

# „Die Invasion von Epithelzellen durch *E. coli* Shigella“

Habilitationsschrift  
zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach

Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. Thomas Adam

geboren am 14. Februar 1959 in Stuttgart

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen  
Prof. Dr. med. Martin Paul

eingereicht am: September / 2003

# Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Abstract	5
1 Einleitung	6
1.1 Shigellen als Erreger der bakteriellen Dysenterie	6
1.1.1 Tiermodelle für die Shigellose	8
1.2 Die Pathogenese der Shigellose	8
1.2.1 Magen-Darm-Passage	8
1.2.2 Infektion von M-Zellen	9
1.2.3 Infektion von Makrophagen und Apoptose	11
1.2.4 Primäre Infektion von Epithelzellen	12
1.2.5 Passive intrazelluläre Motilität in Epithelzellen	12
1.2.6 Bewegung von Zelle zu Zelle	14
2 Die Epithelzellinvasion durch Shigella	16
2.1 Epithelzellinvasion als zentrales Ereignis der Shigellose	16
2.2 Bakterielle Voraussetzungen der Invasion	16
2.2.1 Regulation der Expression der invasionsassoziierten Gene	19
2.2.2 Interaktionen der Shigellen-Invasine mit Wirtszellfaktoren	20
2.3 Wichtige Wirtszellfaktoren für die bakterielle Invasion	21
2.3.1 Zytoskelettveränderungen der Wirtszelle als essentielle Komponente des Internalisierungsprozesses	21
2.3.2 Invasionsassoziierte Signalisationsvorgänge	34
3 Bisher nicht publizierte Daten unserer Arbeitsgruppe zur Pathogenese der Shigellose	37
3.1 Charakterisierung des Rekrutierungsmoduls von RhoA im Epithelzellinvasionssystem	37
3.2 Phospholipidmetabolismus während der Shigellen-Invasion	39
Literaturverzeichnis	40
Anhänge	57
Abkürzungsverzeichnis	57
Danksagung	59
Eidesstattliche Versicherung	61

## **Zusammenfassung**

Shigellen sind enteroinvasive *E. coli*-Klone, die beim Menschen das Krankheitsbild der bakteriellen Ruhr verursachen. Wichtige Virulenzeigenschaften dieser Bakterien werden von dem 220 kb großen Plasmid pINV kodiert. Die für das Krankheitsbild typischen blutig-eitrigen Durchfälle sind Folge der retrograden Zerstörung der Kolon-Mukosa ausgehend von der initialen Infektion im Bereich des Recto-Sigmoids. Die Infektion der Darmmukosa erfolgt über M-Zellen und assoziierte Makrophagen, nach deren apoptotischem Untergang das Bakterium Zugang zum basolateralen Pol der Enterozyten erhält; eine direkte Infektion der Enterozyten vom Darmlumen über deren apikalen Pol wird nicht beobachtet. Das eigentliche Ziel der invasiven Shigellen ist das Zytoplasma des Enterozyten, da nur dort eine relevante Replikation der Bakterien stattfindet. Dabei wird die Ausbreitung der Bakterien durch ihre Fähigkeit begünstigt, von einer primär infizierten Epithelzelle ausgehend benachbarte Epithelzellen über Plasmamembran-Ausstülpungen zu infizieren, ohne dabei den geschützten Raum des epithelialen Zytoplasmas zu verlassen. Die Aufklärung des epithelialen Invasionsmechanismus auf molekularer Ebene ist deshalb von essenzieller Bedeutung für das Verständnis sowohl der Pathogenese der Erkrankung als auch der Ökologie des Erregers. Die Infektion humaner Epithelzellen durch Shigellen erfolgt durch bakterielle Induktion von Membranausstülpungen, die über dem Bakterium fusionieren und morphologisch der Makropinozytose ähneln. Die Ausbildung der zellulären Protrusionen geht mit bedeutenden Umbauvorgängen des Zytoskeletts einher. Wir konnten zunächst in einer mikromorphologischen Analyse die einzelnen Etappen des Zytoskelett-Umbaus sowie die Mikroarchitektur der Protrusionen beschreiben. Anschließend gelang es, mit T-Plastin, Rho und einem Myosin IX Struktur- und Regulations-Moleküle zu identifizieren, die für die bakterielle Invasion funktionell bedeutend sind. Dabei fielen unterschiedliche bakteriell induzierte Rekrutierungsmuster verschiedener Rho-Isoformen und verschiedener Proteine der Rho-Familie auf. Insbesondere wurden RhoA und RhoC in unterschiedliche Bereiche des Invasionskomplexes rekrutiert. Mit umfangreichen Mutationsanalysen dieser Rho-Isoformen gelang es schließlich erstmals, ein humanes Proteinmotiv mit Techniken der 'zellulären Mikrobiologie' zu charakterisieren. Das mit Hilfe unseres Shigellen-Infektionsmodells an Epithelzellen beschriebene Rekrutierungsmotiv von Rho dürfte von fundamentaler Bedeutung sein für die räumliche Aktivitätsregulation dieser Proteinfamilie in normalen und in stimulierten Zellen.

### **Schlagworte**

*E. coli*, Shigellen, Epithelzellen, Invasion, Zytoskelett, Kompartimente, GTPasen, Rho

## **Abstract**

Shigella comprise enteroinvasive clones of *E. coli* and are the cause of bacillary dysentery in humans. Important virulence traits of these bacteria are encoded by the 220 kb pINV plasmid. The bloody-purulent diarrhea typically seen in this disease results from retrograde destruction of colonic mucosa after initial infection of the recto-sigmoid. Infection of intestinal mucosa is via M-cells and associated macrophages. After apoptotic degradation of macrophages the microorganism gains access to the basolateral pole of enterocytes. Direct infection of enterocytes from the intestinal lumen via the apical pole is not observed. Invasive shigella target the cytoplasm of enterocytes since relevant microbial replication only takes place in this compartment. Microbial spread within the epithelial cell layer is via protrusions of the cytoplasmic membrane that reach from cell to cell thus enabling intercellular transitions without leaving the safe cytoplasmic compartment of epithelial cells. Insight into the molecular mechanisms of epithelial cell invasion is therefore essential for the comprehension of the pathogenesis of the disease as well as the ecology of the microorganism. Infection of human epithelial cells by Shigella results from bacteria-induced formation of membraneous protrusions that finally fuse above the bacterium and morphologically resemble macropinocytosis. The formation of cellular protrusions is associated with important rearrangements of the cytoskeleton. In a micromorphological study we first described the different steps of cytoskeletal reorganization and the microarchitecture of the protrusions. We then could identify structure and regulatory molecules that are functionally involved in bacterial entry: T-plastin, Rho and a myosin IX. These studies also showed different bacteria-induced recruitment patterns of Rho isoforms and of various members of the Rho protein family. In particular, RhoA and RhoC were recruited into different regions of the invasion structure. Using exhaustive mutation analysis of these Rho isoforms, we for the first time characterized a human protein motif using methods of 'cellular microbiology'. The recruitment motif described using our model of epithelial cell invasion by Shigella should be significant for the spatial regulation of activity of this protein family in normal and in stimulated cells.

## **Keywords**

*E. coli*, Shigella, epithelial cells, invasion, cytoskeleton, compartments, GTPases, rho

# 1 Einleitung

## 1.1 Shigellen als Erreger der bakteriellen Dysenterie

Shigellen sind stäbchenförmige, unbewegliche, gramnegative Bakterien, die zur Familie der Enterobakteriaceen gerechnet werden. Sie sind fakultativ anaerob und gehören zu den sogenannten enteroinvasiven Bakterien, das heißt sie besitzen die Fähigkeit, in verschiedene Zellen der Darmwand einzudringen. Neuere phylogenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei Shigellen eigentlich um Klone der Spezies *Escherichia coli* handelt (136; 204; 205; 217). Einer entsprechenden Übereinkunft in der Literatur folgend werden die traditionellen `Shigella-Spezies' *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei* und *S. boydii* deshalb in dieser Arbeit als *E. coli* Dysenteriae, Flexneri, Sonnei oder Boydii angesprochen. Die Bezeichnungen `Shigellen' oder `Shigella' (jeweils in nicht-kursiver Schreibweise) werden zur allgemeinen Benennung der unter der traditionellen Gattungsbezeichnung `Shigella' zusammengefassten *E. coli*-Klone verwendet. Nach phylogenetischen Studien entstanden Shigellen 8 mal unabhängig voneinander innerhalb der Spezies *E. coli*. 3 Klone haben sich zwischenzeitlich in verschiedene Serogruppen differenziert und bilden den Ursprung der cluster 1-3, die anderen 5 Klone sind serologisch homogen. Demnach sind cluster 1 und 2 vor etwa 50 000-270 000 Jahren entstanden, während der Ursprung von cluster 3 ca. 35 000 bis 170 000 Jahre zurückliegt (205). Das Genom umfasst ca. 4,6 Mio. Basenpaare mit einem durchschnittlichen G+C-Gehalt von 51%. Shigellen-DNA enthält eine Vielzahl mobiler genetischer Elemente einschließlich ca. 300 Insertions- (IS-) Elemente auf dem Chromosom und ca. 90 IS-Elemente auf dem Virulenzplasmid, womit das Shigella-Genom das IS-reichste aller bisher untersuchter Enterobakteriaceen-Genome darstellt (41; 118; 308). Die meisten Virulenzfaktoren liegen auf dem Virulenzplasmid (pINV) oder sind Teil chromosomaler Pathogenitätsinseln (PAIs). Sieben Geninseln sind mit tRNA-Genen assoziiert: *selC*, *leuX*, *aspV*, *asnT*, *argW*, *pheV* und *glyU*; vier davon enthalten Integrasen (308). Neben der Integration von PAIs ist das Shigella-Genom auch charakterisiert durch eine große Zahl von Pseudogenen. Der Verlust von Genfunktionen korreliert mit der Adaption dieser Bakterien an eine vorwiegend intrazelluläre Lebensweise (118; 157). Zusätzlich zu dem obligaten pINV-Plasmid besitzen einige Shigellen weitere Plasmide. Weit verbreitet sind inzwischen Resistenzplasmide, deren Prototyp NR1 darstellt (315). Man nimmt an, dass ein chromosomaler PAI (SRL PAI), der für einen multiresistenten Phänotyp kodiert, durch Integration von Sequenzen eines NR1-artigen Plasmids entstanden ist (207). Das 3 kb kleine pHS-2 Plasmid wurde mit dem arthritogenen Potenzial von Shigellen assoziiert (262; 263) und kodiert im Wesentlichen für Cld<sub>pHS-2</sub>, ein Faktor, der die Zahl polymerisierter Untereinheiten und damit die Kettenlänge der O-Seitenkette des Lipopolysaccharids (LPS) modifiziert (261). pHS-2 positive Shigella-

Isolate zeigen eine bimodale Verteilung der O-Seitenkettenlängen mit bevorzugten Kettenlängen von 15 und 90 Untereinheiten, die Kettenlängen von pHS-2 negativen Shigellen streuen um 15 Untereinheiten (111; 261). Wir konnten kürzlich zeigen, dass das pHS-2 Plasmid präferentiell bei cluster 3-Shigellen gefunden wird, die auch mit praktisch sämtlichen beim Menschen beobachteten Fällen von Shigella-induzierter Reaktiver Arthritis assoziiert sind (6).

Shigellen sind weltweit endemisch und wurden bereits 1887 als Erreger der bakteriellen Ruhr beim Menschen beschrieben, wobei der Typstamm zunächst als *Bacillus dysentericus* bezeichnet wurde (250; 317). Der Mensch ist der einzige bekannte reguläre Wirt dieser enteroinvasiven Bakterien. Shigellen besitzen keine besondere Umweltresistenz und replizieren auch nicht - im Gegensatz zu Listerien oder Yersinien - bei geringer Umgebungstemperatur (316). Beim Menschen kommen keine Dauerausscheider mit Shigellen vor. Zur Aufrechterhaltung einer kritischen Masse vermehrungsfähiger Bakterien benötigen Shigellen deshalb einen hocheffizienten Infektionsmechanismus beim Menschen. Der hohen Kontagiosität des Erregers entspricht die sehr geringe Infektionsdosis von 10-100 Bakterien (72). Die Übertragung erfolgt meist fäkal-oral; dabei kann die Erkrankung nicht nur über direkten Kontakt, sondern auch über Nahrungsmittel (93; 106; 122) übertragen werden. Aufgrund der geringen Infektionsdosis kann die Shigellose auch in fäkal kontaminierten Badeseen (34; 124) erworben werden. Ist kontaminiertes Trinkwasser die Infektionsquelle (78; 251; 270), können große Shigellose-Ausbrüche resultieren. Die geringe Infektionsdosis dürfte auch Ursache dafür sein, dass Hausfliegen als Vektoren eine wichtige Rolle spielen können (55). Nicht selten findet man Shigellose-Epidemien in Kindertagesstätten, deren Beherrschung den Einsatz rigoroser Hygiene-Maßnahmen erfordert (110; 142; 196; 247). Schließlich kann die Shigellose auch als sexuell übertragbare Erkrankung auftreten (14; 120; 137; 314). Weltweit rechnet man jährlich mit ca. 163 Millionen Shigellosen in Entwicklungsländern und ca. 1,5 Millionen Fällen in Industrieländern (130). Dabei sind etwa 2/3 der Patienten in Entwicklungsländern und etwa 1/3 der Patienten in Industrieländern Kinder im Alter zwischen 0 und 4 Jahren. In Entwicklungsländern sterben ca. 1,1 Millionen Menschen jährlich an Shigellose, davon etwa 60% Kinder unter 5 Jahren (130). Für die Industrieländer geht man von ca. 3000 letalen Verläufen pro Jahr aus. Die Inkubationszeit der Shigellose hängt u.a. von der Infektionsdosis ab und beträgt ca. 1-4 Tage. Nach kurzen Prodromi mit Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen und Temperaturerhöhung bestimmen zunehmend abdominale Beschwerden das Krankheitsbild. Dabei stehen Übelkeit und abdominale Schmerzen mit Tenesmen im Vordergrund. Zahlreiche weiche, purulente Stühle, die im weiteren Verlauf blutig-schleimige Auflagerungen zeigen können und unter Schmerzen abgesetzt werden, charakterisieren den weiteren Verlauf der

Shigellose. Nicht selten sind aber auch wässrige Stühle, insbesondere in der Anfangsphase der Erkrankung (81; 278). Pathologisch-anatomisch imponieren Schleimhautdefekte und -infiltrationen im Sinne einer ulzerösen Rektosigmoiditis, deren retrograde Ausdehnung bis hin zur Pankolitis reichen kann und mit der Schwere der Erkrankung korreliert (153; 259).

#### 1.1.1 Tiermodelle für die Shigellose

Der einzige regelmäßige Wirt von Shigellen ist der Mensch. Andere Primaten können auch von Shigellen infiziert werden; dabei handelt es sich um Affen, die meist in engem Kontakt mit Menschen in Gefangenschaft leben. Die Prävalenz von Shigellen bei Affen in freier Wildbahn ist nicht bekannt. Allerdings scheiden in Gefangenschaft gehaltene Affen nicht selten Shigellen aus, teilweise auch über mehrere Monate (23; 299). Als Tiermodell ist die Infektion von Makakken gut etabliert (186; 274). Diese Tiere zeigen nach Shigellen-Infektion Symptome, die der humanen Erkrankung sehr ähnlich sind; allerdings werden für die Infektion von Makakken  $10^{10}$ - $10^{11}$  Shigellen eingesetzt (123; 224), während die minimale Infektionsdosis der humanen Erkrankung bei  $10^1$ - $10^2$  Bakterien liegt (72). Aufgrund des engen Wirtsspektrums von Shigellen sind abgesehen vom Makakken-Modell nur Tiermodelle verfügbar, die nicht das Vollbild der Erkrankung simulieren. So werden seit langem die Meerschweinchen-Konjunktivitis (248) und das Ileus-Schlingen-Modell am Kaninchen (16; 206) als Tiermodelle zur Virulenzprüfung von Shigellen eingesetzt. Weiter haben sich Tiermodelle für die Erforschung des inflammatorischen Potenzials von Shigellen sowie der durch den Erreger induzierten Immunantwort als nützlich erwiesen. Dabei hat neben den oben beschriebenen Modellen auch die pulmonale Infektion von Mäusen Bedeutung erlangt (102; 151; 305). Dieses Modell wird auch für Studien zur Verwendung attenuierter Shigellen als Vektoren für DNA-Vakzinen eingesetzt (83). Neben dem Ileus-Schlingen-Modell am Kaninchen (17; 325) spielt die artifizielle Infektion von *knock-out*-Mäusen bei der Erforschung der Shigella-induzierten Apoptose eine Rolle (234). Schließlich werden Mäusemodelle für das Studium neurologischer Komplikationen der Shigellose eingesetzt (22; 182).

### 1.2 Die Pathogenese der Shigellose

Die Darstellungen zur Magendarmpassage, der Infektion von M-Zellen und der Rolle des Zytoskeletts folgen in Teilen einem von uns zum Thema erstellten Übersichtsartikel (3) sowie einem derzeit in Bearbeitung befindlichen Buchbeitrag zu dieser Thematik.

#### 1.2.1 Magen-Darm-Passage

Nach oraler Aufnahme des Erregers erfolgt mit der Magenpassage ein erster kritischer Schritt der Pathogenese. Aus der geringen Infektionsdosis beim Menschen kann gefolgert werden, dass die Magenpassage der Shigellen sehr effizient sein muss, zumal eine initiale

orale Vermehrung der Bakterien nicht beschrieben ist. Dabei dürfte die relative Säureresistenz von Shigellen in der stationären Wachstumsphase von Bedeutung sein, die durch einen Wachstumsphase-abhängigen Sigmafaktor reguliert wird (89; 98; 255; 304). Nach Überwindung der Magenbarriere werden die Shigellen durch die Darmwandperistaltik mit dem Darminhalt zum Rektosigmoid transportiert, wo sie in die Mukosa eindringen (259). Vom Rektosigmoid breitet sich die Infektion je nach Dauer und Schweregrad mehr oder weniger weit retrograd ins Kolon aus (259).

### 1.2.2 Infektion von M-Zellen

Der Zugang von Bakterien zu den Epithelzellen der Darmwand kann durch die auf der Darmwand gelegene Mukusschicht reguliert werden. So können Oligosaccharide der Mukusschicht als Rezeptoren für Bakterien fungieren und damit die Adhärenz an Epithelzellen inhibieren (66). Eine indische Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Shigellen an Muzin binden, eine Hauptkomponente der Mukusschicht des Darms. Dabei ist von besonderem Interesse, dass die Bakterien nur an Kolon-Muzin, nicht aber an Muzin aus anderen Bereichen des Darms banden (208). Welche Rolle Muzin für den Infektionsprozess beim Menschen tatsächlich spielt, ist bisher ungeklärt. Muzin könnte einerseits ein Kolonisierungsfaktor sein, der möglicherweise wichtig ist für die initiale Infektionslokalisation; andererseits könnte es sich um einen Abwehrmechanismus des Wirts handeln im Sinne einer Rezeptor-Kompetition. Histologische Untersuchungen an Patienten deuten darauf hin, dass Follikel-assoziierte Epithelzellen (FAE-Zellen) beim Menschen die ersten Zellen sind, die infiziert werden (153). FAE-Zellen bedecken lymphoide Follikel des Mukosa-assoziierten lymphoiden Systems (MALT) im Intestinum. Einzelne FAE-Zellen sind zu Mikrofalten- oder membranösen (M-) Zellen differenziert. Dabei handelt es sich um spezialisierte Epithelzellen, die Makromoleküle und Mikropartikel aus dem Darmlumen aufnehmen und per Transzytose an den lumennahen Teil eines darunterliegenden lymphoiden Follikels weitergeben. Man geht heute davon aus, dass Shigellen die Epithelzellbarriere des Darms über Transzytose von M-Zellen des Rektosigmoids überwinden (s. Abb. 1).

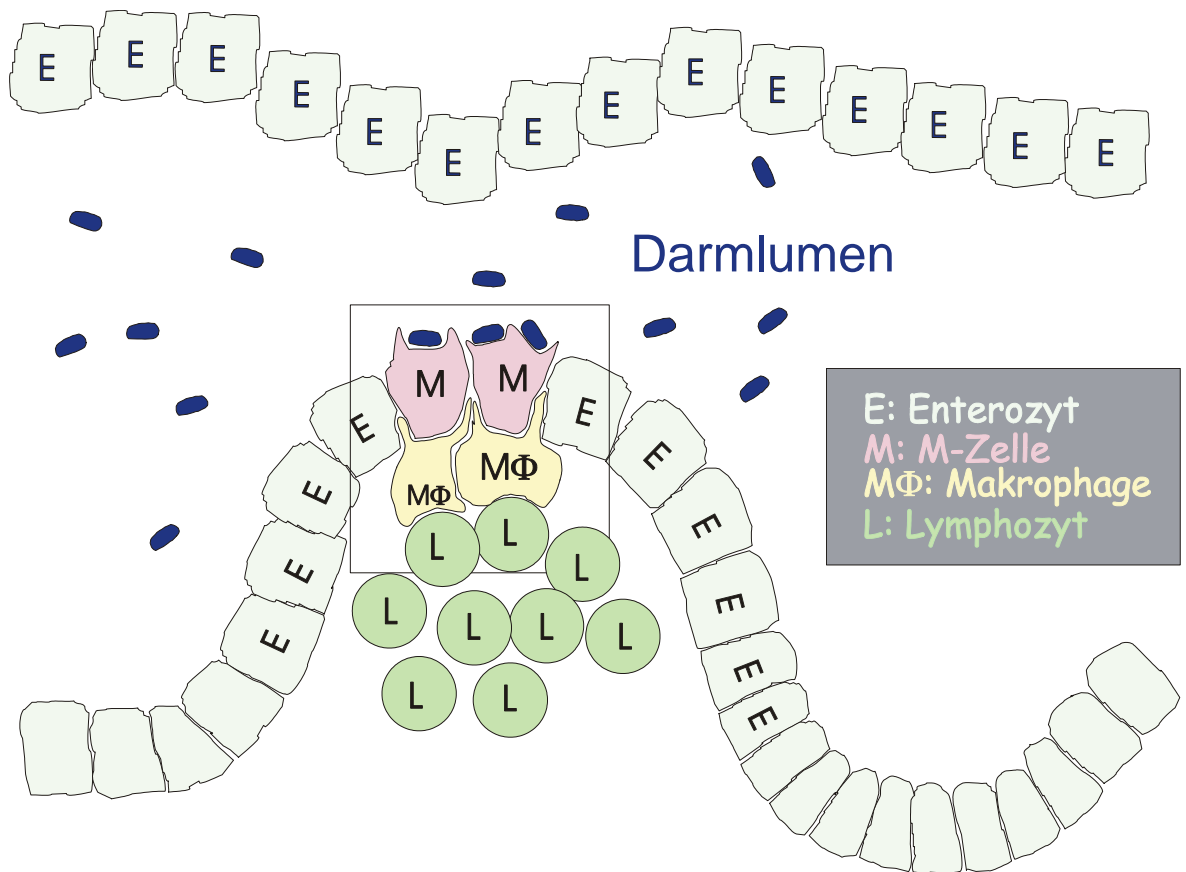


Abb. 1: Überwindung der Mukosabarriere durch Infektion rektosigmoidaler M-Zellen durch Shigellen

Dazu müssen sie Zugang zu diesen Zellen erhalten. Der lumennahe Bereich der lymphoiden Follikel enthält T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen (175; 190). Anhand elektronenmikroskopischer Studien am Ileum-Schlingen-Modell des Kaninchens konnte dargestellt werden, dass die Shigellen-Invasion von M-Zellen morphologisch der Invasion von Epithelzellen ähnelt (226). Die Beobachtung M-Zell-adhärenter Shigellen lässt vermuten, dass M-Zellen bisher nicht identifizierte Rezeptoren für Shigellen exprimieren (226; 300). Epithelzellen können mittels des Fibronektin-Rezeptors  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin und des Hyaluronan-Rezeptors CD44 mit Shigellen interagieren (253; 301). Da beide Rezeptoren nicht essentiell sind für die Shigellen-Invasion, ist zu vermuten, dass noch weitere Rezeptoren mit Shigellen interagieren und je nach Zelltyp unterschiedliche Moleküle Rezeptorfunktion haben können. Shigellen können mindestens in 3 verschiedene Zelltypen eindringen: M-Zellen, Makrophagen und Enterozyten. Für die Interaktion mit Shigellen könnten schließlich auch Glykosylierungsmuster von M-Zellen eine Rolle spielen. Dabei sind die Glykosylierungsmuster von M-Zellen sehr variabel. So konnte bei Mäusen gezeigt werden, dass die Glykosylierungsmuster nicht nur zwischen M-Zellen unterschiedlicher Darmabschnitte variierten, sondern auch zwischen verschiedenen M-Zellen, die sich auf demselben lymphoiden Follikel befanden (94). Interessanterweise wird beim Menschen

das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) von M-Zellen des Kolons, nicht aber von M-Zellen des Dünndarms exprimiert (290). Außerdem können Muzin-artige Epitope auf der apikalen Membran von M-Zellen exponiert sein (139; 140). Auch an eine unspezifische Bindung des invasiven Bakteriums an Epithelzellen auf der Basis hydrophober Wechselwirkungen muss gedacht werden, zumal virulente Shigellen hydrophober sind als nicht-virulente Mutanten (192). Schließlich könnte ein kürzlich identifizierter Phospholipase A-vermittelter Adhärenzmechanismus eine Rolle spielen (103). Ob die genannten Mechanismen bei der primären Interaktion zwischen Shigellen und M-Zellen des Rektosigmoid relevant sind, muss allerdings derzeit offen bleiben. Der Internalisierungsvorgang selbst scheint dem der bakteriellen Aufnahme in andere Epithelzellen, wie er hauptsächlich in Zellkulturmodellen studiert wurde, sehr ähnlich; allerdings gibt es bisher keine Studien zum molekularen Mechanismus der Internalisation in M-Zellen. Auch über den nächsten Schritt, der Transzytose durch die M-Zelle, ist auf molekularer Ebene bisher nichts bekannt.

### 1.2.3 Infektion von Makrophagen und Apoptose

Intestinale Makrophagen sind sehr eng mit M-Zellen assoziiert und liegen im lumennahen Bereich lymphoider Follikel (s. Abb. 2) .

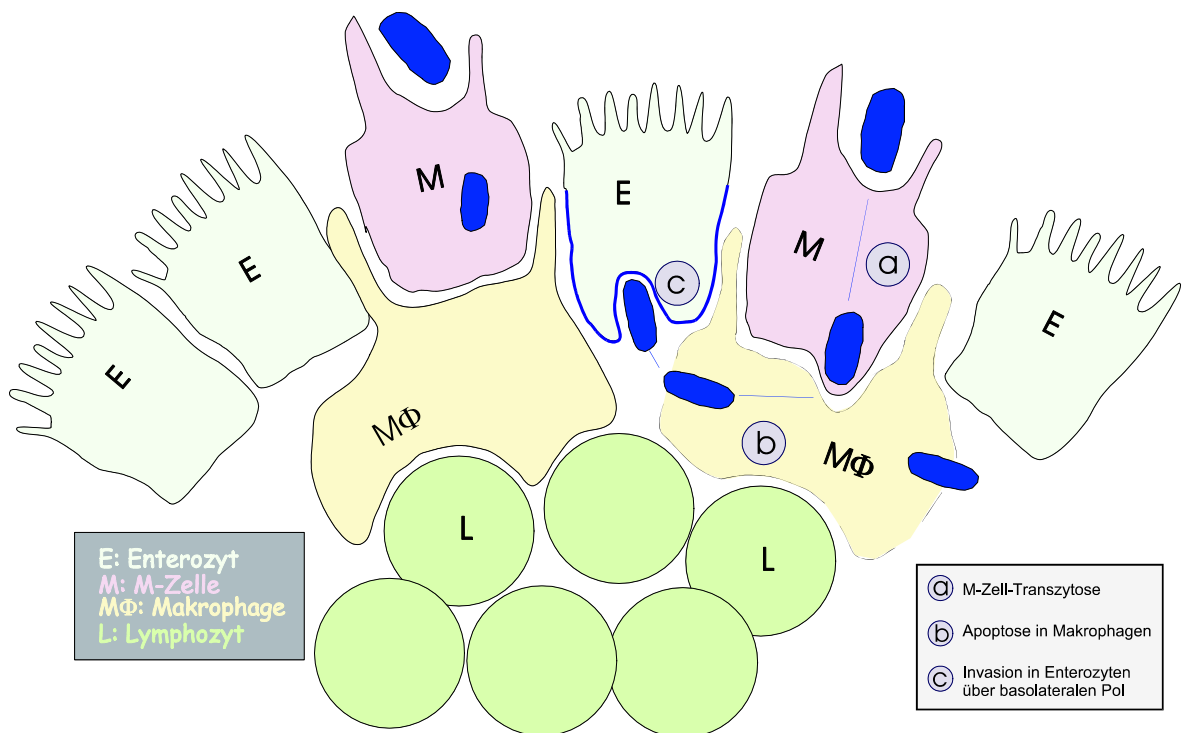


Abb. 2: Shigellen infizieren Makrophagen von M-Zellen aus, induzieren Apoptose und dringen in benachbarte Enterozyten über deren basolateralen Pol ein

Nach Transzytose durch M-Zellen infizieren Shigellen direkt die T-Zell-assoziierten Makrophagen. In Makrophagen bindet und aktiviert das bakterielle Invasin IpaB die Protease caspase-1. Dies führt zur Reifung großer Mengen von IL-1beta und schließlich

zum Zelltod durch Apoptose (108; 279; 324). Untergehende Makrophagen setzen intakte Bakterien und die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 frei (234). Dadurch erhalten die Bakterien Zugang zur basolateralen Membran der Enterozyten. Zusätzlich führt die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine im Anfangsstadium der Infektion zu einer Beschleunigung der Ausbreitung der invasiven Bakterien in der Darmwand (227). Shigella funktioniert damit die Abwehrmechanismen des Wirts zu Beginn der Infektion um und fördert damit die eigene Ausbreitung im Wirtsgewebe. Erst im weiteren Verlauf nach verstärkter Freisetzung proinflammatorischer Zytokine auch aus infizierten Epithelzellen (121; 229) gelingt es dem Wirt, den Infektionsherd granulozytär zu demarkieren. So spricht die Beobachtung, dass caspase-1 (-/-) - Mäuse nicht in der Lage sind, die Infektion zu begrenzen, dafür, dass eine starke Entzündungsreaktion letztendlich doch wesentlich ist für die Elimination von Shigellen (234).

#### 1.2.4 Primäre Infektion von Epithelzellen

Nach Freisetzung der Shigellen aus apoptotischen Makrophagen rektosigmoidaler lymphoider Follikel des MALT-Systems erhalten die Bakterien direkten Zugang zum basolateralen Pol von Enterozyten. Der Zugang zum basolateralen Pol von Enterozyten ist essentiell für die Pathogenese der Shigellose, da Shigellen – im Gegensatz etwa zu Salmonellen (60; 85; 162) – die polarisierten Epithelzellen des Darms nicht vom lumenseitigen apikalen Pol her infizieren können (169). Der 'Umweg' über M-Zellen und Makrophagen ermöglicht damit funktionell eine Umgehung der apikalen Enterozytenmembran, die von Shigellen nicht überwunden werden kann. Eine detaillierte Beschreibung der Zytoskelettveränderungen sowie der Signaltransduktionsvorgänge bei der Shigelleninvasion von Epithelzellen ist Hauptgegenstand dieser Arbeit und wird im 2. Abschnitt gegeben.

#### 1.2.5 Passive intrazelluläre Motilität in Epithelzellen

Nach Lyse des Phagosoms befinden sich die Shigellen im Zytoplasma der Epithelzellen. Da Shigellen keine Flagellen besitzen, sind sie nicht in der Lage, sich aktiv in humanen Zellen zu bewegen. Umso überraschender war die Beobachtung einer intrazytoplasmatischen Lokomotion (187), die durch eine bakteriell induzierte Aktin-Polymerisation zustande kommt. Durch die polarisierte Aktin-Polymerisation kommt es zu einer longitudinalen Netto-Kraft in Richtung des vorderen Bakterienpols, die den Mikroorganismus mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,1  $\mu\text{m}/\text{sec}$  durch das Wirtszell-Zytoplasma schiebt, wobei die Geschwindigkeit in Abhängigkeit von den jeweiligen Bedingungen stark variieren kann (320). Seitens der Bakterien genügt die Expression von ca. 4000 Molekülen IcsA (intercellular spread), syn. VirG, einem Virulenzplasmid-kodierten Protein, am hinteren Bakterienpol zur Induktion der Aktin-Polymerisation (30;

97; 128; 147). Das *icsA*-Gen wurde auf dem 220 kb großen Virulenzplasmid (pINV) lokalisiert (149), seine Nukleotidsequenz (143) hat aber einen mit 41% deutlich höheren GC-Anteil als die Invasine (34%) (236; 296; 297). Ob IcsA und die Ipa-Proteine evolutionsgeschichtlich von verschiedenen Genomen abstammen, ist bisher nicht untersucht. IcsA ist ein 116 kDa großes Protein der äußeren Membran und besitzt 3 Domänen, eine N-terminale Signalsequenz, eine 706 Aminosäuren umfassende alpha-Domäne, sowie eine C-terminale beta-`core´-Domäne mit 344 Aminosäuren. Die beta-`core´-Domäne ist in der äußeren Membran des Bakteriums verankert, während die alpha-Domäne exponiert ist und die biologische Aktivität des Moleküls bestimmt (265; 268). Die Lokalisation von IcsA an einem Pol des Bakteriums wird dadurch bewirkt, dass das Protein nur an diesem Pol in die äußere Membran eingebaut wird und sich anschließend via Diffusion innerhalb der Membran lateral ausbreitet (215). Die charakteristische Verteilung von IcsA auf der äußeren Bakterienmembran setzt die Expression langer O-Seitenketten des Lipopolysaccharids (LPS) voraus (221-223; 291); dabei scheinen die langen O-Seitenketten der pHS-2 positiven Shigellen IcsA teilweise zu maskieren, sodass IcsA nur an dem Pol mit höchster Konzentration zugänglich ist und nur dort Aktin-Polymerisation induziert (163-165). IcsA wird durch SopA, eine vom Virulenzplasmid kodierte Protease, zwischen den Aminosäuren 758 und 759 gespalten (76; 88). Diese posttranslationale Modifikation von IcsA soll für die Funktion und die Lokalisation des Proteins von Bedeutung sein (67; 76); allerdings ist dieser Punkt in der Literatur strittig (223). IcsA bindet das Aktin-bindende Protein Vinkulin (134; 268) und das ubiquitäre Wiskott-Aldrich Syndrom Protein N-WASP (77; 269). N-WASP ist ein Effektorprotein der kleinen GTPase CDC42 und aktiviert den Arp2/3-Komplex zur Aktinnukleation (216). IcsA bindet und aktiviert N-WASP und induziert auf diese Weise die Nukleation und Polymerisation von Aktin (77). Dabei umgeht IcsA die CDC42-vermittelte Aktivierung von N-WASP. Deshalb sind kleine GTPasen für die intrazelluläre Bewegung von Shigella nicht notwendig (168; 249). Allerdings kann CDC42 initial die Aktivierung des N-WASP-Arp2/3-Komplexes verstärken (44; 266). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass IcsA an die pleckstring homology (PH)-Domäne und die Calmodulin-Bindungsstelle (IQ-Domäne) von N-WASP, nicht aber an andere WASP-Isoformen bindet (267). Da in hämatopoetischen Zellen zwar WASP, nicht aber N-WASP exprimiert wird, erklärt sich aus der isoform-spezifischen Bindung von IcsA an N-WASP, dass Shigellen in Makrophagen keine IcsA-vermittelte Motilität zeigen. Ein zweiter Mechanismus IcsA-vermittelter Aktinnukleation kann über eine Aktivierung von Vinkulin und das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP; **v**asodilatator-**s**timulated **p**hosphoprotein) erfolgen. IcsA bindet an Vinkulin, das seinerseits mit VASP interagieren kann über eine Bindungsstelle, die durch Proteolyse freigelegt wird (45; 134). Für eine potenzielle Rolle

dieses Mechanismus' spricht, dass Vinkulin ein geschwindigkeitsbestimmender Faktor für die IcsA-vermittelte Motilität sein soll (258). Dabei würde Vinkulin-gebundenes VASP profilin-gebundenes G-Aktin immobilisieren und dadurch Aktin-Polymerisation induzieren. Allerdings ist dieses Modell strittig, da in Rekonstituierungsexperimenten mit gereinigten Proteinen Vinkulin nicht benötigt wurde für die Induktion von IcsA-vermittelter Bewegung (146). Es ist bemerkenswert, dass die IcsA-vermittelte Bewegung über zwei verschiedene Mechanismen vermittelt werden kann, via N-WASP und den Arp2/3-Komplex und via Vinkulin und VASP, wobei nach derzeitigem Kenntnisstand der Weg über N-WASP und Arp2/3 wichtiger zu sein scheint. Der auf diese Weise am hinteren Pol des Bakteriums gebildete Aktin-Schweif wird dann stabilisiert durch Aktin-bindende Proteine, die insbesondere eine Quervernetzung der Aktin-Filamente bewirken. Dabei konnten das Aktin-bündelnde Protein Plastin, das Aktin-vernetzende Protein Alpha-actinin, sowie das Aktin-bindende Protein filamin in Shigellen-Schweiften nachgewiesen werden (146; 202; 320).

Ein IcsA-unabhängiger, organellen-artiger Motilitäts-Phänotyp wurde zunächst in Fibroblasten beobachtet (295). Dabei werden die Bakterien entlang von Aktin-Filamenten zum Zellkern hin transportiert. In Experimenten mit der polarisierten Enterozyten-Zelllinie Caco2 wurde dieser Phänotyp mit der IcsA-abhängigen Bewegung verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass der organellen-artige Bewegungstyp hauptsächlich in Höhe der "tight junctions" beobachtet wird, wo sich ein ausgedehnter Aktin-Ring befindet (294). Damit könnte der organellen-artige Motilitätstyp die Bakterien nach Invasion polarisierter Enterozyten von der Eintrittsstelle ins Zellinnere bewegen, während der IcsA-abhängige Bewegungstyp für die Bewegung von Zelle zu Zelle von Bedeutung ist (294). Bakterielle Mutanten, die sich im Epithel nicht effizient von Zelle zu Zelle ausbreiten können, sind im Tiermodell nicht pathogen. Insbesondere *icsA*-Mutanten spielen deshalb auch eine wichtige Rolle bei der Konstruktion attenuierter Vakzine-Stämme (86; 225; 228).

#### 1.2.6 Bewegung von Zelle zu Zelle

Die direkte Infektion benachbarter Epithelzellen bietet Shigellen die Möglichkeit, von wenigen lymphoiden Follikeln im Rektosigmoid ausgehend innerhalb kürzester Zeit das Kolonepithel großflächig zu infizieren, ohne dabei jemals das Zytoplasma der Enterozyten verlassen zu müssen. Damit sichern sich die Bakterien Zugang zu einer reichhaltigen Nährstoffquelle, die, zunächst geschützt vor Abwehrmechanismen des Wirts, zur intrazytoplasmatischen Replikation genutzt wird. Allerdings ist durch die bakteriell induzierte Entzündungsreaktion (insbesondere im Zusammenhang mit der Makrophagen-Apoptose) die ungestörte Ausbreitung und Vermehrung im Epithel nur zeitlich begrenzt möglich. Deshalb ist die hohe Effizienz des Zell-zu-Zell-Übergangs ein wichtiges

Virulenzmerkmal von Shigellen. Durch die IcsA-abhängige polarisierte Induktion von Aktin-Polymerisation gelangen die Bakterien an die Zytoplasmamembran und induzieren zelluläre Protrusionen, die in die benachbarte Zelle hineinragen. Diese fingerförmigen Ausstülpungen beinhalten meist zwei Shigellen, da sich die Bakterien während der Bewegung von Zelle zu Zelle in der fingerförmigen Protrusion häufig teilen. Der Übergang zur Nachbarzelle ist keineswegs ein rein mechanischer Vorgang, bei dem sich die Bakterien quasi in die Nachbarzelle 'hineinbohren'; vielmehr hängt der Zell-zu-Zell-Übergang von Zytoskelettstrukturen ab, deren Funktion bisher noch nicht voll verstanden ist. Physiologische Zell-Zell-Kontakte in Epithelzellschichten werden stabilisiert durch Kalzium-abhängige Zell-Adhäsions-Moleküle (Cadherine). Dabei handelt es sich um Membranproteine, die im Bereich der Kontaktstelle homotypisch mit Cadherinen der Nachbarzelle interagieren und über Catenine mit dem Zytoskelett verbunden sind ((286); siehe auch (26) als Übersichtsartikel zu Cadherinen/Cateninen). Unter Verwendung einer Cadherin-negativen Zelllinie konnte gezeigt werden, dass Cadherin-Expression eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung regelrechter Protrusionen und den effizienten Übergang von Zelle zu Zelle ist (233). Eine weitere zelluläre Funktion mit Bedeutung für die bakterielle Ausbreitung von Zelle zu Zelle wurde kürzlich identifiziert. So konnte gezeigt werden, dass der Phosphorylierungszustand leichter Myosinketten mit der Wanderungseffizienz der Bakterien korreliert. So wird die Infektion benachbarter Epithelzellen durch Inhibition der "myosin light chain kinase" (MLCK) stark herabgesetzt. Interessanterweise scheint dies ein Shigellen-spezifischer Mechanismus zu sein, da Listerien durch MLCK-Inhibition in dieser Funktion nicht beeinträchtigt werden (209). Da der Phosphorylierungszustand der leichten Myosinketten andererseits durch Rho-abhängige Inhibition der "myosin light chain phosphatase" erhöht werden kann (13; 125), ist es denkbar, dass die bakterielle Ausbreitung von Zelle zu Zelle in der Epithelzellschicht auch von dieser kleinen GTPase abhängt. Experimentelle Daten hierzu sind allerdings bisher nicht publiziert. Neben IcsA werden die pINV-kodierte Proteine IcsB, IpaB, IpaC sowie das Chaperone-Protein IpgC für die Ausbreitung der Infektion von Zelle zu Zelle und insbesondere für die Lyse der Doppelmembran, die das eindringende Bakterium in der neu infizierten Wirtszelle umgibt, benötigt (10; 191).

Anders als bei Makrophagen induzieren Shigellen in Epithelzellen keine Apoptose. Die Epithelzellen reagieren noch nicht einmal mit erhöhter Expression von Stressproteinen (152). Die Strategie der Shigellen gegenüber Epithelzellen deutet darauf hin, dass sich die Bakterien hier möglichst 'unauffällig' verhalten, um sich maximal lang – ggf. bis zum buchstäblichen 'Plätzen' der Zellen - im Zytoplasma dieser Wirtszellen replizieren zu können (52; 235). Die Infektion wird begrenzt durch den Afflux von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN), die eine hohe Phagozytose-Aktivität gegenüber

Shigellen zeigen. Interessanterweise sind Shigellen nicht in der Lage, das Phagosom in PMN zu lysieren. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der raschen Lyse des Shigellen-Phagosoms in Makrophagen und Epithelzellen und ist vermutlich eine Folge der Degradation bakterieller Virulenzfaktoren durch die neutrophile Elastase (309). Nach Ablösung der infizierten Epithelien vom Gewebeverband bzw. Freisetzung aus 'geplatzen' Epithelzellen kehren die Bakterien ins intestinale Lumen zurück und werden auf natürlichem Wege fäkal ausgeschieden, womit sich der Infektionszyklus schließt.

## **2 Die Epithelzellinvasion durch Shigella**

### **2.1 Epithelzellinvasion als zentrales Ereignis der Shigellose**

Für das Bakterium selbst wie für den Infektionsverlauf ist die Epithelzellinvasion von zentraler Bedeutung: Pathologisch-anatomisch wurde die Infektion von Epithelzellen schon früh als wesentlich für die Shigellose erkannt (92; 132; 275). Aus der Sicht des Bakteriums erfordert das enge Wirtsspektrum einen effizienten Infektionsmechanismus, der durch die geringe Infektionsdosis zum Ausdruck kommt. Da eine wesentliche Vermehrung der Shigellen außerhalb des Wirts nicht beschrieben ist, benötigt das Bakterium innerhalb seines Wirts einen Ort möglichst ungestörter Replikation zur Produktion der für die Übertragung der Erkrankung erforderlichen Zelldichte. Die Darmepithelzelle ist die Zielzelle der Shigelleninfektion, da sich das Bakterium im Zytoplasma von Epithelzellen für eine begrenzte Zeit in einer nährstoffreichen Umgebung weitgehend abgeschirmt von der Abwehr des Wirts vermehren kann (52; 235). In der Tat sind sämtliche Invasionsmutanten im Tierexperiment avirulent (161); auch wurden spontane Invasionsmutanten bei klinischen Primärisolaten bisher nicht beschrieben. Die Bedeutung der Epithelzellinfektion für die Shigellose selbst lässt sich daran ermessen, dass *icsA*-Mutanten im Tierexperiment nicht virulent sind und deshalb auch zur Herstellung von Lebendvakzinen verwendet werden (57; 129; 298). Da *icsA*-Mutanten sowohl in M-Zellen penetrieren als auch Apoptose in Makrophagen auslösen und Epithelzellen vom basolateralen Pol aus primär infizieren sollten, sind diese Mechanismen allein nicht ausreichend, eine relevante klinische Infektion zu induzieren. Dafür bedarf es offensichtlich der großflächigen Infektion von Enterozyten, zu der *icsA*-Mutanten nicht imstande sind.

### **2.2 Bakterielle Voraussetzungen der Invasion**

Alle pathogenen Shigellen-Stämme tragen ein 220 kb Virulenzplasmid (pINV), das für die bakterielle Virulenz essentiell ist und sich auch bei enteroinvasiven *E. coli* (EIEC) findet (230-232). Phylogenetisch werden zwei Formen von pINV unterschieden: A und B.

Shigellen des clusters 1 enthalten pINV A, cluster 3 besitzt pINV B, Shigellen des clusters 2 enthalten entweder pINV A oder pINV B und das Virulenzplasmid von *E. coli* Dysenteriae 1 ist eine separate Variante, die dem Typ A näher ist als dem Typ B (135). Diese Befunde deuten darauf hin, dass pINV von zwei verschiedenen donor-Bakterien stammt (135; 150). Die Fähigkeit, in Epithelzellen einzudringen, wird von einem 31 kb großen DNA-Fragment des 220 kb-Virulenzplasmids kodiert (156; 237). Dieses Fragment kodiert für folgende Gene: *ipgA-F*, *mxiA,C,D,E,G,H,I,J,K,L,M*, *spa15,47,13,32,33,24,9,29,40,icsB*, *ipaA-D*.

Die Ipa-Genprodukte sind neben LPS die wesentlichen Antigene, die in Immunoblots von Rekonvaleszenten-Seren erkannt werden (105; 185). Sie bilden die sog. Invasine, von denen IpaB-D essentiell sind für die Invasion (161), während IpaA eine Steigerung der Invasionseffizienz bewirkt (37; 283). Die Mxi- und Spa-Proteine konstituieren ein TypIII-Sekretionssystem, über welches die Invasine sezerniert werden (11; 32; 177; 194; 243). Mit Ausnahme von Spa15 sind deshalb alle bisher untersuchten Mxi-Spa-Proteine essentiell für die Epithelzellinvasion. Ipg-Proteine scheinen funktionell heterogen zu sein. IpgC erfüllt wichtige Helferfunktionen für die Synthese und die Stabilität von IpaB sowie für die kontrollierte Interaktion von IpaB und IpaC. Es ist somit ein bakterielles Chaperon, das für die Epithelzellinvasion essentiell ist (160). IpgB ist ebensowenig notwendig für die bakterielle Invasion wie IpgD und F (9); die Rolle von IpgA und E wurde bisher nicht untersucht. IcsB ist nicht mit der bakteriellen Invasion assoziiert, spielt aber eine wichtige Rolle bei der Lyse der Doppelmembran, von dem das Bakterium beim Übergang von Zelle zu Zelle umgeben ist (10).

Das Zusammenspiel der verschiedenen bakteriellen Faktoren bei der Epithelzellinvasion durch Shigella ist recht gut untersucht. Die Invasine werden bereits vor der Invasion von Epithelzellen synthetisiert. Dabei ist IpgC für die Synthese und Stabilität vor allem von IpaB wichtig. Es bindet sowohl an IpaB als auch an IpaC und verhindert so eine Komplexbildung von IpaB und IpaC im Zytoplasma des Bakteriums (160). Die Ipa-Proteine finden sich im nicht-induzierten Zustand praktisch vollständig im bakteriellen Zytoplasma; nur ein sehr geringer Anteil scheint mit der äußeren Membran assoziiert zu sein (15; 159; 160; 236). Lediglich in der stationären Phase können auch größere Mengen an Ipa-Proteinen auf der bakteriellen Oberfläche zu finden sein, wobei eine Reassoziaton nach Sekretion ins Medium nicht auszuschließen ist (303). Auf ein Signal hin, das die Nähe oder den Kontakt zur Zielzelle anzeigt, werden IpaB und IpaC über den Typ III-Sekretionsapparat sezerniert. Das Typ III-Sekretionssystem kann durch direkten Kontakt mit Wirtszellen induziert werden (159; 167; 303), aber auch durch extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronektin, Laminin oder Typ IV-Kollagen (303), durch Gallensalze

(199) sowie durch nicht-physiologische kleine amphipathische Moleküle wie Congo-Rot oder Evans-Blau (21). Dabei ist die Sekretion während der exponentiellen Wachstumsphase deutlich stärker ausgeprägt als in der stationären Phase (21; 167) und erfolgt bevorzugt im Bereich der Teilungsfurche (167).

Typ III-Sekretionssysteme zeichnen sich dadurch aus, dass das sezernierte Produkt zu keinem Zeitpunkt im Periplasma auftaucht. Der Sekretionsapparat verbindet also das bakterielle Zytoplasma direkt mit dem Extrazellulärraum und muss deshalb eine Art Kanal bilden vom Zytoplasma durch die innere Membran, das Periplasma, die Zellwand und die äußere Membran (115). Nach außen bilden Typ III-Sekretionsapparate nadelartige Strukturen, durch die die zu sezernierenden Moleküle an den Extrazellulärraum abgegeben werden (32). Der in der Zellwand verankerte Teil des Typ III-Sekretionssystems besteht im Wesentlichen aus den Mxi-Proteinen G, J, M und D, während die nach außen vorstehende nadelartige Struktur aus MxiH und I besteht (32; 33; 148; 243-245). Spa 33 und 32 interagieren mit dem Typ III-Sekretionssystem und sind ebenso wie die Strukturelemente für die Funktion des Systems essentiell (245; 276).

Man geht davon aus, dass während der Sekretion die intrazytoplasmatische Bindung von IpgC an IpaB bzw. IpaC durch die Bindung von IpaB an IpaC ersetzt wird. Diese beiden Proteine erscheinen im Extrazellulärraum als Teil eines Proteinkomplexes, der möglicherweise noch weitere Proteine enthält (160). Polystyren-Kügelchen, an die der IpaB und IpaC enthaltende Proteinkomplex gebunden ist, sind in der Lage, in Epithelzellen einzudringen und dort Zytoskelett-Veränderungen zu induzieren, die denen der Shigellen-Invasion ähnlich sind (158). *In vivo* scheint die Sekretion von Ipa-Proteinen eine wichtige Voraussetzung zu sein für die Invasion. So ist eine spa32-Mutante, die Ipa-Proteine zwar auf der Oberfläche akkumuliert, nicht aber sezerniert, nicht invasiv (303); andererseits führen sezernierte Ipa-Proteine zur Aufnahme nicht-invasiver Bakterien in Epithelzellen (277; 303). Möglicherweise sind die Ipa-beladenen Polystyren-Kügelchen nur deshalb invasiv, weil ein Teil der Ipa-Proteine während des Invasionsvorgangs abgelöst wird. Dafür spricht auch, dass während der Aufnahme von Ipa-beladenen Polystyren-Kügelchen IpaC in endosomalen Einschlüssen von den Kügelchen entfernt lokalisiert wurde (158).

Die Regulation der Sekretion der Ipa-Proteine erfolgt einerseits durch die oben beschriebenen Induktor-Moleküle, andererseits durch IpaB und IpaD, die eine nicht-induzierte Sekretion verhindern. Im nicht-induzierten Zustand werden sowohl IpaB wie auch IpaD benötigt, um das Sekretionssystem 'abdichten' (159). IpaB und IpaD bilden einen Proteinkomplex in den bakteriellen Membranen, nicht aber im Zytosol oder extrazellulär (159). Offenbar blockieren beide Proteine den Sekretionskanal, bis ein

Induktor den Komplex dissoziiert und damit den Kanal freilegt. Dafür würde auch sprechen, dass die nadelartige Sekretionsstruktur schon vor der Aktivierung des Sekretionsapparates vorhanden ist (32). Allerdings ist der genaue Mechanismus der Sekretionsblockade in Abwesenheit eines Induktors bisher nicht bekannt. IpaD wird zwar auch sezerniert, findet sich aber nicht in dem extrazellulären Ipa-Komplex mit IpaB und IpaC (160). Damit führt die Aktivierung des Typ III-Sekretionssystems zu einer Beendigung der Interaktion zwischen IpaB und IpaD in den bakteriellen Membranen, wobei der Sekretionskanal freigelegt wird; weiter kommt es zu einer Ablösung der intrazytoplasmatischen Protein-Protein-Bindungen zwischen IpaB bzw. IpaC und dem molekularen Chaperon IpgC durch die IpaB-IpaC-Bindung, die im Zuge der Sekretion dieser Proteine auftritt. Insgesamt sprechen die vorhandenen Daten für ein höchst effizientes Sekretionssystem, das insbesondere auf eine schnelle Reaktion auf externe Stimuli ausgelegt ist.

IpaH9.8, das zu einer Proteinfamilie mit 5 pINV-kodierten und 4 chromosomal kodierten Genen gehört, wird nach Induktion des Typ III-Sekretionssystems synthetisiert und nach den Invasinen - wahrscheinlich zusammen mit VirA - sezerniert (65; 282). Interessanterweise wird IpaH9.8 Mikrotubuli-abhängig in den Zellkern der Wirtszelle transloziert (282), während IpaH7.8, ein weiteres sezerniertes Protein der IpaH-Proteinfamilie, für die Lyse des Phagosoms von Bedeutung zu sein scheint (84).

### 2.2.1 Regulation der Expression der invasionsassoziierten Gene

Die Regulation der Expression sowohl der Invasine samt ihrer Hilfsmoleküle als auch des Typ III-Sekretionsapparates erfolgt auf verschiedenen Ebenen. Das gesamte 220 kb-Virulenzplasmid kann – vermutlich über *recA*-vermittelte homologe Rekombination - reversibel ins Chromosom integriert werden (319). Im integrierten Zustand ist die Expression der Invasine so stark reduziert, dass diese Bakterien avirulent werden. Im nicht-integrierten Zustand wird der virulente Phänotyp durch eine Kaskade verschiedener Aktivitäten reguliert. Dabei sind die wichtigsten Signalgeber Osmolarität, Temperatur, pH und Verdrillungszustand (Superhelizität) der DNA. Von besonderer pathogenetischer Bedeutung ist die Tatsache, dass die Expression des invasiven Phänotyps unterhalb von 37°C deutlich reduziert ist. Die Bakterien sind unterhalb von 30°C praktisch nicht mehr invasiv (112; 200; 281). Die Expression der Proteine des Sekretionsapparates sowie der Invasine wird direkt durch das Virulenzplasmid-kodierte Protein VirB gesteuert (8; 28; 280). VirB seinerseits wird durch VirF induziert, dem zentralen Schalter des Regulationssystems, der ebenfalls auf dem Virulenzplasmid liegt (8; 219; 220). Die Expression von VirB und VirF werden negativ reguliert durch VirR, einem Protein der H-NS-Familie von Histon-Proteinen (79; 112; 200). Dabei spielt die negative Regulation

durch H-NS insbesondere eine Rolle bei der Temperaturregulation. H-NS (VirR) inhibiert unter nicht-permissiven Bedingungen (z.B. bei 30°C) die Transkription von *virB* sowohl direkt wie auch indirekt über eine Transkriptioninhibition von *virF* (203); zusätzlich inhibiert H-NS die Transkription VirB-abhängiger Gene (27). Nach einer Temperaturerhöhung auf 37°C, wie sie bei der Infektion des Menschen auftritt, wird die Transkription von *virF* durch die chromosomal kodierten DNA-bindenden Proteine FIS und IHF aktiviert (80; 201). Eine zusätzliche Regulationsebene ist die Translation von *virF*-mRNA, da die volle Expression von VirF und damit der Invasine das Vorhandensein modifizierter tRNAs voraussetzt (73; 74). Auf der Basis dieser Erkenntnis wurde kürzlich der erste Inhibitor eines bakteriellen Virulenzfaktors aufgrund der Kristallstruktur durch rationales Medikamenten-Design dargestellt (100). Da zusätzlich der pH (173; 174) sowie der Verdrillungszustand der DNA (73) für die Expression von VirF eine Rolle spielen, ist VirF der zentrale Regulator der Expression des invasiven Phänotyps. Darüberhinaus greifen osmolaritätsabhängige Regulationsgene in die Expression des virulenten Phänotyps ein, wobei diese Gene allerdings mehr die Bewegung von Zelle zu Zelle als die primäre Epithelzellinvasion steuern (29; 31).

#### 2.2.2 Interaktionen der Shigellen-Invasine mit Wirtszellfaktoren

Beim Eindringen von Shigellen in Epithelzellen haben wir es also mit einer wechselseitigen Beeinflussung durch Mediatoren zu tun, die auch als 'crosstalk' bezeichnet wird (56). Nach der Sekretion von IpaB und IpaC und der Ausbildung eines extrazellulären Komplexes interagieren die Invasine mit der Wirtszellmembran. Shigellen sind in der Lage, Erythrozyten zu lysieren, vorausgesetzt, sie werden passiv durch Zentrifugation mit den Erythrozyten in Kontakt gebracht (51). Essentielle Voraussetzungen für das Phänomen der Kontakthämolyse sind ein intakter Typ III-Sekretionsapparat sowie die Expression von IpaB und IpaD, während IpaA und IpgD nicht mit dem Phänomen assoziiert sind (9; 12; 107; 161). IpaC ist zwar nicht essentiell für die Kontakthämolyse, eine *ipaC*-Mutante zeigt allerdings eine deutlich geringere Aktivität (25; 32). Kürzlich konnte durch Osmoprotektionsassays gezeigt werden, dass *Shigella* tatsächlich die Bildung von Poren in der Erythrozytenmembran induziert, deren innerer Durchmesser im Bereich von 26 Å liegt (32). Dabei fanden sich IpaB und in geringerem Maß IpaC in der Erythrozytenmembran integriert, während IpgD und IpaA leicht von der Erythrozytenmembran ablösbar waren und IpaD gar nicht mit der Membran assoziiert gefunden wurde (32). Zusammen mit der Beobachtung, dass die Kontakthämolyse weder durch Antikörper gegen Ipa-Proteine noch durch Proteinase K-Zusatz zum Medium inhibiert wurde (32) und IpaC auch mit artifiziellen Membranen interagieren kann (63), sprechen die Ergebnisse dafür, dass IpaB zusammen mit IpaC durch das Typ III-Sekretionssystem in die Erythrozytenmembran inseriert wird. IpaA und IpgD könnten dann

sekundär via IpaB oder IpaC an die zytoplasmatische Seite der Wirtszellmembran binden. IpaC induziert die CDC42- und rac-abhängige Bildung von Filopodien und Lamellipodien (284; 285). IpaA seinerseits aktiviert das Aktin-bindende Protein Vinkulin und induziert die Depolymerisation von F-Aktin (37; 283). Diese Aktivitäten erhöhen die Invasionseffizienz dadurch, dass die IpaC-abhängige Induktion zellulärer Protrusionen an der Kontaktstelle mit dem Bakterium verhindert wird. Das Bakterium kann somit nicht von diesen Zellausläufern zurückgestoßen werden. IpaB ist essentiell für die Lyse der Phagosomenmembran nach erfolgter Internalisation (107). Weiterhin induziert IpaB durch Aktivierung von Caspase-1 die Apoptose in Makrophagen und Lymphozyten (108; 279; 325). Kürzlich wurde ein weiterer Mechanismus der Shigella-vermittelten Induktion von Apoptose in Makrophagen beschreiben, bei dem Tripeptidyl-Peptidase II, ein in der Signalisationskaskade oberhalb von IL-1 $\beta$ -converting enzyme gelegenes Enzym, eine wichtige Rolle spielt (109); der bakterielle Auslöser dieses Mechanismus ist bisher nicht bekannt. IpgD, ein Homolog des von *Salmonella dublin* sezernierten Proteins SopB, besitzt eine Phosphatidylinositol Phosphatase-Aktivität (90; 184). Es ist im bakteriellen Zytoplasma an IpgE gebunden und bildet nach Sekretion einen Proteinkomplex mit IpaA (177). Die IpgD-Aktivität führt wahrscheinlich zu einer temporären Ablösung des Zytoskeletts von der Zellmembran und erleichtert dadurch die Ausbildung von zellulären Protrusionen, ist aber für die Invasion nicht essentiell (176; 177).

### **2.3 Wichtige Wirtszellfaktoren für die bakterielle Invasion**

#### **2.3.1 Zytoskelettveränderungen der Wirtszelle als essentielle Komponente des Internalisierungsprozesses**

Die morphologischen Veränderungen der Wirtszelle während des Internalisierungsprozesses mit der Ausbildung von Membran-Fältelungen, sogenannten 'membrane ruffles' (54), ließen schon früh an eine funktionelle Beteiligung des Zytoskeletts an der Aufnahme des Bakteriums denken. Ein weiterer Hinweis auf eine funktionelle Rolle des Zytoskeletts war die Beobachtung, dass die bakterielle Invasion durch Inhibition von Aktin-Polymerisation blockiert werden konnte (104). Für eine Zytoskelettbeteiligung sprachen weiterhin DNAase I/Aktin-Bindungsexperimente sowie die fluoreszenzmikroskopische Darstellung von F-Aktin (53). Ausgehend von diesen Beobachtungen studierten wir die Mikromorphologie des Internalisierungsprozesses am Modell der HeLa-Zell-Invasion.

##### *2.3.1.1 Die Architektur des Invasionskomplexes*

Wir wollten zunächst wissen, welche strukturellen Veränderungen des Zytoskeletts während des Internalisierungsvorgangs zu beobachten sind. Dazu führten wir elektronenmikroskopische Studien mit transmissions- und scanning-Techniken durch.

Dabei konnten wir zeigen, dass initial an der Invasionsstelle zelluläre Ausläufer gebildet werden, von denen jeweils 3 oder 4 zusammenstehen und eine Art Pfeiler bilden. Diese Pfeiler werden nachfolgend durch ein aufsteigendes Blatt Plasmamembran verbunden, während die den Pfeiler konstituierenden zellulären Ausläufer fusionieren. Die Komponenten dieser Pfeilerarchitektur sind auch noch bei der reifen, blütenartigen Struktur erkennbar, da die Membran meist nicht ganz bis zur Spitze der Pfeiler aufsteigt und auch die zellulären Fortsätze häufig nicht bis hin zur Spitze fusionieren (4). Die detaillierte Betrachtung der Lagebeziehungen zwischen Wirtszellmembran und Bakterium zeigte, dass die Zellmembran der bakteriellen Zirkumferenz nicht streng folgt, sondern dass die zellulären Protrusionen nur akzidentiellen Kontakt zum Bakterium haben. Diese Beobachtung wird noch dadurch ergänzt, dass das Bakterium Protrusionen induziert, die offensichtlich für den Internalisierungsvorgang nicht wesentlich sind. Damit ist die Shigellen-Invasion im HeLa-Zellmodell paradigmatisch für einen sogenannten *hit-and-run*-Mechanismus, der von alleine abläuft, wenn er einmal induziert ist. Dafür spricht auch, dass die Shigella-induzierten zellulären Ausläufer oft weit über das Bakterium hinausragen, teilweise gar keinen physischen Kontakt zum Bakterium haben und zudem noch persistieren können, nachdem das Bakterium längst internalisiert ist (4). Schließlich ist für diese Art von Internalisierungsmechanismus charakteristisch, dass auch nicht-invasive Bakterien internalisiert werden können, sobald der Mechanismus erst einmal induziert ist (277; 303). Dies im Gegensatz zu einem Internalisationsvorgang, bei dem eine Rezeptor-Ligand-Interaktion zwischen der Wirtszellmembran und der äußeren Bakterienmembran vorliegt, wie man es bei der durch das *Yersinia*-Invasin Inv vermittelten Epithelzellinvasion beobachten kann, die durch die Interaktion zwischen dem bakteriellen Inv-Protein und beta1-Integrinen der Epithelzellen charakterisiert ist (116; 117; 141; 246; 271). Zur näheren Analyse der Zytoskelettstruktur im Bereich der Invasionsstelle führten wir S1-myosin-Markierungen von F-Aktin durch. Damit lassen sich Aktinfilamente elektronenoptisch darstellen und bei hoher Auflösung auch hinsichtlich ihrer Polarität charakterisieren (126). Dabei fiel insbesondere auf, dass die zellulären Protrusionen im Bereich der Invasionsstelle angefüllt sind mit parallelen Aktinfilamenten mit positivem Pol in Richtung der Wirtszellmembran. Weiter fiel auf, dass es im Bereich der bakteriellen Invasion verschiedene Aktinnukleationsstellen gibt. Aus diesen entwickeln sich die zellulären Protrusionen, vorausgesetzt die Nukleationsstelle liegt nicht direkt unterhalb des Bakteriums. Im letzteren Fall entwickelt sich kein Zellausläufer, der ggf. das Bakterium zurückstoßen würde und insofern kontraproduktiv wäre, sondern eine Sprinkler-artige abortive Zytoskelettstruktur, die möglicherweise durch das Zusammenspiel von Faktoren entsteht, die eine Aktin-Polymerisation begünstigen, mit solchen Faktoren, die eine Inhibition von Aktin-Polymerisation bewirken (37; 283).

### 2.3.1.2 T-Plastin als Aktin-bündelndes Prinzip in Shigella-induzierten Zellausläufern

Die auffällige parallele Bündelung der Aktinfilamente in den Shigella-induzierten Zellausläufern motivierte uns, nach einem orientierungssensitiven Aktin-bündelndes Protein in den zellulären Protrusionen zu suchen. Ein solches fanden wir mit T-Plastin, einem Protein, das ubiquitär in humanen Zellen vorkommt, parallele F-Aktin-Filamente bündelt und für die Zytoskelett-Struktur von Mikrovilli von Bedeutung ist (18; 61; 82; 145). Wir konnten zunächst zeigen, dass T-Plastin stark in den Shigella-induzierten Protrusionen angereichert wird und dort mit F-Aktin kolokalisiert. Zur funktionellen Analyse des Moleküls brachten wir ein modifiziertes T-Plastin-Molekül in Epithelzellen zur Expression, bei dem eine von zwei Aktin-Bindungsstellen fehlte. Dieses Molekül sollte also durch die noch vorhandene Aktin-Bindungsstelle mit endogenem T-Plastin um die Aktin-Bindung kompetieren, aber nicht in der Lage sein, zwei F-Aktin-Filamente zu bündeln. Mit diesem Konstrukt transfizierte Zellen sind somit dominant negativ für die T-Plastin-Funktion. Indem wir zeigen konnten, dass diese für die T-Plastin-Funktion dominant negativen Epithelzellen teilweise resistent wurden gegen die Infektion mit Shigella, konnte eine funktionelle Rolle von T-Plastin für die Shigellen-Invasion nachgewiesen werden (4). Nachdem wir bereits gezeigt hatten, dass auch enteropathogene *E. coli* (EPEC) in der Lage sind, T-Plastin zu rekrutieren (4), wurde kürzlich auch eine funktionelle Rolle von T-Plastin für die *Salmonella*-Invasion nachgewiesen (323). Diese Befunde deuten darauf hin, dass T-Plastin möglicherweise über den Invasionsvorgang bei Shigellen hinaus von Bedeutung ist bei der zellulären Aufnahme pathogener *Enterobacteriaceae*.

### 2.3.1.3 Die Steuerung der Shigella-induzierten Zytoskelettveränderungen

Die Signalkaskaden, die von der induzierten Sekretion der bakteriellen Invasine zu den Zytoskelettveränderungen führen, sind bisher noch nicht verstanden. Zur Identifikation zellulärer Proteine, die funktionell mit der Ausbildung der Shigella-induzierten Veränderungen der Zellmorphologie assoziiert sind, gingen wir von der Zytoskelettarchitektur des Invasionskomplexes aus. Von besonderem Interesse waren die zellulären Protrusionen, die neben dem Bakterium aufsteigen, es umschließen und schließlich internalisieren. Die dabei beobachteten langen, in der Membran verankerten, Aktinfilamente erinnerten an fokale Adhäsionen (FA), wo Stress-Filamente zusammenlaufen und in der Zytoplasmamembran fixiert werden (58; 59). Da die Struktur der FA von der Funktion von Rho abhängt (213), untersuchten wir eine mögliche Regulation der Shigella-induzierten Zytoskelett-Rearrangements durch dieses Enzym.

#### 2.3.1.3.1 Kleine GTPasen der Rho-Familie als Regulatoren der Zytoskelett-Dynamik

In eukaryoten Zellen wurden mehr als 100 verschiedene kleine GTP-bindende Proteine

beschrieben. Sie unterteilen sich in mindestens 5 Superfamilien: Ras, Rho, Rab, Sar1/ARF und Ran und besitzen unterschiedliche Funktionen in der Zellphysiologie (s. **Tabelle 1**).

<b>Tabelle 1: Kleine G-Proteine bei Mammaliern (nach Ref. (272))</b>									
Ras-Familie		Rho-Familie		Rab-Familie			Sar1/Arf-Familie		Ran-Familie
Ha-Ras	Tc21	RhoA	Rac1	Rab1A	Rab9	Rab22	Arf1	Arl1	Ran
Ki-Ras	Rit	RhoB	Rac2	Rab1B	Rab10	Rab23	Arf2	Arl2	
N-Ras	Rad	RhoC	Rac3	Rab2	Rab11A	Rab24	Arf3	Arl3	
R-Ras	Kir/Gem	RhoD	Cdc42	Rab3A	Rab11B	Rab25	Arf4	Arl4	
M-Ras	Rheb	RhoE/ Rnd3/ Rho8	Rnd1/Rho6	Rab3B	Rab12	Rab26	Arf5	Arl5	
RalA	$\kappa$ B-Ras1	RhoG	Rnd2/Rho7	Rab3C	Rab13	Rab27A	Arf6	Arl6	
RalB	$\kappa$ B-Ras2	RhoH/ TTF	Tc10	Rab3D	Rab14	Rab27B	Sar1a	Arl7	
Rap1A				Rab4	Rab15	Rab28	Sar1b	Ard1	
Rap1B				Rab5A	Rab16	Rab29			
Rap2A				Rab5B	Rab17	Rab30			
Rap2B				Rab5C	Rab18	Rab31			
				Rab6	Rab19	Rab32			
				Rab7	Rab20	Rab33A			
				Rab8	Rab21	Rab33B			

Während Ras-Proteine die Expression von Genen steuern, Rab und Sar1/ARF-Proteine den Vesikeltransport kontrollieren und Ran-Proteine den nukleo-zytoplasmatischen Transport beeinflussen, sind Rho-Proteine wichtig für die Zytoskelett-Dynamik (272). Rho ist das namensgebende Protein der Familie der Rho-artigen GTPasen. Die wesentlichen Proteine dieser Gruppe sind CDC42 und Rac und Rho mit Molekulargewichten im Bereich von 20-24 kDa. Die GTPase-Aktivität dieser Proteine ist mit ihrem Aktivitätszustand assoziiert. Im GTP-gebundenen Zustand sind sie aktiv, im GDP-gebunden inaktiv.

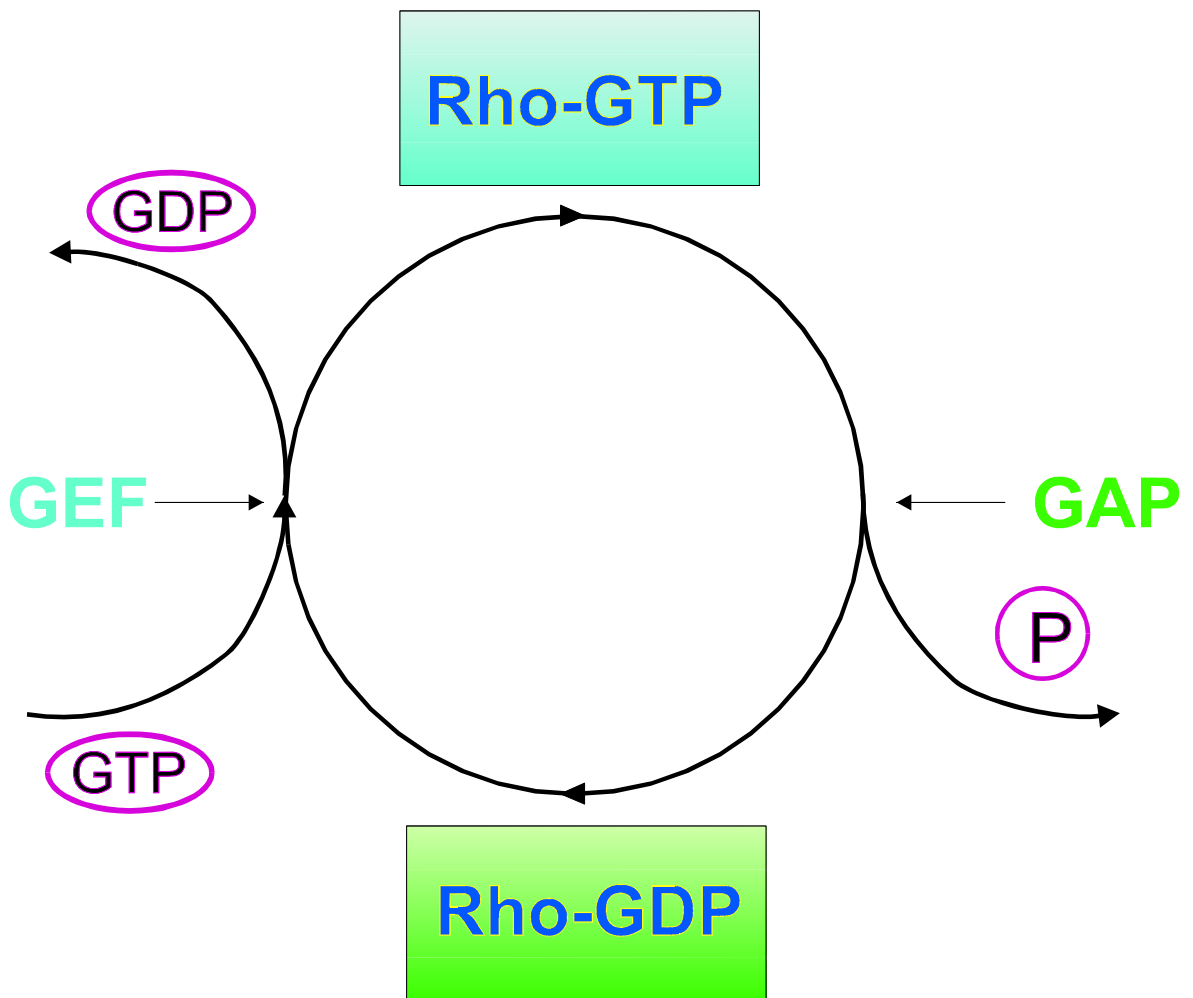


Abb. 3: Steuerung der Aktivität von Rho-Proteinen über den GTP/GDP-Bindungszustand

Die Steuerung der kleinen G-Proteine erfolgt über die Beeinflussung des GTPase-Zyklus (s. Abb. 3): Proteine, die die intrinsische GTPase von Rho aktivieren (*GTPase activating proteins* oder GAPs), führen die GTPasen in den GDP-gebundenen Zustand über und schalten die biologische Aktivität des G-Proteins dadurch ab. Demgegenüber führen Faktoren zu einer Aktivierung der kleinen G-Proteine, die den Austausch von GDP gegen GTP fördern – sogenannte *GTPase exchange factors* (GEFs). Die GTPase-Funktion selbst wird für die Ausübung der biologischen Funktion nicht benötigt; so sind auch solche GTPasen biologisch aktiv, die an ein modifiziertes Nukleotid gebunden haben, das von der GTPase nicht hydrolysiert werden kann. Rho-Proteine werden am prä-C-terminalen Zystein geranylgeranyliert und liegen im Zytoplasma an Rho-GDI gebunden vor. Über ihren lipophilen C-Terminus können Rho-Proteine an die Plasmamembran binden. So besteht ein labiles Gleichgewicht zwischen GDI- und Zytoplasmamembran-gebundenem Rho in der Zelle. Die verschiedenen Proteine der Rho-Familie besitzen unterschiedliche biologische Eigenschaften. So kontrolliert CDC42 die Polarität in Hefezellen sowie die Ausbildung fingerartiger Zellfortsätze, sog. Filopodien (119; 181); Rac reguliert die

Aktivität der NADPH-Oxidase in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen und induziert Membran-Falten nach Aktivierung durch Wachstumsfaktoren (1; 38; 127; 213); Rho ist essentiell für die Bildung von Stress-Filamenten und fokalen Adhäsionen in der Zelle (213). Weiter kann Rho Membran-Fältelungen in KB-Zellen induzieren, die Beweglichkeit von Zellkultur-Zellen beeinflussen und in Blutplättchen und 3T3-Zellen die Phosphatidylinositol 3-Kinase aktivieren (180; 273; 322). Schließlich beeinflusst Rho die Orientierung und Stabilität von Mikrotubuli (193) und spielt eine wesentliche Rolle für den Zellzyklus (310) sowie für die Größe von Zellen (257). Die Rho-vermittelte Bildung von Stress-Filamenten kann *in vitro* durch Lysophosphatidylsäure oder Bombesin induziert werden und ist mit der Aktivierung einer durch Genistein hemmbaren Tyrosinkinase assoziiert (131; 214). Die spezifische Inhibition von Rho durch das *Clostridium botulinum*-Toxin C3, einer ADP-Ribosylase, führt zur Depolymerisation von Aktin (46; 138; 195; 218).

#### 2.3.1.3.2 Funktionelle Rolle von Rho für die Shigellen-Invasion

Die morphologische Ähnlichkeit fokaler Adhäsionen zur Zytoskelettarchitektur der von Shigellen induzierten zellulären Ausläufer veranlasste uns, die Rolle von Rho für die Shigelleninvasion von Epithelzellen zu untersuchen. Dazu bedienten wir uns eines Hybridmoleküls, das die Rho-inhibierende Eigenschaft von C3 mit der Internalisierungsfunktion des Diphtherietoxins kombiniert (19; 95; 289). Mit Hilfe dieses Konstrukts konnten wir zeigen, dass die Shigella-induzierten Zytoskelettarrangements Rho-abhängig sind. Nach spezifischer Hemmung von Rho kommt es lediglich zu einer geringgradigen Akkumulation von F-Aktin um das Bakterium herum. Die für die Invasion essentiellen zellulären Membranausstülpungen werden nicht beobachtet (5). C3-behandelte Zellen waren gegen eine Shigelleninfektion resistent. In EM-Studien konnten wir zeigen, dass die peribakteriellen Zellausläufer in C3-behandelten Zellen zwar im Ansatz noch vorhanden sind, die langen, parallel angeordneten, Aktinfilamente aber fehlen. Damit war gezeigt, dass die Ausbildung der in den Shigella-induzierten Protrusionen beschriebenen langen Aktinfilamente Rho-abhängig ist und die Polymerisation langer Aktinfilamente eine Voraussetzung der Entstehung Shigella-induzierter Zellausläufer darstellt. Die Bedeutung von Rho für die Shigelleninvasion wurde später von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt ((302); s. auch (2)).

#### 2.3.1.3.3 Differentielle Rekrutierung von Rho-Isoformen während der Shigellen-Invasion

Nachdem die funktionelle Rolle von Rho für die bakterielle Invasion gezeigt war, wollten wir wissen, ob Rho auch in den Invasionskomplex rekrutiert wird. Dazu untersuchten wir das Rekrutierungsverhalten verschiedener Rho-Isoformen während der Shigelleninvasion. Wir verwendeten Rho-Konstrukte, an deren N-Terminus ein Peptid fusioniert war, das von

einem monoklonalen Antikörper spezifisch erkannt wurde ("Peptid-tag" oder "tag"). Durch Kotransfektion verschieden 'markierter' (ge-'tag'-ter) Konstrukte kam das Rekrutierungsverhalten mehrerer Rho-Isoformen in derselben infizierten Zelle zur Darstellung. Dabei zeigten unsere Studien, dass Rho tatsächlich im Invasionskomplex akkumuliert; allerdings wurden die Isoformen unterschiedlich rekrutiert: Während RhoA peribakteriell akkumulierte, fanden sich RhoB und RhoC in den von Shigella induzierten Zellausläufern (5). Die unterschiedlichen Rekrutierungsmuster der Rho-Isoformen in unserem System legen unterschiedliche Funktionen dieser Proteine nahe. Zum damaligen Zeitpunkt waren keine Funktionsunterschiede von Rho-Isoformen beschrieben, weshalb biochemische Studien fast ausschließlich mit RhoA durchgeführt worden waren. Erst kürzlich konnte mit einem molekularbiologischen Ansatz gezeigt werden, dass RhoC im Gegensatz zu RhoA eine wichtige Rolle bei der Metastasierung von Melanomen spielt (50). Außerdem ist RhoC ein Onkogen für humane Epithelzellen der Mamma, dessen Überexpression zur Induktion angiogener Faktoren führt und eine Rolle bei der Pathogenese des inflammatorischen Brustkrebses spielen könnte (292; 293). Schließlich wird in Metastasen des Adenokarzinoms des Pankreas RhoC, nicht aber RhoA, stark überexprimiert im Vergleich zum Primärtumor (264). Diese Ergebnisse weisen auf eine besondere Rolle von RhoC für die Metastasierungs Kapazität verschiedener Karzinome hin. Aufgrund der ausgeprägten Sequenzhomologie der beiden Isoformen RhoA und RhoC ist es wahrscheinlich, dass die von uns beschriebenen Rekrutierungsunterschiede von großer Bedeutung für diese Eigenschaften von RhoC sind.

#### **2.3.1.3.3.1 Proteinlokalisierung in eukaryoten Zellen**

Mit Ausnahme einiger weniger (ca. 10) mitochondrialer Proteine werden sämtliche zellulären Proteine im Zytoplasma synthetisiert. Zytoplasmatische Proteine bleiben entweder frei verteilt im Zytosol oder werden Teil eines makromolekularen, mehr oder weniger dynamischen Proteinkomplexes (z.B.: Zytoskelett), während sämtliche anderen Proteine je nach Zielorganell an ihren bestimmungsgemäßen Ort transportiert werden. Die Information für den eigentlichen Bestimmungsort liegt als N-terminale Aminosäuresequenz – 'leader-Sequenz' – vor, mit der die jeweiligen Translokations-Apparate interagieren. Als Destinationen kommen in Frage: intrazelluläre membranhaltige Strukturen (z.B.: Zellkern, Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Mitochondrien, Endosomen, Lysosomen), Zytoplasmamembran und Extrazellulärraum. Dabei ist grundsätzlich zu unterscheiden zwischen solchen Proteinen, die ihr Zielkompartiment direkt erreichen (post-translationaler Transfer: im Zytoplasma synthetisierte mitochondriale Proteine, Kernproteine) und Proteinen, die ihren Bestimmungsort über ein System miteinander über Vesikel kommunizierender Kompartimente erreichen (alle

anderen nicht-zytoplasmatischen Proteine). Letztere werden bereits während der Proteinsynthese ins Endoplasmatische Retikulum (ER) importiert (co-translatationaler Transfer) und von dort weiterverteilt. Die leader-Sequenzen sind in der Regel sowohl notwendig als auch hinreichend für den Transportvorgang. So können mit entsprechenden leader-Sequenzen versehene zytoplasmatische Proteine beispielsweise zur Sekretion gebracht werden. Der Proteinimport ins ER erfolgt über mehrere Zwischenschritte. Zunächst bindet die leader-Sequenz des naszierenden Polypeptids an Signalerkennungspartikel (SRP, signal recognition particle), worauf die Proteinsynthese zunächst sistiert. SRP sind Ribonukleoproteinkomplexe, die aus jeweils 6 Proteinen und einer strukturbildenden 7S RNA bestehen. Der SRP bindet daraufhin an ER-ständigen SRP-Rezeptor. Die leader-Sequenz wird dann vom SRP freigesetzt und kann in die ER-Membran inserieren, während das Ribosom selbst an die ER-Membran bindet (sog. 'raues ER') und SRP wieder von SRP-Rezeptor dissoziiert. Die Proteinsynthese wird nun fortgesetzt, wobei die Polypeptidkette über einen Kanal ins ER geleitet wird. Auf der lumenalen Seite dieses Kanals wird die leader-Sequenz ganz oder teilweise abgespalten und das Protein - z. T. mit Hilfe von Chaperone-Proteinen - korrekt gefaltet. Die Faltung ist wichtig für den weiteren Transport, da nicht korrekt gefaltete Proteine nach Rücktransport ins Zytosol wieder abgebaut werden. Eine weitere wichtige Funktion des ER für den Proteintransport ist die Glykosylierung.

#### **2.3.1.3.3.1.1 Kleine G-Proteine als Regulatoren der Kompartimentalisierung von Molekülen und Membranen**

Die Charakterisierung einer Adressierungsdomäne von RhoA und RhoC mit unserem Infektionsmodell könnte auf eine bisher nicht verstandene Funktion von Rho für den intrazellulären Transport von Molekülen zu spezifischen Zytoplasmamembrandomänen hindeuten. Durch diese neue, isoformspezifische Eigenschaft von Rho können Abschnitte der Zytoplasmamembran Rho-vermittelt angesteuert werden. Damit könnten Rho-Proteine für die Steuerung von Membran-assoziierten Aktivitäten eine wichtige Rolle spielen.

Eine funktionelle Rolle für den intrazellulären Transport von Molekülen und Vesikeln ist für verschiedene Ras-artige kleine G-Proteine beschrieben. Insbesondere Ran und Rab-Proteine sind hierzu gut untersucht. Während Ran-Proteine (**R**as-related **n**uclear protein) wichtig sind für den Proteinaustausch zwischen dem Kern und dem Zytoplasma, spielen Rab-Proteine (**R**as genes from rat **b**rain) eine wichtige Rolle sowohl für den exozytischen wie den endozytischen Transport von Proteinen und Membranen.

Der Molekülverkehr zwischen Kern und Zytoplasma wird in Abhängigkeit von der Größe des Moleküls unterschiedlich geregelt. Während kleine Moleküle bis ca 50 kDa frei durch Kernmembranporen diffundieren können, wird der Transport größerer Moleküle aktiv

gesteuert. Neben Transportrezeptoren (Importine und Exportine) und Adaptermolekülen kommt hier dem kleinen G-Protein Ran und seinen Bindungspartnern eine besondere Bedeutung zu. Transportrezeptoren erkennen Transportsignalsstrukturen und binden das zu transportierende Molekül entweder direkt oder über Adapter, um es anschließend durch Kernmembranporen zu schleusen. Transportsignalsstrukturen sind entweder NLS (**nuclear localization signal**) für den Transport vom Zytoplasma in den Zellkern oder NES (**nuclear export signal**) für die entgegengesetzte Richtung. Dabei hat Ran unterschiedliche Funktionen für den Import und den Export. Eine wesentliche Funktion besteht in der Rolle eines Transportvermittlers, indem es in GTP-gebundenem Zustand im Kern zusammen mit der `Fracht` und einem exportin einen Komplex bildet, der nach dem Transport ins Zytoplasma wieder dissoziiert. Letzteres ist Folge der Aktivierung der intrinsischen GTPase-Aktivität von Ran durch ein Ran-GAP, durch die Ran in den GDP-gebundenen Zustand übergeführt wird. Dabei kommt Ran-GAP praktisch ausschließlich im Zytoplasma, Ran-GEF aber nur im Kern vor. Dadurch liegt im Zellkern überwiegend GTP-Ran, im Zytoplasma überwiegend GDP-Ran vor. Der Rücktransport von GDP-Ran in den Kern erfolgt als Proteinkomplex mit NTF2 (**nuclear transport factor 2**) (212). Der Rücktransport von NTF2 erfolgt als Homodimer über `erleichterte Diffusion` mit Transferraten von >1000 Molekülen pro Kernpore und Sekunde (211). Während GTP-Ran durch Konformationsänderung am Exportin die Bindung an nukleozytoplasmatische `Fracht` begünstigt, bewirkt GTP-Ran bei in den Kern importierten Proteinkomplexen (Importin plus `Fracht`) eine Dissoziation dieser Komplexe im Zellkern und anschließend den Export des Importins aus dem Kern als Importin-Ran-Komplex. Insofern ist jeder aktive Molekültransport zwischen Zytoplasma und Zellkern unabhängig von der Richtung mit einem nukleozytoplasmatischen Transport von GTP-Ran verbunden. Interessanterweise ist Ran aber auch involviert in die Tubulus-Nukleation während der M-Phase des Zellzyklus (311; 312), einer Funktion, die wesentlich ist für den Aufbau der Teilungsspindel. In dieser Phase der Zellteilung ist die Kernmembran aufgelöst, sodass keine Kerntransportfunktionen wahrzunehmen sind.

Während Ran essentiell ist für die meisten Transportprozesse zwischen Zytoplasma und Zellkern, steuern Rab-Proteine wesentliche Vorgänge im Zusammenhang mit dem Transport von Proteinen und Membranen in verschiedene Zellkompartimente, einschließlich der Exozytose und Endozytose. Bisher wurden beim Menschen 60 Rab-Proteine beschrieben (197). Damit stellen Rab-Proteine die größte Familie Ras-artiger Proteine beim Menschen, deren Funktionen sich auf praktisch sämtliche Schritte des exozytischen (vom ER zur Zytoplasmamembran) wie auch des endozytischen Vesikel-Transports (von der Zytoplasmamembran zum Trans-Golgi-Netzwerk bzw. zu Vakuolen/Lysosomen) verteilen (s. Review zu diesem Komplex: (321)). Eine wesentliche

Funktion von Rab-Proteinen besteht in der spezifischen Fusion von Membranen. Dabei fungieren Rab-Proteine als Membranmarker, die die Spezifität des Fusionsvorgangs gewährleisten. So steuert etwa Rab5 die Fusion von frühen Endosomen dadurch, dass das kleine G-Protein sowohl auf der Donor- wie auch auf der Akzeptor-Membran vorhanden sein muss. Die Membranfusion selbst wird dann durch Bindung von Rab5 an EEA1 (early endosome antigen 1) bewirkt, wobei EEA1 wahrscheinlich eine Brücke bildet zwischen Rab5-Molekülen der beiden Membranen (24; 48; 99). Rab-GTPasen sorgen aber nicht nur für die Spezifität von Membranfusionen, sondern auch für den gerichteten Vesikeltransport. So steuert Rab5 die Bindung von frühen Endosomen an Mikrotubuli sowie deren Bewegung entlang dieser Mikrofilamente (75; 179). Die Verteilung von Rab in der Membran scheint eine wichtige Rolle zu spielen für die Funktion dieser Proteine. Rab wird in Membrandomänen angereichert, die nicht identisch sind mit sog. 'lipid rafts' - Membran-'Inseln', in denen neben verschiedenen Proteinen insbesondere Sphingolipide und Cholesterol angereichert sind (62; 170; 252; 256). Rab-Domänen sind charakterisiert durch das Zusammenspiel der GTPase mit Phospholipiden. So sind Phosphatidylinositol-3-Kinasen unterschiedlicher Substratspezifität Effektoren von Rab5 (49). Damit steuert Rab5 sowohl räumlich (Membrandomäne) als auch zeitlich (nur in aktiviertem Zustand) die Phospholipidzusammensetzung der Membranen, die diese GTPase gebunden haben. Ob für die Stabilisierung der Membrandomäne Funktionen des Zytoskeletts benötigt werden, ist derzeit nicht bekannt. Man geht davon aus, dass andere Rab-Proteine in anderen Membrandomänen akkumulieren und dass die komplexen Interaktionen zwischen verschiedenen Rab-Domänen durch Effektoren von Rab vermittelt werden, die auch eine Verbindung des Rab-Steuerungssystems mit der für Membranfusionen wichtigen Gruppe der SNARE Proteine (**s**oluble **N**SF **a**ttachment **p**rotein **r**eceptor; NSF: **N**-ethyl-maleimide-**s**ensitive fusion protein) herstellen (178).

Stellt man unsere Daten zu einem isoformspezifischen Rekrutierungsmotiv (s. 3.1) in den größeren Kontext von Transport- und Sortierfunktionen kleiner G-Proteine, liegt die Vermutung nahe, dass auch Rho-Proteine in isoformtypischen Membrandomänen konzentriert sind, wobei diese im Fall von Rho auf der Zytoplasmamembran liegen. Möglicherweise lassen sich die wesentlichen Funktionen von Rho vor diesem Hintergrund als dynamische lokale Beeinflussung der Membraneigenschaften verstehen, wobei externe Stimuli gezielt und lokal begrenzt an Regulatoren der Zytoskelettdynamik übertragen werden. Die Spezifität dieser Vorgänge könnte durch die Isoformspezifität von RhoGEFs und/oder von Rho-Effektoren bestimmt sein.

#### 2.3.1.3.4 Ein Klasse IX-Myosin als Rho-Antagonist mit Myosin-Funktion

Nach unserer Analyse der Ultrastruktur mussten die Shigella-induzierten

Zytoskelettarrangements das Resultat einer sehr feinen Steuerung sein. Wir interessierten uns daher auch für die Gegenregulation der Rho-Aktivierung. Eine überschießende Aktin-Polymerisation sollte aus mehreren Gründen für das eindringende Bakterium nachteilig sein. Zum einen würden zelluläre Protrusionen direkt unter dem Bakterium den Mikroorganismus von der Zelle wegstoßen. Zum anderen sollte aber auch die Aktin-Polymerisation im Bereich der neben dem Bakterium entstehenden Zellfortsätze limitiert werden, damit die Protrusionen über dem Bakterium fusionieren können. Außerdem sollte nach erfolgreicher Invasion noch ausreichend G-Aktin zur Verfügung stehen, damit nach Lyse der Phagosomenmembran eine intrazelluläre Bewegung möglich ist, die ebenfalls von Aktin-Polymerisation abhängt. Wir studierten deshalb Myr5, ein Klasse IX-Myosin, bezüglich einer potentiellen Rolle für die bakterielle Invasion. Myr5 besitzt eine im Vergleich zum klassischen Myosin II leicht modifizierte Myosin-Kopfdomäne mit einer N-terminalen Extension und einer Insertion in der zweiten flexiblen Windung; weiter besitzt das Molekül 4 IQ-Motive (20; 47) zur Bindung von leichten Ketten des Myosins sowie im Schwanzbereich eine C6H2-Domäne zur koordinativen Bindung von zwei Zink-Ionen (68; 166); schließlich enthält das Molekül ein GAP-Motiv, mit dem kleine G-Proteine der Rho-Familie durch Überführung in den inaktiven, GDP-gebundenen Zustand antagonisiert werden können (210). Dabei ist die GAP-Aktivität für RhoA etwa 100 mal höher als für CDC42 und etwa 1000 mal höher im Vergleich Rac1 (171). Diese Eigenschaften machten Myr5 zu einem interessanten Kandidatenprotein für den Rho-Antagonismus. Nachdem unsere Studien unterschiedliche Funktionen der Rho-Isoformen aufgrund ihrer differentiellen Lokalisation nahegelegt hatten (5), studierten wir zunächst die *in vitro*-Aktivität des Myr5-GAP-Moduls bezüglich verschiedener Rho-Isoformen, wobei wir keine signifikanten Unterschiede zwischen den Substraten RhoA, RhoB oder RhoC fanden (101). So scheint das GAP-Modul dieses Myosins für alle Rho-Isoformen, nicht aber für eine der Rho-Isoformen spezifisch zu sein. Eine *in vivo*-Interaktion zweier Proteine setzt eine zumindest zeitweise Kolo-kalisation voraus. Wir untersuchten daher das Rekrutierungsverhalten von Myr5 während der bakteriellen Invasion. Dabei zeigte sich, dass Myr5 zwar mit RhoC, nicht aber mit RhoA kolo-kalisiert. Dieses Ergebnis ist von besonderer Bedeutung, da es zumindest in unserem System eine *in vivo*-Interaktion von Myr5 mit RhoA unwahrscheinlich macht, obwohl sie biochemisch *in vitro* möglich ist. Dieser Befund unterstreicht also die besondere Bedeutung von Relokalisationsvorgängen in der Zelle, die erst die Voraussetzung für eine spezifische Interaktion von Proteinen schaffen. Demnach kommt in unserem System der Shigelleninvasion von Epithelzellen ein Klasse IX-Myosin zwar als Antagonist von RhoC, nicht aber von RhoA in Betracht. Damit kann das Klasse IX-Myosin die Rho-Aktivität in den peribakteriellen Zellausläufern antagonisieren. Myr5 scheidet hingegen als Rho-Antagonist unterhalb des Bakteriums

aus, da RhoA, nicht aber RhoC unterhalb des eindringenden Bakteriums akkumuliert. In der Tat konnte ein anderer Mechanismus zur Verhinderung zellulärer Protrusionen unterhalb des eindringenden Bakteriums beschrieben werden, der über eine Bindung des sezernierten bakteriellen Proteins IpaA an das zelluläre Aktin-bindende Protein Vinkulin zu einer Inhibition der Aktinpolymerisation führt (37)(s. Abb. 4).

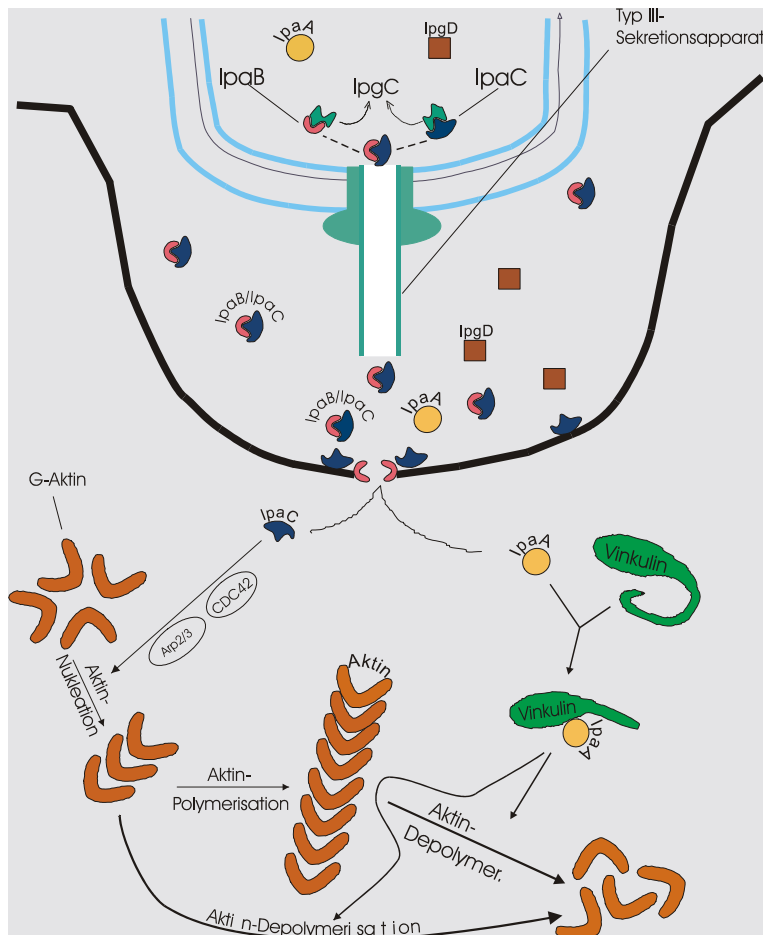


Abb. 4: Inhibition der Ausbildung zellulärer Protrusionen unterhalb des in die Zelle eindringenden Bakteriums

Interessanterweise führt die Überexpression einer GAP-Mutante von Myr5 zu einer Erhöhung der Invasion (101). Damit ist auch die funktionelle Bedeutung der Myosin-Kopffunktion für die Shigellen-Invasion gezeigt und erlaubt diesem Molekül eine Doppelrolle während der bakteriellen Internalisation: zum einen durch initiale Stabilisierung der Zytoskelettstrukturen über die Myosinkopffunktion, zum anderen über eine Limitierung der zellulären Protrusionen durch Antagonisierung von RhoC. Interessanterweise konnten wir auch zeigen, dass CDC42 und Rac einen RhoA-ähnlichen Rekrutierungstyp aufweisen (101). So sind auch diese Proteine von einer Interaktion mit Myr5 unabhängig.

#### 2.3.1.3.5 Rolle weiterer GTPasen der Rho-Familie für initiale Zytoskelettveränderungen

Nachdem gezeigt worden war, dass Rho für die bakterielle Invasion essentiell ist und die Signalisationswege dieser GTPasen miteinander interferieren, lag es nahe, auch die Rolle anderer Proteine der Rho-Familie für den Invasionsprozess zu untersuchen. So konnte gezeigt werden, dass insbesondere die initiale Ausbildung fingerförmiger Membranausstülpungen (Filopodien) CDC42-abhängig ist, während Rac für die Membranverbindungen zwischen den Filopodien von Bedeutung ist (168; 284). Dabei scheint CDC42 durch eine C-terminale Domäne des bakteriellen Invasins IpaC aktiviert zu werden (284). Dies ist konsistent mit dem von uns festgestellten RhoA-artigen Rekrutierungstyp von CDC42 und Rac (101), denn dieser Rekrutierungstyp ist bereits sehr früh während des Invasionsvorgangs zu beobachten.

#### 2.3.1.3.6 Aktin-bindende Proteine im initialen Invasionskomplex

Neben den kleinen GTPasen der Rho-Familie RhoA, CDC42 und Rac wird eine ganze Reihe von Zytoskelett-Proteinen im initialen Invasionskomplex gefunden. Dazu gehören Alpha-actinin (283), Talin (301; 302), Vinkulin (37; 283; 301; 302) und Cortactin (64). Die meisten dieser Proteine kommen auch in fokalen Adhäsionen vor. Das am besten untersuchte Protein ist Vinkulin. Die Aktivierung dieses Proteins führt zur Demaskierung von Bindungsstellen für Alpha-actinin und Talin (260), wohingegen die Bindung von Paxillin nicht über diesen Mechanismus erfolgt (96). Vinkulin wird IpaA-abhängig an die bakterielle Invasionsstelle rekrutiert (283) und bildet mit IpaA einen Proteinkomplex, der zur Aktindepolymerisation unterhalb des eindringenden Bakteriums führt (37). Diese Vorgänge führen zur Ausbildung einer tassenartigen Struktur, die initial das Bakterium wie eine geöffnete Hand teilweise umgibt und möglicherweise für die Vermittlung des Kontaktes zwischen Bakterium und Zelle eine Rolle spielt.

#### 2.3.1.3.7 Zelluläre Proteine mit Bedeutung für die reife, blütenartige Invasionsstruktur

Wenn sich in einem zweiten Schritt lange Zellausläufer ausbilden, bekommt die mechanische Stabilität der Zytoskelettstruktur zunehmende Bedeutung. In dieser Phase dürften die Bündelung und Stabilisierung von F-Aktin durch T-Plastin und RhoC wichtig werden (4; 5; 302). Bisher kann nur spekuliert werden, welche Proteine für den so wichtigen Übergang von der tassenartigen Struktur in die reife Blütenstruktur wichtig ist. Mit seinen Bindungsstellen für die "focal adhesion kinase (FAK)", Aktin, Vinkulin, beta1-Integrine und Layilin könnte Talin eine Mittlerfunktion zukommen, indem es Signale von verschiedenen Transmembranmolekülen wie den beta1-Integrinen und dem C-Typ-Lektin Layilin zusammenführt und an das Zytoskelett weiterleitet (36; 43; 96; 198). Zwar wird Talin in den Shigella-induzierten Invasionskomplex rekrutiert (301; 302); allerdings ist eine mögliche funktionelle Rolle dieses Proteins für den Invasionsvorgang bisher nicht

untersucht.

### 2.3.2 Invasionsassoziierte Signalisationsvorgänge

Während die für die Epithelzellinvasion notwendigen bakteriellen Faktoren gut untersucht und auch die Zytoskelettarrangements, die zur bakteriellen Internalisation führen, recht gut beschrieben sind, ist die genaue Abfolge der Signale, die letztlich zur Aufnahme des Bakteriums in die Wirtszelle führen, bisher nur bruchstückhaft bekannt (s. Abb. 5).

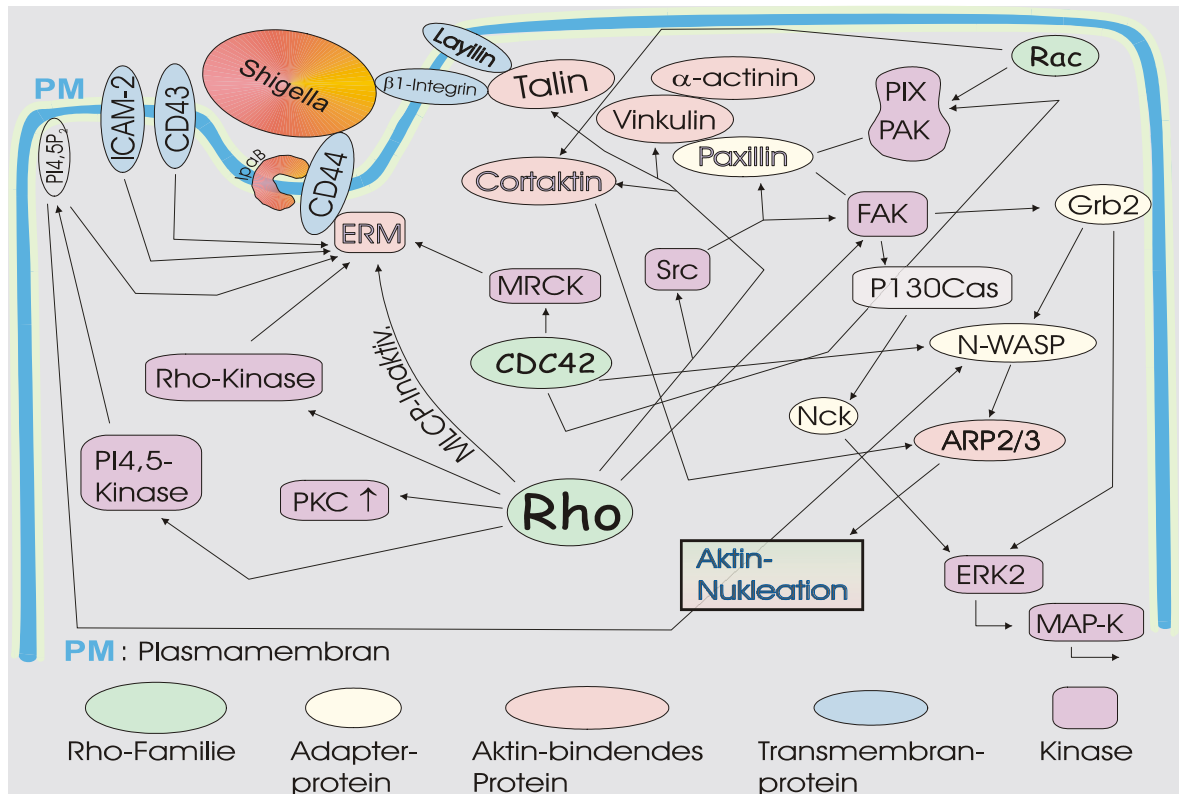


Abb. 5: Shigella-induzierte Signalisationsvorgänge in humanen Zellen

Nach Induktion des bakteriellen Typ III-Sekretionsapparates durch Kontakt mit Fibronectin oder einem anderen Faktor können die Bakterien an beta1-Integrine und/oder über den Hyaluronan-Rezeptor CD44 der Wirtszelle binden (133; 253; 303). CD44 akkumuliert in temporären Mikrodomänen der Zytoplasmamembran mit charakteristischer Lipidzusammensetzung ('lipid rafts', (252)) und ist mit dem Zytoskelett verbunden über ERM (Ezrin-Radixin-Moesin)-Proteine, die zur Aktivierung aufgefaltet werden (91), wobei dem ERM-Protein Ezrin eine funktionelle Rolle im Invasionsprozess zukommt (254). ERM-Proteine können durch die CDC42-bindende Kinase MRCK (172), einem Effektor von CDC42 (144), an einem C-terminalen Threonin phosphoryliert werden. Phosphorylierte ERM-Proteine wiederum akkumulieren in den Spitzen von CDC42-induzierten Filopodien (172). Außerdem hat die Rho-abhängige Phosphorylierung von ERM-Proteinen einen morphogenetischen Effekt für die Ausbildung von Mikrovilli (189). Allerdings ist bisher nicht bekannt, ob etwa die Phosphorylierung von Moesin via Rho-

kinase erfolgt (189) oder nach Rho-induzierter, aber Rho-kinase unabhängiger, Aktivierung der Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase über Phosphatidylinositol 4,5-Biphosphat (PIP2) (155). ERM-Proteine können Signale von einer ganzen Reihe von Transmembranproteinen, CD43, CD44 und ICAM-2, an das Zytoskelett weiterreichen (318).

Auch die Tyrosin-phosphorylierten Proteine Cortactin und Paxillin werden nach Phosphorylierung durch die Tyrosin-Kinase Src in den bakteriellen Invasionskomplex rekrutiert (64; 302). Cortactin ist ein Aktin-bindendes Protein, das in 3 Isoformen vorkommt. Dabei ist CortactinA ein Aktin-vernetzendes Protein (188). Die Tyrosin-Phosphorylierung durch Src verringert die Vernetzungsaktivität von Cortactin, was möglicherweise Src-vermittelte Zytoskelettarrangements begünstigt (113; 114). Cortactin kann auch mit dem Arp2/3-Komplex direkt interagieren und somit Aktinnukleation induzieren (307), wobei zumindest in einem experimentellen System die Rekrutierung von Cortactin Rac-abhängig ist (306). Ob dies auch für die Shigellen-Invasion zutrifft, ist allerdings bisher nicht bekannt. Interessanterweise kann die Src-vermittelte Phosphorylierung von Cortactin durch Interferon-alpha inhibiert werden, was in einer reduzierten Invasionseffizienz resultiert (70). Paxillin ist ein Adaptor-Molekül, das in fokalen Adhäsionen gefunden wird, und Substrat von Src. Die Rekrutierung von Paxillin in fokale Adhäsionen ist ARF-1-abhängig und geht mit einer zusätzlichen Serin/Threonin-Phosphorylierung einher (39; 40; 183). Mit seinen Bindungsstellen für FAK und Vinkulin (288) kann Paxillin Proteinphosphorylierungskaskaden mit Zytoskelettveränderungen verbinden. Außerdem bindet Paxillin einen Proteinkomplex, der auch PAK und PIX enthält (287), wodurch Paxillin auch eine Verbindung zu CDC42- und Rac-abhängigen Signalen herstellen könnte (s. Übersicht in (35)). Interessanterweise kann Paxillin nach Stimulierung von Makrophagen mit LPS Tyrosin-phosphoryliert und in Membran-Fältelungen rekrutiert werden (313); allerdings ist bisher nicht untersucht, ob Paxillin eine funktionelle Rolle bei der Epithelzellinvasion durch Shigella zukommt. FAK ist eine Tyrosinkinase mit einer zentralen katalytischen Region zwischen großen N- und C-terminalen regulatorischen Domänen (238). FAK kann in zwei Schritten aktiviert werden: Der initialen Autophosphorylierung an einem Tyrosin folgt die Phosphorylierung dreier weiterer Tyrosine durch Src (42; 239). Die dadurch entstehenden SH2-Bindungsstellen begünstigen die Interaktion von FAK mit Src und dem SH2-SH3 Adaptor-Protein Grb2, womit eine Verbindung zur ERK2-Signalisationskaskade hergestellt wird (241; 242). Eine zweite, Grb2-unabhängige Verbindung zwischen FAK und ERK2-Signalisation besteht über die Phosphorylierung von p130Cas und die Aktivierung von Nck (240). Außerdem verbindet Grb2 möglicherweise Phosphorylierungskaskaden mit der Zytoskelettorganisation: In einem *in vitro*-System der Aktin-Polymerisation und Shigella-

Motilität konnte mit einem aus bekannten Komponenten rekonstituierten Medium gezeigt werden, dass Grb2 ein Aktivator von N-WASP ist und via Aktivierung des Arp2/3-Komplexes Aktinnukleation induziert (44). Ob dieser Mechanismus auch für die Zytoskelettarrangements während der Invasion eine Rolle spielt, ist nicht bekannt.

Die GTPasen der Rho-Familie sind Teil verschiedener Signalisations-Aktivitäten in der Zelle. Rho selbst ist an einer ganzen Reihe von Invasions-assoziierten Phänomenen beteiligt:

1. Ausbildung langer Aktin-Filamente sowie der reifen, blütenartigen Zytoskelettstruktur (5)
2. Rekrutierung von Vinkulin, Talin, tyrosin-phosphorylierten Proteinen, Ezrin und Src (71; 302)
3. Aktivierung der Proteinkinase C (302)
4. Phosphorylierung von FAK und Paxillin (302)

Dieses Muster Rho-abhängiger Prozesse deutet darauf hin, dass die Rolle von Rho für die bakterielle Invasion komplex ist. Rho könnte seine Wirkung über Signalisationskaskaden ausüben, in die auch CDC42 und Rac involviert sind (siehe (154)). Dies könnte erklären, weshalb die Inhibition von Rho durch das *C. botulinum*-Toxin C3 auch mit der Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien interferiert, Strukturen, die eher der Aktivierung von CDC42 oder Rac zugeschrieben werden (284), wobei die Aktinnukleation Rho-unabhängig zu sein scheint (5; 284; 302). Außerdem kann Rho die Funktion von ERM-Proteinen auf verschiedenen Wegen modulieren: Zum einen ist die Rekrutierung von Ezrin in den bakteriellen Invasionskomplex Rho-abhängig (254); zum anderen kann Moesin über die Rho-abhängige Rho-kinase oder via Rho-abhängiger Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase phosphoryliert werden und schließlich ist die Erhaltung des phosphorylierten Zustands von Moesin abhängig von der Rho-vermittelten Inaktivierung der MLCP, einem Inaktivator von Moesin (87).

#### 2.3.2.1 Invasionsassoziierte Regelkreise der Signalisation

Die Zytoskelettstruktur des reifen Invasionskomplexes ist das Resultat einer Balance zwischen Signalen für Depolymerisation, Kürzung durch Kettenbruch ('severing'), Nukleation, Polymerisation, Bündelung und Quervernetzung von Aktin. Verschiedene Gegenregulationsmechanismen scheinen für die Shigella-induzierten Zytoskelettveränderungen von Bedeutung zu sein. Neben der IpaA/Vinkulin-induzierten Aktin-Depolymerisation, die die Entstehung zellulärer Protrusionen unter dem Bakterium verhindern (37; 283), spielt die Src-vermittelte Signalisation eine Rolle bei der Gegenregulation initial aktivierter Kaskaden. Während die Rekrutierung von Src Rho-abhängig ist, scheint Src selbst Rho über ein RhoGAP zu inaktivieren (71), wobei aufgrund der Lokalisationsverhältnisse *in vivo* hauptsächlich an einen Antagonismus zu

RhoA zu denken ist. Demgegenüber scheint RhoC im wesentlichen durch ein Klasse IX-Myosin mit Rho-spezifischer GAP-Funktion inaktiviert zu werden (101). Die Beobachtung, dass die Zelle zwei verschiedene Gegenregulationsmechanismen für die Steuerung der Rho-Aktivität einsetzt, unterstreicht sowohl die Schlüsselrolle von Rho für die Shigella-induzierten Zytoskelettarrangements wie auch die Bedeutung der isoformspezifischen Rekrutierung dieser Moleküle. Ob die kürzlich beschriebene Regulation der Rho-Aktivität durch das CNF1-Toxin uropathogener *E. coli* über die Abbaukinetik (69) bei der Shigellen-Invasion von Bedeutung ist, wurde bisher nicht untersucht.

### 3 Bisher nicht publizierte Daten unserer Arbeitsgruppe zur Pathogenese der Shigellose

#### 3.1 Charakterisierung des Rekrutierungsmoduls von RhoA im Epithelzellinvasionssystem

Die Ausgangsbeobachtung, dass RhoA und RhoC trotz weitgehender Homologie in ganz unterschiedliche Regionen des Invasionskomplexes rekrutiert werden ((5); s. auch (2)), veranlasste uns zu der Hypothese eines Rekrutierungsmotivs am C-Terminus des Moleküls, da sich hier einige nicht-konservative Aminosäureaustausche befinden. Die Ergebnisse dieser Studien sind in einem zur Publikation vorbereiteten Manuskript niedergelegt, sodass hier nur eine kurze Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse erfolgt.



Abb. 6: Variable, polybasische prä-C-terminale Region von Rho-Isoformen A und C. Farbige dargestellte Positionen unterscheiden sich zwischen den Isoformen, unterstrichene Aminosäuren sind basisch.

Der prä-C-terminale Molekülabschnitt lässt sich in zwei Teile untergliedern: in einen prä-C-terminalen Bereich (AS181-189) und in die C-terminale CAAX-Box (7)(s. Abb. 6). Letztere ist essentiell für das Rekrutierungsphänomen, da CAAX-Deletionsmutanten nicht rekrutiert werden. Der Austausch von CAAX-Boxen zwischen den Rho-Isoformen ändert aber nicht deren Rekrutierungsmuster, sodass die CAAX-Box nicht das Rekrutierungsmuster determiniert. Wird hingegen der prä-C-terminale Abschnitt (AS181-188) zwischen RhoA und RhoC ausgetauscht, kommt es zur Konversion des Rekrutierungsmusters. Weiter fanden wir, dass der Austausch von 2 der 6 Aminosäuren bereits ausreicht, um eine vollständige Konversion des Musters zu erzielen. Für das

Translokationsphänomen unerheblich sind sowohl das Serin188 von RhoA, welches Substrat für die Protein Kinase A (PKA) ist, noch die vom GTP/GDP-Bindungszustand abhängige Signal-Aktivität von RhoA. Deshalb interessierte uns die Frage, ob die C-terminale Region hinreichend ist, um ein beliebiges anderes Protein an die Shigellen-Invasionsstelle zu rekrutieren. Indem wir zeigen konnten, dass Fusionsproteine bestehend aus "enhanced green fluorescent protein" (EGFP) und den AS181-193 von RhoA oder RhoC wie die entsprechenden Rho-Isoformen in die bakterielle Invasionszone rekrutiert werden, ist der C-Terminus als Rekrutierungsmotiv etabliert. Dabei handelt es sich um das erste mit Methoden der 'Mikrobiellen Zellbiologie' identifizierte humane Proteinmotiv.

Insgesamt unterstreichen unsere Ergebnisse die herausragende Bedeutung von Relokalisations-Phänomenen für das Verständnis von mikrobiell induzierten Umbauvorgängen des Zytoskeletts. Die von uns beobachteten Relokalisationsvorgänge sind so deutlich ausgeprägt, dass die Relokalisation eines Proteins bei unveränderter Basis-Aktivität eine so starke lokale Erhöhung dieser Aktivität am Wirkort bringen würde, dass eine zusätzliche spezifische Aktivierung nicht unbedingt erforderlich erscheint. Protein-Rekrutierung ist deshalb bei Proteinen mit Basis-Aktivität *per se* Ausdruck eines Signalisationsereignisses. Kommt eine Aktivierung des rekrutierten Proteins hinzu, potenziert sich das Signal um das Produkt von Aktivierungs- und Rekrutierungskoeffizient. Dies wird insbesondere auch dadurch deutlich, dass die von uns studierten Rekrutierungsvorgänge in den Invasionskomplex sowohl bei Rho wie auch bei Myr5 unabhängig von sonstigen Aktivitäten des Proteins gesteuert werden. Damit wird die Rekrutierungseigenschaft zu einer wesentlichen Eigenschaft des Moleküls selbst. Gerade der Befund, dass Myr5 zwar *in vitro* RhoA, B und C in gleicher Weise inhibiert aber lediglich mit RhoC (und RhoB), nicht aber mit RhoA (und Rac) *in vivo* kolokalisiert (101), zeigt deutlich, dass das Rekrutierungsmuster ein Parameter eigener Art ist, dessen Studium eine Voraussetzung darstellt für das Verständnis von bakteriell induzierten Signalisationskaskaden. Die isoform-typische Adressierung von Rho könnte von fundamentaler Bedeutung für diese G-Proteine sein. So wurde kürzlich gezeigt, dass RhoC für die Metastasierung des Melanoms eine wichtige Rolle spielt (50). Dabei fiel der Unterschied zwischen RhoC und RhoA hinsichtlich der Förderung der Metastasierung auf, da biochemisch bisher keine Unterschiede zwischen diesen Isoformen gefunden wurden. Wir glauben, dass der wesentliche Unterschied zwischen diesen Rho-Isoformen in der von uns dargestellten Membranadressierung besteht. Unsere Beobachtung bildet die theoretische Grundlage für die Markierung von Rho-Isoform-typischen Membrandomänen, für die Rekrutierung beliebiger Proteine an diese Domänen sowie für eine isoform-typische Inhibition von Rho mit potenziellen Anwendungen im Bereich der Zellbiologie aber auch der Krebstherapie (50; 264; 292; 293) durch selektive Inhibition der

Membranadressierung bestimmter Rho-Isoformen.

### **3.2 Phospholipidmetabolismus während der Shigellen-Invasion**

Die nachgewiesene Schlüsselfunktion von Rho für die Epithelzellinvasion wirft die Frage nach weiteren Elementen der Signalisationskaskaden oberhalb von Rho auf. Dabei kommt den Vorgängen an der Zytoplasmamembran und insbesondere dem Phospholipidmetabolismus besondere Bedeutung zu. Wir untersuchten in diesem Zusammenhang den Metabolismus von Phosphatidylcholin (PC) sowie den Inositolphosphatmetabolismus während der Shigellen-Invasion. Dabei konnten wir zunächst zeigen, dass eine Inhibition der Phosphatidat-Phosphohydrolase die bakterielle Invasion um knapp 90% inhibiert und den Invasionskomplex mikromorphologisch stark verändert. Diese Studien wurden dann in Kooperation mit Michel Record und Bernard Payastre (beide Toulouse) erweitert. So konnten wir eine bakterielle Induktion des PC-Metabolismus´ nachweisen, wobei es zu einer Erhöhung von Phosphatidat (Diacylglycerol-Phosphat) kommt. Dieser Befund passt gut zu unseren initialen Beobachtungen einer Rolle der PPH im Infektionsgeschehen, da Phosphatidat das Substrat der PPH darstellt. Zu unserer Überraschung fanden wir während der Infektion auch die Induktion einer Phosphatidyl-Inositol-4,5-Biphosphat-Phosphatase-Aktivität bakteriellen Ursprungs. Das mit dieser Aktivität assoziierte Genprodukt ist IpgD (177), eine Shigellen-Phosphatase, die eine vorübergehende Ablösung des Zytoskeletts von der Plasmamembran zur Erleichterung der Ausbildung von Zellausläufern bewirkt (176), vom Virulenzplasmid kodiert und im Labor von P. Sansonetti bearbeitet wird.

## Literaturverzeichnis

1. Abo, A., E. Pick, A. Hall, N. Totty, C. G. Teahan, und A. W. Segal. 1991. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 353:668-670.
2. Adam, T. 1998. A role for the small GTPase rho in epithelial cell invasion by *Shigella*. *Bull Inst Pasteur* 96:93-102.
3. Adam, T. 2001. Exploitation of host factors for efficient infection by *Shigella*. *Int J Med Microbiol* 291:287-298.
4. Adam, T., M. Arpin, M. C. Prévost, P. Gounon, und P. J. Sansonetti. 1995. Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *J Cell Biol* 129:367-381.
5. Adam, T., M. Giry, P. Boquet, und P. Sansonetti. 1996. Rho-dependent membrane folding causes *Shigella* entry into epithelial cells. *EMBO J* 15:3315-3321.
6. Adam, T., R. Siewerdt, I. Offermann, J. Lang, H. Tschäpe, J. Sieper, und B. Graf. 2003. Prevalence and molecular diversity of pHS-2 plasmids, marker for arthritogenicity, among clinical *Escherichia coli* *Shigella* isolates. *Microbes Infect* 5:579-592.
7. Adamson, P., C. J. Marshall, A. Hall, und P. A. Tilbrook. 1992. Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem* 267:20033-20038.
8. Adler, B., C. Sasakawa, T. Tobe, S. Makino, K. Komatsu, und M. Yoshikawa. 1989. A dual transcriptional activation system for the 230 kb plasmid genes coding for virulence-associated antigens of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 3:627-635.
9. Allaoui, A., R. Menard, P. J. Sansonetti, und C. Parsot. 1993. Characterization of the *Shigella flexneri* ipgD and ipgF genes, which are located in the proximal part of the mxi locus. *Infect Immun* 61:1707-1714.
10. Allaoui, A., J. Mounier, M. C. Prévost, P. J. Sansonetti, und C. Parsot. 1992. icsB: a *Shigella flexneri* virulence gene necessary for the lysis of protrusions during intercellular spread. *Mol Microbiol* 6:1605-1616.
11. Allaoui, A., P. J. Sansonetti, R. Menard, S. Barzu, J. Mounier, A. Phalipon, und C. Parsot. 1995. MxiG, a membrane protein required for secretion of *Shigella* spp. Ipa invasins: involvement in entry into epithelial cells and in intercellular dissemination. *Mol Microbiol* 17:461-470.
12. Allaoui, A., P. J. Sansonetti, und C. Parsot. 1993. MxiD, an outer membrane protein necessary for the secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins. *Mol Microbiol* 7:59-68.
13. Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura, und K. Kaibuchi. 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 271:20246-20249.
14. Amstey, M. S., und D. L. Gandell. 1980. Salpingitis-perihepatitis in a patient with cervical *Shigella sonnei*. *Obstet Gynecol* 55:70S-71S.
15. Andrews, G. P., A. E. Hromockyj, C. Coker, und A. T. Maurelli. 1991. Two novel virulence loci, mxiA and mxiB, in *Shigella flexneri* 2a facilitate excretion of invasion plasmid antigens. *Infect Immun* 59:1997-2005.
16. Arm, H. G., T. M. Floyd, J. E. Faber, und J. R. Hayes. 1965. Use of ligated segments of rabbit small intestine in experimental shigellosis. *J Bacteriol* 89:803-809.
17. Arondel, J., M. Singer, A. Matsukawa, A. Zychlinsky, und P. J. Sansonetti. 1999. Increased interleukin-1 (IL-1) and imbalance between IL-1 and IL-1 receptor antagonist during acute inflammation in experimental Shigellosis. *Infect Immun* 67:6056-6066.
18. Arpin, M., E. Friederich, M. Algrain, F. Vernel, und D. Louvard. 1994. Functional differences between L- and T-plastin isoforms. *J Cell Biol* 127:1995-2008.
19. Aullo, P., M. Giry, S. Olsnes, M. R. Popoff, C. Kocks, und P. Boquet. 1993. A chimeric toxin to study the role of the 21 kDa GTP binding protein rho in the control of actin microfilament assembly. *EMBO J* 12:921-931.
20. Bähler, M., und A. Rhoads. 2002. Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett* 513:107-113.

21. Bahrani, F. K., P. J. Sansonetti, and C. Parsot. 1997. Secretion of Ipa proteins by *Shigella flexneri*: inducer molecules and kinetics of activation. *Infect Immun* 65:4005-4010.
22. Balter-Seri, J., Y. Yuhas, A. Weizman, Y. Nofech-Mozes, E. Kaminsky, and S. Ashkenazi. 1999. Role of nitric oxide in the enhancement of pentylenetetrazole-induced seizures caused by *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun* 67:6364-6368.
23. Banish, L. D., R. Sims, D. Sack, R. J. Montali, L. Phillips, and M. Bush. 1993. Prevalence of shigellosis and other enteric pathogens in a zoologic collection of primates. *J Am Vet Med Assoc* 203:126-132.
24. Barbieri, M. A., S. Hoffenberg, R. Roberts, A. Mukhopadhyay, A. Pomrehn, B. F. Dickey, and P. D. Stahl. 1998. Evidence for a symmetrical requirement for Rab5-GTP in in vitro endosome-endosome fusion. *J Biol Chem* 273:25850-25855.
25. Barzu, S., T. Z. Benjelloun, A. Phalipon, P. Sansonetti, and C. Parsot. 1997. Functional analysis of the *Shigella flexneri* IpaC invasin by insertional mutagenesis. *Infect Immun* 65:1599-1605.
26. Behrens, J. 1999. Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 18:15-30.
27. Beloin, C., and C. J. Dorman. 2003. An extended role for the nucleoid structuring protein H-NS in the virulence gene regulatory cascade of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 47:825-838.
28. Beloin, C., S. McKenna, and C. J. Dorman. 2002. Molecular dissection of VirB, a key regulator of the virulence cascade of *Shigella flexneri*. *J Biol Chem* 277:15333-15344.
29. Bernardini, M. L., A. Fontaine, and P. J. Sansonetti. 1990. The two-component regulatory system ompR-envZ controls the virulence of *Shigella flexneri*. *J Bacteriol* 172:6274-6281.
30. Bernardini, M. L., J. Mounier, H. d'Hauteville, R. M. Coquis, and P. J. Sansonetti. 1989. Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3867-3871.
31. Bernardini, M. L., M. G. Sanna, A. Fontaine, and P. J. Sansonetti. 1993. OmpC is involved in invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 61:3625-3635.
32. Blocker, A., P. Gounon, E. Larquet, K. Niebuhr, V. Cabiaux, C. Parsot, and P. Sansonetti. 1999. The tripartite type III secretin of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol* 147:683-693.
33. Blocker, A., N. Jouihri, E. Larquet, P. Gounon, F. Ebel, C. Parsot, P. Sansonetti, and A. Allaoui. 2001. Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretin. *Mol Microbiol* 39:652-663.
34. Blostein, J. 1991. Shigellosis from swimming in a park pond in Michigan. *Public Health Rep* 106:317-322.
35. Bokoch, G. M. 2000. Regulation of cell function by Rho family GTPases. *Immunol Res* 21:139-148.
36. Borowsky, M. L., and R. O. Hynes. 1998. Layilin, a novel talin-binding transmembrane protein homologous with C-type lectins, is localized in membrane ruffles. *J Cell Biol* 143:429-442.
37. Bourdet, S. R., M. Rudiger, B. M. Jockusch, P. Gounon, P. J. Sansonetti, and G. T. Nhieu. 1999. Binding of the *Shigella* protein IpaA to vinculin induces F-actin depolymerization. *EMBO J* 18:5853-5862.
38. Bromberg, Y., E. Shani, G. Joseph, Y. Gorzalczy, O. Sperling, and E. Pick. 1994. The GDP-bound form of the small G protein Rac1 p21 is a potent activator of the superoxide-forming NADPH oxidase of macrophages. *J Biol Chem* 269:7055-7058.
39. Brown, M. C., J. A. Perrotta, and C. E. Turner. 1996. Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J Cell Biol* 135:1109-1123.
40. Brown, M. C., J. A. Perrotta, and C. E. Turner. 1998. Serine and threonine phosphorylation of the paxillin LIM domains regulates paxillin focal adhesion localization and cell adhesion to fibronectin. *Mol Biol Cell* 9:1803-1816.
41. Buchrieser, C., P. Glaser, C. Rusniok, H. Nedjari, H. D'Hauteville, F. Kunst, P. Sansonetti, and C. Parsot. 2000. The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 38:760-771.

42. Calalb, M. B., T. R. Polte, und S. K. Hanks. 1995. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* 15:954-963.
43. Calderwood, D. A., R. Zent, R. Grant, D. J. Rees, R. O. Hynes, und M. H. Ginsberg. 1999. The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem* 274:28071-28074.
44. Carlier, M. F., P. Nioche, L. H. Broutin, I. R. Boujemaa, C. Le-Clainche, C. Egile, C. Garbay, A. Ducruix, P. Sansonetti, und D. Pantaloni. 2000. GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASp) with actin-related protein (ARP2/3) complex. *J Biol Chem* 275:21946-21952.
45. Chakraborty, T., F. Ebel, E. Domann, K. Niebuhr, B. Gerstel, S. Pistor, C. J. Temm-Grove, B. M. Jockusch, M. Reinhard, und U. Walter. 1995. A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J* 14:1314-1321.
46. Chardin, P., P. Boquet, P. Madaule, M. R. Popoff, E. J. Rubin, und D. M. Gill. 1989. The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *EMBO J* 8:1087-1092.
47. Cheney, R. E., und M. S. Mooseker. 1992. Unconventional myosins. *Curr Opin Cell Biol* 4:27-35.
48. Christoforidis, S., H. M. McBride, R. D. Burgoyne, und M. Zerial. 1999. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397:621-625.
49. Christoforidis, S., M. Miaczynska, K. Ashman, M. Wilm, L. Zhao, S. C. Yip, M. D. Waterfield, J. M. Backer, und M. Zerial. 1999. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol* 1:249-252.
50. Clark, E. A., T. R. Golub, E. S. Lander, und R. O. Hynes. 2000. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC [see comments]. *Nature* 406:532-535.
51. Clerc, P., B. Baudry, und P. J. Sansonetti. 1986. Plasmid-mediated contact haemolytic activity in *Shigella* species: correlation with penetration into HeLa cells. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 137A:267-278.
52. Clerc, P., A. Ryter, J. Mounier, und P. J. Sansonetti. 1986. Plasmid-mediated intracellular multiplication of *Shigella flexneri*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 137A:315-320.
53. Clerc, P., und P. J. Sansonetti. 1987. Entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells: evidence for directed phagocytosis involving actin polymerization and myosin accumulation. *Infect Immun* 55:2681-2688.
54. Clerc, P. L., und P. J. Sansonetti. 1989. Evidence for clathrin mobilization during directed phagocytosis of *Shigella flexneri* by HEp2 cells. *Microb Pathog* 7:329-336.
55. Cohen, D., M. Green, C. Block, R. Slepon, R. Ambar, S. S. Wasserman, und M. M. Levine. 1991. Reduction of transmission of shigellosis by control of houseflies (*Musca domestica*) [see comments]. *Lancet* 337:993-997.
56. Cossart, P., P. Boquet, S. Normark, und R. Rappuoli. 1996. Cellular microbiology emerging. *Science* 271:315-316.
57. Coster, T. S., C. W. Hoge, L. L. VanDeVerg, A. B. Hartman, E. V. Oaks, M. M. Venkatesan, D. Cohen, G. Robin, T. A. Fontaine, P. J. Sansonetti, und T. L. Hale. 1999. Vaccination against shigellosis with attenuated *Shigella flexneri* 2a strain SC602. *Infect Immun* 67:3437-3443.
58. Couchman, J. R., und D. A. Rees. 1979. Actomyosin organisation for adhesion, spreading, growth and movement in chick fibroblasts. *Cell Biol Int Rep* 3:431-439.
59. Couchman, J. R., und D. A. Rees. 1979. The behaviour of fibroblasts migrating from chick heart explants: changes in adhesion, locomotion and growth, and in the distribution of actomyosin and fibronectin. *J Cell Sci* 39:149-65:65.
60. Criss, A. K., D. M. Ahlgren, T. S. Jou, B. A. McCormick, und J. E. Casanova. 2001. The GTPase Rac1 selectively regulates *Salmonella* invasion at the apical plasma membrane of polarized epithelial cells. *J Cell Sci* 114:1331-1341.
61. de Arruda, M. V., S. Watson, C. S. Lin, J. Leavitt, und P. Matsudaira. 1990. Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and actin gelation proteins. *J Cell Biol* 111:1069-1079.

62. De Renzis, S., B. Sonnichsen, und M. Zerial. 2002. Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes. *Nat Cell Biol* 4:124-133.
63. De-Geyter, C., B. Vogt, T. Z. Benjelloun, P. J. Sansonetti, J. M. Ruysschaert, C. Parsot, und V. Cabiaux. 1997. Purification of IpaC, a protein involved in entry of *Shigella flexneri* into epithelial cells and characterization of its interaction with lipid membranes. *FEBS Lett* 400:149-154.
64. Dehio, C., M. C. Prévost, und P. J. Sansonetti. 1995. Invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri* induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60c-src-mediated signalling pathway. *EMBO J* 14:2471-2482.
65. Demers, B., P. J. Sansonetti, und C. Parsot. 1998. Induction of type III secretion in *Shigella flexneri* is associated with differential control of transcription of genes encoding secreted proteins. *EMBO J* 17:2894-2903.
66. Devaraj, N., M. Sheykhnazari, W. S. Warren, und V. P. Bhavanandan. 1994. Differential binding of *Pseudomonas aeruginosa* to normal and cystic fibrosis tracheobronchial mucins. *Glycobiology* 4:307-316.
67. d'Hauteville, H., L. R. Dufourcq, F. Nato, und P. J. Sansonetti. 1996. Lack of cleavage of IcsA in *Shigella flexneri* causes aberrant movement and allows demonstration of a cross-reactive eukaryotic protein. *Infect Immun* 64:511-517.
68. Diaz-Meco, M. T., M. M. Municio, S. Frutos, P. Sanchez, J. Lozano, L. Sanz, und J. Moscat. 1996. The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell* 86:777-786.
69. Doye, A., A. Mettouchi, G. Bossis, R. Clement, C. Buisson-Touati, G. Flatau, L. Gagnoux, M. Piechaczyk, P. Boquet, und E. Lemichez. 2002. CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* 111:553-564.
70. Dumenil, G., J. C. Olivo, S. Pellegrini, M. Fellous, P. J. Sansonetti, und G. T. Nhieu. 1998. Interferon alpha inhibits a Src-mediated pathway necessary for *Shigella*-induced cytoskeletal rearrangements in epithelial cells. *J Cell Biol* 143:1003-1012.
71. Dumenil, G., P. Sansonetti, und N. G. Tran-Van. 2000. Src tyrosine kinase activity down-regulates Rho-dependent responses during *Shigella* entry into epithelial cells and stress fibre formation. *J Cell Sci* 113:71-80.
72. DuPont, H. L., M. M. Levine, R. B. Hornick, und S. B. Formal. 1989. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J Infect Dis* 159:1126-1128.
73. Durand, J. M., B. Dagberg, B. E. Uhlin, und G. R. Bjork. 2000. Transfer RNA modification, temperature and DNA superhelicity have a common target in the regulatory network of the virulence of *Shigella flexneri*: the expression of the virF gene. *Mol Microbiol* 35:924-935.
74. Durand, J. M., N. Okada, T. Tobe, M. Watarai, I. Fukuda, T. Suzuki, N. Nakata, K. Komatsu, M. Yoshikawa, und C. Sasakawa. 1994. vacC, a virulence-associated chromosomal locus of *Shigella flexneri*, is homologous to tgt, a gene encoding tRNA-guanine transglycosylase (Tgt) of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 176:4627-4634.
75. Echard, A., F. Jollivet, O. Martinez, J. J. Lacapere, A. Rousselet, I. Janoueix-Lerosey, und B. Goud. 1998. Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* 279:580-585.
76. Egile, C., H. d'Hauteville, C. Parsot, und P. J. Sansonetti. 1997. SopA, the outer membrane protease responsible for polar localization of IcsA in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 23:1063-1073.
77. Egile, C., T. P. Loisel, V. Laurent, R. Li, D. Pantaloni, P. J. Sansonetti, und M. F. Carlier. 1999. Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol* 146:1319-1332.
78. Egoz, N., M. Shmilovitz, B. Kretzer, M. Lucian, V. Porat, und R. Raz. 1991. An outbreak of *Shigella sonnei* infection due to contamination of a municipal water supply in northern Israel. *J Infect* 22:87-93.
79. Falconi, M., B. Colonna, G. Prosseda, G. Micheli, und C. O. Gualerzi. 1998. Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of virF promoter to transcriptional repressor H-NS. *EMBO J* 17:7033-7043.
80. Falconi, M., G. Prosseda, M. Giangrossi, E. Beghetto, und B. Colonna. 2001. Involvement of FIS in

the H-NS-mediated regulation of virF gene of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 42:439-452.

81. Faruque, A. S., T. Teka, und G. J. Fuchs. 1998. Shigellosis in children: a clinico-epidemiological comparison between *Shigella dysenteriae* type I and *Shigella flexneri*. *Ann Trop Paediatr* 18:197-201.
82. Fath, K. R., und D. R. Burgess. 1995. Microvillus assembly. Not actin alone. *Curr Biol* 5:591-593.
83. Fennelly, G. J., S. A. Khan, M. A. Abadi, T. F. Wild, und B. R. Bloom. 1999. Mucosal DNA vaccine immunization against measles with a highly attenuated *Shigella flexneri* vector. *J Immunol* 162:1603-1610.
84. Fernandez-Prada, C. M., D. L. Hoover, B. D. Tall, A. B. Hartman, J. Kopelowitz, und M. M. Venkatesan. 2000. *Shigella flexneri* IpaH(7.8) facilitates escape of virulent bacteria from the endocytic vacuoles of mouse and human macrophages. *Infect Immun* 68:3608-3619.
85. Finlay, B. B., und S. Falkow. 1990. Salmonella interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *J Infect Dis* 162:1096-1106.
86. Fontaine, A., J. Arondel, und P. J. Sansonetti. 1990. Construction and evaluation of live attenuated vaccine strains of *Shigella flexneri* and *Shigella dysenteriae* 1. *Res Microbiol* 141:907-912.
87. Fukata, Y., K. Kimura, N. Oshiro, H. Saya, Y. Matsuura, und K. Kaibuchi. 1998. Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase and myosin phosphatase. *J Cell Biol* 141:409-418.
88. Fukuda, I., T. Suzuki, H. Munakata, N. Hayashi, E. Katayama, M. Yoshikawa, und C. Sasakawa. 1995. Cleavage of *Shigella* surface protein VirG occurs at a specific site, but the secretion is not essential for intracellular spreading. *J Bacteriol* 177:1719-1726.
89. Gajiwala, K. S., und S. K. Burley. 2000. HDEA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria. *J Mol Biol* 295:605-612.
90. Galyov, E. E., M. W. Wood, R. Rosqvist, P. B. Mullan, P. R. Watson, S. Hedges, und T. S. Wallis. 1997. A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol Microbiol* 25:903-912.
91. Gary, R., und A. Bretscher. 1995. Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol Biol Cell* 6:1061-1075.
92. Gemski, P., Jr, A. Takeuchi, O. Washington, und S. B. Formal. 1972. Shigellosis due to *Shigella dysenteriae*. 1. Relative importance of mucosal invasion versus toxin production in pathogenesis. *J Infect Dis* 126:523-530.
93. Gessner, B. D., und M. Beller. 1994. Moose soup shigellosis in Alaska. *West J Med* 160:430-433.
94. Giannasca, P. J., K. T. Giannasca, P. Falk, J. I. Gordon, und M. R. Neutra. 1994. Regional differences in glycoconjugates of intestinal M cells in mice: potential targets for mucosal vaccines. *Am J Physiol* 267:G1108-G1121.
95. Giannini, G., R. Rappuoli, und G. Ratti. 1984. The amino-acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM45 and CRM197. *Nucleic Acids Res* 12:4063-4069.
96. Gilmore, A. P., und K. Burridge. 1996. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate. *Nature* 381:531-535.
97. Goldberg, M. B., und J. A. Theriot. 1995. *Shigella flexneri* surface protein IcsA is sufficient to direct actin-based motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6572-6576.
98. Gorden, J., und P. L. Small. 1993. Acid resistance in enteric bacteria. *Infect Immun* 61:364-367.
99. Gorvel, J. P., P. Chavrier, M. Zerial, und J. Gruenberg. 1991. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 64:915-925.
100. Gradler, U., H. D. Gerber, D. M. Goodenough-Lashua, G. A. Garcia, R. Ficner, K. Reuter, M. T. Stubbs, und G. Klebe. 2001. A new target for shigellosis: rational design and crystallographic studies of inhibitors of tRNA-guanine transglycosylase. *J Mol Biol* 306:455-467.
101. Graf, B., M. Bähler, P. Hilpelä, C. Böwe, und T. Adam. 2000. Functional role for the class IX myosin myr5 in epithelial cell infection by *Shigella flexneri*. *Cell Microbiol* 2:601-616.

102. Guan, S., and N. K. Verma. 1998. Serotype conversion of a *Shigella flexneri* candidate vaccine strain via a novel site-specific chromosome-integration system. *FEMS Microbiol Lett* 166:79-87.
103. Guhathakurta, B., D. Sasmal, A. N. Ghosh, R. Kumar, P. Saha, D. Biswas, D. Khetawat, and A. Datta. 1999. Adhesion and invasion of a mutant *Shigella flexneri* to an eukaryotic cell line in absence of the 220-kb virulence plasmid. *FEMS Microbiol Lett* 181:267-275.
104. Hale, T. L., R. E. Morris, and P. F. Bonventre. 1979. *Shigella* infection of henle intestinal epithelial cells: role of the host cell. *Infect Immun* 24:887-894.
105. Hale, T. L., E. V. Oaks, and S. B. Formal. 1985. Identification and antigenic characterization of virulence-associated, plasmid-coded proteins of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect Immun* 50:620-629.
106. Hedberg, C. W., W. C. Levine, K. E. White, R. H. Carlson, D. K. Winsor, D. N. Cameron, K. L. MacDonald, and M. T. Osterholm. 1992. An international foodborne outbreak of shigellosis associated with a commercial airline [see comments]. *JAMA* 268:3208-3212.
107. High, N., J. Mounier, M. C. Prévost, and P. J. Sansonetti. 1992. IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *EMBO J* 11:1991-1999.
108. Hilbi, H., J. E. Moss, D. Hersh, Y. Chen, J. Arondel, S. Banerjee, R. A. Flavell, J. Yuan, P. J. Sansonetti, and A. Zychlinsky. 1998. *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J Biol Chem* 273:32895-32900.
109. Hilbi, H., R. J. Puro, and A. Zychlinsky. 2000. Tripeptidyl peptidase II promotes maturation of caspase-1 in *Shigella flexneri*-induced macrophage apoptosis. *Infect Immun* 68:5502-5508.
110. Hoffman, R. E., and P. J. Shillam. 1990. The use of hygiene, cohorting, and antimicrobial therapy to control an outbreak of shigellosis. *Am J Dis Child* 144:219-221.
111. Hong, M., and S. M. Payne. 1997. Effect of mutations in *Shigella flexneri* chromosomal and plasmid-encoded lipopolysaccharide genes on invasion and serum resistance. *Mol Microbiol* 24:779-791.
112. Hromockyj, A. E., S. C. Tucker, and A. T. Maurelli. 1992. Temperature regulation of *Shigella* virulence: identification of the repressor gene *virR*, an analogue of *hns*, and partial complementation by tyrosyl transfer RNA (tRNA<sup>Tyr</sup>). *Mol Microbiol* 6:2113-2124.
113. Huang, C., J. Liu, C. C. Haudenschild, and X. Zhan. 1998. The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *J Biol Chem* 273:25770-25776.
114. Huang, C., Y. Ni, T. Wang, Y. Gao, C. C. Haudenschild, and X. Zhan. 1997. Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272:13911-13915.
115. Hueck, C. J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:379-433.
116. Isberg, R. R., and J. M. Leong. 1988. Cultured mammalian cells attach to the invasins protein of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6682-6686.
117. Isberg, R. R., D. L. Voorhis, and S. Falkow. 1987. Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* 50:769-778.
118. Jin, Q., Z. Yuan, J. Xu, Y. Wang, Y. Shen, W. Lu, J. Wang, H. Liu, J. Yang, F. Yang, X. Zhang, J. Zhang, G. Yang, H. Wu, D. Qu, J. Dong, L. Sun, Y. Xue, A. Zhao, Y. Gao, J. Zhu, B. Kan, K. Ding, S. Chen, H. Cheng, Z. Yao, B. He, R. Chen, D. Ma, B. Qiang, Y. Wen, Y. Hou, and J. Yu. 2002. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Res* 30:4432-4441.
119. Johnson, D. I., and J. R. Pringle. 1990. Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol* 111:143-152.
120. Judson, F. N. 1984. Sexually transmitted viral hepatitis and enteric pathogens. *Urol Clin North Am* 11:177-185.
121. Jung, H. C., L. Eckmann, S. K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska, and M. F. Kagnoff. 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 95:55-65.
122. Kapperud, G., L. M. Rorvik, V. Hasseltvedt, E. A. Hoiby, B. G. Iversen, K. Staveland, G. Johnsen, J.

- Leitao, H. Herikstad, Y. Andersson, and a. et. 1995. Outbreak of *Shigella sonnei* infection traced to imported iceberg lettuce. *J Clin Microbiol* 33:609-614.
123. Karnell, A., P. D. Cam, N. Verma, and A. A. Lindberg. 1993. AroD deletion attenuates *Shigella flexneri* strain 2457T and makes it a safe and efficacious oral vaccine in monkeys. *Vaccine* 11:830-836.
  124. Keene, W. E., J. M. McNulty, F. C. Hoesly, J. Williams-LP, K. Hedberg, G. L. Oxman, T. J. Barrett, M. A. Pfaller, and D. W. Fleming. 1994. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N Engl J Med* 331:579-584.
  125. Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase) [see comments]. *Science* 273:245-248.
  126. King, B. F. 1983. The organization of actin filaments in the brush border of yolk sac epithelial cells. *J Ultrastruct Res* 85:329-337.
  127. Knaus, U. G., P. G. Heyworth, T. Evans, J. T. Curnutte, and G. M. Bokoch. 1991. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* 254:1512-1515.
  128. Kocks, C., J. B. Marchand, E. Gouin, H. d'Hauteville, P. J. Sansonetti, M. F. Carlier, and P. Cossart. 1995. The unrelated surface proteins ActA of *Listeria monocytogenes* and IcsA of *Shigella flexneri* are sufficient to confer actin-based motility on *Listeria innocua* and *Escherichia coli* respectively. *Mol Microbiol* 18:413-423.
  129. Kotloff, K. L., D. N. Taylor, M. B. Sztein, S. S. Wasserman, G. A. Losonsky, J. P. Nataro, M. Venkatesan, A. Hartman, W. D. Picking, D. E. Katz, J. D. Campbell, M. M. Levine, and T. L. Hale. 2002. Phase I evaluation of delta virG *Shigella sonnei* live, attenuated, oral vaccine strain WRSS1 in healthy adults. *Infect Immun* 70:2016-2021.
  130. Kotloff, K. L., J. P. Winickoff, B. Ivanoff, J. D. Clemens, D. L. Swerdlow, P. J. Sansonetti, G. K. Adak, and M. M. Levine. 1999. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ* 77:651-666.
  131. Kumagai, N., N. Morii, K. Fujisawa, Y. Nemoto, and S. Narumiya. 1993. ADP-ribosylation of rho p21 inhibits lysophosphatidic acid-induced protein tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activation in cultured Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 268:24535-24538.
  132. LaBrec, E. H., H. Schneider, T. J. Magnani, and S. B. Formal. 1964. Epithelial cell penetration as an essential step in pathogenesis of bacillary dysentery. *J Bacteriol* 88:1503-1518.
  133. Lafont, F., G. Tran Van Nhieu, K. Hanada, P. Sansonetti, and F. G. van der Goot. 2002. Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction. *Embo J* 21:4449-4457.
  134. Laine, R. O., W. Zeile, F. Kang, D. L. Purich, and F. S. Southwick. 1997. Vinculin proteolysis unmask an ActA homolog for actin-based *Shigella* motility. *J Cell Biol* 138:1255-1264.
  135. Lan, R., B. Lumb, D. Ryan, and P. R. Reeves. 2001. Molecular evolution of large virulence plasmid in *Shigella* clones and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect Immun* 69:6303-6309.
  136. Lan, R., and P. R. Reeves. 2002. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. *Microbes Infect* 4:1125-1132.
  137. Laughon, B. E., D. A. Druckman, A. Vernon, T. C. Quinn, B. F. Polk, J. F. Modlin, R. H. Yolken, and J. G. Bartlett. 1988. Prevalence of enteric pathogens in homosexual men with and without acquired immunodeficiency syndrome. *Gastroenterology* 94:984-993.
  138. Leffers, H., M. S. Nielsen, A. H. Andersen, B. Honore, P. Madsen, J. Vandekerckhove, and J. E. Celis. 1993. Identification of two human Rho GDP dissociation inhibitor proteins whose overexpression leads to disruption of the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* 209:165-174.
  139. Lelouard, H., H. Reggio, P. Mangeat, M. Neutra, and P. Montcourrier. 1999. Mucin-related epitopes distinguish M cells and enterocytes in rabbit appendix and Peyer's patches. *Infect Immun* 67:357-367.
  140. Lelouard, H., H. Reggio, C. Roy, A. Sahuquet, P. Mangeat, and P. Montcourrier. 2001. Glycocalyx on rabbit intestinal M cells displays carbohydrate epitopes from Muc2. *Infect Immun* 69:1061-1071.

141. Leong, J. M., P. E. Morrissey, A. Marra, and R. R. Isberg. 1995. An aspartate residue of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein that is critical for integrin binding. *EMBO J* 14:422-431.
142. Lerman, Y., M. Yavzori, R. Ambar, I. Sechter, M. Wiener, and D. Cohen. 1994. Epidemic spread of *Shigella sonnei* shigellosis and evidence for development of immunity among children attending day-care centers in a communal settlement (Kibbutz). *J Clin Microbiol* 32:1092-1094.
143. Lett, M. C., C. Sasakawa, N. Okada, T. Sakai, S. Makino, M. Yamada, K. Komatsu, and M. Yoshikawa. 1989. *virG*, a plasmid-coded virulence gene of *Shigella flexneri*: identification of the *virG* protein and determination of the complete coding sequence. *J Bacteriol* 171:353-359.
144. Leung, T., X. Q. Chen, I. Tan, E. Manser, and L. Lim. 1998. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol Cell Biol* 18:130-140.
145. Lin, C. S., T. Park, Z. P. Chen, and J. Leavitt. 1993. Human platin genes. Comparative gene structure, chromosome location, and differential expression in normal and neoplastic cells. *J Biol Chem* 268:2781-2792.
146. Loisel, T. P., R. Boujemaa, D. Pantaloni, and M. F. Carlier. 1999. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins [see comments]. *Nature* 401:613-616.
147. Magdalena, J., and M. B. Goldberg. 2002. Quantification of *Shigella* IcsA required for bacterial actin polymerization. *Cell Motil Cytoskeleton* 51:187-196.
148. Magdalena, J., A. Hachani, M. Chamekh, N. Jouihri, P. Gounon, A. Blocker, and A. Allaoui. 2002. Spa32 Regulates a Switch in Substrate Specificity of the Type III Secretion of *Shigella flexneri* from Needle Components to Ipa Proteins. *J Bacteriol* 184:3433-3441.
149. Makino, S., C. Sasakawa, K. Kamata, T. Kurata, and M. Yoshikawa. 1986. A genetic determinant required for continuous reinfection of adjacent cells on large plasmid in *S. flexneri* 2a. *Cell* 46:551-555.
150. Makino, S., C. Sasakawa, and M. Yoshikawa. 1988. Genetic relatedness of the basic replicon of the virulence plasmid in shigellae and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Microb Pathog* 5:267-274.
151. Mallett, C. P., L. VanDeVerg, H. H. Collins, and T. L. Hale. 1993. Evaluation of *Shigella* vaccine safety and efficacy in an intranasally challenged mouse model. *Vaccine* 11:190-196.
152. Mantis, N., M. C. Prévost, and P. Sansonetti. 1996. Analysis of epithelial cell stress response during infection by *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 64:2474-2482.
153. Mathan, M. M., and V. I. Mathan. 1991. Morphology of rectal mucosa of patients with shigellosis. *Rev Infect Dis* 13 Suppl 4:S314-S318.
154. Matozaki, T., H. Nakanishi, and Y. Takai. 2000. Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades. *Cell Signal* 12:515-524.
155. Matsui, T., S. Yonemura, and S. Tsukita. 1999. Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr Biol* 9:1259-1262.
156. Maurelli, A. T., B. Baudry, H. d'Hauteville, T. L. Hale, and P. J. Sansonetti. 1985. Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of HeLa cells by *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 49:164-171.
157. Maurelli, A. T., R. E. Fernandez, C. A. Bloch, C. K. Rode, and A. Fasano. 1998. "Black holes" and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3943-3948.
158. Menard, R., M. C. Prévost, P. Gounon, P. Sansonetti, and C. Dehio. 1996. The secreted Ipa complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1254-1258.
159. Menard, R., P. Sansonetti, and C. Parsot. 1994. The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *EMBO J* 13:5293-5302.
160. Menard, R., P. Sansonetti, C. Parsot, and T. Vasselon. 1994. Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell* 79:515-525.
161. Menard, R., P. J. Sansonetti, and C. Parsot. 1993. Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J Bacteriol* 175:5899-5906.

162. Mills, S. D., und B. B. Finlay. 1994. Comparison of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* invasion, intracellular growth and localization in cultured human epithelial cells. *Microb Pathog* 17:409-423.
163. Morona, R., C. Daniels, und L. Van Den Bosch. 2003. Genetic modulation of *Shigella flexneri* 2a lipopolysaccharide O antigen modal chain length reveals that it has been optimized for virulence. *Microbiology* 149:925-939.
164. Morona, R., und L. Van Den Bosch. 2003. Lipopolysaccharide O antigen chains mask IcsA (VirG) in *Shigella flexneri*. *FEMS Microbiol Lett* 221:173-180.
165. Morona, R., und L. Van Den Bosch. 2003. Multicopy *icsA* is able to suppress the virulence defect caused by the *wzz(SF)* mutation in *Shigella flexneri*. *FEMS Microbiol Lett* 221:213-219.
166. Mott, H. R., J. W. Carpenter, S. Zhong, S. Ghosh, R. M. Bell, und S. L. Campbell. 1996. The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel ras and phospholipid binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8312-8317.
167. Mounier, J., F. K. Bahrani, und P. J. Sansonetti. 1997. Secretion of *Shigella flexneri* Ipa invasins on contact with epithelial cells and subsequent entry of the bacterium into cells are growth stage dependent. *Infect Immun* 65:774-782.
168. Mounier, J., V. Laurent, A. Hall, P. Fort, M. F. Carlier, P. J. Sansonetti, und C. Egile. 1999. Rho family GTPases control entry of *Shigella flexneri* into epithelial cells but not intracellular motility. *J Cell Sci* 112:2069-2080.
169. Mounier, J., T. Vasselon, R. Hellio, M. Lesourd, und P. J. Sansonetti. 1992. *Shigella flexneri* enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole. *Infect Immun* 60:237-248.
170. Mukherjee, S., und F. R. Maxfield. 2000. Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking. *Traffic* 1:203-211.
171. Muller, R. T., U. Honnert, J. Reinhard, und M. Bähler. 1997. The rat myosin *myr 5* is a GTPase-activating protein for Rho in vivo: essential role of arginine 1695. *Mol Biol Cell* 8:2039-2053.
172. Nakamura, N., N. Oshiro, Y. Fukata, M. Amano, M. Fukata, S. Kuroda, Y. Matsuura, T. Leung, L. Lim, und K. Kaibuchi. 2000. Phosphorylation of ERM proteins at filopodia induced by Cdc42. *Genes Cells* 5:571-581.
173. Nakayama, S., und H. Watanabe. 1995. Involvement of *cpxA*, a sensor of a two-component regulatory system, in the pH-dependent regulation of expression of *Shigella sonnei* *virF* gene. *J Bacteriol* 177:5062-5069.
174. Nakayama, S., und H. Watanabe. 1998. Identification of *cpxR* as a positive regulator essential for expression of the *Shigella sonnei* *virF* gene. *J Bacteriol* 180:3522-3528.
175. Neutra, M. R. 1999. M cells in antigen sampling in mucosal tissues. *Curr Top Microbiol Immunol* 236:17-32.
176. Niebuhr, K., S. Giuriato, T. Pedron, D. J. Philpott, F. Gaits, J. Sable, M. P. Sheetz, C. Parsot, P. J. Sansonetti, und B. Payrastre. 2002. Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the *S. flexneri* effector IpgD reorganizes host cell morphology. *Embo J* 21:5069-5078.
177. Niebuhr, K., N. Jouihri, A. Allaoui, P. Gounon, P. J. Sansonetti, und C. Parsot. 2000. IpgD, a protein secreted by the type III secretion machinery of *Shigella flexneri*, is chaperoned by IpgE and implicated in entry focus formation. *Mol Microbiol* 38:8-19.
178. Nielsen, E., S. Christoforidis, S. Uttenweiler-Joseph, M. Miaczynska, F. Dewitte, M. Wilm, B. Hoflack, und M. Zerial. 2000. Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *J Cell Biol* 151:601-612.
179. Nielsen, E., F. Severin, J. M. Backer, A. A. Hyman, und M. Zerial. 1999. Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat Cell Biol* 1:376-382.
180. Nishiyama, T., T. Sasaki, K. Takaishi, M. Kato, H. Yaku, K. Araki, Y. Matsuura, und Y. Takai. 1994. *rac p21* is involved in insulin-induced membrane ruffling and *rho p21* is involved in hepatocyte growth factor- and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced membrane ruffling in KB cells. *Mol Cell Biol* 14:2447-2456.
181. Nobes, C. D., und A. Hall. 1995. Rho, *rac*, and *cdc42* GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81:53-62.

182. Nofech-Mozes, Y., Y. Yuhas, E. Kaminsky, A. Weizman, and S. Ashkenazi. 2000. Induction of mRNA for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in mice brain, spleen and liver in an animal model of Shigella-related seizures. *Isr Med Assoc J* 2:86-90.
183. Norman, J. C., D. Jones, S. T. Barry, M. R. Holt, S. Cockcroft, and D. R. Critchley. 1998. ARF1 mediates paxillin recruitment to focal adhesions and potentiates Rho-stimulated stress fiber formation in intact and permeabilized Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 143:1981-1995.
184. Norris, F. A., M. P. Wilson, T. S. Wallis, E. E. Galyov, and P. W. Majerus. 1998. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14057-14059.
185. Oaks, E. V., T. L. Hale, and S. B. Formal. 1986. Serum immune response to Shigella protein antigens in rhesus monkeys and humans infected with Shigella spp. *Infect Immun* 53:57-63.
186. Ogawa, H., S. Honjo, M. Takasaka, T. Fujiwara, and K. Imaizumi. 1966. Shigellosis in cynomolgus monkeys (*Macaca irus*). IV. Bacteriological and histopathological observations on the earlier stage of experimental infection with *Shigella flexneri* 2 A. *Jpn J Med Sci Biol* 19:22-32.
187. Ogawa, H., A. Nakamura, and R. Nakaya. 1968. Cinemicrographic study of tissue cell cultures infected with *Shigella flexneri*. *Jpn J Med Sci Biol* 21:259-273.
188. Ohoka, Y., and Y. Takai. 1998. Isolation and characterization of cortactin isoforms and a novel cortactin-binding protein, CBP90. *Genes Cells* 3:603-612.
189. Oshiro, N., Y. Fukata, and K. Kaibuchi. 1998. Phosphorylation of moesin by rho-associated kinase (Rho-kinase) plays a crucial role in the formation of microvilli-like structures. *J Biol Chem* 273:34663-34666.
190. Owen, R. L. 1999. Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches--a personal and historical perspective. *Semin Immunol* 11:157-163.
191. Page, A. L., H. Ohayon, P. J. Sansonetti, and C. Parsot. 1999. The secreted IpaB and IpaC invasins and their cytoplasmic chaperone IpgC are required for intercellular dissemination of *Shigella flexneri*. *Cell Microbiol* 1:183-193.
192. Pal, T., and T. L. Hale. 1989. Plasmid-associated adherence of *Shigella flexneri* in a HeLa cell model. *Infect Immun* 57:2580-2582.
193. Palazzo, A. F., T. A. Cook, A. S. Alberts, and G. G. Gundersen. 2001. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol* 3:723-729.
194. Parsot, C., R. Menard, P. Gounon, and P. J. Sansonetti. 1995. Enhanced secretion through the *Shigella flexneri* Mxi-Spa translocon leads to assembly of extracellular proteins into macromolecular structures. *Mol Microbiol* 16:291-300.
195. Paterson, H. F., A. J. Self, M. D. Garrett, I. Just, K. Aktories, and A. Hall. 1990. Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol* 111:1001-1007.
196. Pelletier, A. R., R. F. Finger, and D. M. Sosin. 1991. Shigellosis in Kentucky, 1986 through 1989. *South Med J* 84:818-821.
197. Pereira-Leal, J. B., and M. C. Seabra. 2001. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* 313:889-901.
198. Pfaff, M., S. Liu, D. J. Erle, and M. H. Ginsberg. 1998. Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J Biol Chem* 273:6104-6109.
199. Pope, L. M., K. E. Reed, and S. M. Payne. 1995. Increased protein secretion and adherence to HeLa cells by *Shigella* spp. following growth in the presence of bile salts. *Infect Immun* 63:3642-3648.
200. Porter, M. E., and C. J. Dorman. 1994. A role for H-NS in the thermo-osmotic regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*. *J Bacteriol* 176:4187-4191.
201. Porter, M. E., and C. J. Dorman. 1997. Positive regulation of *Shigella flexneri* virulence genes by integration host factor. *J Bacteriol* 179:6537-6550.
202. Prévost, M. C., M. Lesourd, M. Arpin, F. Vernel, J. Mounier, R. Hellio, and P. J. Sansonetti. 1992. Unipolar reorganization of F-actin layer at bacterial division and bundling of actin filaments by plactin correlate with movement of *Shigella flexneri* within HeLa cells. *Infect Immun* 60:4088-4099.

203. Prosseda, G., P. A. Fradiani, M. Di-Lorenzo, M. Falconi, G. Micheli, M. Casalino, M. Nicoletti, and B. Colonna. 1998. A role for H-NS in the regulation of the virF gene of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Res Microbiol* 149:15-25.
204. Pupo, G. M., D. K. Karaolis, R. Lan, and P. R. Reeves. 1997. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. *Infect Immun* 65:2685-2692.
205. Pupo, G. M., R. Lan, and P. R. Reeves. 2000. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10567-10572.
206. Rabbani, G. H., M. J. Albert, H. Rahman, M. Islam, D. Mahalanabis, I. Kabir, K. Alam, and M. Ansaruzzaman. 1995. Development of an improved animal model of shigellosis in the adult rabbit by colonic infection with *Shigella flexneri* 2a. *Infect Immun* 63:4350-4357.
207. Rajakumar, K., D. Bulach, J. Davies, L. Ambrose, C. Sasakawa, and B. Adler. 1997. Identification of a chromosomal *Shigella flexneri* multi-antibiotic resistance locus which shares sequence and organizational similarity with the resistance region of the plasmid NR1. *Plasmid* 37:159-168.
208. Rajkumar, R., H. Devaraj, and S. Niranjali. 1998. Binding of *Shigella* to rat and human intestinal mucin. *Mol Cell Biochem* 178:261-268.
209. Rathman, M., P. de Lanerolle, H. Ohayon, P. Gounon, and P. Sansonetti. 2000. Myosin light chain kinase plays an essential role in *S. flexneri* dissemination. *J Cell Sci* 113 Pt 19:3375-3386.
210. Reinhard, J., A. A. Scheel, D. Diekmann, A. Hall, C. Ruppert, and M. Bähler. 1995. A novel type of myosin implicated in signalling by rho family GTPases. *EMBO J* 14:697-704.
211. Ribbeck, K., and D. Gorlich. 2001. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J* 20:1320-1330.
212. Ribbeck, K., G. Lipowsky, H. M. Kent, M. Stewart, and D. Gorlich. 1998. NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J* 17:6587-6598.
213. Ridley, A. J., and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70:389-399.
214. Ridley, A. J., and A. Hall. 1994. Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase. *EMBO J* 13:2600-2610.
215. Robbins, J. R., D. Monack, S. J. McCallum, A. Vegas, E. Pham, M. B. Goldberg, and J. A. Theriot. 2001. The making of a gradient: lcsA (VirG) polarity in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 41:861-872.
216. Rohatgi, R., L. Ma, H. Miki, M. Lopez, T. Kirchhausen, T. Takenawa, and M. W. Kirschner. 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97:221-231.
217. Rolland, K., Z. N. Lambert, B. Picard, and E. Denamur. 1998. *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains are derived from distinct ancestral strains of *E. coli*. *Microbiology* 144:2667-2672.
218. Rubin, E. J., D. M. Gill, P. Boquet, and M. R. Popoff. 1988. Functional modification of a 21-kilodalton G protein when ADP-ribosylated by exoenzyme C3 of *Clostridium botulinum*. *Mol Cell Biol* 8:418-426.
219. Sakai, T., C. Sasakawa, S. Makino, and M. Yoshikawa. 1986. DNA sequence and product analysis of the virF locus responsible for congo red binding and cell invasion in *Shigella flexneri* 2a. *Infect Immun* 54:395-402.
220. Sakai, T., C. Sasakawa, and M. Yoshikawa. 1988. Expression of four virulence antigens of *Shigella flexneri* is positively regulated at the transcriptional level by the 30 kiloDalton virF protein. *Mol Microbiol* 2:589-597.
221. Sandlin, R. C., M. B. Goldberg, and A. T. Maurelli. 1996. Effect of O side-chain length and composition on the virulence of *Shigella flexneri* 2a. *Mol Microbiol* 22:63-73.
222. Sandlin, R. C., K. A. Lampel, S. P. Keasler, M. B. Goldberg, A. L. Stolzer, and A. T. Maurelli. 1995. Avirulence of rough mutants of *Shigella flexneri*: requirement of O antigen for correct unipolar localization of lcsA in the bacterial outer membrane. *Infect Immun* 63:229-237.
223. Sandlin, R. C., and A. T. Maurelli. 1999. Establishment of unipolar localization of lcsA in *Shigella*

- flexneri 2a is not dependent on virulence plasmid determinants. *Infect Immun* 67:350-356.
224. Sansonetti, P. J. 1993. [Molecular and cellular mechanisms of invasion of the intestinal barrier by *Shigella flexneri* (editorial)] Mécanismes moléculaires et cellulaires de l'invasion de la barrière intestinale par *Shigella flexneri*. *Pathol Biol Paris* 41:913-918.
  225. Sansonetti, P. J., and J. Arondel. 1989. Construction and evaluation of a double mutant of *Shigella flexneri* as a candidate for oral vaccination against shigellosis. *Vaccine* 7:443-450.
  226. Sansonetti, P. J., J. Arondel, J. R. Cantey, M. C. Prévost, and M. Huerre. 1996. Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. *Infect Immun* 64:2752-2764.
  227. Sansonetti, P. J., J. Arondel, J. M. Cavaillon, and M. Huerre. 1995. Role of interleukin-1 in the pathogenesis of experimental shigellosis. *J Clin Invest* 96:884-892.
  228. Sansonetti, P. J., J. Arondel, A. Fontaine, H. d'Hauteville, and M. L. Bernardini. 1991. OmpB (osmo-regulation) and icsA (cell-to-cell spread) mutants of *Shigella flexneri*: vaccine candidates and probes to study the pathogenesis of shigellosis. *Vaccine* 9:416-422.
  229. Sansonetti, P. J., J. Arondel, M. Huerre, A. Harada, and K. Matsushima. 1999. Interleukin-8 controls bacterial transepithelial translocation at the cost of epithelial destruction in experimental shigellosis. *Infect Immun* 67:1471-1480.
  230. Sansonetti, P. J., H. d'Hauteville, C. Ecobichon, and C. Pourcel. 1983. Molecular comparison of virulence plasmids in *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Ann Microbiol (Paris)* 134A:295-318.
  231. Sansonetti, P. J., H. d'Hauteville, S. B. Formal, and M. Toucas. 1982. Plasmid-mediated invasiveness of "Shigella-like" *Escherichia coli*. *Ann Microbiol (Paris)* 133:351-355.
  232. Sansonetti, P. J., D. J. Kopecko, and S. B. Formal. 1982. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 35:852-860.
  233. Sansonetti, P. J., J. Mounier, M. C. Prévost, and R. M. Mege. 1994. Cadherin expression is required for the spread of *Shigella flexneri* between epithelial cells. *Cell* 76:829-839.
  234. Sansonetti, P. J., A. Phalipon, J. Arondel, K. Thirumalai, S. Banerjee, S. Akira, K. Takeda, and A. Zychlinsky. 2000. Caspase-1 activation of IL-1 $\beta$  and IL-18 are essential for *Shigella flexneri*-induced inflammation. *Immunity* 12:581-590.
  235. Sansonetti, P. J., A. Ryter, P. Clerc, A. T. Maurelli, and J. Mounier. 1986. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect Immun* 51:461-469.
  236. Sasakawa, C., B. Adler, T. Tobe, N. Okada, S. Nagai, K. Komatsu, and M. Yoshikawa. 1989. Functional organization and nucleotide sequence of virulence Region-2 on the large virulence plasmid in *Shigella flexneri* 2a. *Mol Microbiol* 3:1191-1201.
  237. Sasakawa, C., K. Kamata, T. Sakai, S. Makino, M. Yamada, N. Okada, and M. Yoshikawa. 1988. Virulence-associated genetic regions comprising 31 kilobases of the 230-kilobase plasmid in *Shigella flexneri* 2a. *J Bacteriol* 170:2480-2484.
  238. Schaller, M. D., C. A. Borgman, B. S. Cobb, R. R. Vines, A. B. Reynolds, and J. T. Parsons. 1992. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5192-5196.
  239. Schaller, M. D., J. D. Hildebrand, J. D. Shannon, J. W. Fox, R. R. Vines, and J. T. Parsons. 1994. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol* 14:1680-1688.
  240. Schlaepfer, D. D., M. A. Broome, and T. Hunter. 1997. Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Mol Cell Biol* 17:1702-1713.
  241. Schlaepfer, D. D., S. K. Hanks, T. Hunter, and P. van der Geer. 1994. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372:786-791.
  242. Schlaepfer, D. D., and T. Hunter. 1996. Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 16:5623-5633.

243. Schuch, R., und A. T. Maurelli. 1999. The mxi-Spa type III secretory pathway of *Shigella flexneri* requires an outer membrane lipoprotein, MxiM, for invasin translocation. *Infect Immun* 67:1982-1991.
244. Schuch, R., und A. T. Maurelli. 2001. MxiM and MxiJ, base elements of the Mxi-Spa type III secretion system of *Shigella*, interact with and stabilize the MxiD secretin in the cell envelope. *J Bacteriol* 183:6991-6998.
245. Schuch, R., und A. T. Maurelli. 2001. Spa33, a cell surface-associated subunit of the Mxi-Spa type III secretory pathway of *Shigella flexneri*, regulates Ipa protein traffic. *Infect Immun* 69:2180-2189.
246. Schulte, R., S. Kerneis, S. Klinke, H. Bartels, S. Preger, J. P. Kraehenbuhl, E. Pringault, und I. B. Autenrieth. 2000. Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta1 integrins apically expressed on M-like cells. *Cell Microbiol* 2:173-185.
247. Sempertegui, F., B. Estrella, J. Egas, P. Carrion, L. Yerovi, S. Diaz, M. Lascano, R. Aranha, W. Ortiz, A. Zabala, und a. et. 1995. Risk of diarrheal disease in Ecuadorian day-care centers. *Pediatr Infect Dis J* 14:606-612.
248. Sereny, B. 1957. Experimental keratoconjunctivitis shigellosa. *Acad Sci Hung* 4:367-376.
249. Shibata, T., F. Takeshima, F. Chen, F. W. Alt, und S. B. Snapper. 2002. Cdc42 facilitates invasion but not the actin-based motility of *Shigella*. *Curr Biol* 12:341-345.
250. Shiga, K. 1898. Ueber den Dysenteriebacillus (*Bacillus dysenteriae*). *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde u Infektionskrankheiten Erste Abteilung* 24:817-828.
251. Simchen, E., S. Jeeraphat, S. Shihab, und B. Fattal. 1991. An epidemic of waterborne *Shigella* gastroenteritis in Kibbutzim of western Galilee in Israel. *Int J Epidemiol* 20:1081-1087.
252. Simons, K., und D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-39.
253. Skoudy, A., J. Mounier, A. Aruffo, H. Ohayon, P. Gounon, P. Sansonetti, und G. Tran Van Nhieu. 2000. CD44 binds to the *Shigella* IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells. *Cell Microbiol* 2:19-33.
254. Skoudy, A., G. T. Nhieu, N. Mantis, M. Arpin, J. Mounier, P. Gounon, und P. Sansonetti. 1999. A functional role for ezrin during *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J Cell Sci* 112:2059-2068.
255. Small, P., D. Blankenhorn, D. Welty, E. Zinser, und J. L. Slonczewski. 1994. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of rpoS and growth pH. *J Bacteriol* 176:1729-1737.
256. Sonnichsen, B., S. De Renzis, E. Nielsen, J. Rietdorf, und M. Zerial. 2000. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149:901-914.
257. Sordella, R., M. Classon, K. Q. Hu, S. F. Matheson, M. R. Brouns, B. Fine, L. Zhang, H. Takami, Y. Yamada, und J. Settleman. 2002. Modulation of CREB activity by the Rho GTPase regulates cell and organism size during mouse embryonic development. *Dev Cell* 2:553-565.
258. Southwick, F. S., E. D. Adamson, und D. L. Purich. 2000. *Shigella* actin-based motility in the presence of truncated vinculin. *Cell Motil Cytoskeleton* 45:272-278.
259. Speelman, P., I. Kabir, und M. Islam. 1984. Distribution and spread of colonic lesions in shigellosis: a colonoscopic study. *J Infect Dis* 150:899-903.
260. Steimle, P. A., J. D. Hoffert, N. B. Adey, und S. W. Craig. 1999. Polyphosphoinositides inhibit the interaction of vinculin with actin filaments. *J Biol Chem* 274:18414-18420.
261. Stevenson, G., A. Kessler, und P. R. Reeves. 1995. A plasmid-borne O-antigen chain length determinant and its relationship to other chain length determinants. *FEMS Microbiol Lett* 125:23-30.
262. Stieglitz, H., S. Fosmire, und P. Lipsky. 1989. Identification of a 2-Md plasmid from *Shigella flexneri* associated with reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 32:937-946.
263. Stieglitz, H., und P. Lipsky. 1993. Association between reactive arthritis and antecedent infection with *Shigella flexneri* carrying a 2-Md plasmid and encoding an HLA-B27 mimetic epitope. *Arthritis Rheum* 36:1387-1391.

264. Suwa, H., G. Ohshio, T. Imamura, G. Watanabe, S. Arai, M. Imamura, S. Narumiya, H. Hiai, and M. Fukumoto. 1998. Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Cancer* 77:147-152.
265. Suzuki, T., M. C. Lett, and C. Sasakawa. 1995. Extracellular transport of VirG protein in Shigella. *J Biol Chem* 270:30874-30880.
266. Suzuki, T., H. Mimuro, H. Miki, T. Takenawa, T. Sasaki, H. Nakanishi, Y. Takai, and C. Sasakawa. 2000. Rho family GTPase Cdc42 is essential for the actin-based motility of Shigella in mammalian cells. *J Exp Med* 191:1905-1920.
267. Suzuki, T., H. Mimuro, S. Suetsugu, H. Miki, T. Takenawa, and C. Sasakawa. 2002. Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) is the specific ligand for Shigella VirG among the WASP family and determines the host cell type allowing actin-based spreading. *Cell Microbiol* 4:223-233.
268. Suzuki, T., S. Saga, and C. Sasakawa. 1996. Functional analysis of Shigella VirG domains essential for interaction with vinculin and actin-based motility. *J Biol Chem* 271:21878-21885.
269. Suzuki, T., and C. Sasakawa. 1998. N-WASP is an important protein for the actin-based motility of Shigella flexneri in the infected epithelial cells. *Jpn J Med Sci Biol* 51 Suppl:S63-S68.
270. Swaddiwudhipong, W., S. Karintraratana, and S. Kavinum. 1995. A common-source outbreak of shigellosis involving a piped public water supply in northern Thai communities. *J Trop Med Hyg* 98:145-150.
271. Tafazoli, F., A. Holmstrom, A. Forsberg, and K. E. Magnusson. 2000. Apically exposed, tight junction-associated beta1-integrins allow binding and YopE-mediated perturbation of epithelial barriers by wild-type Yersinia bacteria. *Infect Immun* 68:5335-5343.
272. Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki. 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81:153-208.
273. Takaishi, K., T. Sasaki, M. Kato, W. Yamochi, S. Kuroda, T. Nakamura, M. Takeichi, and Y. Takai. 1994. Involvement of Rho p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility. *Oncogene* 9:273-279.
274. Takasaka, M., S. Honjo, K. Imaizumi, H. Ogawa, and R. Nakaya. 1969. Experimental infection with Shigella sonnei in cynomolgus monkeys (Macaca irus). *Jpn J Med Sci Biol* 22:389-393.
275. Takeuchi, A., H. Sprinz, E. H. LaBrec, and S. B. Formal. 1965. Experimental bacillary dysentery. An electron microscopic study of the response of the intestinal mucosa to bacterial invasion. *Am J Pathol* 47:1011-1044.
276. Tamano, K., E. Katayama, T. Toyotome, and C. Sasakawa. 2002. Shigella Spa32 is an essential secretory protein for functional type III secretion machinery and uniformity of its needle length. *J Bacteriol* 184:1244-1252.
277. Terajima, J., E. Moriishi, T. Kurata, and H. Watanabe. 1999. Preincubation of recombinant Ipa proteins of Shigella sonnei promotes entry of non-invasive Escherichia coli into HeLa cells. *Microb Pathog* 27:223-230.
278. Thapa, B. R., K. Ventkateswarlu, A. K. Malik, and D. Panigrahi. 1995. Shigellosis in children from north India: a clinicopathological study. *J Trop Pediatr* 41:303-307.
279. Thirumalai, K., K. S. Kim, and A. Zychlinsky. 1997. IpaB, a Shigella flexneri invasin, colocalizes with interleukin-1 beta-converting enzyme in the cytoplasm of macrophages. *Infect Immun* 65:787-793.
280. Tobe, T., S. Nagai, N. Okada, B. Adler, M. Yoshikawa, and C. Sasakawa. 1991. Temperature-regulated expression of invasion genes in Shigella flexneri is controlled through the transcriptional activation of the virB gene on the large plasmid. *Mol Microbiol* 5:887-893.
281. Tobe, T., M. Yoshikawa, T. Mizuno, and C. Sasakawa. 1993. Transcriptional control of the invasion regulatory gene virB of Shigella flexneri: activation by virF and repression by H-NS. *J Bacteriol* 175:6142-6149.
282. Toyotome, T., T. Suzuki, A. Kuwae, T. Nonaka, H. Fukuda, S. Imajoh-Ohmi, T. Toyofuku, M. Hori, and C. Sasakawa. 2001. Shigella protein IpaH(9.8) is secreted from bacteria within mammalian cells and transported to the nucleus. *J Biol Chem* 276:32071-32079.
283. Tran Van Nhie, G., A. Ben-Ze'ev, and P. J. Sansonetti. 1997. Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the Shigella IpaA invasin. *EMBO J* 16:2717-2729.

284. Tran Van Nhieu, G., E. Caron, A. Hall, and P. J. Sansonetti. 1999. IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. *EMBO J* 18:3249-3262.
285. Tran Van Nhieu, G., A. B. Serfis, J. C. Osiecki, W. L. Picking, L. Coyle, R. Davis, and W. D. Picking. 2000. Interaction of *Shigella flexneri* IpaC with model membranes correlates with effects on cultured cells. *Infect Immun* 68:3710-3715.
286. Tsukita, S., A. Nagafuchi, and S. Yonemura. 1992. Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol* 4:834-839.
287. Turner, C. E., M. C. Brown, J. A. Perrotta, M. C. Riedy, S. N. Nikolopoulos, A. R. McDonald, S. Bagrodia, S. Thomas, and P. S. Leventhal. 1999. Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol* 145:851-863.
288. Turner, C. E., and J. T. Miller. 1994. Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region. *J Cell Sci* 107 ( Pt 6):1583-1591.
289. Uchida, T., A. M. Pappenheimer, Jr, and R. Greany. 1973. Diphtheria toxin and related proteins. I. Isolation and properties of mutant proteins serologically related to diphtheria toxin. *J Biol Chem* 248:3838-3844.
290. Ueki, T., M. Mizuno, T. Uesu, T. Kiso, and T. Tsuji. 1995. Expression of ICAM-1 on M cells covering isolated lymphoid follicles of the human colon. *Acta Med Okayama* 49:145-151.
291. Van den Bosch, L., P. A. Manning, and R. Morona. 1997. Regulation of O-antigen chain length is required for *Shigella flexneri* virulence. *Mol Microbiol* 23:765-775.
292. van Golen, K. L., Z. F. Wu, X. T. Qiao, L. Bao, and S. D. Merajver. 2000. RhoC GTPase overexpression modulates induction of angiogenic factors in breast cells. *Neoplasia* 2:418-425.
293. van Golen, K. L., Z. F. Wu, X. T. Qiao, L. W. Bao, and S. D. Merajver. 2000. RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. *Cancer Res* 60:5832-5838.
294. Vasselon, T., J. Mounier, R. Hellio, and P. J. Sansonetti. 1992. Movement along actin filaments of the perijunctional area and de novo polymerization of cellular actin are required for *Shigella flexneri* colonization of epithelial Caco-2 cell monolayers. *Infect Immun* 60:1031-1040.
295. Vasselon, T., J. Mounier, M. C. Prévost, R. Hellio, and P. J. Sansonetti. 1991. Stress fiber-based movement of *Shigella flexneri* within cells. *Infect Immun* 59:1723-1732.
296. Venkatesan, M. M., and J. M. Buysse. 1990. Nucleotide sequence of invasion plasmid antigen gene ipaA from *Shigella flexneri* 5. *Nucleic Acids Res* 18:1648.
297. Venkatesan, M. M., J. M. Buysse, and D. J. Kopecko. 1988. Characterization of invasion plasmid antigen genes (ipaBCD) from *Shigella flexneri*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9317-9321.
298. Venkatesan, M. M., A. B. Hartman, J. W. Newland, V. S. Ivanova, T. L. Hale, M. McDonough, and J. Butterton. 2002. Construction, Characterization, and Animal Testing of WRSd1, a *Shigella dysenteriae* 1 Vaccine. *Infect Immun* 70:2950-2958.
299. Vore, S. J., P. D. Peele, P. A. Barrow, J. F. Bradfield, and W. H. Pryor, Jr. 2001. A prevalence survey for zoonotic enteric bacteria in a research monkey colony with specific emphasis on the occurrence of enteric *Yersinia*. *J Med Primatol* 30:20-25.
300. Wassef, J. S., D. F. Keren, and J. L. Mailloux. 1989. Role of M cells in initial antigen uptake and in ulcer formation in the rabbit intestinal loop model of shigellosis. *Infect Immun* 57:858-863.
301. Watarai, M., S. Funato, and C. Sasakawa. 1996. Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with alpha5beta1 integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. *J Exp Med* 183:991-999.
302. Watarai, M., Y. Kamata, S. Kozaki, and C. Sasakawa. 1997. rho, a small GTP-binding protein, is essential for *Shigella* invasion of epithelial cells. *J Exp Med* 185:281-292.
303. Watarai, M., T. Tobe, M. Yoshikawa, and C. Sasakawa. 1995. Contact of *Shigella* with host cells triggers release of Ipa invasins and is an essential function of invasiveness. *EMBO J* 14:2461-2470.
304. Waterman, S. R., and P. L. Small. 1996. Identification of sigma S-dependent genes associated with

- the stationary-phase acid-resistance phenotype of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 21:925-940.
305. Way, S. S., A. C. Borczuk, and M. B. Goldberg. 1999. Adaptive immune response to *Shigella flexneri* 2a *cydC* in immunocompetent mice and mice lacking immunoglobulin A. *Infect Immun* 67:2001-2004.
  306. Weed, S. A., Y. Du, and J. T. Parsons. 1998. Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1. *J Cell Sci* 111:2433-2443.
  307. Weed, S. A., A. V. Karginov, D. A. Schafer, A. M. Weaver, A. W. Kinley, J. A. Cooper, and J. T. Parsons. 2000. Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* 151:29-40.
  308. Wei, J., M. B. Goldberg, V. Burland, M. M. Venkatesan, W. Deng, G. Fournier, G. F. Mayhew, G. Plunkett, 3rd, D. J. Rose, A. Darling, B. Mau, N. T. Perna, S. M. Payne, L. J. Runyen-Janecky, S. Zhou, D. C. Schwartz, and F. R. Blattner. 2003. Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. *Infect Immun* 71:2775-2786.
  309. Weinrauch, Y., D. Drujan, S. D. Shapiro, J. Weiss, and A. Zychlinsky. 2002. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* 417:91-94.
  310. Welsh, C. F., K. Roovers, J. Villanueva, Y. Liu, M. A. Schwartz, and R. K. Assoian. 2001. Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat Cell Biol* 3:950-957.
  311. Wilde, A., S. B. Lizarraga, L. Zhang, C. Wiese, N. R. Gliksmann, C. E. Walczak, and Y. Zheng. 2001. Ran stimulates spindle assembly by altering microtubule dynamics and the balance of motor activities. *Nat Cell Biol* 3:221-227.
  312. Wilde, A., and Y. Zheng. 1999. Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science* 284:1359-1362.
  313. Williams, L. M., and A. J. Ridley. 2000. Lipopolysaccharide induces actin reorganization and tyrosine phosphorylation of Pyk2 and paxillin in monocytes and macrophages. *J Immunol* 164:2028-2036.
  314. Wolbert, J. 1983. Sexually transmitted diseases in homosexual men. *Nurse Pract* 8:35-42.
  315. Womble, D. D., and R. H. Rownd. 1988. Genetic and physical map of plasmid NR1: comparison with other IncFII antibiotic resistance plasmids. *Microbiol Rev* 52:433-451.
  316. Wu, F. M., M. P. Doyle, L. R. Beuchat, J. G. Wells, E. D. Mintz, and B. Swaminathan. 2000. Fate of *Shigella sonnei* on parsley and methods of disinfection. *J Food Prot* 63:568-572.
  317. Yabuuchi, E. 2002. *Bacillus dysentericus* (sic) 1897 was the first taxonomic rather than *Bacillus dysenteriae* 1898. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1041.
  318. Yonemura, S., and S. Tsukita. 1999. Direct involvement of ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding membrane proteins in the organization of microvilli in collaboration with activated ERM proteins. *J Cell Biol* 145:1497-1509.
  319. Zagaglia, C., M. Casalino, B. Colonna, C. Conti, A. Calconi, and M. Nicoletti. 1991. Virulence plasmids of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* integrate into a specific site on the host chromosome: integration greatly reduces expression of plasmid-carried virulence genes. *Infect Immun* 59:792-799.
  320. Zeile, W. L., D. L. Purich, and F. S. Southwick. 1996. Recognition of two classes of oligoproline sequences in profilin-mediated acceleration of actin-based *Shigella* motility. *J Cell Biol* 133:49-59.
  321. Zerial, M., and H. McBride. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:107-117.
  322. Zhang, J., W. G. King, S. Dillon, A. Hall, L. Feig, and S. E. Rittenhouse. 1993. Activation of platelet phosphatidylinositide 3-kinase requires the small GTP-binding protein Rho. *J Biol Chem* 268:22251-22254.
  323. Zhou, D., M. S. Mooseker, and J. E. Galan. 1999. An invasion-associated *Salmonella* protein modulates the actin-bundling activity of plactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10176-10181.
  324. Zychlinsky, A., M. C. Prévost, and P. J. Sansonetti. 1992. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 358:167-169.

325. Zychlinsky, A., K. Thirumalai, J. Arondel, J. R. Cantey, A. O. Aliprantis, und P. J. Sansonetti. 1996. In vivo apoptosis in *Shigella flexneri* infections. *Infect Immun* 64:5357-5365.

## Anhänge

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Arf	‘ADP-ribosylation factor’; ursprünglich als Stimulator der Cholera-toxin-vermittelten ADP-Ribosylierung von G <sub>s</sub> identifiziert
Arl	‘Arf-like protein’
bzw.	beziehungsweise
CDC42	‘cell-division-cycle protein 42’, gehört zur Rho-Proteinfamilie
CD43	Leukozyten-Marker; syn. Leukosialin
CD44	Hyaluronan-Rezeptor
EEA1	‘early endosome antigen 1’
EGFP	‘enhanced green fluorescent protein’
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
FA	Fokale Adhäsionen
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
FAK	‘focal adhesion kinase’
GAP	GTPase aktivierendes Protein; führt G-Protein in den inaktiven, GDP-gebundenen Zustand über
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	‘GTPase exchange factor’; führt G-Protein in den aktiven, GTP-gebundenen Zustand über
GTP	Guanosintriphosphat
H-NS	Histon-artige Proteinfamilie, syn. VirR
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
ICAM-2	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 2
IcsA	‘intercellular spread-associated molecule A’
IQ-Domäne	die Aminosäuren Isoleucin (I) und Glutamin (Q) in bestimmter Konfiguration enthaltende Calmodulin-Bindungsstelle
IS	Insertionselement
LPS	Lipopolysaccharid

MALT	Mukosa-assoziiertes lymphoides Gewebe
MLCK	`myosin light chain kinase´
M-Zellen	Mikrofalten- oder membranöse Zellen
NES	Kern-Exportsignal
NLS	Kern-Lokalisationssignal
NSF	`N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein´
NTF2	Kern-Transportfaktor 2
PAI	Pathogenitätsinsel
PC	Phosphatidylcholin
PH-domain	`pleckstring homology´-Domäne
pINV	220 kb großes Virulenzplasmid; kodiert für wichtige Invasine
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-Biphosphat
PKA	Protein Kinase A
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PPH	Phosphatidat Phosphohydrolase
Rab	`ras genes from rat brain´; Familie kleiner G-Proteine
Rac	`ras-related C3 botulinum toxin substrate´, gehört zur Rho-Familie; ist entgegen ursprünglicher Annahme kein Substrat für C3
Ral	`ras-related gene´; Ral-Proteine gehören zur Ras-Familie
Ran	`ras-related nuclear protein´; Familie kleiner G-Proteine mit nur einem Vertreter bei Säugetieren
Rap	`ras-related protein´; Rap-Proteine gehören zur Ras-Familie
Ras	Familie und Superfamilie kleiner G-Proteine; ursprünglich als Homologa zu Onkogenen der Harvey- (Ha-Ras) and Kirsten- (Ki-Ras) Mäusesarkomviren beschrieben
Rho	`ras homolog´; Familie kleiner G-Proteine
s.	siehe
SNARE	`soluble NSF attachment protein receptor´
SRL PAI	Pathogenitätsinsel, die für einen Multiresistenz-Phänotyp kodiert
SRP	`signal recognition particle´
syn.	synonym
u.a.	unter anderem
VASP	`vasodilator-stimulated phosphoprotein´
VirR	Synonym von H-NS
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrom-Protein

## **Danksagung**

Mein Interesse an der Medizinischen Mikrobiologie und an Pathogenitätsmechanismen bakterieller Erkrankungen wurde von Prof. Dr. W. Bredt geweckt, dem damaligen Leiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Freiburg.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. P.J. Sansonetti, Leiter der Abteilung 'Pathogénie Microbienne Moléculaire' am Institut Pasteur, Paris, dessen überragende wissenschaftliche und menschliche Qualitäten ich während meiner dreijährigen Arbeit in seinem Labor kennen und schätzen gelernt habe. Von Mitarbeitern seines Labors, insbesondere von Hélène d'Hauteville und Joelle Mounier, konnte ich zellbiologische Techniken zum Studium der Interaktion zwischen Bakterium und Wirtszelle erlernen. Monique Arpin aus der Arbeitsgruppe von Daniel Louvard (damals Institut Pasteur) danke ich für ihre Kooperation beim Studium der funktionellen Bedeutung von Plastin für den bakteriellen Invasionsmechanismus. Grundlegende Impulse und wichtige Reagenzien für das Studium kleiner GTPasen verdanke ich Prof. Dr. Patrice Boquet, dessen damaliger Mitarbeiterin am Institut Pasteur, Dr. Murielle Giry, sowie Prof. Dr. Christoph von Eichel-Streiber vom Institut für Medizinische Mikrobiologie in Mainz. Mein Dank gilt auch Raymond Hellio, Marie-Christine Prévost und Pierre Gounon vom Institut Pasteur für die in ihren Abteilungen durchgeführten Untersuchungen mittels konfokaler Laserscanning- bzw. Elektronenmikroskopie.

Prof. Dr. Martin Bähler und seiner Mitarbeiterin Dipl.-Biochem. Pirta Hilpelä danke ich für die konstruktive und instruktive Zusammenarbeit beim Studium der Rolle von Klasse IX-Myosin für die Shigellen-Invasion. Einen wichtigen Beitrag hierzu lieferte auch die Dissertationsarbeit von Christian Böwe, dem ich insbesondere für seine Geduld bei der mikroskopischen Quantifizierung des Einflusses der verschiedenen Proteinmutanten auf die Invasionseffizienz danke.

Die hier nur summarisch dargestellten Experimente zum Phospholipid-Metabolismus während der Shigellen-Invasion wurden in Kooperation mit Dr. Bernard Payrastre, Dr. Michel Record (beide INSERM U326, Toulouse) und Dr. Manfred Rohde (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig) durchgeführt; einen Teil dieser Resultate verdanke ich der Promotionsarbeit von cand. med. Elmira Far.

Die Studien zur Prävalenz und zur Heterogenität von pHS-2-Plasmiden wurden durch eine Kooperation mit Prof. Dr. Jochen Sieper (Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin) initiiert und durch die Überlassung von Shigella-Stämmen durch Prof. Dr. Helmut Tschäpe (Robert-Koch Institut, Standort Wernigerode) sowie durch Prof. Dr. Jochen Bockemühl (Institut für Hygiene und Umwelt-Medizin, Hamburg) ermöglicht und von Dr. Roland Siewerdt, AiP Indre Offermann und cand. med. Jörg Lang mit ihren

zielstrebig durchgeführten Promotionsarbeiten wesentlich vorangetrieben.

Die Charakterisierung des Rekrutierungsmoduls von Rho konnte nur gelingen durch das Engagement und den Enthusiasmus mehrerer Generationen von Promovenden. Dr. Birgit Bohm erzeugte und untersuchte die wichtigsten Basis-Konstrukte von Rho, Dr. Thomas Haustein erweiterte die Studie um eine neue Rho-Isoform und stellte die dreidimensionale intrazelluläre Verteilung dieser Fusionsproteine dar. AiP Veronika Gohlke und cand. med. päd. Anke Friedrich verfeinerten die Analyse auf der Ebene einzelner Aminosäuren.

Allen Doktoranden danke ich für ihr Engagement, ihre Hilfsbereitschaft, ihren Mut, ihre Ausdauer und für ihren jeweils ganz spezifischen Beitrag nicht nur zum Gelingen der Projekte sondern auch zu einem angenehm motivierenden und freundschaftlichen Arbeitsklima im Labor. Von unschätzbarem Wert war mir die Hilfe von Frau Anke Friedrich, die das Labor als frisch examinierte MTA mit großer Energie, Intelligenz und Effizienz aufbaute, ihm auch während der Zeit ihres Studiums der Medizinpädagogik immer eng verbunden blieb und derzeit im Rahmen ihrer Diplomarbeit die quantitative Bedeutung einzelner Aminosäuren des Rho-Moduls für das Rekrutierungsverhalten untersucht. Sie war in mannigfacher Weise an den Projekten des Labors beteiligt und trug mit ihrem gewinnenden und positiven Wesen ganz erheblich dazu bei, dass mir und Anderen die gemeinsame Arbeit im Labor viel Freude bereitete.

Das Zustandekommen der Arbeit ist ohne die Ausdauer, Motivation und Mitarbeit meiner lieben Frau Barbara Graf nicht denkbar. Obwohl sie als Leiterin des mykologischen Labors unseres Instituts mit diagnostischen und Forschungsaufgaben stark absorbiert war, arbeitete sie an diversen Projekten in meinem Labor eigenverantwortlich mit. Für ihre kontinuierliche Unterstützung, ihre Geduld und ihr Verständnis danke ich ihr von ganzem Herzen.

Prof. Dr. Dr. Ulf B. Göbel, dem Leiter unseres Instituts, bin ich schon seit gemeinsamer Freiburger Zeit verbunden, wo ich mich in seinem Labor durch das Studium von 16S rDNA-Genen schon früh mit der molekularen Basis moderner Bakterien-Taxonomie vertraut machen und grundlegende und für die weiteren Arbeiten wesentliche molekularbiologische Techniken erlernen konnte. Später ermöglichte er mir den Wechsel in das Labor von Prof. Sansonetti und begleitete meine Arbeiten jederzeit mit großem Interesse, anregenden Diskussionen, geduldig und mit konstruktiver Kritik. Sein fundiertes Urteil war mir auch aufgrund seiner über die Wissenschaft hinausreichenden Interessen stets besonders wichtig.

## Eidesstattliche Versicherung

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, daß

keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,

weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;

die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,

mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 9.9.2003

.....

Unterschrift