinsamkeiten in manchen Effektormechanismen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems.

1.1.1. Das angeborene Immunsystem

Mechanismen zum Schutz vor dem Eindringen potentiell pathogener Erreger stellen die Körperoberfläche als mechanische Barriere sowie in Körperflüssigkeiten enthaltene antimikrobielle Substanzen, z.B. Lysozym, dar. Erfolgt dennoch eine Infektion, tritt das angeborene Immunsystem in Erscheinung. Es liegt allen inflammatorischen Zellantworten zu Grunde, tritt sofort in Aktion und ist nicht auf eine vorherige Pathogenexposition des Wirts angewiesen (Medzhitov and Janeway, 2000a).

Die angeborene Immunantwort erkennt konservierte mikrobielle Moleküle, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster („pathogen-associated molecular pattern“, PAMP) (Medzhitov and Janeway, 2000a). Diese werden von Mikroorganismen exprimiert und ermöglichen es damit dem angeborenen Immunsystem zwischen „eigen“ und „fremd“ zu unterscheiden. PAMPs sind zumeist essentiell für das Überleben oder die Pathogenität des Erregers (Medzhitov, 2001). Darüber hinaus wird in letzter Zeit über die Existenz und Bedeutung von endogenen Molekülen, sogenannten „Gefahr-assoziierten molekularen Mustern“ („danger associated molecular pattern“, DAMP), diskutiert, die unter bestimmten

pathologischen Bedingungen ebenfalls das angeborene Immunsystem aktivieren können (Karin *et al.*, 2006).

Die PAMPs unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Mikroorganismen nur relativ wenig, so dass nur eine relativ geringe Anzahl an PAMP-erkennenden Rezeptoren nötig ist, um eine Vielzahl von unterschiedlichen Mikroorganismen zu detektieren. Diese Rezeptoren sind in der Keimbahn kodiert und werden mustererkennende Rezeptoren („pattern recognition receptor“, PRR) genannt. Sie haben sich im Laufe der Evolution durch natürliche Selektion herausgebildet und werden sowohl von klassischen Immunzellen als auch von fast allen anderen Körperzellen, wie z.B. Endothel- oder Epithelzellen, exprimiert (Medzhitov and Janeway, 2000a).

Die Erkennung von PAMPs durch PRRs kontrolliert Effektormechanismen der angeborenen Abwehr sowie die nachfolgende erworbene Abwehr. Wesentliche solcher Effektormechanismen sind die Induktion von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden. Dem folgt u.a. die Rekrutierung von Neutrophilen sowie die Induktion zellautonomer Abwehrmechanismen, wie z.B. die Freisetzung von NO und ROIs. Die erworbene Immunität wird u.a. durch die Induktion kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen kontrolliert. Diese Oberflächenmoleküle sind zusammen mit der Antigenpräsentation auf MHCII-Molekülen notwendig, um naive CD4- und CD8-T-Lymphozyten zu aktivieren. All diese Mechanismen zeichnen sich durch einen bestimmten Grad an Spezifität aus. So induzieren virale oder bakterielle PAMPs zum Teil verschiedene Effektormechanismen. Beispielsweise bewirkt die Erkennung viraler PAMPs, aber nicht die aller bakterieller PAMPs, eine Typ-I-IFN-Antwort (Medzhitov, 2001).

1.1.2. Das erworbene Immunsystem

Die erworbene Immunantwort basiert auf dem Vorhandensein einer großen Vielfalt von Antigenrezeptoren, die auf zwei Zellpopulationen der hämatopoetischen Linie verteilt sind: den T- und B-Lymphozyten (Medzhitov and Janeway, 2000a). Jeder Lymphozyt besitzt einen strukturell einzigartigen Rezeptor, der zufällig während der Entwicklung der Zellen generiert wurde. Er setzt sich aus einer konstanten und einer variablen Region zusammen, wobei letztere für die Spezifität verantwortlich ist. Die Gene für die variable Region werden als Gruppen von Gensegmenten (V-, D- und J-Segmente) weitergegeben, und diese werden dann in den einzelnen Lymphozyten zu unterschiedlichsten DNA-Sequenzen zusammengesetzt - ein Vorgang, der als somatische Rekombination bezeichnet wird. Dadurch steht dem Menschen ein Repertoire von etwa 10^{11} verschiedenen Antigenrezeptoren zur Verfügung (Janeway, 2005). Wenn es zu einer

Erkennung eines spezifischen Antigens durch einen Antigenrezeptor kommt und zusätzliche durch PAMP-PRR-Erkennung bedingte Signale hinzukommen, z.B. die Expression kostimulatorischer Signale, dann folgt die klonale Expansion der rezeptortragenden Zellen mit der entsprechenden Spezifität (Medzhitov, 2001). Durch eine negative Selektion sowie durch die Notwendigkeit eines zweiten, durch eine PAMP-PRR-abhängige Induktion kostimulatorischer Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen generierten Signals, wird normalerweise sichergestellt, dass das erworbene Immunsystem nur gegen infektiöse Pathogenen und nicht gegen körpereigene Strukturen gerichtet ist (Medzhitov and Janeway, 2000a). Schlagen diese Mechanismen fehl, kann es u.a. zu dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen kommen.

Der Vorteil der adaptiven Immunantwort liegt u.a. in der Erkennung sehr spezifischer Strukturen eines Pathogens sowie der Generierung von T- und B-Gedächtniszellen. Diese gewährleisten einen effektiven und langfristigen Schutz, da so auf eine Reinfektion mit demselben Pathogen schneller und stärker reagiert werden kann. Die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses ist allerdings an das jeweilige Individuum gebunden, da die Rezeptoren nicht in der Keimbahn kodiert sind und dementsprechend nicht an die nächste Generation weitergegeben werden können (Medzhitov and Janeway, 2000a). Die adaptive Immunreaktion hat jedoch zwei Einschränkungen. Zum einen sind die zufällig generierten Rezeptoren nicht in der Lage, den Ursprung und den biologischen Zusammenhang der für sie bestimmten Signale zu bestimmen, d.h. dass die selbst-nicht-selbst-Unterscheidung im strengen Sinne nicht oder nur unzureichend funktioniert. Des Weiteren tritt die erworbene Immunantwort erst verzögert in Kraft, da die Expansion sowie die Differenzierung in Effektorzellen Zeit benötigen. Die so entstehende Verzögerung von etwa 4 bis 7 Tagen bei Erstkontakt mit dem Antigen kann durch die angeborene Immunreaktion überbrückt werden (Medzhitov, 2001).

1.2. Pathogen-assoziierte molekulare Muster

Pathogen-assoziierte molekulare Muster sind konservierte Strukturen, die in einer Vielzahl von Mikroorganismen vorkommen. Zu ihnen gehören u.a. Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykan (PGN), Lipoteichonsäure (LTA), Flagellin und bakterielle sowie virale Nukleinsäuren (Akira *et al.*, 2006). Bakterien können entsprechend ihrer Zellwandstruktur in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: Gram-positiv und Gram-negativ. Charakteristischer Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien ist LPS, eines der potentesten bakteriellen Immunstimuli. Eine LPS-

Fraktion, das *LipidA*, verursacht den Endotoxinschock nach Infektionen mit Gram-negativen Erregern (Munford, 2006). Gram-positve Bakterien enthalten kein LPS, jedoch LTAs sowie Peptidoglykan, welche auf ähnliche Weise als PAMPs das Immunsystem stimulieren können (Akira *et al.*, 2006).

Peptidoglykan ist Bestandteil nahezu aller Bakterien. Es setzt sich aus langen Glykanketten, bestehend aus alternierend β -1,4-verbundener N-Acetylglucosamin- (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) zusammen. Diese sind durch kurze Peptide vernetzt, so dass ein starres Polymer entsteht, welches die bakterielle Zelle umgibt (Boneca *et al.*, 2007). Das Peptidoglykan von Gram-positiven und –negativen Bakterien unterscheidet sich in der Dicke sowie in der dritten Aminosäure der Peptide. So findet sich bei Gram-positiven Bakterien an dieser Stelle Lysin, während bei Gram-negativen hier Diaminopimelinsäure (DAP) enthalten ist. Ausnahmen bilden z.B. die Gram-positiven Bakterien *L. monocytogenes* und *Bacillus subtilis*, welche an dieser Position ebenfalls DAP enthalten (Chamaillard *et al.*, 2003b). Während des Lebens- und Entwicklungszyklus der Bakterien wird Peptidoglykan ständig durch Hydrolasen, wie z.B. Muraminidasen (bakterielles Autolysin), Lysozym sowie Amidasen abgebaut, und neu synthetisierte Untereinheiten werden eingefügt, um biologische Prozesse wie Zellteilung zu ermöglichen (Girardin *et al.*, 2003c).

1. 3. Mustererkennende Rezeptoren

PRRs sind eine heterogene Gruppe von Proteinen (Akira *et al.*, 2006). Sie befinden sich auf der Zelloberfläche (die meisten Toll-like Rezeptoren [TLR], Makrophagen Mannoserezeptor [MMR], Makrophagen Scavengerrezeptor [MSR]), in intrazellulären Kompartimenten (NOD-like Rezeptoren [NLRs], RIG-like Helikasen) oder werden in das Blut oder die Gewebsflüssigkeit sezerniert (Mannan-bindendes Lektin [MBL], C-reaktives Protein [CRP], Serum-Amyloid P [SAP]) (Janeway and Medzhitov, 2002).

Bei den MMR und MSR handelt es sich um Phagozytose-induzierende Rezeptoren an der Oberfläche von Makrophagen. CRP und SAP sind von der Leber sezernierte Akute Phase Proteine, die zum einen als Aktivatoren des klassischen Wegs des Komplementsystems über Bindung an C1q fungieren, zum anderen als Opsonine nach Bindung an bakterielle Oberflächenmoleküle (Phosphorylcholine) dienen (Janeway and Medzhitov, 2002). MBL bindet

spezifisch Mannose an mikrobiellen Oberflächen und aktiviert die MBL-assoziierten Proteinkinasen (MASP), die den Lektinweg des Komplementsystems über Spaltung von C2 und C4 aktivieren (Fraser *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu diesen hier nur kurz erwähnten Rezeptorklassen handelt es sich bei den TLRs, NLRs und RLRs um Signaltransduktions-aktivierende Rezeptoren, welche nachfolgend z.B. die Expression von proinflammatorischen Genen regulieren.

1.3.1. Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Das erste Mitglied der Toll-Familie wurde in *Drosophila melanogaster* als eines der Genprodukte identifiziert, welches die dorsoventrale Axenbildung im Rahmen der Embryonalentwicklung der Fruchtfliege kontrolliert (Anderson *et al.*, 1985). Später stellte sich heraus, dass es auch eine wichtige Funktion in der Abwehr von Pilzen und Gram-positiven Bakterien erfüllt (Lemaitre *et al.*, 1997; Michel *et al.*, 2001). Nach der Identifizierung des ersten Säugetier-Homologs zu *Drosophila* Toll (Medzhitov *et al.*, 1997), später als TLR4 bezeichnet, wurden nach und nach eine Reihe von Proteinen mit struktureller Ähnlichkeit zu TLR4 entdeckt und Toll-like Rezeptoren (TLRs) genannt (Rock *et al.*, 1998). In Säugetieren spielen TLRs eine wichtige Rolle in der angeborenen Abwehr sowie der nachfolgenden Steuerung der adaptiven Immunantwort (Medzhitov, 2001).

TLRs sind transmembrane Proteine. Ihre Ligandenbindungsdomäne ist gegen das extrazelluläre Milieu (TLR1, 2, 4-6, 10) bzw. das topographisch äquivalente Lumen membranumschlossener intrazellulärer Kompartimente (TLR3, 7-9) gerichtet (Akira and Takeda, 2004). Die Ligandenbindungsdomäne der TLRs besteht aus LRRs („leucine rich repeats“), einem Konsensussequenzmotiv, das in einer Vielzahl von Proteinen unterschiedlichster Funktion vorhanden ist und hauptsächlich der Protein-Protein-Interaktion dient (Kobe and Kajava, 2001). Die zytosolische Signaldomäne ist homolog zur intrazellulären IL-1R-Domäne und wird deswegen als Toll/IL-1R(TIR)-Domäne bezeichnet (Gay and Keith, 1991). Sie kann ebenfalls als ein konserviertes Modul zur Protein-Protein Interaktion betrachtet werden und findet sich in einer großen Anzahl transmembraner und zytoplasmatischer Proteine (Aravind *et al.*, 2001).

Mittlerweile sind 10 humane und 12 murine TLR-Homologe näher charakterisiert worden (Takeda and Akira, 2005). Neben der Lokalisation unterscheiden sich die TLRs in der Ligandenspezifität, dem Expressionsmuster und der durch sie aktivierten Signaltransduktion (Janeway and Medzhitov, 2002). Für die meisten humanen TLR-Rezeptoren sind bislang Liganden identifiziert worden. TLR4 erkennt das LPS Gram-negativer Bakterien und

wahrscheinlich auch virale Proteine, das endogene Hitzeschockprotein hsp60, oxidiertes LDL sowie Fibrinogen (Akira *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2005; Poltorak *et al.*, 1998).

Bakterielle Lipoproteine und Lipoteichonsäuren werden durch TLR2, teilweise in Zusammenarbeit mit TLR1 und TLR6, detektiert (Takeuchi *et al.*, 2001; Takeuchi *et al.*, 2002). Extrazelluläres Flagellin aktiviert TLR5 (Hayashi *et al.*, 2001) und unmethylierte CpG-DNA stimuliert über TLR9 (Hemmi *et al.*, 2000). Des Weiteren werden virale dsRNA durch TLR3 (Alexopoulou *et al.*, 2001) und Einzelstrang-RNA durch TLR7/8 (Heil *et al.*, 2004) erkannt.

Die Eigenschaft einiger Rezeptoren, mehrere strukturell unterschiedliche PAMPs zu detektieren ist vermutlich auf die multimere Struktur der Extrazellulärdomänen der TLRs zurückzuführen. Des Weiteren ermöglichen die Dimerisierung einiger TLRs sowie der Einsatz von Korezeptoren, wie z.B. CD14 und CD36, eine Erweiterung des Spektrums erkannter PAMPs (Hayden *et al.*, 2006; Hoebe *et al.*, 2005). Nach Erkennung mikrobieller Pathogene aktivieren TLRs intrazelluläre Signalwege, die eine Expression z.B. von inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Typ I-IFNs bewirken. Zudem erfolgt die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle in dendritischen Zellen (DC). Diese DC-Reifung ist essentiell für die Induktion einer Pathogen-spezifischen adaptiven Immunantwort (Kawai and Akira, 2006a).

1.3.2. NOD-like Rezeptoren (NLRs)

Lange Zeit war wenig darüber bekannt, wie Wirtszellen intrazelluläre Erreger erkennen und wie sie darauf reagieren. Entscheidende Hinweise ergaben sich u.a. aus Untersuchungen des pflanzlichen Immunsystems.

Pflanzen fehlt im Gegensatz zu Wirbeltieren das erworbene Immunsystem. Ihre Immunreaktion wird u.a. durch eine große Anzahl sogenannter Resistenz(R)-Proteine vermittelt, die sie vor Viren, Bakterien, Pilzen und sogar Nematoden schützen können. Trotz eines breiten Pathogenspektrums kodieren die R-Gene lediglich 5 Proteinklassen (Dangl and Jones, 2001). Die größte Klasse umfaßt die NBS-LRR („nucleotide binding site leucine rich repeats“)-Proteine. Diese sind entweder membrangebunden oder zum Großteil im Zytoplasma lokalisiert. Die Aktivierung von R-Protein-Signalwegen bewirkt u.a. eine Änderung von Ioneneinströmen in die Zelle, die Produktion von ROIs und NO, die Aktivierung von MAP-Kinase- und anderen Proteinkinasesignalwegen sowie eine erhöhte Transkriptionsaktivität. Dies kann z.B. die Bildung antimikrobieller Peptide sowie eine Art von programmiertem Zelltod („hypersensitive response“) zur Folge haben (Dangl and Jones, 2001).

Es wurde angenommen, dass auch im Zytosol von Vertebraten ein Detektionssystem („surveillance system“) vorhanden ist, das intrazelluläre Bakterien aufspürt und eine angeborene

Immunreaktion einleitet (O'Riordan *et al.*, 2002). Besondere Bedeutung scheint hierbei den Mitgliedern der NLR-Familie zuzukommen, die als Regulatoren der inflammatorischen Antwort, z.B. auf intrazelluläre Bakterien, agieren. 23 humane und mindestens 34 murine Mitglieder dieser Proteinfamilie sind bislang identifiziert worden, wobei man zwei große Untergruppen, die NODs (Nod1-5) und die NALPs, unterscheiden kann (Abbildung 1). Zusätzlich gibt es noch die Moleküle IPAF, NAIP und CIITA (Franchi *et al.*, 2009). Gemeinsames charakteristisches Strukturmerkmal ist der Aufbau aus drei Domänen.

C-terminal befinden sich, wie auch in den pflanzlichen R-Proteinen und den TLRs, LRRs. Darauf folgt zentral eine NOD-Domäne, die die Auto-Oligomerisierung vermittelt, welche für die Aktivierung von Effektormolekülen nötig ist (Inohara and Nunez, 2001). Am N-terminalen Ende sind variable Effektordomänen lokalisiert, die der homo- bzw. heterophilen Interaktion mit nachgeschalteten Signalmolekülen dienen und deren Struktur variabel ist. Diese Effektordomänen umfassen die CARD-Domänen der NODs und die PYD-Domäne der NALPs sowie die BIR-Domänen der NAIPs, die heterophil interagieren (Inohara and Nunez, 2003).

CARD-Domänen sind Bestandteil viele Effektor- und Signalmoleküle (Hofmann *et al.*, 1997). Sie stellen ein charakteristisches Strukturmerkmal der NODs sowie von Ipaf und CIITA dar.

Nod1/CARD4 und Nod2/CARD15 wurden auf der Suche nach Proteinen mit Homologie zu Apaf-1 entdeckt. Nod1 wird ubiquitär exprimiert, Nod2 hingegen vorwiegend in myeloischen Zellen (Bertin *et al.*, 1999; Inohara *et al.*, 1999). Allerdings konnte es auch z.B. in Epithelzellen nachgewiesen werden (Gutierrez *et al.*, 2002).

Nod1 und Nod2 sind vorwiegend im Zytosol lokalisiert. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Nod2 in epithelialen und monocytären Zellen zur Plasmamembran rekrutiert werden kann (Barnich *et al.*, 2005; Eitel *et al.*, 2008). Beide Moleküle aktivieren u.a. den Transkriptionsaktivator NF- κ B und nachfolgend eine NF- κ B-abhängige Genexpression sowie möglicherweise apoptotische Signalwege (Bertin *et al.*, 1999; Inohara *et al.*, 1999; Ogura *et al.*, 2001). Ursprünglich wurde vermutet, dass Nod1 und Nod2 intrazelluläres LPS detektieren können (Inohara *et al.*, 2001). Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, dass sie hochspezifische Peptidoglykanfragmente erkennen (Girardin *et al.*, 2003c). So ist das minimale von Nod1 detektierte Motif das Dipeptid γ -D-Glu-meso-DAP (iE-DAP) (Chamaillard *et al.*, 2003b), ein Bestandteil der Zellwände v.a. von Gram-negativen Bakterien. Interessanterweise sind D-Glu und meso-DAP Aminosäuren, die nicht in eukaryontischen Zellen vorhanden sind und somit eine Fremd-Eigen-Diskriminierung erlauben. Die minimale von Nod2 erkannte Struktur stellt

das Muramyl-dipeptid MurNAc-L-Ala-D-isoGln (MDP) dar, welches Peptidoglykanbestandteil sowohl Gram-positiver als auch Gram-negativer Bakterien ist (Girardin *et al.*, 2003c).

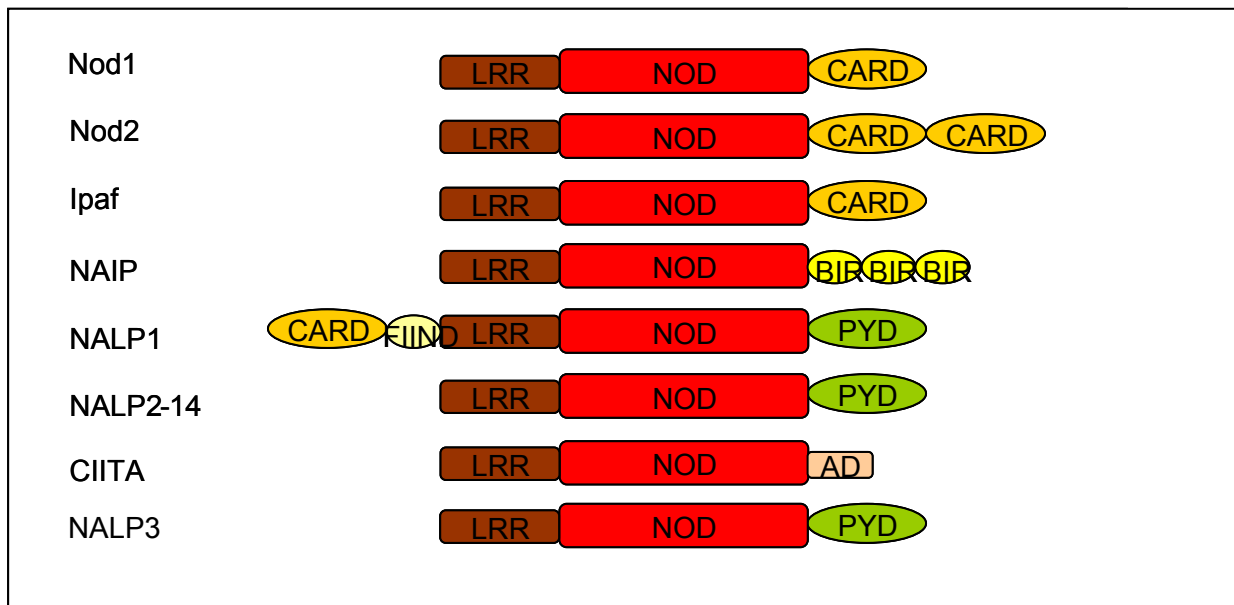


Abbildung 1: Die NLR-Familie Die NLR-Proteine setzen sich aus 3 verschiedenen Domänen zusammen: eine zentrale NOD-Domäne, eine C-terminale LRR -Domäne, welche möglicherweise der Ligandenerkennung dient, und eine N-terminale Effektor-domäne, entweder als CARD-, PYD- oder BIR-Domäne

Die bedeutende Rolle von Nod1/2 in der Regulation inflammatorischer Prozesse wird dadurch deutlich, dass Mutationen in ihren Genloci das Auftreten verschiedener Erkrankungen begünstigen. So führen Mutationen im Nod2-kodierenden Gen zu einem deutlich erhöhten Risiko an M. Crohn zu erkranken (Hugot *et al.*, 1996; Ogura *et al.*, 2001). Mutationen im Nod1-Gen werden ebenfalls mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (McGovern *et al.*, 2005) sowie mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Asthma (Hysi *et al.*, 2005) in Zusammenhang gebracht.

NALP-Proteine besitzen eine N-terminale Pyrin-(PYD)-Effektor-domäne. Einige Mitglieder dieser Proteinfamilie, unter ihnen NALP2 und NALP3, bilden zusammen mit ASC und der proinflammatorischer Caspase-1 einen zytosolischen Multiproteinkomplex, das Inflammasom (Martinon and Tschopp, 2004). Dessen Aktivierung scheint durch eine direkte oder indirekte Erkennung von PAMPs bzw. der Präsenz von zelleigenen Gefahrensignalen (DAMPs) zu erfolgen und bewirkt die Aktivierung von Caspase-1 und nachfolgend eine Prozessierung von pro-IL-1 β /pro-IL-18 zu IL-1 β /IL-18 (Ogura *et al.*, 2006). IPAF ist ein weiteres NLR-Protein, das intrazelluläres Flagellin, z.B. von *Salmonella typhimurium*, TLR-unabhängig detektieren kann (Miao *et al.*, 2006).

1.3.3. RIG-like Helikasen (RLHs)

Antivirale RNA-Helikasen, wie z.B. RIG-I und MDA5, gehören einer weiteren Gruppe von PRRs an. Sie sind in der Lage, virale RNA im Zytoplasma TLR-unabhängig zu erkennen (Kawai and Akira, 2006b). RIG-I und MDA5 setzen sich aus einer C-terminalen RNA-Helikasedomäne und zwei Tandem-CARD-Domänen am N-terminalen Ende zusammen. Diese Proteine binden mit ihrer C-terminalen Domäne RNA und entwinden diese ATP-abhängig. Durch die CARD-Domänen werden Signalkaskaden in Gang gesetzt, die eine Aktivierung von IRF3 und NF- κ B bewirken (Andrejeva *et al.*, 2004; Yoneyama *et al.*, 2004).

1.4. Die intrazelluläre Signaltransduktion

1.4.1. Der TLR-Signalweg

Der Erkennung von PAMPs folgt die Bildung von TLR-Heterodimeren (TLR2 mit TLR1 oder TLR6) oder -Homodimeren. Dimerisation der TLRs löst dabei Signalkaskaden aus, die ihren Ursprung von der zytosolischen TIR-Domäne nehmen und abhängig von einem oder mehreren der Adaptermoleküle MyD88, TIRAP, TRIF und TRAM verlaufen (Takeda and Akira, 2005).

Alle TLRs aktivieren konservierte Signalwege, die zum einen eine Aktivierung von NF- κ B und zum anderen die Aktivierung von AP-1 über die MAP-Kinasen p38 und JNK bewirken. Dennoch werden in Abhängigkeit des aktivierten TLRs unterschiedliche Genexpressionsmuster reguliert. Die Basis dieser Spezifität könnte das Vorhandensein verschiedener Adaptermoleküle sein (O'Neill, 2006). Fast alle TLRs triggern den MyD88-abhängigen klassischen Signalweg. MyD88 ist ein Adapterprotein, welches die Stimulation von TLRs und Mitgliedern der IL-1-Rezeptorfamilie in intrazelluläre Signale konvertiert und Kinasen sowie NF- κ B aktiviert. Dadurch wird die Bildung proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF α , IL-6, pro-IL-1 β und IL-12, induziert. MyD88 interagiert über seine eigene TIR-Domäne mit der des TLRs und rekrutiert die Ser/Thr-Kinasen IRAK-1 und -4 an den Rezeptor. Die IRAKs werden dadurch phosphoryliert und aktiviert. Im weiteren Verlauf erfolgt die Aktivierung von TRAF6 und TAK1. Die Kinase TAK1 wird für die Aktivierung des IKK-Komplexes und nachfolgend von NF- κ B sowie von AP-1 und ERK benötigt (Sato *et al.*, 2005). Die TLR2- und TLR4-stimulierte, MyD88-abhängige Signaltransduktion ist zudem abhängig von dem Adaptermolekül TIRAP (Kawai and Akira, 2006a).

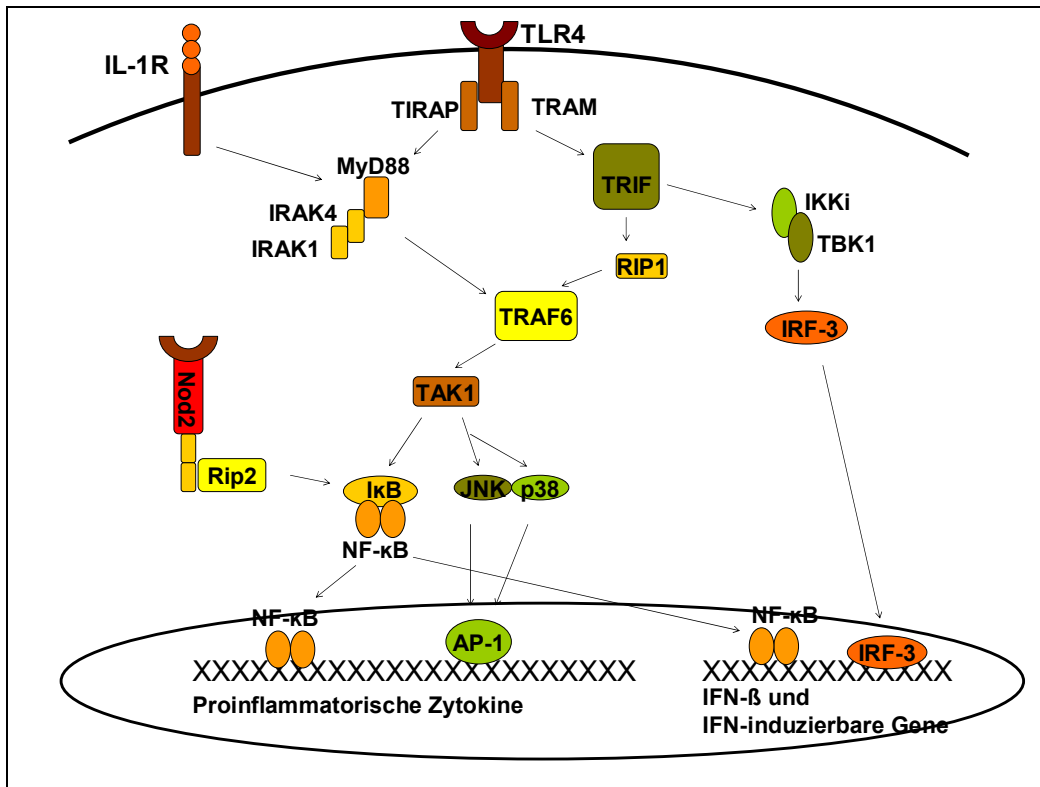


Abbildung 2: Intrazelluläre Signaltransduktion - TLR- und IL-1R Signalweg Stimulation mit dem entsprechenden Liganden, z.B. LPS bzw. IL-1, bewirkt die Rekrutierung der TIR-Domänen-enthaltenden Adaptermoleküle MyD88 und TIRAP an den Rezeptor. Daraufhin bildet sich ein Komplex aus IRAK und TRAF6. Es folgt die Aktivierung des TAK1-Komplexes und in den nachfolgenden Schritten die Phosphorylierung von NEMO und die Aktivierung des IKK-Komplexes. IκB wird phosphoryliert, ubiquitiniert und im Proteasom degradiert, woraufhin das freie NF-κB in den Zellkern transloziert. Eine Aktivierung der MAPK-Kaskade und des Transkriptionsfaktors AP-1 erfolgt über TAK1. Stimulation von TLR4 kann ausserdem MyD88-unabhängig über TRIF eine NF-κB- und IRF-3-Aktivierung induzieren. Die **Signaltransduktion von Nod1/2** zu NF-κB verläuft über Rip2. Dieses bindet NEMO, wodurch eine direkte Aktivierung des IKK-Komplexes gegeben ist. (Abbildung adaptiert nach (Akira *et al.*, 2006)).

TLR4 induziert zusätzlich zu dem MyD88-abhängigen Signalweg eine Aktivierung der von TRIF abhängigen Signalkaskaden. TLR3 hingegen scheint als einziger TLR ausschließlich TRIF-abhängige Signalwege zu aktivieren (Oshiumi *et al.*, 2003). Im TLR4-Signalweg wird TRIF für die Spätphase der NF-κB-Aktivierung sowie für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 benötigt (Yamamoto *et al.*, 2003). Die TRIF-abhängige NF-κB-Aktivierung im TLR4-Signalweg ist zudem abhängig von TRAM.

Für die TLR-Signalwege wurden auch negative Regulationsmechanismen beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass IRAK-M wahrscheinlich über Inhibition von TRAF6 als negativer Regulator des TLR-Signalweges agiert (Kobayashi *et al.*, 2002a). Des Weiteren wurden u.a. Tollip, SOCS-1 und SI6IRR als mögliche Inhibitoren beschrieben (Hayden *et al.*, 2006).

1.4.2. Der Nod1- und Nod2-Signalweg

Die Aktivierung von Nod1 und Nod2 durch ihre Liganden bewirkt eine Aktivierung von NF- κ B, einiger MAP-Kinasen sowie möglicherweise auch die Aktivierung einiger Caspasen (Strober *et al.*, 2006). Der genaue Mechanismus der NF- κ B Aktivierung durch Nod1 bzw. Nod2 ist noch nicht vollständig geklärt. Die Erkennung des spezifischen Liganden bewirkt die Oligomerisierung von Nod1 bzw. Nod2. Hierauf folgt die Interaktion mit Rip2/RICK über homophile CARD-CARD-Interaktion. Rip2 ist eine Ser/Thr-Kinase mit Homologie zu IRAK, Rip1 und den pflanzlichen Pto-Kinasen (McCarthy *et al.*, 1998). Rip2/RICK gilt als essentiell für die Nod1- und Nod2-vermittelte NF- κ B-Aktivierung, da z.B. in Rip2-defizienten, mit Nod1 oder Nod2 transfizierten Fibroblasten eine verminderte NF- κ B-Aktivierung zu verzeichnen war (Kobayashi *et al.*, 2002b), und da Rip2-defiziente Mäuse sehr anfällig für Infektionen mit dem intrazellulärem Bakterium *L. monocytogenes* waren (Chin *et al.*, 2002). Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt schließlich durch Rekrutierung des I κ B-Kinasekomplex IKK an die zentrale Domäne von Rip2 (Inohara *et al.*, 2000; Ogura *et al.*, 2001). Neben NF- κ B aktivieren Nod1 und Nod2 verschiedene MAP-Kinase-Signalwege. Nod1 aktiviert so z.B. JNK (Girardin *et al.*, 2001) und Nod2 p38 sowie ERK u.a. über das Adaptermolekül CARD9 (Hsu *et al.*, 2007).

1.4.3. Der NF- κ B-Signalweg

Mitglieder der NF- κ B/Rel-Familie von Transkriptionsfaktoren kontrollieren eine Vielzahl biologischer Funktionen und spielen eine Hauptrolle in der Genexpressionsregulation der angeborenen Immunantwort. Zur NF- κ B-Familie gehören NF- κ B1 (p105/p50), NF- κ B2 (p100/52), RelA, RelB sowie c-Rel. Diese werden zell- und gewebsspezifisch exprimiert: NF- κ B1 und RelA ubiquitär, NF- κ B2, RelB und c-Rel vorwiegend in lymphatischen Zellen und Geweben (Hayden *et al.*, 2006).

NF- κ B1 und NF- κ B2 werden als große Polypeptide synthetisiert, welche posttranslativ in die DNA-bindenden Untereinheiten p50 bzw. p52 gespalten werden (Caamano and Hunter, 2002).

Mitglieder der NF- κ B-Familie zeichnen sich durch das Vorhandensein einer N-terminalen Rel-homologie-Domäne (RHD) aus. Die RHD vermittelt neben sequenzspezifischer DNA-Bindung die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren, wodurch spezifische Zellantworten auf unterschiedlichste Stimuli und damit unterschiedliche Transkriptionseffekte erzielt werden (Caamano and Hunter, 2002; Karin and Greten, 2005). RelA, c-Rel und RelB besitzen ferner eine C-terminale Transkriptionsaktivierungsdomäne (TAD), die der Zielgenaktivierung dient.

P50 und p52 enthalten keine TAD, so dass Dimere ohne Beteiligung von RelA, c-Rel oder Rel-B die Transkription unterdrücken (Hayden *et al.*, 2006).

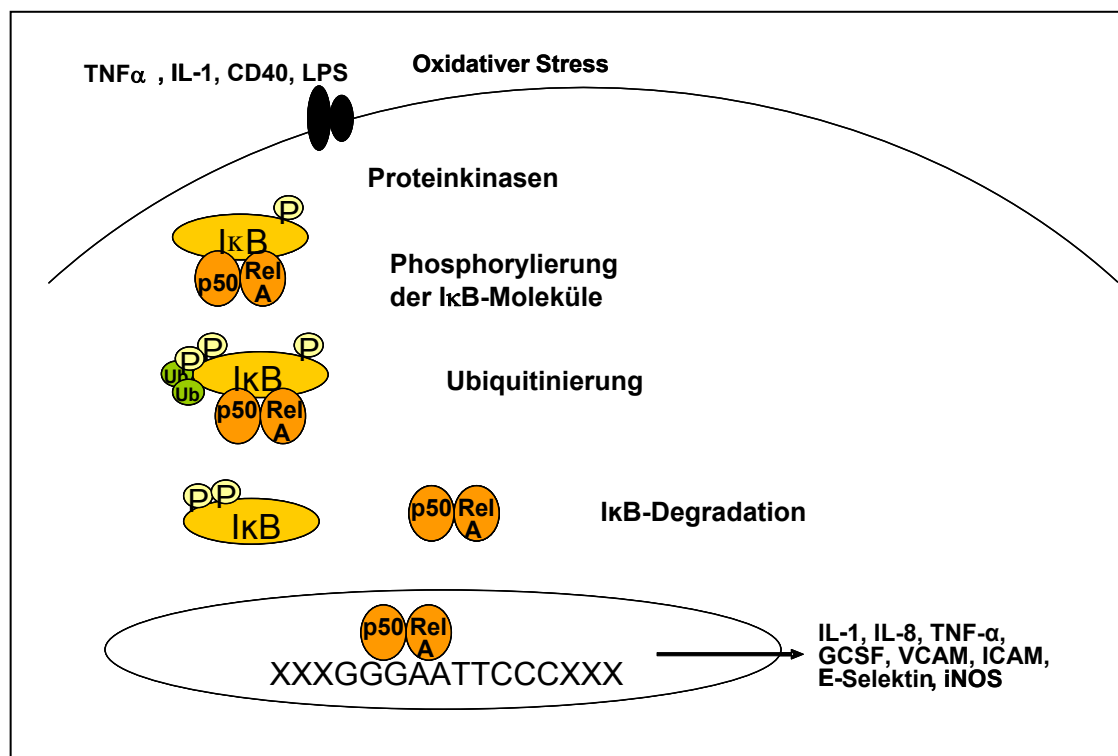


Abbildung 3: Der NF-κB-Signalweg In unstimulierten Zellen liegen Rel/NF-κB-Homo-/Heterodimere (hier z.B. p50/RelA) als Komplex mit dem IκB-Inhibitorprotein vor und sind inaktiv. Nach Stimulation der Wirtszellen, z.B. mit LPS, TNFα, oxidativem Stress, werden IκB-Moleküle phosphoryliert und für die proteasomale Degradierung durch Ubiquitinierung markiert. Die NF-κB-Dimere können daraufhin im Nukleus die Gentranskription durch Bindung an κB-Bindungsstellen regulieren. (Abbildung adaptiert nach (Caamano and Hunter, 2002)).

NF-κB-Homo-/Heterodimere liegen im Zytosol unstimulierter Zellen in inaktiver Form gebunden an IκB-Proteine vor. Ihre Aktivierung kann zum einen auf nicht-rezeptorvermitteltem Wege, z.B. durch oxidativen Streß, oder aber durch Bindung von Liganden, wie z.B. TNFα, IL-1 und LPS, an ihre spezifischen Rezeptoren erfolgen. Die gemeinsame Endstrecke der Aktivierung von NF-κB besteht in der Aktivierung des IκB-Kinase-Komplexes, der die IκB-Proteine phosphoryliert (Caamano and Hunter, 2002; Karin, 1999). IKKs sind 700 kDa große Proteine, welche aus zwei katalytischen Untereinheiten, IKKα und IKKβ (Zandi *et al.*, 1997) sowie der regulatorischen Untereinheit IKKγ/NEMO (Rothwarf *et al.*, 1998) bestehen. Eine Phosphorylierung von IκB durch IKK hat dessen Degradierung im Proteasom und die Freigabe der Kernlokalisationssequenz der NF-κB-Dimere zur Folge. Diese gelangen daraufhin in den Zellkern und binden dort an eine spezifische Konsensussequenz von 10 Basenpaaren, das sogenannten κB-Motiv. Dies bewirkt in der Regel eine verstärkte Transkription der entsprechenden Gene von z.B. Chemokinen (IL-8), Zytokinen (IL-1, IL-2, TNFα, IL-12) sowie

von Adhäsionsmolekülen (ICAM, VCAM) (Caamano and Hunter, 2002). Auf dem sogenannten „kanonischen Signalweg“ erfolgt die Aktivierung z.B. von p50/RelA oder p50/c-Rel über IKK β und NEMO. Im „nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweg“ kontrolliert alleine IKK α die Aktivierung von Komplexen, welche durch das I κ B Protein p100 gehemmt werden (Hayden *et al.*, 2006).

1.4.4. Der MAPK-Signalweg

Die MAP-Kinase-Kaskade ist eine der ältesten und in der Evolution konserviertesten Signalwege und spielt eine essentielle Rolle in der angeborenen und erworbenen Immunität (Takeuchi *et al.*, 2002). Alle eukaryontischen Zellen besitzen multiple MAP-Kinase-Signalwege, die eine Vielzahl zellulärer Funktionen, wie z.B. Genexpression, Mitose, Apoptose und Zelldifferenzierung, koordinieren (Roux and Blenis, 2004). Die MAPK-Familie umfasst drei Hauptmitglieder: die „extracellular regulated-signal kinases“ (ERKs), die „c-Jun NH₂-terminal kinase“ bzw. „stress-activated protein kinase“ (JNK/SAPK) sowie die p38 Kinasefamilie.

Jede der MAPK-Signalkaskaden besteht aus drei Kinasen: einer MAP-Kinase (MAPK), einer MAPK-Kinase (MKK) sowie einer MAPKK-Kinase (MKKK). Die MAPKK-Kinase erhält Signale durch Rezeptoren der Zelloberfläche oder durch Interaktion mit GTP-bindenden Proteinen der Ras/Rho-Familie und/oder anderen Kinasen. Aktivatoren können mitogene oder proliferative Stimuli, wie z.B. Wachstumsfaktoren (ERK1 und 2), oder zellulärer Stress (JNK, p38) und inflammatorische Signale sein. Die MAPKK-Kinase aktiviert daraufhin die MAPK-Kinase, eine dualspezifische Kinase, die wiederum die MAP-Kinase durch Phosphorylierung am Thr-X-Tyr Motif (X = Glutamat, Prolin oder Glycin in ERK, JNK, p38) aktiviert. MAP-Kinasen am Ende dieser Kaskade phosphorylieren ihre Zielproteine, wie z.B. Phospholipasen, zytoskelettale Proteine sowie Transkriptionsfaktoren an Ser/Thr-Positionen, welche von Prolin gefolgt werden (Cowan and Storey, 2003; Roux and Blenis, 2004).

p38 MAPK

Der p38-Signalweg bewirkt eine inflammatorische Reaktion durch Regulierung der Expression von proinflammatorischen Zytokinen, COX-2 sowie von Adhäsionsproteinen u.a. über die Aktivierung von AP-1 (Johnson and Lapadat, 2002) oder über Histonmodifikationen (Zhong *et al.*, 2000). Ferner dient p38 in der erworbenen Immunität als positiver Regulator für die Differenzierung und Proliferation von Th1-Zellen (Bertin *et al.*, 1999; Rincon *et al.*, 1998).

Bis jetzt wurden 4 Splicingvarianten von p38 identifiziert, von denen p38 α die am besten charakterisierte und möglicherweise physiologisch wichtigste ist (Kumar *et al.*, 2003). Das p38

MAPK Modul setzt sich aus verschiedenen MAPKKs, z.B. MEKK1 - 4, MLK2 und -3, DLK, ASK1, Tpl2 und Tak1, den MAPKKs MEK3 und MEK6 und den vier bekannten p38-Isoformen (α , β , γ , δ) zusammen. Sie unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität. So aktivieren p38 α - und β z.B. die Hitzeschockproteine 25 und -27 sowie das MAPK-aktivierte-Protein (MAPKAP)-2. Diesem kommt eine wichtige Rolle in der inflammatorischen Zytokinproduktion zu. So zeigten MAPKAP2-defiziente Mäuse eine Verminderung der durch bakterielles LPS ausgelösten Biosynthese von TNF- α , Interferon γ , IL-1 β , IL-6 und NO (Kotlyarov *et al.*, 1999). Die γ - und δ -p38-Isoformen hingegen aktivieren den Transkriptionsfaktor ATF2. Andere durch p38-MAPK über MSK1 beeinflusste Transkriptionsfaktoren sind z.B. Stat1, Elk-1 und CREB (Cowan and Storey, 2003). In Säugetierzellen wird der p38-MAPK-Signalweg durch physikalischen oder chemischen Stress und inflammatorische Zytokine, nicht jedoch durch mitogene Stimuli aktiviert (Roux and Blenis, 2004). GTPasen, z.B. Rac, Rho und Cdc42, sind verantwortlich für die Transmission dieser Signale zu den MAPKKs, die daraufhin MEK3 und MEK6 phosphorylieren. Diese sind hochspezifisch für p38, da sie weder ERK1/2 noch JNK aktivieren (Roux and Blenis, 2004). Aktivierung von TAK1 im Rahmen der TLR-Signaltransduktion bewirkt ebenfalls eine Aktivierung der MAPK, wie z.B. JKN/p38 (Abbildung 2). Es erfolgt hierbei die selektive Aktivierung der Untereinheiten von AP-1 sowie der mit AP-1 interagierenden Transkriptionsfaktoren und nachfolgend eine Hochregulation der Zytokin- und Chemokinproduktion (Johnson and Lapadat, 2002). Eine negative Regulation von p38 erfolgt durch Dephosphorylation mittels verschiedenster Proteinphosphatasen, wie z.B. Proteinphosphatase 2A (Kumar *et al.*, 2003).

1.5. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes ist ein Gram-positives, fakultativ anaerobes, intrazelluläres, unbekapseltes und nicht-sporenbildendes Bakterium. Infektionen des Menschen mit diesem Bakterium sind meist auf kontaminierte Lebensmittel zurückzuführen und manifestieren sich klinisch als Gastroenteritis, Sepsis und Infektion des ZNS. Etwa 25% der Fälle von Listeriose treten zudem bei Schwangeren auf. Eine Infektion hat dann häufig Aborte, Totgeburten oder eine neonatale Sepsis zur Folge (Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Die Pathophysiologie der Infektion mit *L. monocytogenes* ist noch nicht vollständig geklärt. Der Immunstatus des Wirts scheint jedoch wesentlich für die Manifestation der Erkrankung verantwortlich zu sein. So besitzen die meisten

Patienten, die eine Listerien-Sepsis entwickeln, einen Defekt, v.a. der T-Zell-vermittelten Immunität (Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

1.5.1. Virulenzfaktoren

L. monocytogenes ist in der Lage sowohl phagozytierende als auch nicht-professionell phagozytierende Zellen, wie z.B. Epithelzellen (Portnoy *et al.*, 1988), Fibroblasten (Kuhn *et al.*, 1988), Hepatozyten (Dramsi *et al.*, 1995), Endothelzellen (Drevets *et al.*, 1995), Neurone (Dramsi *et al.*, 1998) und dendritische Zellen (Guzman *et al.*, 1996) zu invadieren. Nach Eintritt des Bakteriums in die Zelle durchläuft *L. monocytogenes* einen Entwicklungszyklus mit den Charakteristika: Lyse des das Bakterium-umgebenden Phagosoms, Vermehrung im Zytoplasma sowie Aktin-vermittelte Bewegung und Ausbreitung in Nachbarzellen (Portnoy *et al.*, 2002).

Jeder Schritt des intrazellulären Parasitismus erfordert die Expression von Virulenzfaktoren. Viele bisher identifizierte Virulenzgene sind in einem Gencluster auf dem mikrobiellen Chromosom lokalisiert, dessen Expression durch den temperaturabhängigen Transkriptionsaktivator PrfA reguliert wird (Kuhn and Goebel, 1995; Leimeister-Wachter *et al.*, 1992).

Internalin

Internalin A und B (InlA/InlB) sind LRR-enhaltende Oberflächenproteine, die *L. monocytogenes* befähigen, an Wirtszellen zu binden und in sie einzudringen (Dramsi *et al.*, 1995; Gaillard *et al.*, 1991). Die Mitglieder der Internalingenfamilie sind auf dem bakteriellen Chromosom entweder als Cluster (InlAB und InlC2DE) oder als einzelne Gene (InlC, InlF) angeordnet (Dramsi *et al.*, 1997; Engelbrecht *et al.*, 1996; Gaillard *et al.*, 1991).

Die Expression von InlA alleine ist ausreichend für die Invasion von Epithelzellen. Dagegen wird InlB für die Bindung an eine Vielzahl von Zellen, u.a. Hepatozyten und nichtepithelialen Zellen benötigt (Dramsi *et al.*, 1995). Das 80 kDa große Protein InlA bindet an das Wirtzelladhäsionsmolekül E-Cadherin epithelialer Zellen (Gaillard *et al.*, 1991; Mengaud *et al.*, 1996). Diese Interaktion ist speziesspezifisch. So besitzt Mauszell-E-Cadherin Glutamat statt Prolin an Position 16 der ersten extrazellulären Domäne und vermittelt keine InlA-abhängige Invasion von *L. monocytogenes* (Lecuit *et al.*, 1999). Als Rezeptor für Internalin B dient hauptsächlich der Hepatozyten-Wachstumsfaktorrezeptor, ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor, der u.a. die Aktivierung von NF- κ B in Makrophagen über Ras, PI-3kinase und Akt vermitteln kann (Mansell *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2000). Die Inl A- bzw. B-abhängige Invasion verläuft über eine Rezeptor-vermittelte Phagozytose (Cossart and Sansonetti, 2004).

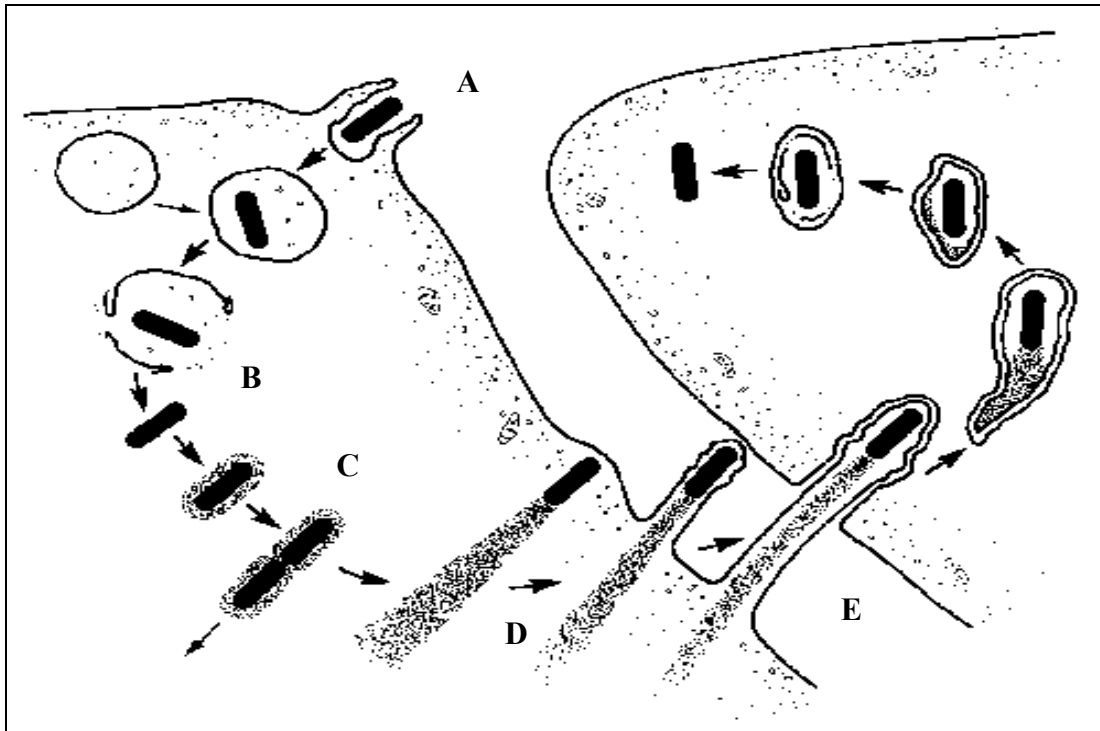


Abbildung 4: Jedes Stadium des intrazellulären Parasitismus durch *L. monocytogenes* ist abhängig von verschiedenen Virulenzfaktoren (A): Eindringen in die Wirtszelle durch induzierte Phagozytose (Internalin), (B): Entkommen aus dem phagolysosomalen Kompartiment (Listeriolysin O, Phospholipasen), (C): zytosolische Vermehrung und Rekrutierung von Aktinfilamenten (ActA), (D): aktinabhängige Bewegung, (E): Zell-zu-Zell-Verbreitung (Tilney and Portnoy, 1989)

Listeriolysin O und Phospholipasen

Das Hämolyysin Listeriolysin O (LLO) ist ein Zytolysin, das wie das Streptolysin, *Staph. aureus* α -Toxin und das Pneumolysin zur Familie der cholesterolabhängigen, porenformenden Toxine (CDTX) gehört. Es ist ein multifaktorieller Virulenzfaktor, dem eine wichtige Rolle in der Wirtszell-Parasiten-Beziehung zu Teil wird. LLO ist essentiell für das Überleben und die Proliferation von *L. monocytogenes* in Makrophagen und nicht-professionell phagozytierenden Zellen (Gaillard *et al.*, 1987; Kuhn *et al.*, 1988; Portnoy *et al.*, 1988). LLO-defiziente *Listeria* sind avirulent (Hof, 1984). LLO bewirkt nicht nur die Lyse des primären Phagosoms nach der Aufnahme des Bakteriums, sondern wird auch für die Freisetzung aus der Vakuole nach Infektion benachbarter Zellen benötigt (Gedde *et al.*, 2000). Um der potentiell zytotoxischen Wirkung von LLO entgegenzuwirken und seine Aktivität auf das phagolysosomale Kompartiment zu beschränken, hat *L. monocytogenes* verschiedene Strategien entwickelt. Zum einen zeichnet sich *Listeria* LLO durch ein niedriges pH-Optimum (5,5) sowie einen engen pH-Wirkungsbereich (4,5 – 6,5) aus, welcher in etwa den Bedingungen im Phagolysosom, nicht jedoch denen im Zytosol entspricht (Geoffroy *et al.*, 1987). Des Weiteren befindet sich am N-terminalen Ende des LLO-Moleküls eine PEST-ähnliche Sequenz, die reich an Prolin-,

Glutamat-, Serin- und Threoninresten ist (Decatur and Portnoy, 2000). Diese vermittelt in eukaryontischen Zellen die Phosphorylierung und den Abbau von Proteinen.

Die Beobachtungen, dass auch LLO-defiziente *L. monocytogenes* in der Lage sind, aus dem Phagolysosom ins zytosolische Kompartiment zu gelangen und in humanen epithelialen Zellen zu wachsen, ließ vermuten, dass weitere z.T. redundant wirkende Faktoren an der Durchbrechung der Membranbarriere beteiligt sind (Portnoy et al., 1988). So wurden bakterielle Phospholipasen als zusätzliche Virulenzfaktoren identifiziert. Pathogene Listerienstämme produzieren drei verschiedene Enzyme mit Phospholipase C(PLC)-Aktivität, die an der Freisetzung aus dem Phagosomen beteiligt sind. PI(Phosphatidylinositol)-PLC und PC(Phosphatidylcholin)-PLC werden sowohl von *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* als Proenzyme synthetisiert, die PLC-SmcL (Sphingomyelinase C) ist hingegen spezifisch für *L. ivanovii* (Vazquez-Boland et al., 2001). PC-PLC hydrolysiert Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidyl-serin, zu einem geringen Teil auch Sphingomyelin, kaum jedoch Phosphatidylinositol (Geoffroy et al., 1991). PI-PLC hingegen ist hoch spezifisch für PI (Goldfine and Knob, 1992).

ActA

Nach Freisetzung des Bakteriums in das Zytosol aktiviert *L. monocytogenes* in Abhängigkeit seines Oberflächenproteins ActA die Polymerisierung von Aktinfilamenten an einem Pol. Dieser 5 µm lange „Kometenschweif“ befähigt es zur intrazellulären Fortbewegung und zur Zell-zu-Zell-Verbreitung (Kocks et al., 1993; Tilney and Portnoy, 1989).

1.5.2. *L. monocytogenes* und Endothelzellen

Eine Wirtszellabwehr gegen *L. monocytogenes* wird primär v.a. durch phagozytierende Zellen wie Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten, zum späteren Zeitpunkt der Infektion aber durch T-Lymphozyten vermittelt (Unanue, 1997a).

Zentrale Schritte in der systemischen Infektion mit dem Bakterium *L. monocytogenes* sind das Überwinden der intestinalen Barriere sowie die Invasion des ZNS bzw. der Plazenta (Dussurget et al., 2004). Dementsprechend müssen diese Bakterien in der Lage sein, die Blut-Hirn- und die Plazentaschranke durch Interaktionen mit den Endothelzellen zu durchbrechen (Drevets et al., 1995). Listerien sind sehr gut in der Lage, Endothelzellen zu invasieren (Drevets, 1998). Dies kann über zwei Mechanismen geschehen (Drevets et al., 1995): über direkte Zellinvasion oder indirekt über adhärente infizierte mononukleäre Phagozyten durch Zell-zu-Zell Verbreitung

(Drevets *et al.*, 1995) Im Zytosol angelangt, vermag das Bakterium sich dann zu vermehren. Eine Infektion endothelialer Zellen mit *L. monocytogenes* bewirkt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie die Induktion der Produktion proinflammatorischer Zytokine (Kayal *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 2001) und die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche (Drevets, 1997). Diese vermitteln die Extravasation sowie Bindung von polymorphkernigen Neutrophilen und Monocyten an infizierte Endothelzellen (Kayal *et al.*, 1999; Krull *et al.*, 1997). Eine schnelle Rekrutierung polymorphkerniger Neutrophiler durch Zytokine wie IL-8, IFN- γ oder TNF- α ist essentiell für die Induktion einer adäquaten und schnellen Wirtsantwort auf eine Infektion mit *L. monocytogenes* (Pamer, 2004; Unanue, 1997b). Diese Beobachtungen einer inflammatorischen Endothelzellaktivierung v.a. durch virulente, ins Wirtszytosol gelangende Listerien sind ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung intrazellulärer PRRs an der Erkennung von *L. monocytogenes*.

1.6. Aufgabenstellung

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie gegenüber Pathogenen dar und tritt sofort nach Infektion in Aktion. Die Aktivierung dieses Systems basiert auf der Erkennung konservierter molekularer Strukturen, den Pathogen-assoziierten-molekularen Mustern (PAMPs), durch spezifische Pathogen-erkennende Rezeptoren (PRRs). Die schnelle Erkennung von Pathogenen ist essentiell für die Aktivierung der angeborenen sowie die nachfolgende Steuerung der adaptiven Immunantwort.

Eine wichtige Rolle in der Erkennung von Infektionen, v.a. im Extrazellularraum wird dabei der Familie der transmembranären Toll-like Rezeptoren zuteil. Wenig ist dagegen darüber bekannt, wie intrazelluläre Pathogene durch das angeborene Immunsystem erkannt werden und welche Signalwege sie in den Zellen auslösen. Einige Veröffentlichungen wiesen auf die Existenz eines zytosolischen Pathogen-Erkennungssystem hin (McCaffrey *et al.*, 2004; O'Riordan *et al.*, 2002). Ungefähr gleichzeitig erfolgte die Identifizierung und Charakterisierung der NLR-Proteinfamilienmitglieder Nod1 und Nod2 (Inohara *et al.*, 1999; Ogura *et al.*, 2001).

Zunächst konzentrierten sich die Untersuchungen vorwiegend auf die molekularen Strukturen, welche von NLRs detektiert werden. Während die Funktion vieler NLRs noch vollständig ungeklärt ist, stellt sich zum anderen die Frage nach der Funktion einzelner NLRs in der „mehr physiologischen“ und „komplexeren“ Situation der Infektion von Wirtszellen *in vitro* und Wirtsorganismen *in vivo* durch lebende Pathogene. In dieser Situation ist die Wirtszelle mit dem gesamten Mikroorganismus und dessen Vielzahl von PAMPs konfrontiert.

L. monocytogenes stellt hierbei ein ideales Untersuchungsobjekt dar. Es ist zum einen klinisch äußerst relevant und zum andern ein gut untersuchter zytosolischer Modellkeim, von dem gut charakterisierte Deletionsmutanten existieren, deren Lokalisation nach der Wirtszellinfektion aufgrund von Mutationen in den einzelnen Virulenzfaktoren auf bestimmte zelluläre Kompartimente beschränkt ist. So vermögen Internalin B-defiziente Stämme kaum zu adhären und die Zellen zu invadieren, während LLO-defiziente Mutanten dem phagosomalen Kompartiment nicht entkommen können (Marquis *et al.*, 1995; Portnoy *et al.*, 2002). Diese Bakterien stellen somit ideale Studienobjekte für die Untersuchung von Erkennungsmechanismen des angeborenen Immunsystems in verschiedenen intra- oder extrazellulären Zellkompartimenten dar.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, die Rolle von zytosolischen PRRs, insbesondere von Nod1 in der Endothelzellinfektion durch *L. monocytogenes* zu untersuchen. Da über die Nod1- und Nod2-vermittelten Signalwege nur wenig bekannt ist, sollte ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit in der weiteren Charakterisierung der Nod1-aktivierten Signaltransduktion, insbesondere der Bedeutung der p38-MAPK hierbei liegen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Bakterien

2.1.1. Bakterienkultur/Infektion

Die Listerienstämme wurden freundlicherweise von Prof. Dr. T. Chakraborty (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig Universität, Gießen) zur Verfügung gestellt.

Folgende Stämme bzw. Deletionsmutanten (Δ) wurden eingesetzt:

Strang	Serotyp	Genotyp	Abkürzung
<i>L. monocytogenes</i>			
EGD	1/2a	Wildtyp	EGD
EGD Δ hly	1/2a	Δ hly	Δ LLO
EGD Δ InlB	1/2a	Δ InlB	Δ InlB
<i>L. innocua</i> (ATCC30090)			
INN	6a	Wildtyp	INN

BHI-Flüssigmedium (Difco, Heidelberg) wurde mit dem jeweiligen Listerienstamm beimpft und über Nacht bei 5% CO₂ und 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Teil dieser Übernachtskultur erneut mit BHI-Medium in einer 1:50 Verdünnung versetzt und für 3 bis 4 h bis zur mittlogarithmischen Phase (OD₆₀₀ 0,7 – 1,0) kultiviert. Die optische Dichte wurde bei 600 nm im Photometer bestimmt. Kontrollausplattierungen auf BHI-Agar ergaben, dass eine OD von 0,7 – 1,0 dabei einer Konzentration von 10⁹ Bakterien je ml entsprach. Daraufhin wurde die Bakteriensuspension bei 3500 U/min für 10 min zentrifugiert, mit PBS -/- gewaschen und dann in der entsprechenden Menge Zellkulturmedium (je nach Versuch) resuspendiert und abhängig von der Versuchsanordnung auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

2.1.2. Herstellung hitzeinaktivierter *L. monocytogenes* und *L. innocua*

Die Bakterienhauptkultur wurde für 3 h bei 95°C im Wasserbad inkubiert, dann 10 min bei 3400 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, nach einmaligem Waschen in PBS resuspendiert und in Aliquots bei -80°C gelagert.

2.2. DNA-Präparation

Die Expressionsplasmide für Nod1, Nod2 (jeweils in pcDNA3) und TLR2 (in pFlagCMV1) wurden freundlicherweise durch Dr. G. Nuñez (Universität Michigan, Ann Arbor, USA) sowie Dr. C. Kirschning (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München) zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurden RSV- β -Galaktosidase kodierende Plasmide (Opitz *et al.*, 2001) und NF- κ B-abhängige Luciferase Reporter Plasmide (Krull *et al.*, 1997) verwendet. Für die Transformation in *E. coli* (DH5 α) wurden 100 μ l dieser kompetenten Zellen mit 10 ng Plasmid-DNA 30 min lang auf Eis, dann 45 min bei 42°C und schließlich weitere 2 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde mit 900 μ l LB-Flüssigmedium (10 g Bactotrypton, 5 g Yeast Extract, 10 g NaCl ad 1000 ml Aqua bidest, pH=7) versetzt und 1 h lang bei 37°C kultiviert. Davon wurden 100 μ l auf Selektionsagar-LB/Ampicillin-Agar (1,5% Agar mit 100 μ g/ml Ampicillin) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Ausgehend von den mit Plasmiden transformierten und damit ampicillinresistenten Bakterien bildeten sich sichtbare Einzelkolonien. Von diesen Einzelkolonien wurde am folgenden Tag eine ausgewählt und in LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin inokuliert. Diese Vorkulturen wurden ca. 6-8 h lang inkubiert. Die Hauptkultur (0,5 ml Vorkultur auf 100 ml LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin für den Midiprep; 2,5 ml Vorkultur auf 500 ml für den Maxiprep) wurde über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen bei 6000 x g für 15 min bei 4°C abzentrifugiert und die Plasmid-DNA mittels Midi- bzw. Maxiprep nach Anleitung des Herstellers (Plasmid Maxi Kit bzw. Midi Kit, Qiagen, Hilden) isoliert. Die DNA-Konzentrationen wurden im UV-Photometer durch Absorptionsmessung bei 260 nm Wellenlänge und nachfolgender Berechnung mit der Formel DNA-Konzentration (μ g/ μ l) = OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 0,05 ermittelt.

2.3. HUVEC-Infektionsexperimente

2.3.1. Isolation von HUVEC

Die zur Endothelzellisolation benötigten Nabelschnüre wurden freundlicherweise von der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe des Humboldt Krankenhauses Reinickendorf, Berlin, zur Verfügung gestellt. Sie wurden bis zur Verwendung in Hank's HEPES Puffer +/- gelagert. Die Zellisolation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Jaffé *et al.* (Jaffé *et al.*, 1973) unter sterilen Bedingungen. Nach Kanülieren und Spülen mit HBSS +/- wurde die

Nabelschnurvene für 20 min mit 0,025% TypII-Kollagenase gefüllt. Durch mehrfaches Massieren und Ausspülen mit M199 konnten Endothelzellen aus der Vene gewonnen werden, welche daraufhin für 10 min bei 350 x g zentrifugiert wurden. Das entstandene Pellet wurde in Endothel-Basal-Medium (PAA, Cölbe) mit 10% inaktiviertem FCS*, 5 ml L-Glutamin (500 µl/ml), 200 µl Amphotericin B (0,5 µg/ml), 100 µl EGF (5 ng/ml), 10% ECGM sowie 7 ml Penicillin/Streptomycin (je 1000 µg/ml) aufgenommen und resuspendiert. Die so gewonnene Primärkultur lagerte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ 4 bis 5 Tage lang und wurde dann je nach Verwendungszweck gesplittet. Dazu wurden die Zellen mit PBS -/- gewaschen, mit 0,5% Trypsin-EDTA abgelöst und erneut in Kulturmedium aufgenommen. Alle verwendeten Gefäße sind zuvor 1 h mit 0,5%iger Gelatinelösung (5 g Gelatine ad 100 ml Aqua bidest bei 80°C gelöst; sterilfiltriert) behandelt worden. Die nach morphologischen und immunologischen Kriterien Jaffés (Posnett *et al.*, 1984) charakterisierten humanen Endothelzellen wuchsen zu einem Monolayer und waren CD31-, vWF-, E-Selektin- und Vimentin-positiv sowie Zytokeratin-negativ.

* FCS wurde über 45 min bei 56°C zur Inaktivierung der Komplementfaktoren erhitzt

2.3.2. Nucleofektion mit siRNA

Das Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) wurde zuerst in *C. elegans* als zelluläre Reaktion auf dsRNA beschrieben, welche eine sequenzspezifische Gensuppression zur Folge hatte (Fire *et al.*, 1998). In darauffolgenden Studien wurde beobachtet, dass die Mediatoren dieser Reaktion ~ 22-Nukleotid doppelsträngige RNA-Fragmente („short interfering RNA“ – siRNA) waren, welche intrazellulär durch Dicer-Enzyme aus dsRNA generiert werden (Bernstein *et al.*, 2001). Durch das Einschleusen synthetischer, dem Zielgen homologer siRNAs, die den Produkten von Dicer ähneln, kann in humanen Zellen eine sequenzspezifische, posttranskriptionelle Gensuppression ausgelöst werden (Hannon, 2002).

Die Nucleofektion ist eine nicht-virale Methode der Transfektion, um Nukleinsäuren in Zellen unter Zuhilfenahme von elektischen Potentialänderungen einzubringen. Humane Endothelzellen wurden mit Hilfe des HUVEC „Nucleofector Kits“ (Amaxa, Köln) mit siRNA (Ambion) entsprechend dem Protokoll des Herstellers transfiziert. Folgende Sequenzen wurden verwendet:

Kontroll-non-silencing-siRNA:	sense: UUCUCCGAACGUGUCACGUtt antisense: ACGUGACACGUUCGGAGGAGAAtt
NOD1-siRNA Sequenz 1:	sense: GGGUGAG ACCAUCUUCAUCtt antisense: GAUGAAGAUGGUCUCACCCtg
Sequenz 2:	sense: GGCAA AGUCUAUGAAGAUtt antisense: AUCUUCAUAGACUUUGGCCtc
NOD2-siRNA Sequenz 1:	sense: GGAAUUACCAGUCCCAUUGtt antisense: CAAUGGGACUGGUAAUU CCTg
Sequenz 2:	sense: GGCUGAAAUUCAGAAUAUUt antisense: AAUAUUCUGAAUUUCAGCCtc
TLR2-siRNA:	sense: GCCUUGACCUGUCCAACAAtt antisense: UUGUUGGACA GGUCAAGGctt

Die Endothelzellen wurden mit 0,5% Trypsin-EDTA abgelöst, erneut in HUVEC-Kulturmedium aufgenommen und gezählt. Je Ansatz wurden 10^6 Zellen und 2 μg siRNA eingesetzt. 72 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Überprüfung des spezifischen „knock-down“ mittels der RT-PCR Analyse. Funktionelle Untersuchungen zur Rolle von Nod1, Nod2 und TLR2 in der Zellaktivierung durch *Listeria monocytogenes* wurden 72 h nach der Transfektion durchgeführt.

2.3.3. Infektion von HUVEC

Für Experimente zur MAP-Kinase-Aktivierung wurden die Zellen 3 h vor der Stimulation in Medium ohne FCS inkubiert. Für alle anderen Versuche erfolgte dieser Schritt 1 h vorher.

Die HUVEC-Zellen wurden daraufhin mit *L. monocytogenes* EGD, EGD Δhly , EGD ΔInlB oder *L. innocua* INN (MOI 0,05 und 5) in MCDB131 Medium ohne FCS infiziert. Nachfolgend wurden die Platten bei 600 x g 30 min lang zentrifugiert, um den Kontakt der Bakterien mit den Zellen zu verbessern. Nach 60 bis 90 min und einmaligem Waschen mit PBS -/- erfolgte die Zugabe von neuem HUVEC-Zellkulturmedium mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamicin, um extrazellulär verbliebene Listerien abzutöten. Es ist beschrieben, dass Gentamicin extrazelluläre Listerien, nicht jedoch internalisierte Listerien abtötet (Portnoy *et al.*, 1988). Nach weiterer einstündiger Inkubation (MAP-Kinase Phosphorylierung) oder Übernachtinkubation (IL-8-, Nod-mRNA-Expression) wurden die HUVECs lysiert oder deren Zellüberstände zur weiteren Analyse gesammelt. In einigen Experimenten wurden HUVECs zusätzlich mit dem spezifischen p38 Inhibitor SB202190 (Calbiochem, Darmstadt) oder dem Kontrollpeptid SB202474 (Calbiochem) in Konzentrationen von 1 μM und 10 μM für 1 h vorinkubiert und auch während der Infektion

behandelt. Des Weiteren wurden die HUVECs in einigen Experimenten mit TNF α (10 ng/ml) (Pharmingen, Heidelberg) stimuliert.

2.3.4. Konfokalmikroskopie

Infizierte HUVECs wurden mit 3%igem Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich) für 20 Minuten fixiert und die Färbung zellulärer und bakterieller DNA mit 4',6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI [Sigma-Aldrich]) durchgeführt. Um intrazelluläre *L. monocytogenes*, die Listerienmutanten und *L. innocua* sichtbar zu machen, erfolgte zusätzlich eine F-actin Färbung/Markierung mit Phalloidin Alexa488 (Molecular Probes, Karlsruhe). Fluoreszenzmikroskopische Bilder wurden mit dem Axioskop 2 mot (Objektiv: PlanNeoFluar x 199, NA 1.4) ausgestattet mit einer „AxioCam MRm cooled greyscale“ Kamera (Zeiss) aufgenommen. Die digitale Bildbearbeitung erfolgte mittels ImageProPlus 5.0 Software (Media Cybernetics). Dem DAPI Kanal wurde rote Farbe zugeteilt.

2.3.5. Invasionsassay

HUVECs wurden mit siRNA wie beschrieben transfiziert und in 48-Wellplatten kultiviert. Die Invasion der Listerien in die Endothelzellen und der potentielle Einfluss der siRNA darauf wurden untersucht. HUVECs wurden mit *L. monocytogenes* mit einer MOI von 0,5 infiziert und bei 600 x g für 30 min zentrifugiert, um den Kontakt zwischen Zellen und Bakterien zu verbessern. Nach 60 min wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und neues HUVEC-Zellkulturmedium mit Gentamicin in einer Konzentration von 100 μ g/ml hinzugegeben, um eventuell extrazelluläre Listerien abzutöten. Eine weitere Stunde später wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und in Zellkulturmedium ohne Antibiotikum über Nacht inkubiert. Daraufhin wurden die HUVECs mittels 0,2% Triton X-100 20 min lang lysiert, verdünnt und auf BHI-Agar ausplattiert, um die Anzahl intrazellulärer Bakterien zu bestimmen. Kontrollexperimente, deren Daten hier nicht aufgeführt werden, wiesen eine ausreichende Abtötung extrazellulärer Listerien durch Gentamicin nach.

2.3.6. Interleukin-8 ELISA

Die Konzentrationen von h(humanem)IL-8 in den HUVEC- bzw. HEK293-Zellüberständen wurden mittels eines Sandwich-ELISA (OptEIA Set humanIL8, Pharmingen) gemessen. MaxiSorp-ELISA-Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden mit 100 μ l/Well 1:250 in Carbonatpuffer (4,2 g NaHCO₃, 1,78 g Na₂CO₃, 500 ml Aqua bidest, pH=9,5) verdünntem anti-hIL-8 Antikörper über Nacht bei 4 °C beschichtet. Daraufhin folgte, wie auch vor allen weiteren

Schritten, ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (PBS 1x, 0,05 % Tween-20, pH=7). Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur mit Blockingpuffer (PBS 1x, 10 % inaktiviertes FCS) zum Absättigen unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die hIL-8 Standardreihe sowie die Zellüberstände (1: 500 verdünnt) aufgetragen und weitere 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion mit 100 µl/Well anti-hIL-8 Antikörper und Enzymreagenz (48 µl anti-hIL-8, 48 µl „avidin-horseradish peroxidase“ Konjugat, 11,95 ml Blockingpuffer) für 1 h. Nach Herunterwaschen des Detektionsantikörpers wurden 100 µl/Well Substratlösung (H₂O₂ und 3,3',5,5'tetramethylbenzidine zu gleichen Teilen) hinzugegeben und die einsetzende Farbreaktion nach 30 minütiger Inkubation im Dunkeln mit 50 µl/Well 1 M H₂SO₄ abgestoppt. Mit einem Spektrometer wurde die Extinktion bei 450 nm gemessen und daraus mittels Standardkurve die jeweiligen IL-8-Konzentrationen ermittelt. Die Absolutwerte der gemessenen IL-8-Konzentrationen lagen im Bereich zwischen 3,1 pg/ml und 200 pg/ml.

2.3.7. Gel-Elektrophorese und Western-Blot

Die Bestimmung der Tyrosinphosphorylierungen der p38-Kinase erfolgte mittels Elektrophorese und Western-Blot-Technik.

Proteinextraktion:

Die Zellen wurden mit eiskalten Phosphoproteinwaschpuffer (5 ml Na₃VO₃, 50 ml NaF, 50 ml Na₄P₂O₇ in 500 ml H₂O) gewaschen und in Lysepuffer (20 µl je 6-Well) (50 mM Tris-HCL [pH=7,4], 0,25 mM EDTA, 1 mM Phenylmethansulfonylfluorid, 10 µg/ml Antipain, 10 µg/ml Pepstatin, 10 µg/ml Leupeptin, 1% NP40 Phosphoproteinwaschpuffer) abgeschabt. Das erhaltene Lysat wurde 10 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert und die so gewonnenen proteinhaltigen Überstände in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. 5 µl der Proben wurden zur Proteinbestimmung nach Bradford verwendet und der Rest bei -20°C gelagert.

Proteinbestimmung nach Bradford:

Die Proteinbestimmung erfolgt durch Messung des Farbumschlags der Bradford-Reagenz (BioRad). Hierbei ändert der Farbstoff sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm nach Bindung von Aminosäuren. 5 µl der zuvor gewonnenen Überstände wurden mit 1 ml Reagenz gut vermischt und die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Über eine zuvor hergestellte Standardkurve konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden.

Gel-Elektrophorese:

Von den aufgetauten Proben wurde jeweils 60 µg Protein entnommen, mit dem gleichen Volumen an Auftragepuffer (47,5% Aqua bidest, 12,5% 0,5 M Tris-HCL [pH=6,8] 10% Glycerol, 20% SDS [10%], 5% Bromphenolblau [1%], 5% 2-Mercaptoethanol [1%]) versetzt und 5 min unter Schütteln bei 95°C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel (Sammelgel: 0,5 M Tris-HCL [pH=6,8], Aqua bidest, 10 % SDS, Acrylamid 19:1, Ammoniumpersulfat 10%, TEMED, Trenngel-Puffer: 1,5 M Tris-HCL [pH=8,8], Aqua bidest, 10% SDS, Acrylamid 19:1, 10% Ammoniumpersulfat, TEMED). Das anionische Detergens SDS bindet in einem festen Massenverhältnis an das Polypeptidgerüst der Proteine und verleiht diesen dadurch eine negative Außenladung, welche eine Auftrennung nach Molekulargewicht im Gel ermöglicht. Die Proben sowie ein Marker (Amersham Rainbow high) zur Größenbestimmung wurden in je eine Geltasche aufgetragen. Die darauffolgende Elektrophorese erfolgte in BioRad Mini-Gel-Kammern im 1x Puffersystem (Lauf-Puffer 5x: 15 g Tris-Base, 72 g Glycerin 5 g SDS, 1000ml Aqua bidest) bei 100 V für 2 h.

Protein-Blot:

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Trenngele vorsichtig aus den Kammern gelöst, für 10-15 min in 1x Blotting-Puffer (Blotting-Puffer 10X 15 g Tris-Base, 72 g Glycerin, 500 ml Aqua bidest) äquilibriert und auf eine ebenfalls puffergetränkte Hybond-Nitrozellulosemembran (Amersham, München) gelegt. Um die Gel-Membran-Konstruktion wurde ein Sandwich aus zwei puffergetränkten Lagen 3M-Whatman-Filterpapieren und der Blotvorrichtung (Transblot) gebildet. Diese wurde in die Blotkammer überführt und zusammen mit eiskaltem Blotting Puffer bei 100 V und maximaler Stromstärke eine Stunde geblottet. Auf diesem Weg wurden die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen, um eine optimale Antikörperdetektion zu ermöglichen. Nach erfolgtem Blotten konnte der Transfererfolg mittels reversibler Ponceau-S-Färbung (250 ml Aqua bidest, 5 ml Eisessig, 1 g Ponceau S) der Membran beurteilt werden.

Antikörperexposition:

Die Membran wurde daraufhin 1 h in Odyssey-Blockpuffer (LI-COR Biosciences, Bad Homburg) inkubiert, um freie unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Daraufhin wurde die Membran über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler mit spezifischen primären Antikörper (pp38 [Cell Signaling Technology] bzw. p42, [Santa Cruz Biotechnology]) in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Am folgenden Tag wurde gründlich mit PBS + 0,1% Tween-20 gewaschen und nachfolgend der sekundäre Antikörper gelöst in PBST und Licorblocking für 1 h bei

Raumtemperatur zugesetzt. Die an den primären Antikörper gebundenen mit IRDye800 (anti-rabbit [Rockland Immunochemicals]) oder Cy.5.5 (anti-mouse [Rockland Immunochemicals]) markierten sekundären Antikörper wurde mit Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) detektiert und nach Herstellervorgaben mit einer entsprechenden Software bearbeitet.

2.3.8. Reverse Transkription/Polymerasekettenreaktion

Die reverse Transkription und anschließende PCR diente der Analyse der mRNA-Expression von Nod1 bzw. Nod2 in HUVEC- bzw. HEK293-Zellen. Zuerst wurde aus der isolierten mRNA cDNA im RT-Schritt gewonnen, welche dann als Template für die PCR genutzt wurde. Die Isolation und Aufreinigung der RNA aus den Endothelzellen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers. Die RNA-Konzentration wurde bei 260 nm Wellenlänge im Photometer ermittelt.

Reverse Transkription:

1 µg RNA wurden nach Zugabe von 11,5 µl Aqua tridest im Thermocycler im ersten Inkubationsschritt 5 min bei 70°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 42°C wurden 8,5 µl des RT-PCR Master Mixes (4 µl 5x AMV-Puffer, 2 µl 10 mM dNTP [Promega, Mannheim], 1 µl Hexamer-Primer [0,2 µg/µl][Pharmacia], 0,75 µl RNAsin [Promega]), 0,75 µl AMV RT [Promega]) hinzugefügt und der Ansatz für weitere 60 min bei 42°C inkubiert. Die RT-Reaktion wurde durch Erhitzen auf 95°C beendet. Die gewonnene cDNA wurde mit Aqua tridest auf 100 µl aufgefüllt und für die PCR weiterverwendet bzw. bei -20 °C weggefroren.

Polymerase-Kettenreaktion:

5 µl cDNA wurden nach Zugabe von 20 µl PCR-Master Mix (2,5 µl 10x Red Taq PCR Reaction Buffer, 0,5 µl 10 mM dNTP [Promega], 2 x 0,25 µl Primer [0,5 µg/ml] – „forward“ und „reverse“, 15,25 µl Aqua tridest, 1,25 µl Red Taq Polymerase) in 31 (Nod1) bzw. 34 Zyklen (Nod2) amplifiziert.

Folgende Primer (Tib Molbiol) wurden eingesetzt:

Nod1: sense 5'-AAGCGAAGAGCTGACCAAT-3'
 antisense 5'-TTCATAGACTTTGGCCTCCTC-3'

Nod2: sense 5'-AGCCATTGTCAGGAGGCTC-3'
 antisense 5'-CGTCTCTGCTCCATCATAGG-3'

Die PCR-Produkte wurden danach in 1,5%igem Agarosegel mit Ethidiumbromid analysiert und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Um sicherzustellen, dass die gleichen Mengen an mRNA eingesetzt wurden, wurde von jeder Probe gleichzeitig die GAPDH mRNA-Expression bestimmt.

2.4. HEK293 – Überexpressionsexperimente

2.4.1. Zellkultur und Transfektion der HEK293-Zellen

Die humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293 [ATCC]) wurden in DMEM-Medium (Invitrogen, Paisley, UK) mit 10% inaktiviertem FCS, 1% Glutamat und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert und in 24-Well-Platten ausgesät. 80%ig konfluente Zellen wurden mittels der Kalzium-Phosphat-Methode entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Clontech, Palo Alto, USA) mit 0,05 ng leerem Expressionsvektor, 0,05 ng Nod1, 0,05 ng Nod2 bzw. 0,05 ng TLR2 sowie 0,05 µg NF-κB-abhängigem Luciferase Reporter gen und 0,025 µg β-Galaktosidase Reporter gen je Well einer 24-Well-Platte transfiziert. Nach fünf-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ und einmaligem Waschen mit PBS -/- wurde den Zellen neues Medium zugegeben. Für die Experimente, in denen die p38-MAP-Kinase-Phosphorylierung oder IL-8-Sekretion bestimmt wurde, erfolgte die Transfektion mit 1,2 µg (12-Well-Platte) oder 0,5 µg (24-Well-Platte) des Nod1-Expressionsplasmids oder des entsprechenden leeren Expressionsvektors mittels des Superfect-Reagenzes (Qiagen).

2.4.2. Infektion der HEK293-Zellen

Am darauffolgenden Tag erfolgte die Infektion der Zellen mit *L. monocytogenes* in einer MOI von 2 bzw. 20 in DMEM ohne Antibiotikazugabe. Nach 1,5-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen und mit neuem Medium, welches mit 100 µg/ml Gentamicin zur Abtötung extrazellulärer Listerien versetzt war, versorgt und daraufhin weitere 1,5 Stunden kultiviert.

Um die NF-κB-Aktivierung durch hitzeinaktive Listerien zu untersuchen, wurden diese („MOI“ = 2) während der Transfektion dem Kulturmedium zugefügt, um zusammen mit der zu transfizierenden DNA in die Zellen aufgenommen zu werden.

2.4.3. β-Galaktosidase- und Luciferase-Bestimmung

Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte unter Verwendung des Luciferase Reporter gen Assay Systems (Promega). Die Zellen wurden gewaschen und entsprechend den Angaben des

Herstellers mit Lysepuffer (Promega) lysiert. 5 µl Lysat wurden mit 30 µl Luciferase Assay Reagent versetzt und die Lumineszenz gemessen. Die relative Luciferaseaktivität wurde nach Abgleich mit der RSV-β-Galaktosidaseaktivität nach Protokoll des Herstellers (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) bestimmt und in Mittelwerten des Vielfachen der Grundaktivität +/- Standardabweichung graphisch dargestellt.

2.4.4. Versuche mit p38-MAPK- Inhibitor

In einigen Experimenten wurden der spezifische p38-Inhibitor SB202190 oder das Kontrollpeptid SB202474 in Konzentrationen von 0,1 µM, 1 µM und 10 µM 24 h nach erfolgter Transfektion mit Nod1 bzw. einem Kontrollvektor (s.o.) inkubiert und mit TNFα (10 ng/ml) für weitere 12 h stimuliert. Die Überstände wurden daraufhin mittels IL-8 ELISA wie oben beschrieben analysiert.

2.4.5. Untersuchung der p38-MAPK Phosphorylierung durch Western-Blot

HEK293 Zellen wurden entweder mit einem leeren Expressionsvektor oder einem Nod1-Expressionsplasmid mit Hilfe des „Superfect Transfektionsreagenz“ (Qiagen) transfiziert. Am folgenden Tag erfolgte wie beschrieben die Infektion mit *L. monocytogenes* (EGD). Die Lyse der Zellen, die Fraktionierung im SDS-Polyacrylamidgel sowie das Immunoblotting mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte Form von p38 (pp38) sowie von p42 als Ladekontrolle erfolgte wie für HUVEC beschrieben.

2.5. Statistische Auswertung und benutzte Software

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Students-t-Test. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind gekennzeichnet (*); n.s. = nicht signifikant.

3. ERGEBNISSE

3.1. Zytosolische *L. monocytogenes* induzieren die IL 8 – Produktion in humanen Endothelzellen

Um den Einfluß von *L. monocytogenes*, *L. innocua* bzw. verschiedener Deletionsmutanten auf humane Endothelzellen zu untersuchen, wurden HUVEC mit *L. monocytogenes* (EGD), der InlB- bzw. der LLO-defizienten Mutante sowie dem nicht-pathogenen Stamm *L. innocua* infiziert. In der Konfokalmikroskopie ist zu erkennen, dass *L. monocytogenes* (EGD) und zu einem geringen Teil auch Internalin B-defiziente Listerien in die Endothelzellen einzudringen und Aktinfilamente zu rekrutieren vermochten. Im Gegensatz dazu waren *L. innocua* und Δ LLO-Listerien nicht in der Aktin- und DAPI-Färbung darstellbar. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass *L. innocua* und LLO-defiziente Listerien nicht in das Zytosplasma eindringen können, in der Vakuole abgetötet werden bzw. sich nicht oder nicht ausreichend vermehren können.

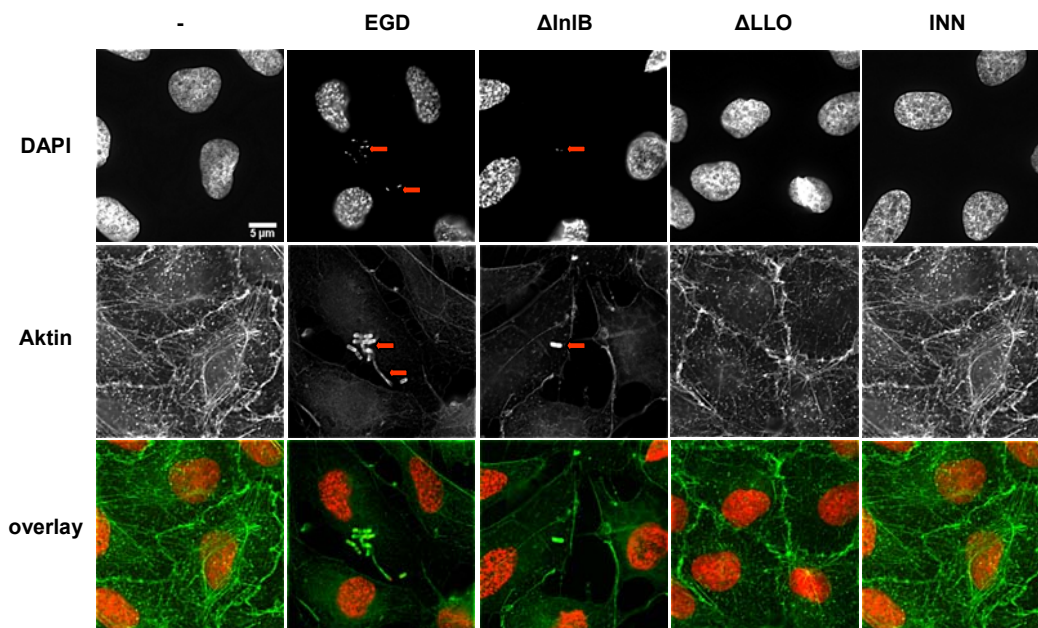


Abbildung 3.1.1. Invasivität verschiedener Listerien – Stämme

HUVEC wurden mit *L. monocytogenes*, InlB (Δ InlB)- und LLO (Δ LLO)- defizienten Mutanten sowie dem apathogenen Stamm *L. innocua* infiziert. Nach der Fixierung erfolgte die Färbung mit DAPI zur Darstellung bakterieller und zellulärer DNA sowie eine Aktinfärbung. Die intrazellulären Bakterien wurden mittels Konfokallaser mikroskopie detektiert.

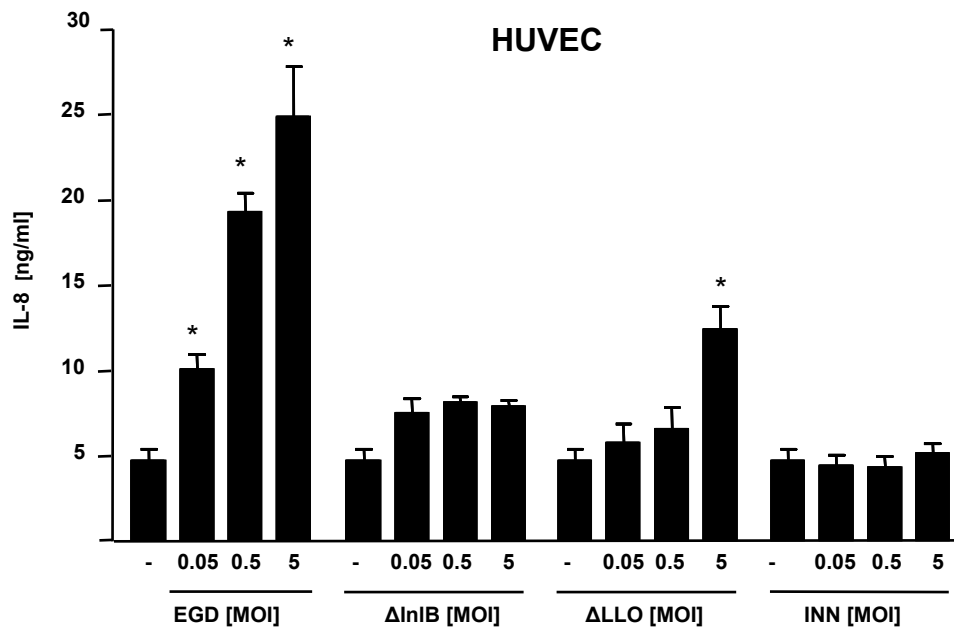


Abbildung 3.1.2. *Listeria monocytogenes* (EGD) induziert die IL-8 Produktion in HUVEC

HUVEC wurden mit *Listeria monocytogenes* (EGD), der Internalin B- (Δ InIB) oder der Listeriolysin-defizienten Mutante (Δ LLO) oder mit *L. innocua* (INN) infiziert. Nach 90 min wurden die Zellen gewaschen und Gentamicin-haltiges Medium wurde zugefügt. Die Überstände wurden am nächsten Morgen auf IL-8 Sekretion mittels ELISA analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen, jeweils mit Doppelwerten.

In weiteren Versuchen wurde der Einfluß der Listerieninfektion auf die IL-8 Produktion der humanen Endothelzellen untersucht. Hierbei korrelierte die IL-8 Produktion mit der Invasivität der Bakterien (Abbildung 3.1.2.). Die Infektion mit Wildtyp-EGD, nicht jedoch mit Δ InIB- oder Δ LLO-defizienten *L. monocytogenes* oder *L. innocua*, bewirkte eine konzentrationsabhängige Erhöhung der IL-8 Produktion im Vergleich zu nicht infizierten Zellen. In sehr hohen Konzentrationen (MOI = 5) führte auch die Infektion mit dem LLO-defizienten Stamm zu einer leichten Erhöhung der Zytokinausschüttung. Somit schienen Endothelzellen v.a. dann IL-8 zu produzieren, wenn sie mit invasiven Listerien infiziert wurden. Es stellte sich somit die Frage inwiefern intrazelluläre Rezeptoren, z.B. die kürzlich entdeckten NOD-Proteine, an der Listerien-abhängigen Endothelzellaktivierung beteiligt waren.

3.2. Die Bedeutung von Nod1, Nod2 und TLR2 für die IL-8-Produktion durch Listerien-infizierte Endothelzellen

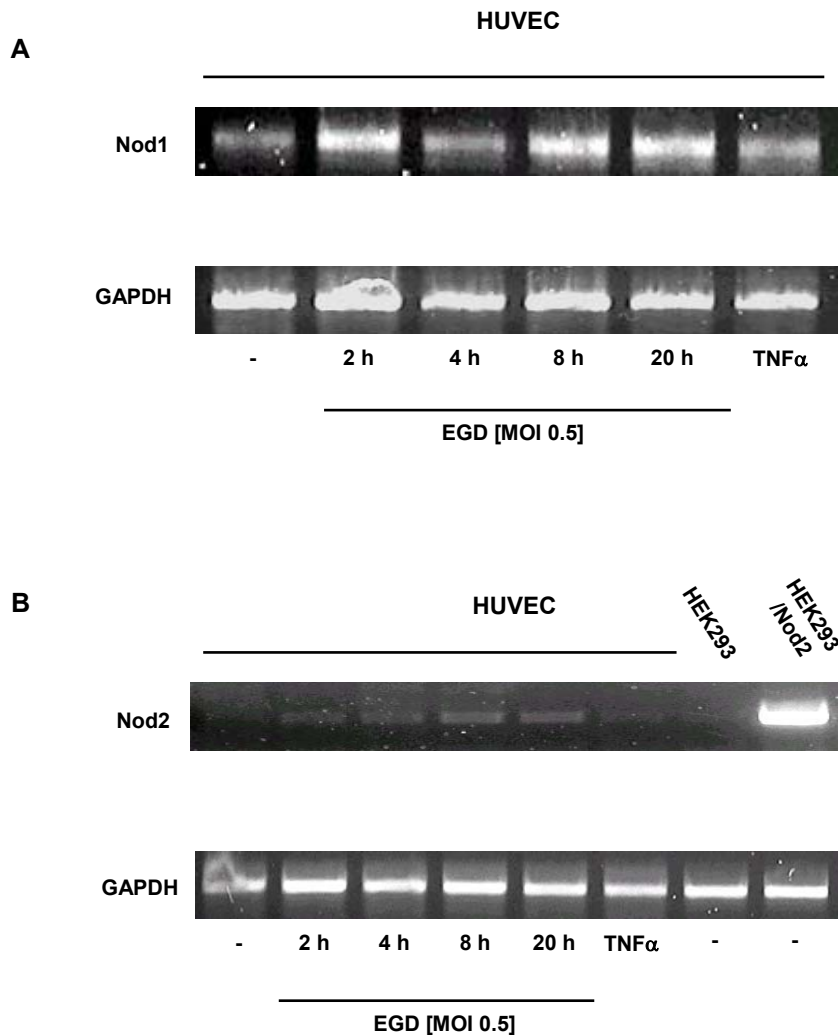


Abbildung 3.2.1. Die Expression von Nod1 und Nod2 in HUVEC Die Nod1- und Nod2-mRNA-Expression vor bzw. nach der Infektion von HUVEC mit *L. monocytogenes* (EGD) bzw. nach Behandlung mit TNF α wurden mittels RT-PCR analysiert (Nod1: 31 Zyklen, Nod2: 34 Zyklen). Nod2-überexprimierende HEK293 Zellen dienen als Positivkontrolle für die Nod2 RT-PCR

Die Expression von Nod1- bzw. Nod2-mRNA in Endothelzellen wurde mittels RT-PCR untersucht. Unbehandelte HUVEC exprimierten konstitutiv Nod1-mRNA, jedoch keine Nod2-mRNA. Nach Stimulation der Zellen durch Wildtyp-*L. monocytogenes* (EGD) erfolgte eine Induktion der Nod1-mRNA-Expression sowie eine deutlich schwächer ausgeprägte Nod2-mRNA-Expression. Eine Stimulation mit TNF α hingegen hatte keinen Einfluss auf die Nod1- bzw. Nod2-mRNA-Expression. Nod2-überexprimierende HEK293-Zellen dienen als Positivkontrolle für die Nod2-RT-PCR (Abbildung 3.2.1.).

Als nächstes sollte die Rolle von Nod1 und Nod2 in der Listerien-induzierten IL-8-Produktion durch Endothelzellen untersucht werden. Hierfür wurden zunächst Versuche mit siRNA durchgeführt, um die endogene Nod1- bzw. Nod2-Expression zu unterdrücken. Zuerst wurden verschiedene siRNA Sequenzen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Nod1- bzw. Nod2-mRNA-Expression zu hemmen. Lediglich die beiden Nod1- bzw. eines der beiden Nod2-spezifischen Oligonukleotide, nicht jedoch die unspezifische Kontroll-siRNA, reduzierten die entsprechende Nod1- bzw. Nod2 mRNA-Expression (Abbildung 3.2.2.).

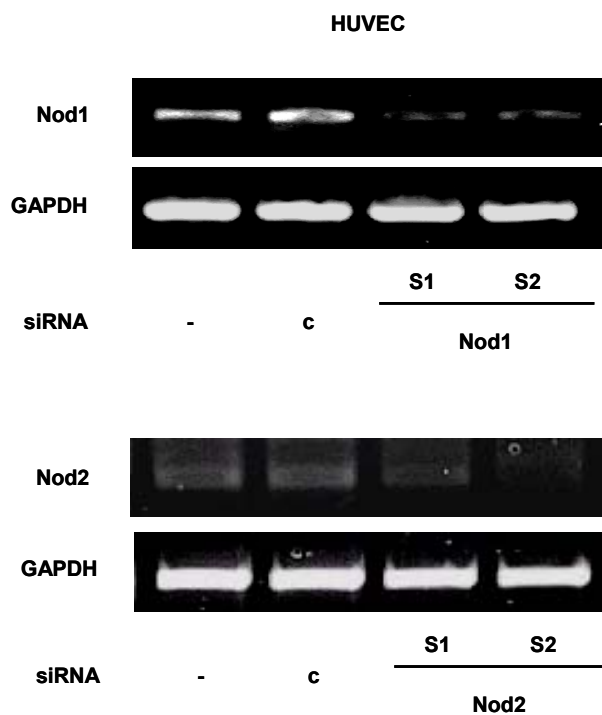


Abbildung 3.2.2. Nachweis der Reduzierung der mRNA-Expression durch spezifische Nod1- bzw. Nod2-mRNA HUVECs wurden untransfiziert belassen oder mit siRNA gegen Nod1 (S1-2, Sequenzen 1-2), Nod2 (S1-2, Sequenzen 1-2) bzw. der Kontroll-siRNA (c) transfiziert. Nach 72 h wurde die Expression von Nod1, Nod2 bzw. von GAPDH mittels RT-PCR beurteilt (Nod1: 31 Zyklen, Nod2: 34 Zyklen).

Beide Nod1-spezifischen-, nicht jedoch die Kontroll-siRNAs hemmten signifikant die *L. monocytogenes*-aktivierte IL-8-Produktion in HUVECs (Abbildung 3.2.3. A). Im Gegensatz dazu wurde die TNF α - und LPS-induzierte IL-8-Sekretion nicht durch Nod1-siRNA beeinflusst. Des Weiteren wurde die Rolle von Nod2 in der Listerien-vermittelten IL-8-Produktion durch humane Endothelzellen untersucht. Die Transfektion mit Nod2-spezifischer siRNA bewirkte keine Verminderung der IL-8-Ausschüttung in infizierten Zellen (Abbildung 3.2.3. B). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Nod1, nicht jedoch Nod2, die IL-8-Produktion in *L. monocytogenes*-infizierten HUVEC vermittelt.

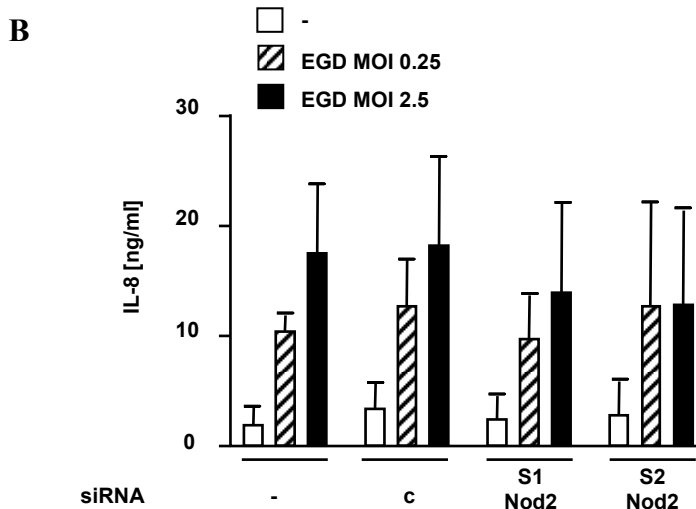
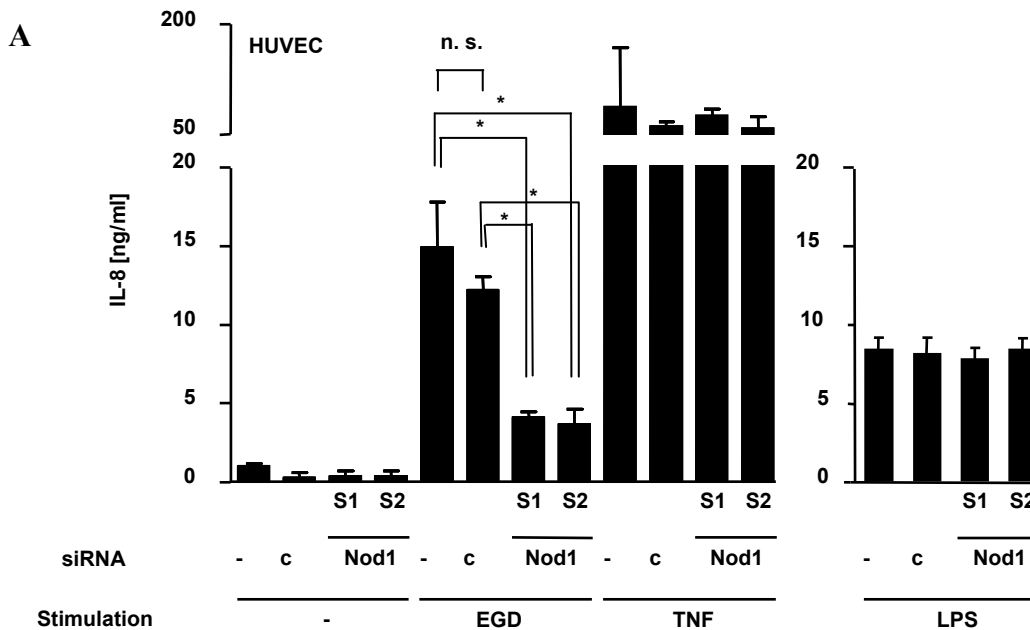


Abbildung 3.2.3. *L. monocytogenes* induziert die IL-8-Produktion über Nod1 HUVECs wurden untransfiziert belassen oder mit siRNA gegen Nod1 (A) oder Nod2 (B) (S1-2, Sequenzen 1-2) bzw. Kontroll-siRNA (c) transfiziert. 72 h später erfolgte die Stimulation mit *L. monocytogenes* (MOI 0,5) bzw. TNF α (10 ng/ml) oder LPS (10 μ g/ml). In den Überständen wurde 1 Tag später die IL-8 Konzentration mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung zweier unabhängiger Versuche von insgesamt vier Versuchen mit ähnlichen Ergebnissen (A) bzw. von vier unabhängigen Versuchen (B).

Während die hier dargestellten Ergebnisse Hinweise auf die wichtige Bedeutung von intrazellulären PRRs, insbesondere von Nod1 für die angeborene Immunantwort von Endothelzellen auf *L. monocytogenes* geben, wurde in der Literatur auch eine Rolle des transmembranären TLR2-Rezeptors für die Erkennung von *L. monocytogenes* durch andere Zellen des angeborenen Immunsystems beschrieben (Flo *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2004). Zur genaueren Untersuchung der Rolle von TLR2 in der Listerieninfektion endothelialer Zellen wurden HUVECs mit siRNA gegen TLR2 transfiziert. Es zeigt sich, dass die *L. monocytogenes* (EGD)-induzierte IL-8-Sekretion nicht durch TLR2-spezifische- oder Kontroll-siRNA beeinflusst wurde (Abbildung 3.2.4.). Im Gegensatz dazu wurde die durch den TLR2-Agonisten

MALP-2 hervorgerufene IL-8-Produktion in den mit TLR2-siRNA transfizierten Zellen jedoch signifikant vermindert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TLR2 keine entscheidene Rolle für die *L. monocytogenes*-induzierte IL-8-Produktion in HUVEC einnimmt.

Zusätzlich zur Bedeutung von Nod2 für die NF- κ B-abhängige Genregulation wurde Nod2 auch als antibakteriell wirkender Faktor beschrieben (Hisamatsu *et al.*, 2003). Um zu untersuchen, ob Nod1 möglicherweise ebenfalls das intrazelluläre Überleben oder Wachstum der Listerien beeinflusst, wurden die zuvor mit Nod1- oder Kontroll-siRNA transfizierten HUVEC mit den Bakterien für 60 min inkubiert. Daraufhin wurde Gentamicin-haltiges Zellkulturmedium hinzugefügt, um die extrazellulären Listerien abzutöten. Am folgenden Tag wurden die Zellen lysiert und auf BHI-Agar ausplattiert. Es zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der Zahl intrazellulärer Bakterien durch die Nod1- oder Kontroll-siRNA 20 h post infectionem (Abbildung 3.2.5).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine wichtige Rolle von Nod1, nicht jedoch von Nod2 oder TLR2, in der Listerien-induzierten IL-8-Produktion durch Endothelzellen hin. Im Gegensatz dazu schien die Invasion bzw. intrazelluläre Replikation der Listerien in den Endothelzellen während der Untersuchungszeiträume nicht durch Nod1 beeinflusst zu sein.

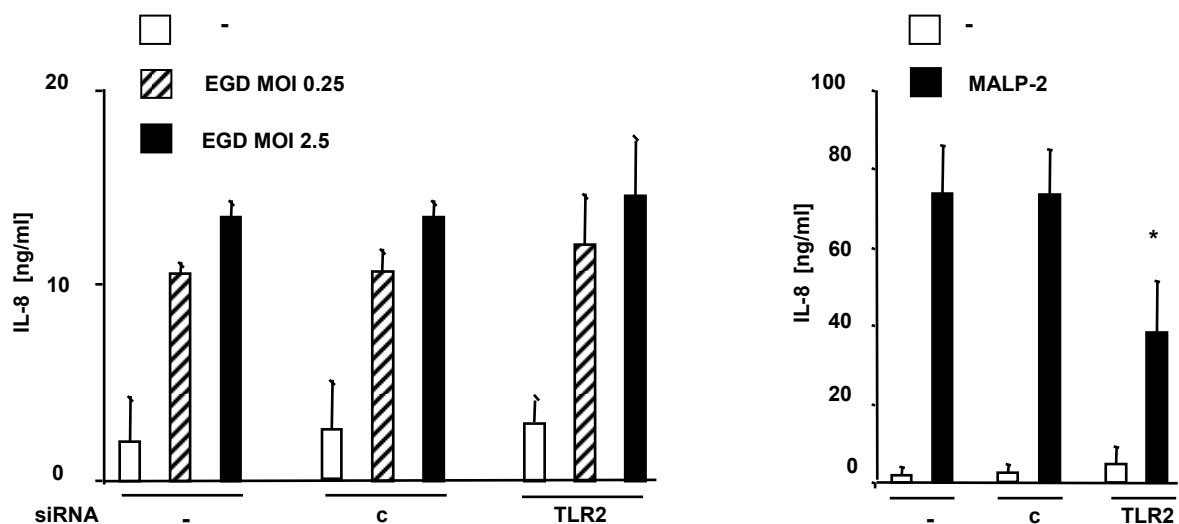


Abbildung 3.2.4. Einfluss von TLR2 auf die *L. monocytogenes* induzierte IL-8-Produktion HUVEC wurden mit siRNA gegen TLR2 transfiziert und 72 h später mit *L. monocytogenes* infiziert bzw. mit dem TLR2-Agonisten MALP-2 (100 ng/ml) stimuliert. Am darauffolgenden Tag wurde die IL-8-Produktion mittels ELISA ermittelt. Im Gegensatz zur Listerien-induzierten IL-8-Produktion in HUVEC wurde die MALP-2-induzierte IL-8-Produktion signifikant durch TLR2-siRNA gehemmt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen.

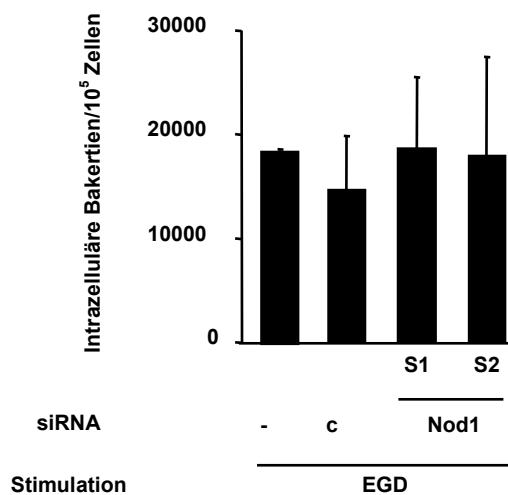


Abbildung 3.2.5. Zell-Invasions-Assay HUVEC wurden mit Kontroll- bzw. Nod1-siRNA transfiziert und 72 h später mit *L. monocytogenes* infiziert. Zur Entfernung extrazellulär verbliebener Bakterien wurden die Zellen gewaschen und Gentamicin haltiges Zellkulturmedium zugefügt. Am nächsten Morgen wurde die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch Auszählen der CFUs bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen, welche jeweils mit Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

3.3. Die Aktivierung von NF- κ B durch *L. monocytogenes* in HEK293-Zellen erfolgt abhängig von Nod1

Zur weiteren Untersuchung der Funktion von Nod1 in der Zellaktivierung nach Infektion mit *L. monocytogenes* wurden Überexpressionsexperimente durchgeführt. Dazu wurden HEK293-Zellen verwendet, welche TLR2-negativ sind (Kirschning *et al.*, 1998) und sich besonders gut für Überexpressionsassays eignen. Des Weiteren konnten nur sehr geringe Mengen von Nod1-mRNA bzw. kaum Nod2-mRNA in diesen Zellen nachgewiesen werden (Opitz *et al.*, 2004). Zunächst wurde der Einfluß von Nod1 auf die NF- κ B-Aktivierung mit Hilfe eines NF- κ B-abhängigen Reportergens untersucht.

Die HEK293-Zellen wurden mit Nod1-, Nod2- oder TLR2-kodierenden Plasmiden bzw. leeren Expressionsvektoren (mock) sowie NF- κ B-abhängigen Luciferase-Reportergen-Konstrukten und RSV- β -Galaktosidase-Konstrukten transient kotransfiziert. Nach einer Ruhephase wurden die Zellen in den angegebenen Konzentrationen mit *L. monocytogenes* (EGD) bzw. dem nichtinvasiven Stamm *L. innocua* (INN) infiziert.

Nach Überexpression von Nod1 oder Nod2 konnte in nicht-infizierten Zellen eine konstitutive Reporter-Gen Aktivität verzeichnet werden (Abbildung 3.3.1.). Diese Beobachtung korreliert mit bisher veröffentlichten Ergebnissen. Es scheint, dass Nod1 und Nod2 nach Überexpression durch Auto-Oligomerisierung aktiviert werden können (Bertin *et al.*, 1999; Girardin *et al.*, 2003b;

Inohara *et al.*, 1999). *L. monocytogenes* war in der Lage, eine NF- κ B-Aktivität in HEK293-Zellen zu induzieren. Die Kotransfektion von Nod1 und TLR2, kaum jedoch von Nod2, verstärkte diese Listerien-stimulierte NF- κ B-Aktivierung deutlich. Im Gegensatz dazu bewirkte *L. innocua* eine NF- κ B Aktivierung lediglich in den TLR2-transfizierten HEK293-Zellen. Diese Ergebnisse deuten somit ebenfalls auf eine vornehmlich Nod1-abhängige Wirtszellaktivierung durch zytoplasmische Listerien hin. Darüber hinaus scheint TLR2 in TLR2-exprimierenden Zellen eine kleine Bedeutung für die Erkennung von sich extrazellulär befindenden Listerien zu spielen.

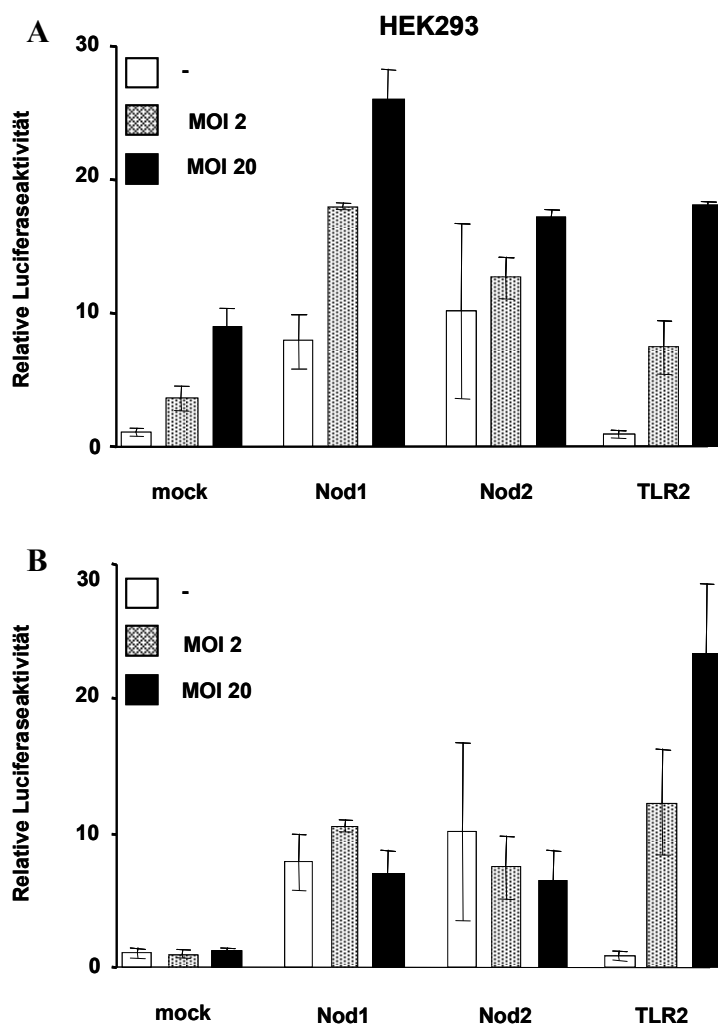


Abbildung 3.3.1. *L. monocytogenes*, nicht jedoch *L. innocua*, induziert eine Nod1-abhängige NF- κ B-Aktivierung in HEK293 Zellen. HEK293 Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (mock), Nod1-, Nod2- oder TLR2-Expressionsplasmiden sowie einem NF- κ B-abhängigen Luciferase-Reportergenkonstrukt und einem RSV- β -Galactosidase Reporterplasmid kotransfiziert. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion der Zellen mit *L. monocytogenes* (EGD) (**A**) oder *L. innocua* (INN) (**B**) (jeweils MOI = 2 oder 20) für 3.5 h. Die relativen Luciferaseaktivitäten wurden bestimmt und als Mittelwerte \pm Standardabweichungen als Vielfaches der Grundaktivität dargestellt.

Zur Bestätigung dieser Hypothese, wurden hitzeinaktivierte *L. monocytogenes* in die HEK293-Zellen zusammen mit Nod1-Vektoren sowie dem NF- κ B-Reporterplasmids wie in „Material und Methoden“ beschrieben transfiziert. Es zeigte sich eine Listerien-induzierte NF- κ B-Aktivierung in den Nod1-transfizierten Zellen, nicht jedoch in den mit dem Leervektor-transfizierten Zellen (Abbildung 3.3.2.).

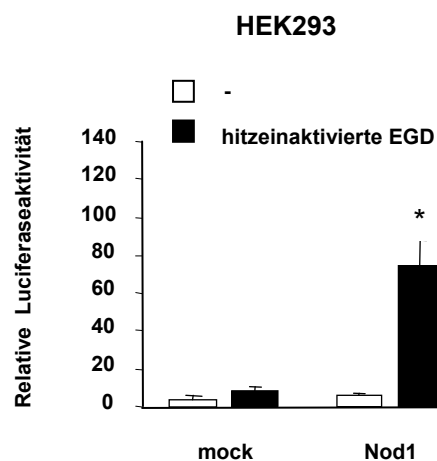


Abbildung 3.3.2 Hitzeinaktivierte *L. monocytogenes* (EGD) bewirken eine Nod1-abhängige NF- κ B Aktivierung in HEK293 Zellen. HEK293 wurden mit einem Kontrollvektor (mock), Nod1-Expressions-Plasmiden sowie einem NF- κ B- bzw. β -Galaktosidase-Konstrukt transfiziert. Während der Transfektion wurden die hitzeinaktivierten *L. monocytogenes* (EGD) („MOI = 2“) hinzugefügt, um deren Internalisierung zu ermöglichen. Die relative Luciferaseaktivität wurde bestimmt und als Mittelwert \pm Standardabweichung als Vielfaches der Grundaktivität für einen von drei repräsentativen, unabhängigen Versuchen mit Doppelwerten dargestellt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine Nod1-abhängige NF- κ B-Aktivierung in HEK293-Zellen nur durch zytosolisch lokalisierte (lebende oder hitzeinaktive) Listerien ausgelöst werden kann.

3.4. *Listeria monocytogenes* aktiviert Nod1-abhängig die p38-MAPK

Die Aktivierung von MAPK ist ein früher Schritt in der intrazellulären Signaltransduktion nach der Aktivierung vieler Zellen. So spielt z.B. die p38-MAPK eine essentielle Rolle in der Regulation der Produktion vieler proinflammatorischer Zytokine einschließlich von IL-8 (Roux and Blenis, 2004). Die Beeinflussung der p38-MAPK-Aktivierung durch Nod1 nach Stimulation mit *L. monocytogenes* wurde im Folgenden untersucht.

Hierzu wurden HUVEC erneut mit *L. monocytogenes* infiziert und die Überstände der Zellysate mittels spezifischer Antikörper im Westernblot auf das Vorhandensein der phosphorylierten und damit aktivierten Form von p38-MAPK (pp38) hin untersucht. Als Ladekontrolle diente die Detektion der unphosphorylierten p42-Kinase. Es zeigte sich eine Aktivierung von p38 in *L. monocytogenes* infizierten HUVEC-Zellen (Abbildung 3.4.1. A). Dieser Effekt war kaum in den Zellen nachweisbar, in denen zuvor siRNA gegen Nod1 transfiziert worden war, Die

unspezifische Kontroll-siRNA hingegen hatte kaum einen Einfluß auf die p38-Aktivierung durch *L. monocytogenes*. Diese Resultate weisen darauf hin, dass Nod1 in der *L. monocytogenes*-induzierten p38-MAPK-Aktivierung eine wichtige Rolle einnimmt. Zur Bestätigung dieses Zusammenhangs wurden Überexpressionsexperimenten in HEK293 Zellen durchgeführt. Sie wurden entweder mit einem Kontrollvektor oder Nod1 transfiziert und daraufhin mit *L. monocytogenes* infiziert. Es zeigte sich eine verstärkte *L. monocytogenes*-induzierte p38-MAPK-Phosphorylierung durch Überexpression von Nod1 (Abbildung 3.4.1. B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die p38-MAPK Nod1-abhängig in der Listerieninfektion aktiviert werden kann.

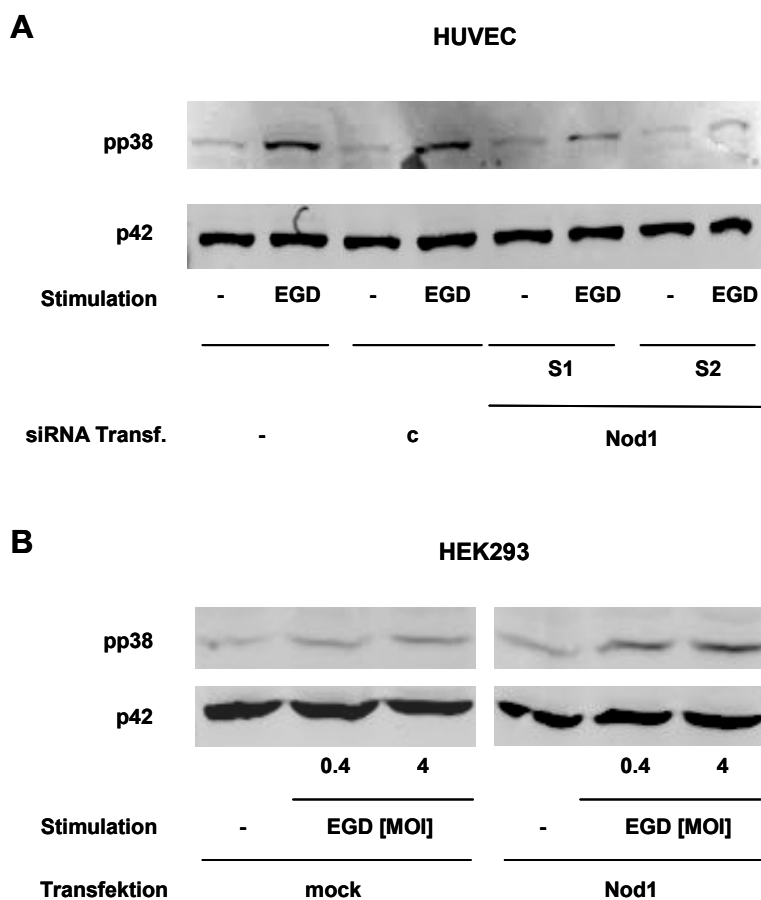


Abbildung 3.4.1. Die *L. monocytogenes* induzierte p38-MAPK Phosphorylierung in HUVEC (A) und HEK293 Zellen (B) ist Nod1-abhängig (A) HUVEC wurden wie dargestellt mit siRNA transfiziert. 72 h nach der Transfektion erfolgte die Infektion mit *L. monocytogenes* (EGD) mit einer MOI von 1. **(B)** HEK293-Zellen wurden entweder mit einem leeren Kontrollvektor (mock) oder einem Nod1-Expressionsplasmid transfiziert. Die Zellen wurden am folgenden Tag mit *L. monocytogenes* (EGD) in den angegebenen MOI infiziert. **(A + B)** Die Zellysate wurden daraufhin im SDS-Acrylamidgel fraktioniert und durch Immunoblotting mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte Form von p38 (pp38) analysiert. Die parallele Detektion von p42-MAPK diente dabei als Beladungskontrolle. Die Abbildung stellt einen repräsentativen Versuch von vier (A) bzw. einen von drei (B) unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar.

3.5. Die durch *L. monocytogenes* und Nod1 induzierte IL 8-Produktion wird durch p38-MAPK vermittelt

Die Beobachtung, dass sowohl die IL-8-Produktion als auch die p38-Aktivierung in Listerien-infizierten Endothelzellen Nod1-abhängig verlief, ließ uns untersuchen, welche Rolle die p38-MAPK in der Listerien-stimulierten, Nod1-abhängigen IL-8-Produktion spielt.

Humane Endothelzelle wurden entweder mit dem spezifischen p38-Inhibitor SB202190 oder dem unspezifischen Kontrollpeptid SB202474 vorbehandelt und nachfolgend mit *L. monocytogenes* infiziert oder mit TNF α stimuliert. Die Bakterien-induzierte IL-8 Sekretion wurde durch den p38-MAPK-Inhibitor dosisabhängig reduziert (Abbildung 3.5.1.). Im Gegensatz dazu war kaum ein inhibitorischer Effekt in den mit SB202474 behandelten Zellen nachzuweisen. Die TNF α -aktivierte IL-8-Produktion wurde nicht wesentlich durch den Inhibitoren SB202474, SB202190 oder die Kontrollsubstanz (Zellkulturmedium) verändert.

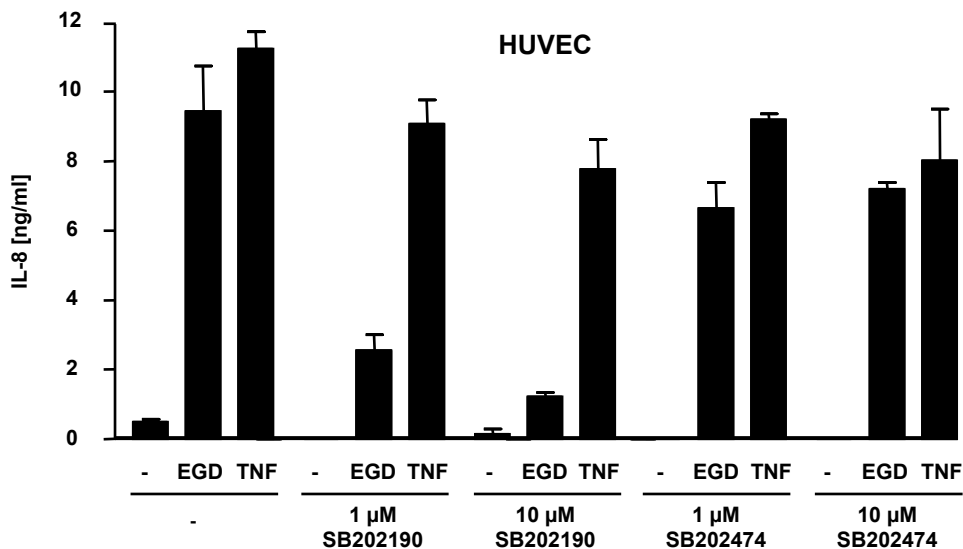


Abbildung 3.5.1. Die *L. monocytogenes*-induzierte IL-8 Produktion ist p38-MAPK-abhängig

HUVEC wurden entweder mit dem spezifischen p38-Inhibitor SB202190 oder dem unspezifischen Kontrollpeptid SB202474 vorbehandelt und dann mit *L. monocytogenes* (EGD; MOI 0,5) infiziert oder mit 10 ng/ml TNF α stimuliert. Am nächsten Tag wurden die Überstände mittels ELISA auf ihre IL-8 Konzentration hin untersucht. Die Daten stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung eines repräsentativen Versuches mit Dreifachwerten von 4 unabhängigen Versuchen dar.

Dieses Ergebnis zeigt eine p38-Abhängigkeit der IL-8-Produktion in Listerien-infizierten Endothelzellen und weist auf eine mögliche Bedeutung der p38-MAPK in der Nod1-abhängigen Signaltransduktion hin.

Um diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen, wurden abschließend Nod1-Überexpressionsexperimente in HEK293-Zellen durchgeführt. Wie schon mehrfach beschrieben, führt die ektopische Expression von Nod1 in HEK293 zu einer konstitutiven Aktivierung des NF- κ B-Signalweges und zu einer vermehrten IL-8-Produktion (Bertin *et al.*, 1999; Girardin *et al.*, 2003b; Inohara *et al.*, 1999). Die durch Nod1 ausgelöste IL-8 Produktion wurde in unseren Versuchen dosisabhängig durch den spezifischen p38-MAPK Inhibitor SB202190 gehemmt (Abbildung 3.5.2.). Im Gegensatz dazu wurde die TNF α -induzierte Zytokinproduktion kaum durch den Inhibitor beeinflusst.

Es ergeben sich somit eindeutige Hinweise dafür, dass die durch *L. monocytogenes* und Nod1 vermittelte IL-8 Produktion von der p38-MAPK Aktivierung abhängig ist.

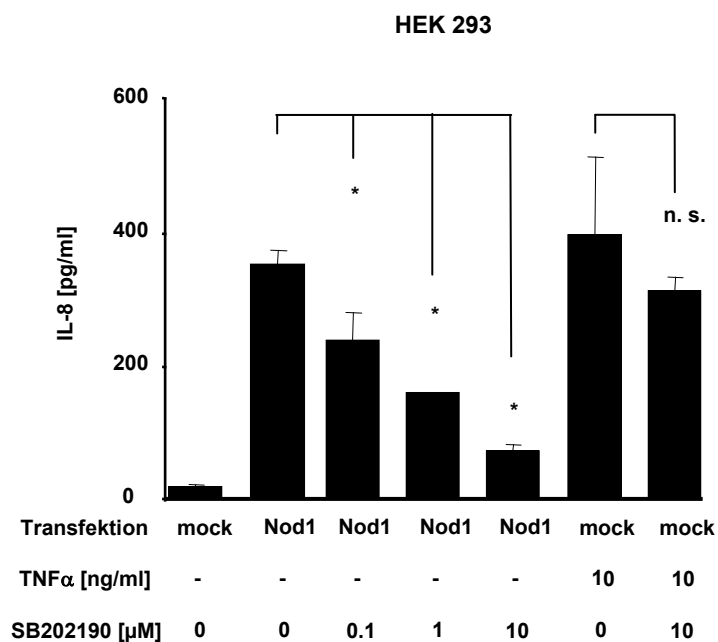


Abbildung 3.5.2. Die Nod1-aktivierte IL-8 Produktion in HEK293 Zellen wird durch den spezifischen p38-MAPK-Inhibitor gehemmt HEK293 Zellen wurden mit einem leeren Kontrollplasmid (mock) bzw. einem Nod1-Expressionsvektor transfiziert. 24 h später wurden die Zellen mit dem spezifischen p38-MAPK-Inhibitor SB202190 in den angegebenen Konzentrationen inkubiert bzw. wie dargestellt mit TNF α für weitere 12 h stimuliert. Die Überstände wurden mittels ELISA untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei Versuchen, welche jeweils in Dreifachwerten durchgeführt wurden.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wird ein wesentlicher Mechanismus der angeborenen Immunantwort, die Erkennung intrazellulärer Pathogene in Wirtszellen, untersucht. Während in den letzten Jahren große Fortschritte im Verständnis von der Detektion u.a. von extrazellulären Pathogenen durch transmembrane Rezeptoren erzielt werden konnten, blieben wichtige Mechanismen der intrazellulären Pathogendetektion bisher weniger gut verstanden.

Die kürzliche Identifizierung der zytosolischen NLR-Proteine als intrazelluläre PRRs stellt einen Meilenstein in der Aufklärung von Mechanismen der Erkennung insbesondere intrazellulärer Pathogene durch das angeborene Immunsystem dar. Bisher wurden v.a. die molekularen Strukturen (PAMPs) definiert, welche von einigen NLR-Mitgliedern erkannt werden. Während diese Untersuchungen noch lange nicht abgeschlossen sind und die Funktion vieler NLRs noch vollständig ungeklärt ist, stellt sich zudem die Frage nach der Funktion einzelner NLRs in der „mehr physiologischen“ und „komplexeren“ Situation der Infektion von Wirtszellen *in vitro* mit intakten Pathogenen. In dieser Situation ist die Wirtszelle mit dem gesamten Mikroorganismus und dessen Vielzahl von PAMPs konfrontiert.

In der vorliegenden Arbeit wird die Listerieninfektion von Endothelzellen untersucht. Diese Zellen wurden einerseits wegen ihrer Bedeutung in der Listerieninfektion (Drevets, 1997), andererseits wegen ihrer im Vergleich zu monozytären Zellen schwächeren TLR-Expression (Faure *et al.*, 2000) ausgewählt. Es ließ sich somit vermuten, dass in diesen Zellen die Nod1/2-abhängigen Effekte besser von TLR-abhängigen Prozessen zu diskriminieren seien.

Es kann gezeigt werden, dass zytosolisch lokalisierte Wildtyp-Listerien, nicht jedoch die extrazellulär verbleibenden oder endosomal „gefangenen“ Listeriendeletionsmutanten, eine IL-8-Produktion in humanen Endothelzellen hervorrufen. Knock-down- und Überexpressionsexperimente zeigen die wichtige Bedeutung von Nod1 für die *L. monocytogenes*-aktivierte IL-8-Sekretion. Die Erkennung von *L. monocytogenes* durch Nod1 führt zu einer NF- κ B- und einer p38-MAPK-Aktivierung. Letztere ist dabei essentiell für die IL-8-Produktion in *L. monocytogenes*-infizierten Endothelzellen.

4.1. *L. monocytogenes* aktiviert humane Endothelzellen

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass nur Listerien mit den Virulenzfaktoren LLO und InlB effektiv in Endothelzellen eindringen können (Abbildung 3.1.1.). Bereits in anderen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass diese Virulenzfaktoren für die Zelinvasion und das Entkommen aus dem phagolysosomalen Kompartiment essentiell sind (Drevets, 1998; Portnoy *et al.*, 1988). Es wurde zwar beschrieben, dass eine Endothelzellinvasion auch Internalin B-unabhängig in HUVEC erfolgen kann (Drevets *et al.*, 1995), allerdings ist die Anzahl der intrazellulären InlB-defizienten Listerien nach Infektion wesentlich geringer als die der Wildtyp-Listerien (Abbildung 3.1.1.). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen zusätzlich, dass lediglich der invasive Wildtypstamm EGD, nicht jedoch die LLO- oder InlB-defizienten Mutanten bzw. das apathogene Bakterium *L. innocua*, von humanen Endothelzellen detektiert werden und eine Produktion von IL-8 induzieren (Abbildung 3.1.2.). Diese Beobachtungen werden von anderen veröffentlichten Ergebnissen unterstützt. In diesen wurde gezeigt, dass nur invasive *L. monocytogenes* eine NF- κ B-Aktivierung sowie eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen und Produktion von Zytokinen in humanen Endothelzellen stimulierten (Drevets, 1998; Kayal *et al.*, 1999; Krull *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 2001).

4.2. Die Rolle von Nod1 für die *L. monocytogenes*-abhängige Zellaktivierung

Die Beobachtung, dass nur zytosolisch lokalisierte Listerien eine IL-8-Produktion (Abbildung 3.1.2.) hervorrufen, ließ uns die Rolle intrazellulärer NLR-Proteine hierbei untersuchen. Als intrazelluläre Rezeptoren zur Erkennung von bakteriellen Peptidoglykanen stellen sowohl Nod1 als auch Nod2 interessante Kandidaten für die gesuchten intrazellulären Listerien-erkennenden PRRs dar. Die zuerst durchgeführte Expressionsanalyse zeigt, dass Nod1 wesentlich stärker in Endothelzellen exprimiert wird als Nod2 (Abbildung 3.2.1.).

Nod1 konnte in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe nachgewiesen werden, während Nod2 bevorzugt in Leukozyten, dendritischen Zellen sowie epithelialen Zellen zu finden ist (Chamaillard *et al.*, 2003a; Inohara and Nunez, 2003). Da die Expression von Nod1 in HUVEC im Vergleich zu epithelialen, monocytären und lymphocytären Zelllinien wesentlich höher ist, scheint es in diesem Zelltyp eine Schlüsselrolle in der Detektion intrazelluläre pathogener Moleküle zu spielen (Opitz *et al.*, 2005).

4.2.1. NF- κ B- und Zytokinproduktion

Der Nod1-Signalweg als Antwort auf bakterielle PAMPs wurde in der Vergangenheit oftmals im Modellsystem der transienten Überexpression von Nod1 in HEK293 untersucht (Girardin *et al.*, 2001; Girardin *et al.*, 2003a; Inohara *et al.*, 1999; Inohara *et al.*, 2001). Während dieses Modellsystem entscheidend zum Verständnis der Ligandenerkennung und der Signaltransduktion von Nod1 und Nod2 beigetragen hat, so blieb die Frage der Bedeutung von Nod1 und Nod2 für die Erkennung von intakten Bakterien weitestgehend ungeklärt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Überexpressionsexperimente zur Untersuchung der NF- κ B-Aktivierung in HEK293 Zellen wurden deswegen mit intakten Bakterien durchgeführt. Dabei bewirkt der pathogene Wildtyp-Listerienstamm eine signifikant höhere NF- κ B-Aktivierung in Nod1-überexprimierenden Zellen als in solchen, die mit einem Kontrollvektor transfiziert wurden. Das nichtinvasive Bakterium *L. innocua* ist hingegen nicht in der Lage, Nod1-exprimierende HEK293-Zellen zu aktivieren. Die in unseren Versuchen zu beobachtende hohe NF- κ B-Grundaktivität in mit Nod1 transfizierten unstimulierten HEK293 Zellen ist ein bekanntes Phänomen und wahrscheinlich auf die durch die Überexpression forcierte Oligomerisation der LRR-Domänen von Nod1 zurückzuführen (Inohara *et al.*, 2000).

Unsere Ergebnisse der siRNA-Untersuchungen in HUVEC bestätigen in diesem Zusammenhang eine Nod1-abhängige Aktivierung inflammatorischer Signalkaskaden. Dabei verläuft die IL-8 Produktion unabhängig vom TLR2-Signalweg (Abbildung 3.2.3. und 3.2.4.). Diese Ergebnisse stimmen mit Veröffentlichungen überein, die auf einen zytosolischen Detektionsmechanismus nach Zellaktivierung durch *L. monocytogenes* hinweisen. So induzierten im Zytosol lokalisierte Listerienmutanten sowie LLO-exprimierende *E. coli* eine NF- κ B-Aktivierung und p38-Phosphorylierung (O'Riordan *et al.*, 2002) in Makrophagen. Andere Studien mit invasiven Pathogenen, wie z.B. mit *Shigella flexneri* oder *Pseudomonas aeruginosa*, beschrieben eine Nod1-abhängige NF- κ B-Aktivierung und nachfolgende IL-8-Produktion in epithelialen Zellen *in vitro* (Girardin *et al.*, 2001; Philpott *et al.*, 2000; Travassos *et al.*, 2005).

Untersuchungen mit *Chlamydomyphila pneumoniae* verdeutlichten ebenfalls die Bedeutung von Nod1 für die Erkennung dieser Bakterien und Aktivierung von Endothelzellen *in vitro* (Opitz *et al.*, 2005). Im *in vivo*-Modell konnten Mosa *et al.* eine vermehrte Anfälligkeit von Nod1-knock-out Mäusen nach systemischer Infektion mit *L. monocytogenes* nachweisen (Mosa *et al.*, 2009).

Nod1 detektiert Peptidoglykanbestandteile, welche meso-DAP enthalten (Chamaillard *et al.*, 2003b; Girardin *et al.*, 2003a). Dieses ist Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien, aber auch von *L. monocytogenes*. Nod2 hingegen erkennt MDP, einen Bestandteil aller bakterieller

Zellwände (Chamaillard *et al.*, 2003b). Dennoch zeigen unsere Ergebnisse, dass Nod2 bei der Endothelzellaktivierung durch *L. monocytogenes* keine wesentliche Bedeutung zuzukommen scheint. So wird Nod2 in Endothelzellen nur zu einem geringen Maße exprimiert und auch die „Ausschaltung“ von Nod2 durch siRNA beeinflusste die Zytokinproduktion nach Infektion mit *L. monocytogenes* kaum (Abbildung 3.2.1. und 3.2.3.).

In vivo scheint Nod2 jedoch eine Rolle in der Infektabwehr von *L. monocytogenes* zu spielen. So wurde gezeigt, dass Nod2-knock-out Mäuse empfindlicher auf *L. monocytogenes* Infektion reagieren, allerdings nur nach oraler, nicht jedoch intravenöser Infektion (Kobayashi *et al.*, 2005). Dies hängt möglicherweise mit dem unterschiedlichen Expressionsmuster von Nod2 zusammen. Nach intravenöser Infektion, interagiert *L. monocytogenes* primär mit endothelialen Zellen, welche kaum Nod2 exprimieren (Opitz *et al.*, 2004). Von intestinalen Epithelzellen ist jedoch bekannt, dass sie Nod2 enthalten (Hisamatsu *et al.*, 2003).

Auch andere Untersuchungen weisen auf die wichtige Funktion von Nod2 im Zusammenspiel mit Nod1 im komplexen System *in vivo* nach Infektionen mit *L. monocytogenes* hin (Kim *et al.*, 2008b; Park *et al.*, 2007). Da die unterschiedlichen Funktionen von Nod1 und Nod2 als intrazellulärer Rezeptor für Listerien noch nicht genau charakterisiert sind, besteht durchaus die Möglichkeit, dass sich beide in unterschiedlichen Geweben ergänzen (Chamaillard *et al.*, 2003a; Inohara and Nunez, 2003). Interessanterweise konnte zudem gezeigt werden, dass neben der Detektion von intrazellulären bakteriellen Bestandteilen Nod2 zudem in infizierten Epithelzellen eine antibakterielle Funktion besitzt. So war die Anzahl intrazellulärer *Salmonella typhimurium* in mit Nod2 stabil-transfizierten Zellen niedriger als in untransfizierten Zellen oder der Kontrolle (Hisamatsu *et al.*, 2003). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass die Produktion des antimikrobiellen Peptids α -Defensin in Paneth-Zellen von der Nod2-Aktivierung abhängig ist (Kobayashi *et al.*, 2005). Einen Effekt von Nod1 auf die Anzahl intrazellulärer Bakterien, welcher die Ergebnisse unser Versuche beeinflusst haben könnte, konnten wir jedoch durch den Invasionsassay ausschliessen (Abbildung 3.2.5.).

4.2.2. P38-MAPK-Phosphorylierung

L. monocytogenes bewirkt eine vermehrte p38-Phosphorylierung in HUVEC und HEK293-Zellen (Abbildung 3.4.1.). Auch andere Veröffentlichungen konnten in Übereinstimmung damit eine durch zytosolisch lokalisierte Listerien hervorgerufene Aktivierung der MAP-Kinasen p38 in Makrophagen und Epithelzellen (O’Riordan *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 1998) sowie JNK und

p42/44 in epithelialen Zellen (Tang *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1998) nachweisen. Allerdings war bislang unklar, auf welchem Wege die Wirtszellen in der Lage sind, zwischen zytosolisch lokalisierten und in der Vakuole gefangenen Bakterien zu unterscheiden. Einen möglichen zytosolischen Rezeptor stellt in diese Falle abermals Nod1 dar. So konnten Girardin *et al.* zeigen, dass die MAPK JNK durch *Shigella flexneri* aktiviert und durch dnNod1 in epithelialen Zellen gehemmt wird (Girardin *et al.*, 2001).

Zur weiteren Untersuchung von Nod1 als möglichen Rezeptor für die Detektion intrazellulärer Listerien in Endothelzellen und nachfolgender p38-MAPK-Aktivierung führten wir Experimente mit Nod1-siRNA durch. So zeigte sich, dass die Listerien-stimulierte p38-Aktivierung durch Transfektion von Nod1-siRNA abgeschwächt wird. Darüber hinaus konnte eine vermehrte p38-Phosphorylierung nach Listerieninfektion in Nod1 überexprimierenden HEK293-Zellen beobachtet werden (Abbildungen 3.4.1. und 3.5.1.) Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die p38-MAPK Nod1-abhängig in Listerien-infizierten Wirtszellen aktiviert wird.

Des Weiteren demonstriert der von uns nachgewiesene Effekt einer spezifischen Hemmung des p38-MAPK-Signalwegs durch den Inhibitor SB202190, dass die durch *L. monocytogenes* verursachte Stimulation der p38-MAPK auch Bedeutung für die Interleukin8-Sekretion in Endothelzellen hat (Abbildung 3.5.1. und 3.5.2.). Anderen Untersuchungen zufolge induzierte *L. monocytogenes* die IL-8-Transkription in HUVEC durch p38- und p42/44-abhängige Modifikation der Histone H3 und H4 (Schmeck *et al.*, 2005). Die hier beschriebene Nod1-abhängige p38-MAPK-Aktivierung könnte somit zur *L. monocytogenes*-induzierten epigenetischen Modifikation, und zur daraus resultierenden vermehrten Expression inflammatorischer Gene, wie z.B. IL-8, beitragen.

Es ist allerdings davon auszugehen, dass abgesehen von der Detektion durch Nod1 zusätzliche durch Listerien aktivierte Signalwege existieren, die eine MAPK-Aktivierung bewirken. So führte eine *L. monocytogenes* Infektion in epithelialen Zelllinien zu einer Phosphorylierung der p42- und p44- MAPK, die von der Adhärenz, nicht jedoch der Invasion der Bakterien abhängig war. Es wurde vermutet, dass dieser Vorgang an der bakteriellen Endozytose beteiligt gewesen sein könnte (Tang *et al.*, 1994). Auch LLO und Phospholipasen trugen zur Listeria vermittelten MAP-Kinase-Aktivierung unabhängig von ihrer Bedeutung für die Invasion der Listerien bei (Tang *et al.*, 1996; Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

In anderen Zelltypen scheint auch Nod2 eine Rolle in der MAPK-Aktivierung zuzukommen. So zeichneten sich Makrophagen von Nod2-knock-out Mäuse durch eine fehlende Aktivierung von p38 und p42/44 nach Infektion mit *L. monocytogenes* aus (Kobayashi *et al.*, 2005).

Es ist soweit bekannt, dass Nod2 dabei wie auch Nod1 den MAPK-Signalweg über die Signalmoleküle RIP2 und CARD9 (Hsu *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2002b) aktiviert. Darüber hinaus wurde kürzliche TAK1 als essentielles Adapterprotein in der Nod2 abhängigen Aktivierung von p38, p42/44 und JNK nach Infektion mit *L. monocytogenes in vivo* beschrieben (Kim *et al.*, 2008a) .

4.3. Die Rolle der Toll-like Rezeptoren

Die primäre Detektion vieler Pathogene erfolgt auf der Zelloberfläche z.B. durch Toll-like Rezeptoren. Diese erkennen eine Vielzahl Pathogen-assoziiertes Moleküle und steuern z.B. die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle, die Produktion antimikrobieller Peptide sowie die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine (Medzhitov, 2001).

L. monocytogenes exprimiert neben Aktivatoren von Nod1 und Nod2 (Peptidoglykan) auch sonche von TLR2 (Lipopeptide, LTA), möglicherweise TLR4 (LLO), TLR5 (Flagellin) sowie von TLR9 (CpG-DNA). Somit muss eine Rolle dieser PRRs für die *L. monocytogenes*-induzierte Endothelzellaktivierung in Betracht gezogen werden.

TLR2 erkennt Lipopeptide und LTA, und viele Veröffentlichungen zeigen, dass TLR2 eine protektive Rolle bei Infektionen mit Gram-positiven Bakterien spielt. So waren TLR2-defiziente Mäuse anfälliger gegenüber Infektionen mit *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae meningitis* (Echchannaoui *et al.*, 2002; Takeuchi *et al.*, 2000). *In vitro* Studien mit Makrophagen belegten zudem, dass TLR2 für die NO- und Zytokinproduktion nach Listerieninfektion benötigt wird (Edelson and Unanue, 2002). Diese Beobachtung deckt sich mit unseren Ergebnissen, die zeigen, dass Listerien grundsätzlich über TLR2 erkannt werden können (Abbildung 3.3.1.), TLR2 aber wahrscheinlich keine wichtige Bedeutung für die Erkennung von *L. monocytogenes in vitro* in Endothelzellen zukommt. So ist in mit TLR2-siRNA transfizierten HUVEC nach Infektion mit *L. monocytogenes* im Vergleich zu TLR2-exprimierenden Zellen eine unveränderte IL-8 Produktion zu verzeichnen ist (Abbildung 3.2.4.)

In vivo Untersuchungen ergaben widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses von TLR2 auf die Kontrolle einer frühen Listerieninfektion. Während Edelson *et al.* und Gekara *et*

al. keinen Unterschied hinsichtlich des Überlebens zwischen TLR2-defizienten und Wildtypmäusen fanden (Edelson and Unanue, 2002; Gekara *et al.*, 2009), kamen Torres *et al.* zu dem entgegengesetzten Resultat. Des Weiteren war zudem eine verminderte Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen sowie eine verminderte Produktion von TNF α , IL12 und IFN γ *in vitro* und *in vivo* zu beobachten (Seki *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2004), wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei MyD88 $-/-$ Mäusen. Dies könnte ein Hinweis sein, dass TLR2 zumindest teilweise an der *L. monocytogenes*-abhängigen Zellaktivierung beteiligt ist. Dies könnte z.B. durch die Bildung von Heterodimeren mit anderen TLRs, wie z.B. für TLR6 und TLR1 beschrieben (Bulut *et al.*, 2001; Ozinsky *et al.*, 2000), erfolgen.

Abgesehen von TLR2 exprimieren HUVEC TLR4 (Faure *et al.* 2000). Es wurde kürzlich beschrieben, dass TLR4 für die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit Pneumolysin von *Streptococcus pneumoniae* (Malley *et al.*, 2003) oder Anthrolysin von *Bacillus anthracis* (Park *et al.*, 2004), beides dem LLO-verwandte Zytolysine, benötigt wird.

Die vorliegenden Ergebnisse können eine Beteiligung von TLR4 an der Signaltransduktion nach Infektion mit Wildtyp *Listeria* nicht sicher ausschließen. Da aber z.B. die Internalin-defiziente *Listeria*, welche durchaus LLO produzieren nur eine geringe Zytokinproduktion im Vergleich zum Wildtypstamm induzieren und auch LLO-defiziente *Listeria*, wenn auch nur in hohen Konzentrationen, eine Endothelzellaktivierung bewirken (Abbildung 3.1.2), ist eine entscheidende Rolle dieses Rezeptors nicht als wahrscheinlich anzusehen.

Zudem wurde in anderen Untersuchungen bei TLR4-knock-out Mäusen keine reduzierte Zytokinausschüttung im Vergleich zum Wildtyp nach Infektion mit *L. monocytogenes* beobachtet (Seki *et al.*, 2002) und auch die LLO-abhängige p38-MAPK-Aktivierung *in vitro* verlief TLR4-unabhängig (Zwaferink *et al.*, 2008).

TLR5 wird ebenfalls von Endothelzellen exprimiert (Maaser *et al.*, 2004) und erkennt *Listeria*-Flagellin, welches temperaturabhängig gebildet wird (Hayashi *et al.*, 2001; Peel *et al.*, 1988). *In vivo* schien es allerdings nicht essentiell für die *Listeria*-pathogenität oder die Induktion einer *Listeria*-spezifischen adaptiven Immunantwort zu sein (Way *et al.*, 2004).

Ein weiterer Kandidat in der *Listeria*-detektion durch Endothelzellen könnte TLR9 sein, welches inflammatorische Antworten durch die Erkennung bakterieller, unmethylierter DNA vermittelt (Hemmi *et al.*, 2000). Hinsichtlich der Bedeutung von TLR9 gibt es jedoch widersprüchliche Untersuchungen. Während die IFN-Produktion durch NK-Zellen und dendritischen Zellen nach

Listerieninfektion *in vitro* TLR9 bedurfte (Plitas *et al.*, 2007; Stockinger *et al.*, 2009), so war der TLR9-Signalweg *in vivo* nicht für die Listerien-induzierte IFN-Produktion notwendig (Stockinger *et al.*, 2009)

Zusammenfassend betrachtet kann eine Beteiligung der TLRs an der durch *Listeria monocytogenes* ausgelösten Endothelzellaktivierung nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Im komplexeren System *in vivo* ist in Anbetracht des aktuellen Wissensstandes durchaus von einer synergistischen Funktion von TLRs und NLRs bei der durch Bakterien ausgelösten Wirtszellaktivierung auszugehen. Auch wenn die Rolle, welche TLRs in der Wirtszellaktivierung nach Infektion mit *L. monocytogenes* spielen, nicht endgültig geklärt ist, so scheint dem TLR-Adaptermolekül MyD88 eine kritische Rolle bei der Immunantwort in der frühen Phase der Listerieninfektion *in vivo* zuzukommen (Edelson and Unanue, 2002; Seki *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2004). Da dieses nicht nur Bestandteil des TLR-Signalweges ist, sondern auch Anteil am IL-1- und IL-18-Signalweg hat, können diese Ergebnisse ein Hinweis darauf sein, dass IL-1 und IL-18 ebenfalls eine Rolle in der Kontrolle der Listerieninfektion *in vivo* spielen.

4.4. Interaktionen zwischen NLRs und TLRs

Es gibt zahlreiche Hinweise auf eine Interaktion zwischen NLRs und TLRs in der Regulation inflammatorischer Antworten auf Pathogene (Chen *et al.*, 2008). Nod1 und Nod2 sind die am besten charakterisierten NLRs. Sie scheinen die zytosolischen Counterparts der TLRs darzustellen (Fritz *et al.*, 2006). Beide zusammen detektieren PAMPs an der Zellmembran sowie im Zytosol. Während TLRs als first line Rezeptoren dienen, könnten NLR-Proteine in der unmittelbar folgenden Phase der Infektion eine Rolle spielen.

Es gibt eine ausgeprägte Redundanz in der Funktion der NLR-Proteine und der TLRs bei der Erkennung von Pathogenen, und viele der Rezeptoren konvergieren zudem zu gemeinsamen Signalwegen. Dies kann eine Potenzierung der inflammatorischen Reaktion bewirken. So zeigten Untersuchungen, dass eine Nod1-Stimulation durch iE-DAP eine vermehrte TLR-induzierte Zytokinproduktion in antigenpräsentierenden Zellen hervorruft (van Heel *et al.*, 2005). Zusätzlich zu diesem synergistischen Effekt könnten NLRs auf diese Weise einen Backup-Mechanismus darstellen, der eingreift, wenn eine Toleranzentwicklung auf die TLR-Signaltransduktion einsetzt. So konnte *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, dass nach vorheriger Stimulation mit *E. coli* oder LPS, eine TLR-Toleranzentwicklung eintritt und die Zytokinproduktion, NF- κ B- und

MAPK-Aktivierung bzw. das Überleben nach einer weiteren Infektion mit *L. monocytogenes* unbedingt von Nod1 und Nod2 abhängig ist. Ein möglicher Grund für diese Regulation könnte es sein, eine Überstimulation von Zellen, die *in vivo* kontinuierlich TLR-Liganden, wie z.B. kommensalen Bakterien, ausgesetzt sind, zu verhindern, und sie bei Vorhandensein von pathogenen oder intrazellulären Bakterien zu resensitivieren (Kim *et al.*, 2008b)

Die genauen Mechanismen, die hinter Beobachtungen wie der Redundanz und Toleranzentwicklung stecken, sind noch nicht ausreichend untersucht worden. Da TLR- und Nod1/2-Signalwege gemeinsame Komponenten besitzen, sollten sie dementsprechend an spezifischen Punkten konvergieren. Mögliche Schnittpunkte stellen IKK, TAK und IRAK1 dar (Hedl *et al.*, 2007; Opitz *et al.*, 2004). Hinsichtlich der Rolle von CARD9 und Rip2 als Konvergenzpunkte für die Signalwege von Nod1/2 und TLRs ist die Datenlage widersprüchlich.

CARD9 wird für die Zytokinproduktion nach bakteriellen und viralen Infektionen benötigt. Es vermittelt selektiv die Aktivierung der p38- und JNK-MAPK, nicht jedoch die von NF- κ B, nach Stimulation mit dem Nod2-Liganden MDP sowie nach Stimulation von TLR3 und 4. Es konnte ferner nachgewiesen werden, dass sowohl Nod2 als auch Rip2 eine Bindung mit CARD9 nach Überexpression in HEK293 Zellen eingehen bzw. eine Assoziation zwischen endogen exprimiertem CARD9 und Nod2 nach Infektion mit *L. monocytogenes* zustande kommt (Hsu *et al.*, 2007), so dass davon auszugehen ist, dass CARD9 sich im Signalweg unterhalb von Nod2 befindet. Aufgrund der beobachteten Ergebnisse wäre es denkbar, dass die Nod2- und TLR-Signalwege bei CARD9 konvergieren und synergistisch, CARD9-abhängig, MAPKs aktivieren und so proinflammatorische Gene aktivieren. Andere Studien hingegen sehen keine Beteiligung von CARD9 im TLR-Signalweg (Gross *et al.*, 2006; LeibundGut-Landmann *et al.*, 2007).

Die Beobachtung, dass Rip2 downstream Kinase von Nod1 ist und sie zusätzlich in TLR2, -3 und -4 Signalkaskaden benötigt wird (Kobayashi *et al.*, 2002b), favorisierte ursprünglich ein Modell, in dem Rip2 eine wichtige Rolle im Nod1/2- und im TLR-Signalweg einnimmt. So zeigten Untersuchungen an Rip2-knock-out Mäusen, dass zusätzlich zur Nod1-Signaltransduktion auch der TLR-abhängige Signalweg abgeschwächt war (Chin *et al.*, 2002). Neuere Untersuchungen widersprechen jedoch einer Beteiligung von Rip2 am TLR-Signalweg (Park *et al.*, 2007).

Im Falle von Nod1 gibt es derzeit keine Hinweise auf eine negative Regulation TLR-abhängiger Signalwege (van Heel *et al.*, 2005), für Nod2 ist dies jedoch beschrieben worden. So

produzierten Nod2-defiziente Makrophagen nach Stimulation mit Peptidoglykan signifikant mehr IL-12 als Wildtyp-Makrophagen (Watanabe et al., 2004) und in Nod2 knock-out Mäusen konnten wesentlich höhere IL-12-Serumspiegel nach Peptidoglykanstimulation als im Wildtypstamm nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Peptidoglykan-vermittelte TLR2-Aktivierung negativ durch gleichzeitige Stimulation von Nod2 durch MDP reguliert wird. Diese negative Regulierung scheint in Abwesenheit von Nod2 aufgehoben (Watanabe et al., 2004). Andererseits zeigen andere Untersuchungen, dass eine Nod2-Aktivierung in antigenpräsentierenden Zellen auch eine Steigerung der TLR2-abhängigen IL-8-, IL-6-, IL-10- sowie TNF-Produktion bewirkte (Strober et al., 2006). Die genauen molekularen Grundlagen und Interaktionen, die diesen Beobachtungen zugrunde liegen sind noch nicht näher bekannt.

4.5. Die Rolle von LLO

Unsere Ergebnisse zeigen, dass nach Infektion mit den LLO-defizienten Listerien Δ LLO bzw. *L. innocua* im Vergleich zum Wildtyp keine inflammatorische Aktivierung von Endothelzellen und Epithelzellen zu verzeichnen ist (Abbildung 3.1.2. und 3.3.1.).

Viele Studien schrieben dem LLO neben der Bedeutung für die Lyse von primären oder sekundären Vakuolen, auch eine direkte Bedeutung für die Aktivierung von Signalkaskaden und für die Regulation proinflammatorischer Gene zu. Es ist bekannt, dass sowohl LLO produzierende Bakterien als auch pures LLO als proinflammatorischer Stimulus wirken (Kayal et al., 1999; Rose et al., 2001). So wurde eine LLO-stimulierte NF- κ B-Aktivierung (Kayal et al., 1999; Kayal et al., 2002; Rose et al., 2001), Bildung von Lipidmediatoren (Schwarzer et al., 1998; Sibelius et al., 1996b), Zytokin/Chemokinfreisetzung (Kayal et al., 1999; Kayal et al., 2002; Rose et al., 2001) und vermehrte Expression der Zelladhäsionsmoleküle E-Selektin (Kayal et al., 1999; Schwarzer et al., 1998), ICAM und VCAM (Drevets, 1997) in Endothelzellen sowie die MAPK-Aktivierung in Epithelzellen (Tang et al., 1996) und die Rekrutierung humaner Neutrophiler (Sibelius et al., 1999) beschrieben. Dabei waren bereits LLO-produzierende *L. innocua* und pures LLO ausreichend für die Generierung einer NF- κ B-Antwort. Die Internalisierung von *L. monocytogenes* war dafür nicht nötig (Kayal et al., 1999).

Für diese LLO-induzierte Zellaktivierung gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Zum einen wurde gezeigt, dass LLO und PI-PLC in HUVEC in der Spaltung zellulären

Phosphatidylinositols kooperieren. Diese PI-Hydrolyse bewirkt die Entstehung von Ins1,2-phosphat und DAG (Sibelius *et al.*, 1996b; Sibelius *et al.*, 1999). Letzteres wiederum vermag über Aktivierung der zellulären Proteinkinase C Kalziumkanäle zu öffnen. Zellen benutzen Kalzium für die intrazelluläre Kommunikation, um z.B. Enzymsekretion oder Genexpression zu triggern. Die Oszillationsfrequenz von Kalzium kann so u.a. zur Spezifität der Genexpression beitragen (Dolmetsch *et al.*, 1998). Auf diese Weise könnte die LLO-abhängige Kalziumsignaltransduktion eine mögliche molekulare Basis für durch *L. monocytogenes* hervorgerufene intrazelluläre Signaltransduktion darstellen.

Viele der bisher veröffentlichten Ergebnisse beruhen allerdings auf einer direkten Stimulation der Zellen mit LLO (Drevets, 1998; Kayal *et al.*, 1999; Schwarzer *et al.*, 1998; Sibelius *et al.*, 1996a; Sibelius *et al.*, 1996b). Exogenes LLO jedoch entspricht nicht der physiologischen Exposition von Wirtszellen während einer Infektion mit *L. monocytogenes* und greift die Zellmembran an (McCaffrey *et al.*, 2004), so dass in diesen Untersuchungen auch das Entstehen von Membranschäden als mögliche Ursache der Zellaktivierung diskutiert werden müsste.

Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die membranschädigende Eigenschaft des LLO nicht unbedingt mit der Aktivierung von Signaltransduktionswegen zusammenhängt. So wurde nach Hemmung der LLO-vermittelten Zytolyse durch Cholesterol keine verminderte NF- κ B-Aktivität verzeichnet (Kayal and Charbit, 2006). Es wird ferner vermutet, dass LLO als Ligand für einen spezifischen Rezeptor fungieren könnte. Ein solcher wurde jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig identifiziert. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass neben TLR4 auch der IL-1R an der LLO-abhängigen NF- κ B-Aktivierung beteiligt sein könnten. So wird u.a. davon ausgegangen, dass LLO eine auto- oder parakrine IL-1R-abhängige Signalkaskade triggert (Kayal *et al.*, 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen jedoch die Hypothese, dass LLO indirekt für die zytosolische Detektion von Listerienbestandteilen nötig ist, da es dem Bakterium ermöglicht, dem phagolysosomalen Kompartiment zu entkommen. Lediglich der Wildtyp gelangt in effektiver Zahl in die Zellen und könnte dort über intrazelluläre Detektionssysteme erkannt werden, wodurch die wirtszelleigenen Abwehrmechanismen, u.a. die Zytokinproduktion, in Gang gesetzt werden. Unterstützt wird diese Vermutung durch Untersuchungen mit HeLa-Zelllinien, die eine Listerien-abhängige Hochregulation von IL-8 unabhängig von LLO beschreiben, da die Bakterien in dieser Zelllinie das Zytosol LLO-unabhängig erreichen konnten (O'Riordan *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde eine biphasische NF- κ B-Aktivierung nach

Infektion von Makrophagen mit *L. monocytogenes* beschrieben (Hauf *et al.*, 1997). Während die initiale und transiente NF- κ B-Aktivierung durch Adhäsion der Bakterien an die Makrophagen hervorgerufen wurde, persistierte die zweite Phase der NF- κ B-Aktivierung in diesen Zellen und setzte die Invasivität der Bakterien voraus (Hauf *et al.*, 1994; Hauf *et al.*, 1997).

4.6. Schlussfolgerung und Ausblick

Nod1 und Nod2 nehmen eine Schlüsselrolle in der Wirtszellantwort *in vitro* nach Infektion u.a. mit *Streptococcus pneumoniae*, *Shigella flexneri*, enteroinvasiven *E.coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa*. (Ferwerda *et al.*, 2005; Girardin *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004; Opitz *et al.*, 2004; Opitz *et al.*, 2005; Travassos *et al.*, 2005; Viala *et al.*, 2004) ein. Die Rolle von Nod1 in der *in vivo* Infektion bleibt, mit Ausnahme von *Helicobacter pylori*, weitestgehend unklar. Nod1-defiziente Mäuse zeigten eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen mit diesem Bakterium. Ursächlich könnte u.a. eine verminderte Produktion von Defensinen sein (Boughan *et al.*, 2006; Viala *et al.*, 2004). Hinsichtlich Stimulation mit *Chlamydophila pneumoniae* ergaben sich widersprüchliche Beobachtungen. So schien z.B. Nod1 protektiv auf eine Infektion mit *Chlamydophila pneumoniae in vitro* zu sein, während *in vivo* Studien mit Nod1-defizienten Mäusen keine erhöhte Bakterienzahl oder klinische Symptome nachweisen konnten, so dass entweder Nod1 nicht direkt an der Immunantwort beteiligt war oder es redundante Signalwege gab, die die Nod1-Defizienz kompensieren konnten. (Welter-Stahl *et al.*, 2006).

Das Erkennen von bakteriellen Peptidoglykanspaltprodukten durch Nod1/2 reguliert durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 sowie der MAP-Kinasen und Typ-I-IFN die Produktion proinflammatorischer Mediatoren, wie z.B. von Chemokinen und Zytokinen, die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen oder von induzierbaren Molekülen wie z.B. iNOS und Cox-2 (Fritz *et al.*, 2006; Kufer *et al.*, 2005). Insbesondere die Stimulation von Nod1 kann über die Produktion von Chemokinen Effektorimmunzellen *in vivo*, wie z.B. neutrophile Granulozyten, zum Infektfokus rekrutieren (Masumoto *et al.*, 2006). *In vitro* Untersuchungen weisen zudem auf eine Rolle von Nod1/2 in der Induktion der Apoptose hin. Die darin involvierten Signalwege sind noch nicht vollständig bekannt, im Falle von Nod1 scheinen Caspase 8 und 9 sowie Rip2 beteiligt zu sein (da Silva Correia *et al.*, 2007; Inohara *et al.*, 1999; Ogura *et al.*, 2001). Allerdings ist die Relevanz dieser Beobachtungen *in vivo* noch zu klären.

Die Unterschiede in der Signaltransduktion von Nod1 und Nod2 sind ebenfalls zur Zeit noch nicht ausreichend charakterisiert. Es ist bekannt, dass für die Nod2-abhängige NF- κ B-Aktivierung TRAF6 nötig ist. Dieses ist im Nod1-Signalweg jedoch entbehrlich, während dort TRAF2 und TRAF5 essentielle Adaptermoleküle darstellen (Abbott *et al.*, 2007; Hasegawa *et al.*, 2008).

Neuere Untersuchungen weisen Nod1 zusätzlich eine wichtige Rolle auch in nichthaematopoetischen Zellen, wie z.B. Endothelzellen, Fibroblasten und Stromazellen in der Koordination der erworbenen Immunantwort in Synergie mit den TLRs zu.

Stimulation mit Nod1-Agonisten triggerte so eine Th2-abhängige antigenspezifische adaptive Immunantwort und induzierte eine TLR-vermittelte IL-12-Freisetzung und das Primen von Th1- und Th17-abhängigen Signalwegen *in vivo* (Fritz *et al.*, 2007). Ähnliches könnte für Nod2 gelten. So konnte beobachtet werden, der Nod2-Agonist MDP als effektives Adjuvans für eine Antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung und einer daraus resultierender Antikörperproduktion dient (Kobayashi *et al.*, 2005).

Trotz zahlreicher neuer Erkenntnisse über die NLR-Proteine bleibt eine Vielzahl von Fragen offen. So sind die genauen Mechanismen der Detektion mikrobieller Moleküle noch nicht eingängig untersucht. Und es bleibt unklar, inwiefern NLRs als direkte Rezeptoren für PAMPs dienen oder lediglich Adapterproteine darstellen. So gibt es zwar Hinweise auf eine unmittelbare Interaktion zwischen der LRR-Domäne von Nod1 und Peptidoglykanbestandteilen (Girardin *et al.*, 2005), die molekularen Grundlagen der Peptidoglykanerkennung bleiben jedoch weiterhin nur ansatzweise bekannt.

Die entsprechenden Peptidoglykanprodukte der bakteriellen Zellwand müssen in das Zytosol gelangen, um von Nod1 bzw. Nod2 erkannt zu werden. Auf welchem Wege dies geschieht ist jedoch noch nicht ausreichend untersucht. Phagozytotische Zellen wie z.B. Makrophagen und dendritische Zellen könnten diese Peptidoglykanfragmente durch Verdauung der aufgenommenen Bakterien in Phagolysosomen spalten (Strober *et al.*, 2006). Einige Bakterien, wie z.B. *Listeria monocytogenes* oder *Shigella flexneri* (Girardin *et al.*, 2001; Portnoy *et al.*, 1988) sind nach Infektion zudem zytosolisch lokalisiert und setzen möglicherweise bei ihrem Stoffwechsel und der Zellteilung Peptidoglykanfragmente ins Zytosol frei. Wiederum andere Bakterien, u.a. *Helicobacter pylori*, scheinen über bakterielle Sekretionsapparate, z.B. den Typ IV Sekretionsapparat, Peptidoglykane in das Zytosol von Wirtszellen zu translozieren (Viala *et*

al., 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Colonepithelzellen MDP durch den apikalen Peptidtransporter PEPT 1 aufnehmen können (Vavricka *et al.*, 2004)

Obwohl eine Reihe von Mediatoren des Nod1- und Nod2-Signalwegs identifiziert wurden, sind die molekularen Details derer Regulation noch nicht ausreichend bekannt. Neuere Studien haben u.a. TAK1, TRIP-6, GRIM-19, β -PIX, Rac1 und ERBIN als potentielle Regulatoren der NOD-abhängigen NF- κ B-Aktivierung identifiziert (Eitel *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008a; Werts *et al.*, 2006). Des Weiteren wurden eine alternativ transkribierte Nod2-Isoform, eine Unterbrechung der Nod2-RIP2-Interaktion durch Caspase-12 und MEKK4 sowie die Ubiquitinierung von Rip2 durch das A20 Protein als downregulierende Mechanismen beschrieben (Clark *et al.*, 2008; Hitotsumatsu *et al.*, 2008; LeBlanc *et al.*, 2008; Rosenstiel *et al.*, 2006).

Es konnte zudem gezeigt werden, dass *Listeria monocytogenes* und andere Bakterien im Zytosol neben Nod1 und Nod2 ebenfalls über Nalp3 und IPAF detektiert werden und so u.a. die Aktivierung von Caspase-1 induzieren können (Mariathasan *et al.*, 2006; Miao *et al.*, 2006). Daher ist eine weitere Charakterisierung der Mitglieder der NLR-Familie insbesondere auch derer Funktion *in vivo* nötig. Dies könnte zu einem besseren Verständnis der mit den NLRs-assoziierten inflammatorischen Erkrankungen beitragen sowie mögliche therapeutische Konsequenzen aufzeigen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die NOD-like Rezeptormoleküle Nod1 und Nod2 fungieren als intrazelluläre Muster-erkennende Rezeptoren zur Detektion von bakteriellen Peptidoglykanfragmenten. Um die Bedeutung von Nod1 und Nod2 für die intrazelluläre Erkennung von lebenden Bakterien weiter zu untersuchen, wurde *L. monocytogenes* als ein Modellorganismus für Studien der angeborenen Immunantwort auf intrazelluläre Bakterien in der vorliegenden Arbeit verwendet. Während sich Wildtyp-*L. monocytogenes* im Wirtszytosol replizieren, verbleiben nicht-pathogene *L. innocua* oder Internalin B- oder Listeriolysin O-defiziente *L. monocytogenes*-Mutanten extrazellulär bzw. im Phagoendosomen der Wirtszelle gefangen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Infektion mit Wildtyp-*L. monocytogenes*, nicht aber mit Listeriolysin O- oder Internalin B-negativen *L. monocytogenes*-Mutanten oder mit *L. innocua* eine IL-8-Produktion in HUVEC-Endothelzellen hervorruft. RNA-Interferenz- und Nod1-Überexpressionsexperimente zeigen, dass Nod1 die *L. monocytogenes*-induzierte IL-8-Sekretion und NF- κ B-Aktivierung vermittelt. Nod1-siRNA hemmt zudem die *L. monocytogenes*-vermittelte Aktivierung des p38-MAPK-Signalwegs in Endothelzellen, und Nod1-Überexpression verstärkt die Listerien-induzierte p38-Aktivierung. Des Weiteren konnten wir beobachten, dass eine Inhibition von p38 die Listerien-stimulierte IL-8-Produktion hemmt.

Zusammengefasst verdeutlichen die Ergebnisse, dass *L. monocytogenes* Nod1-abhängig die p38-MAPK sowie NF- κ B aktiviert und nachfolgend die IL-8-Produktion in Endothelzellen reguliert. Nod1 scheint somit eine wichtige Bedeutung für die angeborene Immunantwort auf intrazelluläre Bakterien in Endothelzellen zu besitzen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbott, D.W., Yang, Y., Hutti, J.E., Madhavarapu, S., Kelliher, M.A., and Cantley, L.C. (2007) Coordinated regulation of Toll-like receptor and NOD2 signaling by K63-linked polyubiquitin chains. *Mol Cell Biol* **27**: 6012-6025.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**: 499-511.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**: 783-801.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**: 732-738.
- Anderson, K.V., Bokla, L., and Nusslein-Volhard, C. (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* **42**: 791-798.
- Andrejeva, J., Childs, K.S., Young, D.F., Carlos, T.S., Stock, N., Goodbourn, S., and Randall, R.E. (2004) The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17264-17269.
- Aravind, L., Dixit, V.M., and Koonin, E.V. (2001) Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. *Science* **291**: 1279-1284.
- Barnich, N., Aguirre, J.E., Reinecker, H.C., Xavier, R., and Podolsky, D.K. (2005) Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- κ B activation in muramyl dipeptide recognition. *J Cell Biol* **170**: 21-26.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-366.
- Bertin, J., Nir, W.J., Fischer, C.M., Tayber, O.V., Errada, P.R., Grant, J.R., Keilty, J.J., Gosselin, M.L., Robison, K.E., Wong, G.H., Glucksmann, M.A., and DiStefano, P.S. (1999) Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J Biol Chem* **274**: 12955-12958.
- Boneca, I.G., Dussurget, O., Cabanes, D., Nahori, M.A., Sousa, S., Lecuit, M., Psylinakis, E., Bouriotis, V., Hugot, J.P., Giovannini, M., Coyle, A., Bertin, J., Namane, A., Rousselle, J.C., Cayet, N., Prevost, M.C., Balloy, V., Chignard, M., Philpott, D.J., Cossart, P., and Girardin,

- S.E. (2007) From the Cover: A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 997-1002.
- Boughan, P.K., Argent, R.H., Body-Malapel, M., Park, J.H., Ewings, K.E., Bowie, A.G., Ong, S.J., Cook, S.J., Sorensen, O.E., Manzo, B.A., Inohara, N., Klein, N.J., Nunez, G., Atherton, J.C., and Bajaj-Elliott, M. (2006) Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem* **281**: 11637-11648.
- Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Equils, O., and Arditi, M. (2001) Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J Immunol* **167**: 987-994.
- Caamano, J., and Hunter, C.A. (2002) NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* **15**: 414-429.
- Chamaillard, M., Girardin, S.E., Viala, J., and Philpott, D.J. (2003a) Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol* **5**: 581-592.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M.A., Foster, S.J., Mak, T.W., Nunez, G., and Inohara, N. (2003b) An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* **4**: 702-707.
- Chen, G., Shaw, M.H., Kim, Y.G., and Nunez, G. (2008) Nod-like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease. *Annu Rev Pathol*.
- Chin, A.I., Dempsey, P.W., Bruhn, K., Miller, J.F., Xu, Y., and Cheng, G. (2002) Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses. *Nature* **416**: 190-194.
- Clark, N.M., Marinis, J.M., Cobb, B.A., and Abbott, D.W. (2008) MEKK4 sequesters RIP2 to dictate NOD2 signal specificity. *Curr Biol* **18**: 1402-1408.
- Cossart, P., and Sansonetti, P.J. (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**: 242-248.
- Cowan, K.J., and Storey, K.B. (2003) Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol* **206**: 1107-1115.
- da Silva Correia, J., Miranda, Y., Leonard, N., Hsu, J., and Ulevitch, R.J. (2007) Regulation of Nod1-mediated signaling pathways. *Cell Death Differ* **14**: 830-839.

- Dangl, J.L., and Jones, J.D. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833.
- Decatur, A.L., and Portnoy, D.A. (2000) A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science* **290**: 992-995.
- Dolmetsch, R.E., Xu, K., and Lewis, R.S. (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* **392**: 933-936.
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P., and Cossart, P. (1995) Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* **16**: 251-261.
- Dramsi, S., Dehoux, P., Lebrun, M., Goossens, P.L., and Cossart, P. (1997) Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect Immun* **65**: 1615-1625.
- Dramsi, S., Levi, S., Triller, A., and Cossart, P. (1998) Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an in vitro study. *Infect Immun* **66**: 4461-4468.
- Drevets, D.A., Sawyer, R.T., Potter, T.A., and Campbell, P.A. (1995) *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect Immun* **63**: 4268-4276.
- Drevets, D.A. (1997) *Listeria monocytogenes* infection of cultured endothelial cells stimulates neutrophil adhesion and adhesion molecule expression. *J Immunol* **158**: 5305-5313.
- Drevets, D.A. (1998) *Listeria monocytogenes* virulence factors that stimulate endothelial cells. *Infect Immun* **66**: 232-238.
- Dussurget, O., Pizarro-Cerda, J., and Cossart, P. (2004) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu Rev Microbiol* **58**: 587-610.
- Echchannaoui, H., Frei, K., Schnell, C., Leib, S.L., Zimmerli, W., and Landmann, R. (2002) Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis* **186**: 798-806.
- Edelson, B.T., and Unanue, E.R. (2002) MyD88-dependent but Toll-like receptor 2-independent innate immunity to *Listeria*: no role for either in macrophage listericidal activity. *J Immunol* **169**: 3869-3875.
- Eitel, J., Krull, M., Hocke, A.C., N'Guessan, P.D., Zahlten, J., Schmeck, B., Slevogt, H., Hippenstiel, S., Suttorp, N., and Opitz, B. (2008) Beta-PIX and Rac1 GTPase mediate trafficking and negative regulation of NOD2. *J Immunol* **181**: 2664-2671.

- Engelbrecht, F., Chun, S.K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W., and Sokolovic, Z. (1996) A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol Microbiol* **21**: 823-837.
- Faure, E., Equils, O., Sieling, P.A., Thomas, L., Zhang, F.X., Kirschning, C.J., Polentarutti, N., Muzio, M., and Arditi, M. (2000) Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* **275**: 11058-11063.
- Ferwerda, G., Girardin, S.E., Kullberg, B.J., Le Bourhis, L., de Jong, D.J., Langenberg, D.M., van Crevel, R., Adema, G.J., Ottenhoff, T.H., Van der Meer, J.W., and Netea, M.G. (2005) NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **1**: 279-285.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Flo, T.H., Halaas, O., Lien, E., Ryan, L., Teti, G., Golenbock, D.T., Sundan, A., and Espevik, T. (2000) Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. *J Immunol* **164**: 2064-2069.
- Franchi, L., Warner, N., Viani, K., and Nunez, G. (2009) Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* **227**: 106-128.
- Fraser, I.P., Koziel, H., and Ezekowitz, R.A. (1998) The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* **10**: 363-372.
- Fritz, J.H., Ferrero, R.L., Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2006) Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* **7**: 1250-1257.
- Fritz, J.H., Le Bourhis, L., Sellge, G., Magalhaes, J.G., Fsihi, H., Kufer, T.A., Collins, C., Viala, J., Ferrero, R.L., Girardin, S.E., and Philpott, D.J. (2007) Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity* **26**: 445-459.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S., and Sansonetti, P. (1987) In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun* **55**: 2822-2829.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Guin, E., and Cossart, P. (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**: 1127-1141.

- Gay, N.J., and Keith, F.J. (1991) Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* **351**: 355-356.
- Gedde, M.M., Higgins, D.E., Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. (2000) Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **68**: 999-1003.
- Gekara, N.O., Dietrich, N., Lyszkiewicz, M., Lienenklaus, S., and Weiss, S. (2009) Signals triggered by a bacterial pore-forming toxin contribute to toll-like receptor redundancy in gram-positive bacterial recognition. *J Infect Dis* **199**: 124-133.
- Geoffroy, C., Gaillard, J.L., Alouf, J.E., and Berche, P. (1987) Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **55**: 1641-1646.
- Geoffroy, C., Raveneau, J., Beretti, J.L., Lecroisey, A., Vazquez-Boland, J.A., Alouf, J.E., and Berche, P. (1991) Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **59**: 2382-2388.
- Girardin, S.E., Tournebize, R., Mavris, M., Page, A.L., Li, X., Stark, G.R., Bertin, J., DiStefano, P.S., Yaniv, M., Sansonetti, P.J., and Philpott, D.J. (2001) CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* **2**: 736-742.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Carneiro, L.A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M.K., Labigne, A., Zahringer, U., Coyle, A.J., DiStefano, P.S., Bertin, J., Sansonetti, P.J., and Philpott, D.J. (2003a) Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* **300**: 1584-1587.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., and Sansonetti, P.J. (2003b) Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **278**: 8869-8872.
- Girardin, S.E., Travassos, L.H., Herve, M., Blanot, D., Boneca, I.G., Philpott, D.J., Sansonetti, P.J., and Mengin-Lecreulx, D. (2003c) Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem* **278**: 41702-41708.
- Girardin, S.E., Jehanno, M., Mengin-Lecreulx, D., Sansonetti, P.J., Alzari, P.M., and Philpott, D.J. (2005) Identification of the critical residues involved in peptidoglycan detection by Nod1. *J Biol Chem* **280**: 38648-38656.
- Goldfine, H., and Knob, C. (1992) Purification and characterization of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Infect Immun* **60**: 4059-4067.
- Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schafer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., Forster, I., and Ruland, J. (2006) Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* **442**: 651-656.

- Gutierrez, O., Pipaon, C., Inohara, N., Fontalba, A., Ogura, Y., Prosper, F., Nunez, G., and Fernandez-Luna, J.L. (2002) Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* **277**: 41701-41705.
- Guzman, C.A., Domann, E., Rohde, M., Bruder, D., Darji, A., Weiss, S., Wehland, J., Chakraborty, T., and Timmis, K.N. (1996) Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **20**: 119-126.
- Hannon, G.J. (2002) RNA interference. *Nature* **418**: 244-251.
- Hasegawa, M., Fujimoto, Y., Lucas, P.C., Nakano, H., Fukase, K., Nunez, G., and Inohara, N. (2008) A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *Embo J* **27**: 373-383.
- Hauf, N., Goebel, W., Serfling, E., and Kuhn, M. (1994) *Listeria monocytogenes* infection enhances transcription factor NF-kappa B in P388D1 macrophage-like cells. *Infect Immun* **62**: 2740-2747.
- Hauf, N., Goebel, W., Fiedler, F., Sokolovic, Z., and Kuhn, M. (1997) *Listeria monocytogenes* infection of P388D1 macrophages results in a biphasic NF-kappaB (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by IkappaBalpha and IkappaBbeta degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9394-9399.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**: 1099-1103.
- Hayden, M.S., West, A.P., and Ghosh, S. (2006) NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* **25**: 6758-6780.
- Hedl, M., Li, J., Cho, J.H., and Abraham, C. (2007) Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19440-19445.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**: 1526-1529.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**: 740-745.
- Hisamatsu, T., Suzuki, M., Reinecker, H.C., Nadeau, W.J., McCormick, B.A., and Podolsky, D.K. (2003) CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**: 993-1000.

- Hitotsumatsu, O., Ahmad, R.C., Tavares, R., Wang, M., Philpott, D., Turer, E.E., Lee, B.L., Shiffin, N., Advincula, R., Malynn, B.A., Werts, C., and Ma, A. (2008) The ubiquitin-editing enzyme A20 restricts nucleotide-binding oligomerization domain containing 2-triggered signals. *Immunity* **28**: 381-390.
- Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zahring, U., and Beutler, B. (2005) CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* **433**: 523-527.
- Hof, H. (1984) Virulence of different strains of *Listeria monocytogenes* serovar 1/2a. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **173**: 207-218.
- Hofmann, K., Bucher, P., and Tschopp, J. (1997) The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* **22**: 155-156.
- Hsu, Y.M., Zhang, Y., You, Y., Wang, D., Li, H., Duramad, O., Qin, X.F., Dong, C., and Lin, X. (2007) The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nat Immunol* **8**: 198-205.
- Hugot, J.P., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Olson, J.M., Lee, J.C., Beaugerie, L., Naom, I., Dupas, J.L., Van Gossum, A., Orholm, M., Bonaiti-Pellie, C., Weissenbach, J., Mathew, C.G., Lennard-Jones, J.E., Cortot, A., Colombel, J.F., and Thomas, G. (1996) Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* **379**: 821-823.
- Hysi, P., Kabesch, M., Moffatt, M.F., Schedel, M., Carr, D., Zhang, Y., Boardman, B., von Mutius, E., Weiland, S.K., Leupold, W., Fritsch, C., Klopp, N., Musk, A.W., James, A., Nunez, G., Inohara, N., and Cookson, W.O. (2005) NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. *Hum Mol Genet* **14**: 935-941.
- Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J., and Nunez, G. (1999) Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* **274**: 14560-14567.
- Inohara, N., Koseki, T., Lin, J., del Peso, L., Lucas, P.C., Chen, F.F., Ogura, Y., and Nunez, G. (2000) An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem* **275**: 27823-27831.
- Inohara, N., and Nunez, G. (2001) The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* **20**: 6473-6481.
- Inohara, N., Ogura, Y., Chen, F.F., Muto, A., and Nunez, G. (2001) Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* **276**: 2551-2554.
- Inohara, N., and Nunez, G. (2003) NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* **3**: 371-382.

- Jaffe, E.A., Hoyer, L.W., and Nachman, R.L. (1973) Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* **52**: 2757-2764.
- Janeway, C.A. (2005) *Immunobiology - The Immune System in Health and Disease*: Garland Science Publishing.
- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**: 197-216.
- Johnson, G.L., and Lapadat, R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**: 1911-1912.
- Karin, M. (1999) The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **274**: 27339-27342.
- Karin, M., and Greten, F.R. (2005) NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* **5**: 749-759.
- Karin, M., Lawrence, T., and Nizet, V. (2006) Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* **124**: 823-835.
- Kawai, T., and Akira, S. (2006a) TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**: 816-825.
- Kawai, T., and Akira, S. (2006b) Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* **7**: 131-137.
- Kayal, S., Lilienbaum, A., Poyart, C., Memet, S., Israel, A., and Berche, P. (1999) Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol Microbiol* **31**: 1709-1722.
- Kayal, S., Lilienbaum, A., Join-Lambert, O., Li, X., Israel, A., and Berche, P. (2002) Listeriolysin O secreted by *Listeria monocytogenes* induces NF-kappaB signalling by activating the IkappaB kinase complex. *Mol Microbiol* **44**: 1407-1419.
- Kayal, S., and Charbit, A. (2006) Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 514-529.
- Kim, J.G., Lee, S.J., and Kagnoff, M.F. (2004) Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect Immun* **72**: 1487-1495.
- Kim, J.Y., Omori, E., Matsumoto, K., Nunez, G., and Ninomiya-Tsuji, J. (2008a) TAK1 is a central mediator of NOD2 signaling in epidermal cells. *J Biol Chem* **283**: 137-144.
- Kim, Y.G., Park, J.H., Shaw, M.H., Franchi, L., Inohara, N., and Nunez, G. (2008b) The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. *Immunity* **28**: 246-257.

- Kirschning, C.J., Wesche, H., Merrill Ayres, T., and Rothe, M. (1998) Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* **188**: 2091-2097.
- Kobayashi, K., Hernandez, L.D., Galan, J.E., Janeway, C.A., Jr., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2002a) IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* **110**: 191-202.
- Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L.D., Galan, J.E., Nunez, G., Janeway, C.A., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2002b) RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* **416**: 194-199.
- Kobayashi, K.S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G., and Flavell, R.A. (2005) Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **307**: 731-734.
- Kobe, B., and Kajava, A.V. (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 725-732.
- Kocks, C., Hellio, R., Gounon, P., Ohayon, H., and Cossart, P. (1993) Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *J Cell Sci* **105 (Pt 3)**: 699-710.
- Kotlyarov, A., Neininger, A., Schubert, C., Eckert, R., Birchmeier, C., Volk, H.D., and Gaestel, M. (1999) MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat Cell Biol* **1**: 94-97.
- Krull, M., Nost, R., Hippenstiel, S., Domann, E., Chakraborty, T., and Suttorp, N. (1997) *Listeria monocytogenes* potently induces up-regulation of endothelial adhesion molecules and neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J Immunol* **159**: 1970-1976.
- Kufer, T.A., Fritz, J.H., and Philpott, D.J. (2005) NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity. *Trends Microbiol* **13**: 381-388.
- Kuhn, M., Kathariou, S., and Goebel, W. (1988) Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **56**: 79-82.
- Kuhn, M., and Goebel, W. (1995) Molecular studies on the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Genet Eng (N Y)* **17**: 31-51.
- Kumar, S., Boehm, J., and Lee, J.C. (2003) p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* **2**: 717-726.
- LeBlanc, P.M., Yeretssian, G., Rutherford, N., Doiron, K., Nadiri, A., Zhu, L., Green, D.R., Gruenheid, S., and Saleh, M. (2008) Caspase-12 modulates NOD signaling and regulates antimicrobial peptide production and mucosal immunity. *Cell Host Microbe* **3**: 146-157.

- Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaiken, M., Gumbiner, B., and Cossart, P. (1999) A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Embo J* **18**: 3956-3963.
- LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M.J., Osorio, F., Slack, E.C., Tsoni, S.V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G.D., Ruland, J., and Reis e Sousa, C. (2007) Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* **8**: 630-638.
- Leimeister-Wachter, M., Domann, E., and Chakraborty, T. (1992) The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J Bacteriol* **174**: 947-952.
- Lemaitre, B., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1997) *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 14614-14619.
- Maaser, C., Heidemann, J., von Eiff, C., Lugerling, A., Spahn, T.W., Binion, D.G., Domschke, W., Lugerling, N., and Kucharzik, T. (2004) Human intestinal microvascular endothelial cells express Toll-like receptor 5: a binding partner for bacterial flagellin. *J Immunol* **172**: 5056-5062.
- Malley, R., Henneke, P., Morse, S.C., Cieslewicz, M.J., Lipsitch, M., Thompson, C.M., Kurt-Jones, E., Paton, J.C., Wessels, M.R., and Golenbock, D.T. (2003) Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1966-1971.
- Mansell, A., Khelef, N., Cossart, P., and O'Neill, L.A. (2001) Internalin B activates nuclear factor-kappa B via Ras, phosphoinositide 3-kinase, and Akt. *J Biol Chem* **276**: 43597-43603.
- Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M., and Dixit, V.M. (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**: 228-232.
- Marquis, H., Doshi, V., and Portnoy, D.A. (1995) The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infect Immun* **63**: 4531-4534.
- Martinon, F., and Tschopp, J. (2004) Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* **117**: 561-574.
- Masumoto, J., Yang, K., Varambally, S., Hasegawa, M., Tomlins, S.A., Qiu, S., Fujimoto, Y., Kawasaki, A., Foster, S.J., Horie, Y., Mak, T.W., Nunez, G., Chinnaiyan, A.M., Fukase, K., and Inohara, N. (2006) Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment in vivo. *J Exp Med* **203**: 203-213.

- McCaffrey, R.L., Fawcett, P., O'Riordan, M., Lee, K.D., Havell, E.A., Brown, P.O., and Portnoy, D.A. (2004) A specific gene expression program triggered by Gram-positive bacteria in the cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 11386-11391.
- McCarthy, J.V., Ni, J., and Dixit, V.M. (1998) RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem* **273**: 16968-16975.
- McGovern, D.P., Hysi, P., Ahmad, T., van Heel, D.A., Moffatt, M.F., Carey, A., Cookson, W.O., and Jewell, D.P. (2005) Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet* **14**: 1245-1250.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**: 394-397.
- Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr. (2000a) Innate immunity. *N Engl J Med* **343**: 338-344.
- Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr. (2000b) The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* **8**: 452-456.
- Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**: 135-145.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.M., and Cossart, P. (1996) E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84**: 923-932.
- Miao, E.A., Alpuche-Aranda, C.M., Dors, M., Clark, A.E., Bader, M.W., Miller, S.I., and Aderem, A. (2006) Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol* **7**: 569-575.
- Michel, T., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., and Royet, J. (2001) Drosophila Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* **414**: 756-759.
- Miller, Y.I., Viriyakosol, S., Worrall, D.S., Boullier, A., Butler, S., and Witztum, J.L. (2005) Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**: 1213-1219.
- Mosa, A., Trumstedt, C., Eriksson, E., Soehnlein, O., Heuts, F., Janik, K., Klos, A., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Hidmark, A., Wigzell, H., and Rottenberg, M.E. (2009) Nonhematopoietic cells control the outcome of infection with *Listeria monocytogenes* in a nucleotide oligomerization domain 1-dependent manner. *Infect Immun* **77**: 2908-2918.
- Munford, R.S. (2006) Severe sepsis and septic shock: the role of gram-negative bacteremia. *Annu Rev Pathol* **1**: 467-496.

- O'Neill, L.A. (2006) How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol* **18**: 3-9.
- O'Riordan, M., Yi, C.H., Gonzales, R., Lee, K.D., and Portnoy, D.A. (2002) Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13861-13866.
- Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., and Nunez, G. (2001) Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* **276**: 4812-4818.
- Ogura, Y., Sutterwala, F.S., and Flavell, R.A. (2006) The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Cell* **126**: 659-662.
- Opitz, B., Schroder, N.W., Spreitzer, I., Michelsen, K.S., Kirschning, C.J., Hallatschek, W., Zahringer, U., Hartung, T., Gobel, U.B., and Schumann, R.R. (2001) Toll-like receptor-2 mediates Treponema glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem* **276**: 22041-22047.
- Opitz, B., Puschel, A., Schmeck, B., Hocke, A.C., Rosseau, S., Hammerschmidt, S., Schumann, R.R., Suttorp, N., and Hippenstiel, S. (2004) Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized Streptococcus pneumoniae. *J Biol Chem* **279**: 36426-36432.
- Opitz, B., Forster, S., Hocke, A.C., Maass, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Suttorp, N., and Krull, M. (2005) Nod1-mediated endothelial cell activation by Chlamydomphila pneumoniae. *Circ Res* **96**: 319-326.
- Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M., and Seya, T. (2003) TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* **278**: 49751-49762.
- Ozinsky, A., Smith, K.D., Hume, D., and Underhill, D.M. (2000) Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* **6**: 393-396.
- Pamer, E.G. (2004) Immune responses to Listeria monocytogenes. *Nat Rev Immunol* **4**: 812-823.
- Park, J.H., Kim, Y.G., Shaw, M., Kanneganti, T.D., Fujimoto, Y., Fukase, K., Inohara, N., and Nunez, G. (2007) Nod1/RICK and TLR signaling regulate chemokine and antimicrobial innate immune responses in mesothelial cells. *J Immunol* **179**: 514-521.
- Park, J.M., Ng, V.H., Maeda, S., Rest, R.F., and Karin, M. (2004) Anthrolysin O and other gram-positive cytolysins are toll-like receptor 4 agonists. *J Exp Med* **200**: 1647-1655.

- Peel, M., Donachie, W., and Shaw, A. (1988) Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J Gen Microbiol* **134**: 2171-2178.
- Philpott, D.J., Yamaoka, S., Israel, A., and Sansonetti, P.J. (2000) Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol* **165**: 903-914.
- Plitas, G., Chaudhry, U.I., Kingham, T.P., Raab, J.R., and DeMatteo, R.P. (2007) NK dendritic cells are innate immune responders to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **178**: 4411-4416.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**: 2085-2088.
- Portnoy, D.A., Jacks, P.S., and Hinrichs, D.J. (1988) Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* **167**: 1459-1471.
- Portnoy, D.A., Auerbuch, V., and Glomski, I.J. (2002) The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J Cell Biol* **158**: 409-414.
- Posnett, D.N., Marboe, C.C., Knowles, D.M., 2nd, Jaffe, E.A., and Kunkel, H.G. (1984) A membrane antigen (HC1) selectively present on hairy cell leukemia cells, endothelial cells, and epidermal basal cells. *J Immunol* **132**: 2700-2702.
- Rincon, M., Enslin, H., Raugeaud, J., Recht, M., Zapton, T., Su, M.S., Penix, L.A., Davis, R.J., and Flavell, R.A. (1998) Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *Embo J* **17**: 2817-2829.
- Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., and Bazan, J.F. (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 588-593.
- Rose, F., Zeller, S.A., Chakraborty, T., Domann, E., Machleidt, T., Kronke, M., Seeger, W., Grimminger, F., and Sibelius, U. (2001) Human endothelial cell activation and mediator release in response to *Listeria monocytogenes* virulence factors. *Infect Immun* **69**: 897-905.
- Rosenstiel, P., Huse, K., Till, A., Hampe, J., Hellmig, S., Sina, C., Billmann, S., von Kampen, O., Waetzig, G.H., Platzer, M., Seegert, D., and Schreiber, S. (2006) A short isoform of NOD2/CARD15, NOD2-S, is an endogenous inhibitor of NOD2/receptor-interacting protein kinase 2-induced signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3280-3285.

- Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G., and Karin, M. (1998) IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature* **395**: 297-300.
- Roux, P.P., and Blenis, J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 320-344.
- Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005) Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* **6**: 1087-1095.
- Schmeck, B., Beermann, W., van Laak, V., Zahlten, J., Opitz, B., Witzenrath, M., Hocke, A.C., Chakraborty, T., Kracht, M., Rosseau, S., Suttorp, N., and Hippenstiel, S. (2005) Intracellular bacteria differentially regulated endothelial cytokine release by MAPK-dependent histone modification. *J Immunol* **175**: 2843-2850.
- Schwarzer, N., Nost, R., Seybold, J., Parida, S.K., Fuhrmann, O., Krull, M., Schmidt, R., Newton, R., Hippenstiel, S., Domann, E., Chakraborty, T., and Suttorp, N. (1998) Two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* induce ceramide generation, nuclear factor-kappa B activation, and E-selectin expression in human endothelial cells. *J Immunol* **161**: 3010-3018.
- Seki, E., Tsutsui, H., Tsuji, N.M., Hayashi, N., Adachi, K., Nakano, H., Futatsugi-Yumikura, S., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S., Fujimoto, J., and Nakanishi, K. (2002) Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes* in mice. *J Immunol* **169**: 3863-3868.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., and Ireton, K. (2000) InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**: 501-510.
- Sibeliuss, U., Chakraborty, T., Krogel, B., Wolf, J., Rose, F., Schmidt, R., Wehland, J., Seeger, W., and Grimminger, F. (1996a) The listerial exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C synergize to elicit endothelial cell phosphoinositide metabolism. *J Immunol* **157**: 4055-4060.
- Sibeliuss, U., Rose, F., Chakraborty, T., Darji, A., Wehland, J., Weiss, S., Seeger, W., and Grimminger, F. (1996b) Listeriolysin is a potent inducer of the phosphatidylinositol response and lipid mediator generation in human endothelial cells. *Infect Immun* **64**: 674-676.
- Sibeliuss, U., Schulz, E.C., Rose, F., Hattar, K., Jacobs, T., Weiss, S., Chakraborty, T., Seeger, W., and Grimminger, F. (1999) Role of *Listeria monocytogenes* exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C in activation of human neutrophils. *Infect Immun* **67**: 1125-1130.

- Stockinger, S., Kastner, R., Kernbauer, E., Pilz, A., Westermayer, S., Reutterer, B., Soulat, D., Stengl, G., Vogl, C., Frenz, T., Waibler, Z., Taniguchi, T., Rulicke, T., Kalinke, U., Muller, M., and Decker, T. (2009) Characterization of the interferon-producing cell in mice infected with *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* **5**: e1000355.
- Strober, W., Murray, P.J., Kitani, A., and Watanabe, T. (2006) Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* **6**: 9-20.
- Takeda, K., and Akira, S. (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**: 1-14.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., and Akira, S. (2000) Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* **165**: 5392-5396.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* **13**: 933-940.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L., and Akira, S. (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* **169**: 10-14.
- Tang, P., Rosenshine, I., and Finlay, B.B. (1994) *Listeria monocytogenes*, an invasive bacterium, stimulates MAP kinase upon attachment to epithelial cells. *Mol Biol Cell* **5**: 455-464.
- Tang, P., Rosenshine, I., Cossart, P., and Finlay, B.B. (1996) Listeriolysin O activates mitogen-activated protein kinase in eucaryotic cells. *Infect Immun* **64**: 2359-2361.
- Tang, P., Sutherland, C.L., Gold, M.R., and Finlay, B.B. (1998) *Listeria monocytogenes* invasion of epithelial cells requires the MEK-1/ERK-2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Infect Immun* **66**: 1106-1112.
- Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. (1989) Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* **109**: 1597-1608.
- Torres, D., Barrier, M., Bihl, F., Quesniaux, V.J., Maillet, I., Akira, S., Ryffel, B., and Erard, F. (2004) Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* **72**: 2131-2139.
- Travassos, L.H., Carneiro, L.A., Girardin, S.E., Boneca, I.G., Lemos, R., Bozza, M.T., Domingues, R.C., Coyle, A.J., Bertin, J., Philpott, D.J., and Plotkowski, M.C. (2005) Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **280**: 36714-36718.
- Unanue, E.R. (1997a) Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunol Rev* **158**: 11-25.

- Unanue, E.R. (1997b) Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. *Curr Opin Immunol* **9**: 35-43.
- van Heel, D.A., Ghosh, S., Butler, M., Hunt, K., Foxwell, B.M., Mengin-Lecreulx, D., and Playford, R.J. (2005) Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation. *Eur J Immunol* **35**: 2471-2476.
- Vavricka, S.R., Musch, M.W., Chang, J.E., Nakagawa, Y., Phanvijhitsiri, K., Waypa, T.S., Merlin, D., Schneewind, O., and Chang, E.B. (2004) hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology* **127**: 1401-1409.
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., and Kreft, J. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* **14**: 584-640.
- Viala, J., Chaput, C., Boneca, I.G., Cardona, A., Girardin, S.E., Moran, A.P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M.R., Coyle, A.J., DiStefano, P.S., Sansonetti, P.J., Labigne, A., Bertin, J., Philpott, D.J., and Ferrero, R.L. (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* **5**: 1166-1174.
- Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P.J., and Strober, W. (2004) NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* **5**: 800-808.
- Way, S.S., Thompson, L.J., Lopes, J.E., Hajjar, A.M., Kollmann, T.R., Freitag, N.E., and Wilson, C.B. (2004) Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. *Cell Microbiol* **6**: 235-242.
- Welter-Stahl, L., Ojcius, D.M., Viala, J., Girardin, S., Liu, W., Delarbre, C., Philpott, D., Kelly, K.A., and Darville, T. (2006) Stimulation of the cytosolic receptor for peptidoglycan, Nod1, by infection with *Chlamydia trachomatis* or *Chlamydia muridarum*. *Cell Microbiol* **8**: 1047-1057.
- Werts, C., Girardin, S.E., and Philpott, D.J. (2006) TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad. *Cell Death Differ* **13**: 798-815.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S. (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**: 640-643.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**: 730-737.

- Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M., and Karin, M. (1997) The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* **91**: 243-252.
- Zhong, S.P., Ma, W.Y., and Dong, Z. (2000) ERKs and p38 kinases mediate ultraviolet B-induced phosphorylation of histone H3 at serine 10. *J Biol Chem* **275**: 20980-20984.
- Zwaferink, H., Stockinger, S., Hazemi, P., Lemmens-Gruber, R., and Decker, T. (2008) IFN-beta increases listeriolysin O-induced membrane permeabilization and death of macrophages. *J Immunol* **180**: 4116-4123.

7. ANHANG

7.1. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Norbert Suttorp, Herrn Prof. Dr. med. Stefan Hippenstiel und Herrn PD Dr. med. Bastian Opitz danke ich für das Überlassen des Themas sowie die Möglichkeit, diese Arbeit durchzuführen. Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Bastian Opitz für seine exzellente Betreuung den gesamten Entstehungsprozess hindurch. Herzlichen Dank verdienen auch die MTAs sowie meine Mitdoktoranden für die tatkräftige Unterstützung, insbesondere auch beim Erlernen der Methoden der Arbeit.

Abschließend sei meinen Eltern sowie Moritz, Emma und Max gedankt, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

7.2. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7.3. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Anja Püschel, an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertationsarbeit von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die verwendete Literatur sind vollständig angegeben